



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA

**Pruebas de Eficacia del Propionato de Amonio y
Propionato de Calcio como Inhibidores del Creci-
miento de Aspergillus Flavus y de la Producción de
su Aflatoxina B1 en Alimento Concentrado para Cerdo**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

ALEJANDRA GUTIERREZ QUINTERO

Asesor: M V Z René Rosiles Martínez

MEXICO, D. F.

JUNIO 1982



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

INDICE

	PAGINA
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	4
3. OBJETIVO	42
4. MATERIAL Y METODO	43
5. RESULTADOS	47
6. DISCUSION	71
7. BIBLIOGRAFIA	76

PRUEBAS DE EFICACIA DEL PROPIONATO DE AMONIO Y PROPIONATO DE CALCIO COMO INHIBIDORES DEL CRECIMIENTO DE ASPERGILLUS FLAVUS Y DE LA PRODUCCION DE SU AFLATOXINA B₁ EN EL ALIMENTO CONCENTRADO PARA CERDO.

RESUMEN

Con el objeto de evaluar la eficacia del Acido propiónico como inhibidor del crecimiento de Aspergillus flavus y la producción de su aflatoxina B₁ en el alimento, se usaron dos de sus sales; Propionato de amonio y Propionato de calcio. Realizándose el experimento en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, inoculándose Aspergillus flavus en el alimento concentrado para cerdo.

Los cambios macroscópicos que se observaban en el alimento, fueron primeramente, la aparición de grumos, la formación de agua y la aparición del hongo; después, la apariencia algodonosa y al final la consistencia pastosa del alimento.

El alimento se incubo a combinaciones de temperatura (Temperatura Ambiente, 30 y 40°C) con diferentes porcentajes de humedad (13, 15 y 17%). Teniendo un recipiente control y otro experimental. El experimento duró cuarenta y tres días en el caso del Propionato de calcio y treinta y uno en el caso del Propionato de amonio. Detectándose como máximo 1,6 ppm. de aflatoxina B₁ por cromatografía de capa fina en el alimento que estaba como No tratado a 40°C con 17% de humedad a los 43 días.

ALEJANDRA GUTIÉRREZ QUINTERO

ASESOR; MVZ. RENE ROBILOS MARTINEZ

Para que el A. flavus pueda desarrollarse dependerá de varios factores, siendo los más importantes la humedad y la temperatura.

En el caso de los incubados a Temperatura Ambiente el orden de crecimiento del hongo fue de 17, 15 y 13% de humedad tanto en los no tratados como en los tratados con Propionato de amonio, ya que los de Propionato de calcio se inhibió el crecimiento en 13 y 15% de humedad, y en donde si hubo crecimiento, éste fue lento comparándolo con el Propionato de amonio.

En los recipientes incubados a 30°C el orden de crecimiento fue en los no tratados como en los tratados de 17, 15 y 13% de humedad. Siendo el crecimiento más lento con los tratados con Propionato de calcio en el caso de los de 13 y 15 ya que en el recipiente de 17% de humedad fue más rápido comparándolo con Propionato de amonio.

En el incubado a 40°C en el primer experimento (Propionato de amonio) el desarrollo fue de 17, 15 y 13% de humedad y en el segundo (Propionato de calcio) el orden de crecimiento es igual que en el primero con la diferencia que en 13% no hubo desarrollo. En los tratados se inhibió el crecimiento en los tres porcentajes de humedad,

A pesar de que hubo crecimiento del A. Flavus en los recipientes tratados en el momento en que se hizo el análisis para aflatoxina - B₁ esta nunca se llegó a detectar.

En base a los resultados se apreció que el A. flavus creció más rápidamente en 17% de humedad, por lo cual se concluye que a mayor humedad habrá mayor crecimiento, pero éste también estará determinado por la temperatura.

Comparando las sales del Acido propiónico para determinar -- cual es más efectiva resultaron ambas tener el mismo grado de inhibición para la producción de aflatoxinas. Para el crecimiento del A. flavus resultó el Propionato de calcio ser más potente para inhibirlo y en los casos en que éste se desarrolló fue más lento su crecimiento -- comparándolo con Propionato de amonio.

INTRODUCCION

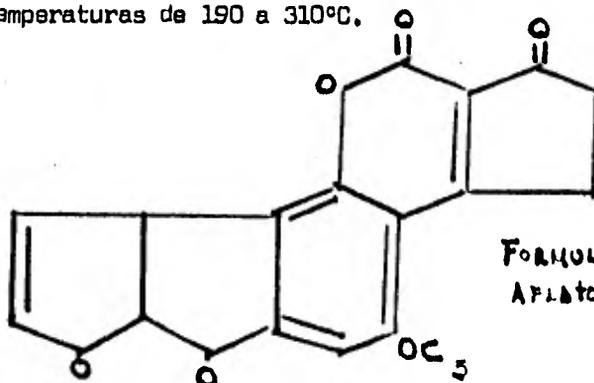
Las aflatoxinas son un grupo de compuestos hepatotóxicos, carcinogénicos y teratógenos, producidos por algunos hongos de los géneros Aspergillus y Penicillium, cuando crecen en circunstancias adecuadas.

El Aspergillus flavus requiere para su crecimiento y esporulación 80% de humedad relativa, 16% de humedad absoluta así como una temperatura de 18 a 38°C en el sustrato, aunque tolera de 4 a 6°C como mínimo y un máximo de 44 a 46°C. Como son aeróbicos en un ambiente de más de 20% de CO₂ se inhibe su crecimiento y reproducción. (27).

El hecho de que requiera una alta humedad relativa en el aire, hace que en zonas del país sea más frecuente que en otras como sería en las zonas tropicales donde se encuentra notablemente mucho más productos infectados con Aspergillus que en las zonas templadas. En estas zonas el Aspergillus flavus y la aflatoxina son menos frecuentes que en las regiones tropicales y subtropicales. (1,3,24)

La principal aflatoxina que produce el Aspergillus flavus es la B₁ siendo la más tóxica del grupo y encontrándose comúnmente como un contaminante de los alimentos. Su fórmula empírica es C₁₇H₁₂O₆. Dicho compuesto está formado por lo menos por cuatro derivados difurano coumarina, siendo esta la razón por la cual la aflatoxina B₁ y sus derivados producen fluorescencia azul (B), y los de la B₁ verde azulada (G) bajo la luz ultravioleta (40).

El peso molecular de la aflatoxina es de 312 a 350 y se descompone a temperaturas de 190 a 310°C.



FORMULA DE LA
AFLATOXINA B₁

La presencia de anillos lactónico en su estructura les confiere una alta sensibilidad a la luz, aire, ácidos, y sicalis débiles, - por lo que fácilmente pueden descomponerse en productos secundarios - (aflatoxina M₁, M₂, B₂, G₂), también tóxicos haciendo éstos más difícil la identificación de la aflatoxina B₁.

Los hongos al igual que las bacterias están ampliamente distribuidos en la naturaleza, especialmente en el suelo donde pueden sintetizar la toxina al pasar el alimento o materia prima como es en el caso de los Fusarios, Alternarios y Aspergillus; otros microorganismos necesitan ser ingeridos por el animal para poder producir sus toxinas como es el caso de la Salmonela y Candida spp., produciendo en ambos casos alteraciones en el animal (10,16,40,47).

En la actualidad se conocen 16 toxinas fungosas de elevada toxicidad, 19 de media toxicidad y 16 de baja toxicidad. Entre los productores de toxinas figuran especies de Aspergillus, de Fusarium y de Alternaria. Los animales más jóvenes son lo más susceptibles. (10,16)

Los granos contaminados pueden sufrir disminución en la germinación decoloración ya sea del germen o del embrión de la semilla. —
(27)

El Aspergillus flavus se ha podido identificar en todos los cereales así como en el maíz que por su época tardía de recolección y el a menudo insuficiente secado se halla especialmente expuesto al — ataque de los hongos. También se encuentra el cacahuete en todas sus presentaciones siendo en estado molido donde se ha encontrado más frecuentemente. Parece ser que el tipo de cultivo y su composición ofrecen muy buenas posibilidades de desarrollo del Aspergillus flavus.

Las espigas se infectan por medio de las esporas que se encuentran en el aire. Así como la harina de pescado y tapioca por el tipo de transporte que es muy poco higiénico al llegar a la fábrica de piensos éste se encuentra con gran cantidad de gérmenes y toxinas.

Los piensos tienden a agrumarse en los silos por la gran proliferación de microorganismos sobre todo en la época de calor. Estos grupos provocan un mal dealizamiento del alimento al salir del silo — ya que los microorganismos desprenden agua y al aumentar la humedad — aumenta el calor permitiendo su multiplicación y con un aspecto enmohecido, flemoso, sucio y mal oliente. Los piensos en estas condiciones provocan que los animales lo coman con desagrado y haya pérdida — de peso por la deficiente energía. (1,6,16,19,24,27).

En Inglaterra en el año de 1960, se informó la muerte de — 100 000 pavos, a causa de un trastorno desconocido, el cual fue llamado "Enfermedad X de los pavos" se determinó que el agente tóxico estaba en el cacahuete brasileño. El responsable de esto fue un hongo —

identificado como Aspergillus flavus y a su toxina llamada aflatoxi—
na.

En un principio se pensó que solamente dos especies de hongos del género Aspergillus eran capaces de producir aflatoxinas, el Aspergillus flavus y el Aspergillus parasiticus. Sin embargo se ha demostrado que otras especies de hongos también pueden sintetizar aflatoxi—
nas, como se ilustra en el siguiente cuadro.

HONGOS PRODUCTORES DE AFLATOXINA

IN VITRO

Hongo	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
Grupo <u>Aspergillus flavus</u>				
A. flavus	X	X	X	X
A. flavus var. columnaris		X		X
A. oryzae	X	X		
A. parasiticus	X	X	X	X
A. parasiticus var. globosus	X	X	X	X
Otras especies de los géneros <u>Aspergillus</u> , <u>Penicillium</u> y <u>Rhizopus</u> :				
A. niger	X			
A. wentii	X			
A. ruber	X			
A. ostianus	X			
A. ochraceus	X		X	X
Penicillium puberulum	X	X	X	

P. variable	X	X	
P. frequentans	X		
P. citrinum	X		
Rhizopus spp	X	X	X

(47)

Una serie de factores influyen en la formación de aflatoxinas entre los que se encuentran, temperatura del aire (caliente), humedad (cuando ésta está arriba de 12.5% no son estables los piensos al almacenamiento), tiempo de cultivo, altura del producto almacenado, contenido de agua del ambiente y radiaciones de cobalto, (4,5,15,27).

Entre los medios de cultivo que existen para producir la aflatoxina esta la asparagina, en el cual se han producido hasta 30 mg de toxina por 100 ml de medio. En México, Osorio al experimentar con varios medios de cultivo, hizo saber que la máxima producción del compuesto fue lograda en un medio de fitona a las 168 horas de incubación y con agitación constante.

Además de las aflatoxinas mencionadas hay otros metabolitos aislados de la leche de vaca producidos por el género *Aspergillus*, como son la M_1 y M_2 que son la 4-hidroxi-aflatoxina B_1 y la 4-hidroxi-aflatoxina B_2 respectivamente. Las aflatoxinas G_{2a} y G_{2b} , poco tóxicas para patos recién nacidos, son derivados de la 2-hidroxi de aflatoxina B_2 y G_2 .

Siendo la aflatoxina B_1 la más peligrosa con una dosis letal 50% de 7mg/Kg para ratas por vía oral y la más carcinogénica, Cuando-

se ha administrado más de 0.3% se ha encontrado en la leche a las pocas horas de haberse ingerido. (1,24,47)

La aflatoxina B₁ por su poder tóxico en numerosos países como Estados Unidos de América, Alemania, Inglaterra, se ha fijado el contenido máximo admisible en alimento. Por lo general oscilan estos límites entre 0.05 y 0.1 ppm. (4).

Contenido de Aflatoxinas

En los Piensos

Contenido de aflatoxina		Porcentaje
0 - 0,05 ppm	nada - bajo	5,9%
0,05- 0,25 ppm	medio	38,2%
0,25-1,00	elevado	41,2%
más de 1,00	muy elevado	44,7%

(1)

Cuando las aflatoxinas son administradas a los animales el compuesto puro o sus derivados aparecen en la orina, en las heces y en la leche.

Se ha demostrado que las aflatoxinas se difunden por todos los tejidos corporales, indicando rápida absorción, pero lenta eliminación. En el hígado, riñones y médula ósea la aflatoxina se concentra más en el encéfalo, músculo y grasa corporal. (1,24,28,31,47).

Al eliminarse la aflatoxina por las heces es lógico pensar — que el intestino delgado tenga alta concentración, debido a la constante eliminación del compuesto o de sus metabolitos por la bilis. Es tos resultados demostraron que todos los componentes del huevo y partes comestibles de la canal, contenían diferentes concentraciones de aflatoxina . (47)

Es bien sabido que las aflatoxinas influyen sobre la síntesis de las proteínas, ya que a bajas concentraciones de B_1 , B_2 , C_2 , y G_1 inhibían la incorporación de C - leucina a la proteína. La aflatoxina B_1 causa serias alteraciones en la síntesis proteica y de ácidos nucleicos en el hígado, cuando son administradas a ratas en dosis elevadas. La inhibición de la síntesis de ADN, ARN nuclear y alteraciones de la transcripción genética, aparecen inmediatamente después de que el compuesto es administrado.

Estudios realizados sobre el sitio de acción de las aflatoxinas en la célula animal, indican que a los 15 minutos ya hay inhibición del aprovechamiento de la leucina en la proteína y que aproximadamente en una hora se produce inhibición de la síntesis proteica in vitro midiéndola a través de la incorporación del ácido orótico en el ARN. Esto pone en evidencia que la aflatoxina B_1 no inhibe directamente la entrada de aminoácidos a la proteína, sino que hay una marcada inhibición en la colocación de los nucleótidos precursores en el ARN nuclear. Los resultados señalaron que hubo inhibición de la ARN polimerasa, la única enzima que actúa entre estos dos estudios; por ello se sugiere la siguiente secuencia;

1) La aflatoxina, después de penetrar en la célula hepática, es intry

duce en el núcleo.

- 2) Se une con el ADN y, de este modo, inhibe la ARN polimerasa.
- 3) Reduce la síntesis de ARN involucrando la inhibición del ARN mensajero.

La inhibición del ARN mensajero se refleja después de 15 minutos - con la reducción de la síntesis protéica.

La reducción constante en la síntesis del ARN mensajero causa pérdida en la granulación del retículo endoplásmico.

El primer efecto de la aflatoxina en un sistema biológico es la supresión de la síntesis de ADN y de la mitosis. Este efecto es detectable pocas horas después de la exposición de las células a la - - aflatoxina. La inhibición de toda división y síntesis de ADN, lleva a la célula a una etapa de disminución en la actividad mitótica para sobrevivir, lo cual puede ser cuantificado después de 48 horas de exposición a la toxina. La producción anormal de células gigantes parece ser del tipo no sincicial y se asocia con la mitosis impedida en la - metafase. La supresión de la mitosis, la inhibición de la síntesis de ADN, la formación de células gigantes e inducción de bacteriófagos en bacterias lisogénicas, indican que las aflatoxinas afectan el sistema biológico de una manera similar a los agentes alquilantes. Los que - son conocidos como inducto es de mutagenicidad, carcinogenicidad y an tinaoplásicos. (47).

El orden de sensibilidad de las especies animales a las aflatoxinas de mayor a menor grado es como sigue; trucha, y patos (entre todos los animales útiles estos son los más sensibles a las aflatoxinas). Para las aves el orden de sensibilidad es; Patos, Pavos, Ganso,

Faisán, Gallinas y por último la Codorniz, y para los mamíferos; lechón, cerda de cría, ternero, cerdo de engorda, bovino y ovino; los animales más jóvenes son siempre los más susceptibles. (1,47).

En los animales jóvenes los signos clínicos son: diarrea, disminución del apetito o de la absorción de los alimentos, acompañado de un menor aumento de peso y muerte. Como signo característico está el opistótonos cefálico en las aves viejas y la hepatitis en las cerdas. En terneros hay movimientos circulares, trinar de dientes y ceguera y en el ganado bovino viejo se produce generalmente una disminución en el rendimiento. Los signos clínicos van acompañados por diversas lesiones hepáticas como son necrosis, hemorragias. Las aflatoxinas pueden tener también efectos carcinogénicos en el hígado. En aves baja la producción de huevos que se debe a que la síntesis y el transporte de los precursores de la yema están reducidos en el hígado. Las aflatoxinas causan lesión hepática, misma que se refleja en perjuicio del transporte lipídico, depresión de la síntesis de ácidos grasos y de la síntesis proteica. Esta difusión en el hígado provoca un aumento de lípidos plasmáticos producidos en el hígado, que son precursores de los lípidos y proteínas del vitelo. La producción de huevo no baja tan rápidamente como los lípidos y proteínas plasmáticas y la ponedora aparentemente compensa esta baja produciendo huevos y vitelos pequeños. (1,161,24,47).

Se han llevado a cabo experimentos para estudiar la respuesta que inducen las aflatoxinas sobre los gallos reproductores concluyendo que había diferente respuesta de acuerdo con la edad. Por otro lado, también se sabe que las aflatoxinas no tienen efecto significati-

vo en las características del semen de gallos. (47).

Cuando se suministró a gallinas ponedoras dosis de 1834 ppb. de aflatoxina ningún huevo fue incubable, debido a la mortalidad embrionaria en los seis primeros días de incubación.

En gallinas con 1,5 ppm de aflatoxinas, el hígado aumentó de tamaño y presentó consistencia blanda, color rojo, grisáceo y hemorragias petequiales subcapsulares. También se observaron pequeños puntos blancos difusos, del tamaño de la cabeza de un alfiler, disminución del crecimiento corporal, aumento de tamaño del hígado, bazo, páncreas y atrofia de la bolsa de Fabricio. Los cambios microscópicos son degeneración de las células hepáticas con vacuolización citoplásmica y grados variables de hiperplasia de los conductos biliares. Examinando corazón, páncreas e hígado, el órgano más dañado es el hígado, notando cambios degenerativos en células individuales del parénquima y en la organización del tejido. El páncreas tuvo pequeños cambios y es un buen órgano para la observación de cambios iniciales a nivel ultra estructural. La prioridad de los cambios tempranos en el núcleo sobre los cambios citoplasmáticos fue clara en este órgano, y sólo las mitocondrias del corazón sufrieron cambios notables. (1,47). Thornton (23), comprobó que en barregos causa eczema pulmonar.

Toxinas importantes del Aspergillus flavus

su toxicidad y signos de enfermedad en los animales

A. flavus	Aflatoxina B ₁	0,36mg/Kg oral	Necrosis de
		pato	hígado, diarrea.

Aflatoxina G ₁	5.5mg/Kg oral	Carcinomas roturas -
	rata	de venas con hemorra-
		gias.
	0.78mg/Kg oral	
	pato	
Acido aspergi-	150mg/Kg	Mareos vómitos
línico	ratón	muerte

(1,4)

Las aflatoxinas al ser suministradas afectan el Sistema Retículo Endotelial donde hay alteraciones en el sistema inmunocoparente y el metabolismo de lípidos. En conejos intoxicados con aflatoxinas se estableció que los macrófagos tenían una reducida actividad fagocitaria; además que durante la aflatoxicosis, las enzimas lisosomales tiene una actividad aumentada. Ya se ha verificado la producción de anticuerpos contra la Ocratoxina "A" en conejos; asimismo se ha asociado la presencia de aflatoxina B₁ albuminas sericas bovinas, obteniéndose anticuerpos contra la toxina. En un estudio realizado con aves aclimatadas al frío se notó que desarrollaban resistencia inespecifica contra la aflatoxicosis y que podría ser a nivel hormonal, metabólico o de enzimas microsomales.

Entre los métodos usados contra el desarrollo del Aspergillus flavus se encuentran;

Secado de los productos a un nivel de humedad tan bajo que limita las posibilidades de vida de los microorganismos. Sin embargo el número de géminas no se reduce sensiblemente por el secado de productos. Productos químicos como es el Propionato de Amonio y Propionato-

de Calcio al igual que otros como es el Acido Acético, Sórbito, Acidos Grasos, Cristal Violeta, también son buenos inhibidores del crecimiento de hongos.

En el caso del salvado de algodón o cascarilla en Estados Unidos se trata a este durante 30 minutos con una presión de 3 a 3,5 atmósferas y una temperatura de 90 a 120°C. De esta manera se destruye más del 99% de aflatoxinas. Otros métodos son; iluminación con luz solar, almacenaje hermético, prolongada exposición a rayos ultravioleta, bajas temperaturas de 1.6-5.5°C, al igual que la hidratación entre otros. (3,8).

La acción biocida y biostática del Acido Propiónico se basa principalmente en su entrada en la metabolización de los hidratos de Carbono por las células del organismo. Diversas enzimas quedan bloqueadas y la transformación natural de la energía se inhibe y debido a esto las células mueren. En la práctica la aplicación del Acido Propiónico su efecto se observa por la reducción del número de gérmenes presentes en los piensos que se han reducido (notablemente al tratar éstos de esta forma) (3,15).

No se conoce nada de infecciones de resistencia por el uso del Acido Propiónico. (3)

El Acido Propiónico influye en la formación de CO_2 en alimentos para animales, siendo un parámetro indirecto para medir la actividad de los microorganismos.

El espectro de acción del Acido Propiónico dependerá del equi

valente de ácido. Para que la acción se desarrolle es preciso que se produzca una hidrólisis, es decir, la separación del Calcio y del Anión del Acido Propiónico. Esta separación tiene lugar en presencia de agua (5)

Al igual que sucede con todos los productos de conservación, la acción de Acido Propiónico y del Propionato de Calcio, depende hasta cierto punto, del pH que tenga el producto a conservar.

El ácido sin disociar es activo. Cuanto más bajo es el pH tanto mayor es la parte de ácido sin disociar.

Los forrajes simples y compuestos presentan un pH que oscila de 5.5 a 6.5. Este margen es favorable para la eficacia del Acido Propiónico tal como muestran los datos relativos al valor de inhibición mínimo frente a las bacterias. También se pueden obtener buenos resultados con dosis bajas a un pH de 7.0 a 7.2 al igual que el contenido de agua del forraje, número de microorganismos y tipo de los mismos.

Especificación del Acido Propiónico:

Especificación

Fórmula Química	$\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{COOH}$
Peso molecular	74.08
Color	Incoloro
Olor	Penetrante
Sabor	Acido

El Acido Propiónico se puede mezclar con agua y es soluble en Eter, Alcohol y Cloroformo. Se puede determinar por titulación pero - preferentemente por medio de Cromatografía de Gases.

El Acido Propiónico se encuentra también en la naturaleza se produce por ej. en determinadas fermentaciones de hongos. (3)

Para el depósito del Acido Propionico puro sólo se usaran materiales a prueba de corrosión, como acero especial o aluminio puro.

La sustancia más activa del Acido Propiónico es la Sal de Am₄ nio o Propionato de amonio que goza de las propiedades siguientes; amplio espectro, se encuentra muy extendido en la naturaleza, no es corrosivo, actua con seguridad bajo condiciones difíciles, no debe de entrar en contacto con materiales que no son suficientemente estables (Hierro galvanizado, Cobre y Latón). Para el almacenamiento de Propionato de amonio todos los materiales plásticos probados son adecuados, (4).

El Propionato de Amonio tiene un contenido energético (en sustancias nutritivas completas) de aproximadamente 840Kcal/Kg y un contenido proteico (equivalente de proteínas crudas), de 514 g/Kg. Esta sal tiene una viscosidad claramente más alta que el Acido Propiónico-puro o que el agua; fluye entonces más lentamente en 20 a 25%. Esta viscosidad del Propionato de Amonio tiene que ser considerada para su circulación, que esta graduado para Acido Propiónico o para agua, toxicológicamente es inocuo.

Especificaciones
del Propionato de Amonio

Fórmula Química	$\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{COO NH}_4$
Valor de pH	6,7 - 6,8
Punto de inflamación (Según DIN 51758)	No inflamable
Autoincendio	No se enciende por sí mismo
Peligro al incendio	No es producto inflamable
Presión de vapor	a 20°C - 13 milibar, a 50°C - 71 milibar
Punto de ebullición	110°C
Punto de solidificación	- 30°C
Viscosidad	23,4 m Pa . s (DIN 51562)
Higroscopicidad	No es higroscopico
Apariencia	Claro como el agua
Olor	Débil aromático - amoniacal
Mezclable	En cualquier proporción con agua
Densidad	1,07
Toxicidad	Dosis letal DL ₅₀ aproximada mente 3,500 mg/Kg rata oral
Valor energético	Por Kg de Propionato de Am _o nio
Contenido Bruto de energía	4,867 cal/g
Unidades de fécula /bovino	1,200 u,d,f.
Bustancias nutritivas en total/ cerdo	1,200 s,n,t.

Energía transformable/aves de

corral

4,949 Kcal U.E.

(32)

Un Kg. de Propionato de Amonio tiene el siguiente valor nutricional.

Aves

3,600 Kcal. Energía metaboli-
zable

Cerdo

840 TND

3,893 Kcal. Energía Digesti-
ble

3,600 Kcal. Energía metaboli-
zable

Bovino

840 TND

(10)

El Propionato de Amonio tiene 840% TND un mayor contenido energético que un pienso normal. Del contenido en Nitrógeno se calculó una equivalencia en proteína bruta de 81.4% (15)

El Propionato de Amonio es menos corrosivo que el agua potable normal. La adición de amoníaco neutraliza el Acido Propiónico de forma que deja de ser corrosivo. Otro inhibidor de corrosión reduce el punto de congelación a -6.4°C .

El Propionato de Calcio (Sal Calcica del Acido Propiónico), está compuesto por un 75% de Propionato, un 20% de Calcio y 5% de agua, referido a sustancia seca. Su densidad es de 0.4 Kg/l. Puede causar ligera irritación en las mucosas, no irrita la piel. (3,5).

El Propionato de Calcio es higroscópico en contacto con el — aire. Entre la humedad relativa y el aire la absorción de humedad del Propionato de Calcio existe el equilibrio que se describe seguidamente. (3)

Humedad Relativa del aire 20°C	Contenido de agua (Correspondencia) del Propionato de Calcio.
50%	6%
60	7.5
70	9
80	10.5
93	12

Existiendo una Humedad Relativa del aire superior al 90% y un contenido en agua del Propionato de Calcio superior al 10.5% el producto forma grumos al cabo de cierto tiempo.

No es tóxico en lo que respecta a la metabolización. En ratas la DL₅₀ es de 3.6 mg/Kg. No hay signos característicos de toxicidad.-(3).

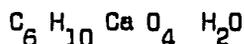
Especificaciones del Propionato de Calcio

Sustancia activa

Propionato de Calcio (claridad —
para forraje) mínimo 94%

Fórmula Química

$(\text{CH}_3 - \text{CH}_2 \text{ CO})_2 \text{ Ca} - \text{H}_2\text{O}$



Peso Molecular	204,23
Análisis	94% de Propionato de Calcio 6% de Agua
Contenido	75% de Acido Propiónico 20% de Calcio
Descripción	Polvo fino, casi blanco y casi inodoro
Densidad aparente	Aproximadamente 0,4 Kg/l
Densidad	1.25g/Kg .

(3,15)

El Acido Propiónico ha reducido y restringido en forma duradera la flora de hongos tanto en el caso de poca humedad como también - existiendo una humedad elevada. (32)

Hay que hacer constar que el Acido Propiónico no inactiva las toxinas ya existentes, pero si evita la proliferación de hongos, fermentos y bacterias así también protege del enmohecimiento y de todas sus secuelas negativas. (1,2).

Entre los ácidos orgánicos los Acidos grasos con uno hasta 14 átomos de Carbono son productos de ensilado eficaces contra la formación de moho. El Acido Propiónico y los Propionatos tienen una especial importancia a este respecto, porque desarrollan una acusada acción contra las levaduras causantes de la fermentación posterior. Frenan el empobrecimiento del lactato en las levaduras y con ello se re-

ducen notablemente el peligro de formación de hongos.

Otras acciones que tiene sobre el alimento son las siguientes: El valor fisiológico alimenticio del salvado de algodón tratado con Acido Propiónico no se perjudica aparentemente excepto los dos aminoácidos lisina y metionina. Después del tratamiento se determinó un contenido de 1.61% de lisina y 0.65% de metionina en un salvado de algodón con 46% de proteína pura lo cual indica una infima reducción. Hay una conservación del pienso sin destrucción de nutrientes ni formación de micotoxinas, elevándose el valor nutritivo y la digestibilidad del pienso y mejorando la calidad microbiológica. (1,32).

Con respecto a la estabilidad de sustancias activas en una premezcla vitamínica - mineral después de un período de 4 meses de almacenamiento la disminución de sustancias activas tratadas con Acido Propiónico no eran más grandes que los controles, solamente el contenido de antibiótico pareció haber disminuido en las muestras tratadas con Acido Propiónico pero debe de considerarse el límite de error analítico ± 30 . (4,5,16,32).

Cuando se ve aumentado el contenido de agua en los piensos compuestos por haberse utilizado melaza la cual aumenta la humedad al límite crítico debido a la aportación de agua pudiéndose provocar fermentación no deseada. Con el Acido Propiónico se estabiliza al igual que se reduce su viscosidad en 26 partes de Acido Propiónico y 75 partes de melaza. No influye negativamente en el contenido de Nitrógeno y el valor nutritivo del alimento. (4,32).

La formación de ácidos grasos libres, representa en varios ali

mentos para animales un problema, causando entre otros el la reducción de antioxidantes (4).

En productos examinados (coco, maíz y cebada), se disminuyó la formación de ácidos grasos libres debido a la adición de Acido Propiónico. La reducción en comparación con controles no tratados llegó en cebada solamente a aproximadamente 20% pero se elevó en maíz y coco a 40%. (4).

Estos valores son de mucha importancia más en vista de que las partes de control eran menos húmedas que las partes sometidas al efecto del Acido Propiónico y por consiguiente menos expuestas al peligro de la oxidación que las últimas. Este compuesto impide el calentamiento del pienso, conserva el deslizamiento del alimento, no hay separación de componentes, la carga y el secado se efectúa con mayor rapidez. Todo dependerá de la empresa, la estación del año y la clase de pienso. En los piensos tratados con Acido Propiónico en comparación a uno sin tratar, aparecieron los primeros grumos a partir del decimo octavo día. Transcurridos 20 días aparecieron los primeros signos de enmohecimiento mientras que el de sin tratar aumento la temperatura a los 6 días alcanzando su máxima a los 8. A los 7 días se observó enmohecimiento a los diez estaba alterado completamente, ambos estaban a 24°C. Por consiguiente a mayor humedad menor tiempo de conservación teniendo que aumentar el porcentaje de Acido Propiónico, -- (4,5).

El efecto antimicrobiano del Acido Propiónico hace posible estabilizar el almacenaje de granos húmedos recién cosechados sin secado, ni aireación o enfriamiento durante semanas, meses e incluso --

años. La humedad del grano no tiene importancia alguna si se tiene en cuenta que la cantidad de Acido Propiónico a emplear ha de elevarse - cuanto mayor sea la humedad. Puede prescindirse del secado del cereal con una humedad del 20%. (15).

Cristensen (1973) reportó que la adición de un porcentaje de Acido Acético - Acido Propiónico (60 - 40%) inmediatamente después de la cosecha permite la aparición de crecimiento de hongos en maíz con alta humedad. En el alimento de cerdos y aves se obtuvo el mismo resultado (20).

El Acido Propiónico permite la preservación de harina de maíz (68 y 64% de Materia Seca), para un período de 9 meses con solamente pequeñas pérdidas (21).

Al usar Acido Propiónico hay menos pérdidas de Materia Seca, No hay baja de Carbohidratos (siempre hay una baja de 0.005 con los otros tratamientos), No hay pérdida de Nitrógeno. (29).

Cuando el Acido Propiónico ha sido usado para el tratamiento del alimento se observó que éste, es mucho más efectivo cuando el alimento ha sido molido, es mucho más efectivo que cuando se ha usado - - otro método (rodillo, secado al aire etc.),

Dentro de los alimentos en que se ha usado el Acido Propiónico están; Soja triturada, harina de cacahuate, expeller de coco, habas, maíz en grano para piensos, trigo, cebada, cereales para piensos, alfalfa, ensilado de maíz, maíz húmedo, ensilaje de piensos verdes y maíz, patatas vaporizadas y ensiladas, ensilaje de bolsas pre-

sada, guizantes para pienso, remolacha azucarera, melaza etc..

El hecho de que el Acido Propiónico durante el metabolismo normal se forme y sea un factor esencial de la fermentación en el estómago, demuestra su elevada compatibilidad. El Acido Propiónico pertenece a las sustancias llamadas glucoplásticas, es decir sirve para formar glucosa de la sangre (gluconeogénesis) (4).

El Acido Propiónico se encuentra entre los proctos fisiológicos del metabolismo de los mamíferos y se desintegra muy rápidamente por oxidación. El Propionato es reabsorbido en el Intestino Delgado y eventualmente en el Estómago, en forma prácticamente íntegra sin que se modifique la estructura. Después de la resorción la mayor parte del Propionato queda retenido en el hígado para intervenir en la gluconeogénesis.

Como es sabido, la glucosa es necesaria para mantener las funciones nerviosas y cerebrales, para los eritrocitos, para la musculatura accionada por anaerobiosis para el desarrollo del feto, para la formación lactosa para los mucopolisacáridos y otros fines (5). El glucógeno es la sustancia hidrocarbonada que se acumula en el organismo animal. Si el nivel de azúcar en la sangre es suficientemente elevado, el Propionato se degrada oxidativamente en el ciclo del Acido Cítrico para la obtención de energía. El ácido propiónico se utiliza como intermediario desembocando la reacción de propionato a succinilo-coenzima A y oxalacética en el ciclo tricarbónico (Ciclo de Acido Cítrico). La metabolización tiene lugar en un 100% pudiéndose contar al Acido Propiónico como alimento complementario. (3,4,16,8).

El Acido Propiónico se encuentra en la orina y en el sudor y también en pequeñas cantidades en los productos lácteos. Los ácidos grasos de cadenas cortas son metabolitos normales del metabolismo humano dentro de los procesos de la digestión. Este ácido no origina efectos negativos siempre que se tome en concentraciones semejantes a como es el caso de los animales domésticos. A este respecto ocupa un puesto especial el rumiante que dentro de la síntesis preestomacal forma aproximadamente hasta 1Kg de Acido propiónico por 500 Kg. de peso (3,4).

Con la administración oral del Propionato aumenta en los ruminantes el nivel de azúcar en la sangre. La tendencia a que se origine ketosis con el agotamiento de las reservas de hidratos de carbono de los ruminantes se puede combatir con ácidos grasos de cadena corta que, para la obtención de energía tiene que sufrir una desintegración por oxidación. El Acido Propiónico como formador de glucosa no actúa aquí como cetógeno. Ya no se piensa con razón, que la alta formación de cuerpos cetónicos en la desintegración de ácidos grasos impares sea una consecuencia de la transformación del Acido Propiónico en Acido Pirruvico, formándose ácido oxalacético después de la carboxilación. En cambio el Acido Propiónico frena directamente la formación de Acido Acetico del acetato por contención del fermento en el sistema cicloforasa, desintegrándose el Acido Propiónico en las mitocondrias del hígado. (3,4).

El Acido Propiónico suministra por medio del Carbón la cantidad principal de azúcar de la leche y de la grasa del cuerpo. El pro-

propionato es además importante para la síntesis de la glucosa en el hígado así como también para la oxidación final biológica en todas las células suocinilo coenzima "A" que se produce también del Propionato a través de la forma activa del propionil coenzima "A", y la carboxilación en melilmalonil coenzima, está sometida a la descomposición por el ciclo del ácido tricarbónico (Acido Cítrico). Así mismo suministra a través de fumarato y malato hacia el acetato oxálico el Hidrógeno - oportunamente para el metabolismo de las células.

Una insuficiencia de vitamina B₁₂ puede originar perturbaciones en la descomposición del Acido Propiónico, de tal manera que en ratas aumentaron las cifras de muerte.

En el organismo animal no son de esperar residuos después de la administración del Acido Propiónico porque la descomposición y la expulsión son completas. En la orina y en el excremento de los mamíferos no aparece Acido Propiónico sin modificar ni después de la alimentación ni después de la inyección. El Acido Propiónico es determinable analíticamente en el estómago pero no en el Intestino. En la orina de conejos aparece después de la administración de Propionato Acido Acético además del Acido Butírico que siempre se encuentra solo, - siendo sin embargo igual la cantidad de los ácidos grasos volátiles. - Esto se considera como efecto en la competencia por la coenzima "A". - Aquí el Acido Propiónico, gracias a su mayor afinidad por el fermento desplaza el Acido Acético y lo pone a merced de la eliminación.

El Acido Propiónico se oxida en el organismo hasta CO₂ y en las ratas se exhala dentro de dos horas a través de la respiración, - (3,8).

Por lo demás el Acido Propiónico posee otros efectos particulares en el metabolismo que por ej. son una consecuencia de la expulsión del Acido Acético de la coenzima "A". Esto se pudo ver en la intoxicación con ácido triflurecético pudiéndose impedir en el corazón del perro un enriquecimiento del Acido Cítrico gracias al Acido Propiónico.

En 16 ensayos de nutrición con cerdos, vacunos y aves se pudo determinar que mediante el empleo de pienso (húmedos y secos), con Acido Propiónico sus aumentos en peso y la metabolización del pienso mejoraba de un 2% hasta un 9%. Es de marcar que estos efectos se consiguieron con piensos compuestos que contenían un promotor de crecimiento, y llevaban muy poco tiempo de almacenaje. El efecto en el almacenado se basa primeramente en una mejora de la calidad microbiológica del pienso compuesto y secundariamente en un efecto "carry over" de la conservación del tubo digestivo de los animales. Los reportes de campo sugieren que cuando se ha suministrado Acido Propiónico en el alimento para las aves hay una baja de consumo de alimento al igual que la pérdida de animales dentro de los 7 meses. (4)

Buministros de 1,2,4,8% durante 6 semanas en el alimento de aves ponedoras se encontró que no hubo cambios en el consumo de alimento, peso corporal, peso del hígado, humedad y contenido de grasa. (26):

El valor de pH del contenido de estómago-intestino, prácticamente no cambió por adición del A. propiónico a los alimentos de los animales. Se notó con la alimentación con Acido Propiónico en el estómago de los cerdos una concentración aumentada de ácidos grasos volá-

tiles. En el examen del intestino no se podía reconocer relaciones — claras en el contenido de ácidos grasos. El Propionato de Calcio mejora la estabilidad de la cáscara de huevo en las gallinas ponedoras. — El propionato de Amonio en los piensos de gallinas ponedoras permite el empleo de sodio libre de cloruros. Si para las necesidades de sodio de las gallinas ponedoras se emplea cloruro de sodio (Sal ganado) aumenta al mismo tiempo la alimentación de cloruro. Con un elevado — contenido en cloruro en los piensos desciende la concentración de bicarbonato en la sangre, lo que es perjudicial para la cáscara de huevo. El propionato de sodio evita esta desventaja manteniendo la altura normal de la concentración de bicarbonato en la sangre. (25)

Los piensos para caballos en particular los destinados a potros y caballos de equitación no permiten en general la mezcla de grasas debido a que se altera su sabor. Unicamente se logra en estos casos la Aportación de energía empleando Propionato de Calcio (Ya que este contiene 900 TMD es decir 3,900 Kcal de energía transformable — por Kg. y además 20% de Calcio), o propilenglicol (5).

El maíz húmedo tratado con Acido Propiónico se demostró que — hubo mejor utilización de energía (aumento de ácido butírico y bajo — el ácido acético), pero hubo una baja digestión de los principales — componentes de la dieta (21).

Dentro del marco de experimentos y ensayos de conservación — con Acido Propiónico se ha determinado la concentración mínima de inhibición (CMI) del Acido Propiónico contra numerosos microorganismos. (1,4,5,8,14,23,28).

Organismos de la Prueba	CMI en %
I. Hongos ⁺	
Phycomyceten	
Rhizopus nigricans	0.10
Ascomyceten	
Aspergillus niger	0.25
Aspergillus flavus	0.25
Aspergillus versicolor	0.25
Chaetomium globosum	0.125
Penicillium funiculosum	0.125
Penicillium expansum	0.125
Penicillium spinulosum	0.10
Penicillium roqueforti	0.125
Trichoderma viride	0.25
Fungi imperfecti	
Alternaria sp	0.50
Cladosporium sp	0.25
Fusarium nivale	0.125
Fusarium oxysporium	0.125
Fusarium moniliforme	0.25

Helminthosporium sativum	0.10
Helminthosporium gramineum	0.05
Verticillium albo - atrum	0.10

II. Bacterias⁺⁺

Staphylococcus aureus	0.25
Bacillus subtilis	0.50
Aerobacter aerogenes	0.50
Escherichia coli	0.50
Escherichia freundii	0.25
Proteus vulgaris	0.50
Pseudomonas aeruginosa	0.25
Pseudomonas fluorescense	0.25
Serrat marcescens	0.50

III. Levaduras

Candida albicans	0,50
Candida Krusel	1,00
Hansenula anomala	0,50
Pichia fermentans	1,00
Odium sp	0,50
Sacharomyces cerevisiae	0,10
	0,10

Sacharomyces vivi

+ Baboureaud - Bouillon pH 6,0

++ Standard - Bouillon pH 7,0 - 7,2

La dosificación de Acido Propiónico dependerá del grado de humedad y éste a su vez dependerá de la limitación de la estabilidad — del almacenamiento. La escala de dosificación para cereales va desde un mes de almacenamiento con 16% de humedad con una adición de Acido-Propiónico de 0,35% hasta 12 meses con 45% de humedad y una cantidad de 0,45% de ésta. Como agente de desecación se ha demostrado que un — 1,0% de Acido Propiónico se permite la conservación de pacas de pienso verde con un contenido de agua de 18 hasta 20% en lugar de 12 hasta 14%.

Muy importante es también la conservación de piensos compuestos. Aquí una adición de 0,3% de Acido Propiónico proporciona una protección de conservación de tres meses contra toxinas y hongos. (3)

En dosis de 0,5 - 1,0% mata a todos los acaros. En granos la dosis de 0,3% ayuda a la prevención de crecimiento de hongos. Normalmente, tales tratamientos son afortunados pero ocasionalmente pueden — enlamearse pero sin producir su toxina. (30)

En otros experimentos realizados en Papel Disco, Crecimiento Radial en Agar y Crecimiento en Cultivo de movimiento, se demostró — que el crecimiento de hongos fué inhibido por 100 000 ppm de Acido — Propiónico en Papel Disco y 10 000 ppm en los otros dos. (23)

Contenido de humedad
en el Pienso

Adición de Acido
Propiónico

12 - 13%

3 Kg/ t de pienso (0,3%)

13 - 14%

4 Kg/ t de pienso (0,4%)

15 - 16%

5 Kg/ t de pienso (0,5%)

Dosis de 0,5% tienen acción repelente sobre insectos que se hallan en los cereales, por ej., para los gorgojos del trigo (*Sitophylus granarius*), y mientras que dosis de 1,0% mostró un efecto mortal.

El Acido Propiónico tiene acción tanto bactericida como bacteriostática al igual que Fungicida y fungioestática. La acción frente a bacterias Gram ⁺, es menor que frente a las Gram aunque *E. coli* parece que hace una excepción. (3).

Alimento con 30% de humedad dosis de 1,0 a 1,1% de Acido Propiónico conserva por 16 meses.

Porcentaje de Acido Propionico por tiempo de Almacén

Porcentaje de Humedad	Seis meses de Almacén ⁺	Un mes de Almacén
10	0,45	0,35
20	0,60	0,40
22	0,60	0,45
24	0,70	0,50
26	0,80	0,55
28	0,95	0,65
30	1,10	0,80
35	1,40	1,15
40	1,75	1,40

+ La cantidad de Acido Propiónico debe de incrementarse en 0,3% por cada adición de mes de almacenaje sobre seis meses,

Conrad (1961), observó que alimento almacenado con alta humedad y con 0,5% de Acido Propiónico, el comportamiento fue similar al que no estuvo tratado con éste teniendo apenas una mejora en el tratado.

El Acido Propiónico como producto de desecación es fisiológicamente inocuo. Es un producto del metabolismo natural que se produce en grandes cantidades sobre todo en la fermentación preestomacal de los rumiantes y que después de la resorción se metaboliza completamente. Por lo tanto no existe ningún peligro de la formación de residuos. No es de esperar ningún peligro agudo o secundario para el hombre como consumidor, de productos animales, pues incluso 100 mg/Kg de peso originan en el hombre una alcalinización de la orina, pero no producen diuresis o diarrea. (3)

No hay datos especiales sobre incompatibilidades, antagonismo y sinergismo biológicos. Otros ensayos crónicos con animales de estómago de una sola cavidad no son conocidos. Tampoco se dispone de datos sobre propiedades antigénicas, teratogenicidad, carcinogenicidad, efectos farmacológicos, influencias hormonales y antihormonales y efectos sobre la fertilidad. (3)

Sobre la tolerancia de mamíferos superiores se informa que la aplicación subcutánea en gatos induce vómitos y parálisis del cerebro. (3)

El ganado Bovino, Ovino, y Cerdo han tolerado piensos con 15% de ácidos orgánicos sin fenómenos tóxicos. En estas concentraciones el gusto tiene factor negativo y se produce un descenso de la toma de pienso. El valor límite parece hallarse entre 5 y 10%, cantidad que -

todavía favorece el crecimiento, (3,4).

En las gallinas ponedoras no se dan cambios notables frente a los del grupo de control cuando el pienso se trata con 0,3% hasta 0,9%. (3).

En vacas de leche adiciones del 1,5% de Acido Propiónico en el pienso, aumentó levemente el contenido protéico en la leche y una escasa disminución del contenido graso. En bovinos de engorda ocasiona un crecimiento mejor tolerando un contenido de 4% en el pienso. -- (3).

Adiciones en el alimento de cerdos y lechones de 0,3% hasta 0,9% no reducen el consumo de alimento y el aprovechamiento no disminuye.

La toxicidad aguda oral determinada en rata (LD_{50}), del Acido Propiónico, es de 3.500 mg/Kg de peso corporal y es por consiguiente sumamente reducida, produciéndose en el tracto estómago intestinal fenómenos de irritación y en la cavidad peritoneal ascitis. (3,4).

En un ensayo crónico de 224 días de duración las ratas de un peso de 35 a 79 g, toleraron un 5% de Propionato de Sodio mezclado con un pan especial. El desarrollo del peso fue menor que en los animales del grupo control. Este efecto se produjo en las primeras semanas de ensayo, el aprovechamiento del animal fue también menor. Los ensayos patológicos e histológicos no dieron después de 112 días ninguna señal de daños debidos al Propionato de Sodio. Con dosis de 1% a 3 no influye en el crecimiento del animal. (3,5).

Con dosis crecientes sucede una reducción en el consumo del alimento, pero no aparecen cambios histológicos y en los animales machos aparece un menor aumento de peso. En la región preestomacal se encuentra acantosis irreversible y fenómenos de hiperqueratosis en las mucosas con concentraciones de 50 000 ppm. En las hembras se producen cambios en la relación del peso del corazón y del peso del hígado con el peso del cuerpo. No se producen cambios orgánicos histológicos (3).

Es improbable que los animales consuman cantidades para sufrir de toxicidad aguda incluso empleadas en una elevada concentración por ej. 2 - 4% de Acido Propiónico para la conservación de piensos porque en otros casos de estos piensos tan húmedos apenas se trata de piensos que se emplean solos y por lo tanto dentro de la ración total tiene lugar una "dilución", y con elevadas concentraciones hay que contar con los factores del gusto que actúan como freno del consumo. (3).

El Acido Propiónico es una de las sustancias químicas que se caracterizan por un óptimo de indiferencia en el organismo de los mamíferos.

Para las personas diabéticas en las que dentro de su metabolismo puede producirse Acido Propiónico y tener un efecto de reducción de los alcalia, este ácido no es normalmente ningún problema especial para la salud, pues al igual que el Acido Acético se combustiona sin dificultades,

El Acido Propiónico se emplea en el campo médico-fermaceútico en pomadas de acción antimicótica. El empleo externo para el tratamiento de dermatomycosis. El Acido Propiónico se utiliza también en la oftalmología. Un campo de indicación especial terapéutico es el tratamiento de acetomias con ayuda de Propionato de Sodio como donador de energía, no quetógeno. Los propionatos se pueden utilizar como preventivos de la quetosis, dosificándolos en el pienso. Por esta razón el Acido Propiónico al igual que sus sales se encuentran incluidos bajo el número E280 en las directrices del mercado común sobre aditivos. (3,38).

En las aves se consigue una notable recesión en la formación de "Ampollas de Pechuga".

El efecto antimicrobiano pasa a través del pienso compuesto y consigue una especie de efecto "Carry over" en el intestino de los animales donde continúa ejerciendo su acción. (2,4).

La reducción de número de gérmenes en el pienso (menor carga) en el canal digestivo, debida a microorganismos poco deseados con ello se consigue también un menor stress. (2)

En los lechones y pollos los trastornos de digestión producidos por colibacterias causan mermas en rendimiento y pérdidas. En vista de que el desarrollo de los gérmenes colifórmicos dentro del organismo del animal depende ampliamente del valor del pH del Aparato Digestivo, Podía deducirse que el Acido Propiónico agregado a un alimento para animales bajara su valor de pH por lo menos el sector delantero del Aparato Digestivo, de modo que el efecto antimicrobiano del --

Acido Propiónico se extiende hasta cierto grado también sobre los microorganismos en el Aparato Digestivo del macroorganismo. Por lo tanto disminuye los problemas de diarrea. (4,5,25)

Efecto de adiciones de Acido Propiónico sobre el valor de pH en los alimentos para cría de lechones.

Adición	pH
Control (sin AP)	5.8
0.5% de AP	5.4 ,
1.0% de AP	5.2

Como se observa en el cuadro anterior pequeñas dosis de Acido Propiónico bajan el pH del alimento. (4)

Slanina (5), ensayó con bovinos que estaban afectados por --- trastornos en la función del Estómago. La administración de Propionato de Sodio y Calcio, estimuló claramente la actividad microbiana en el contenido del estómago, aumentando la cantidad de ácidos grasos volátiles en los jugos estomacales normalizando la acidez de éste y activando la secreción del cuarto estómago.

Cuando ha habido resistencia a Penicilina, Sulfas u otras drogas se ha seleccionado al Propionato de Sodio como agente microbiano.

Otros usos de Acido Propiónico es en el empleo de la Industria de los plásticos, en fábrica de productos alimenticios, almacenamiento de heces, protección contra el enrroquecimiento del pan y queso y otros. (3)

De acuerdo a las disposiciones legales que regulan el empleo del Acido Propiónico y de sus Sales, la República Federal de Alemania menciona que por ser una sustancia glucoplástica se puede incorporar en dosis de hasta el 8.0% en los piensos complementarios para ganado vacuno y en dosis de hasta el 25.0% en los piensos con base de sustancias minerales, destinados asimismo a ganado vacuno. No tiene limitación en la cantidad ni obligatoriedad de combinar su empleo a los organismos competentes. (3)

En Europa el Consejo Europeo en fecha 23.XI.70 autorizó el uso de Acido Propiónico.

En los EE.UU. de América el Acido Propiónico está incluido en la lista de GRAS (Generally Recognized As Safe), y según los cuales: de 0 hasta 10 mg de AP/Kg de peso corporal están permitidos, de 10 hasta 20 mg de AP/Kg de peso corporal están permitidos con limitaciones y las sales de Sodio y Calcio están autorizadas sin limitación. - (3,8)

En Francia están autorizados el Acido Propiónico y sus Sales hasta un 3.0% del pienso bajo consideración del contenido de humedad.

Nota: En los E.U. se ha liberado al Acido Propiónico del límite de tolerancia cuando se emplee como fungicida en cereales, heno etc. que se emplearán para la alimentación de animales. (3)

Entre las ventajas y desventajas del Acido Propiónico y sus Sales Propionato de Sodio y Amonio encontramos que al Propionato Sodio al absorber agua se aglomera con mayor facilidad y por consiguiente no se ha hallado una aplicación por su alto contenido de higroscopicidad. (5,44, 51)

El Acido Acético es tan solo la mitad de efectivo en comparación con el Acido Propiónico. Les Sales del Acido Acético no tienen casi poder preservativo. Este cuando se combina con Acido propionico es efectivo. Es muy usado en alimento más que en embutidos.

El Acido Sórbico sólo es efectivo cuando es disuelto en alcohol y completamente disuelto en el alimento por consiguiente sólo es efectivo en polvo seco. Este es muy efectivo en medio líquido pero no en granos.

El Acido Fórmico es preservativo pero es caústico con olor penetrante, sus vapores son tóxicos.

Acido Láctico tiene efecto preservativo dependiendo de la humedad del alimento.

Acido Isobutírico es muy efectivo en granos, es de olor penetrante.

Acido Benzoico y Benzonato de Sodio esta limitado por la ley a más de 0,1% en el alimento.

Los ácidos grasos ($C_1, C_2, C_3, C_4, C_5, C_6, C_7, C_8, C_9, C_{10}, C_{11}, C_{12}, C_{13}$), tienen actividad antimicrobiana. Cuando éstos se diluyen en 20%

de stanol como emulsificantes.

Otros desinfectantes son el Isoburato de Amonio, presencia de luz, rayos ultravioleta, hidratación, cloruro de sodio, hidróxido de amonio, formaldehido, cristal violeta (éste en algunos casos es más efectivo que el mismo Acido Propiónico), sulfato de cobre, violeta de benzoato. (3,5,8,9,10,14,17,19,27,41,42,43,44,48,51).

El objetivo del presente estudio es evaluar el Propionato de Amonio y Propionato de Calcio como inhibidores del crecimiento de Aspergillus flavus y la producción de su aflatoxina B₁, en el alimento para cerdos imitando varias condiciones climáticas del país.

MATERIAL Y METODO

El material necesario para el desarrollo del presente estudio consiste en:

- a) Cepa de hongos de Aspergillus flavus (Que fue obtenida del Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México).
- b) Propionato de Amonio y Propionato de Calcio como inhibidores del crecimiento de hongos.
- c) Alimento concentrado para cerdos.
- d) Utiles para esterilizar alimento por autoclave.
- e) Utiles para determinación de aflatoxias por el método de Stoloff - (45 y 46).
- f) Utiles para la determinación de la humedad del alimento (8, 11 y - 22).
- g) Utiles para la incubación del inculo y el alimento.

Para la determinación de la eficiencia del Propionato de Amonio y Propionato de Calcio como inhibidores del crecimiento de Aspergillus flavus y la producción de su aflatoxina B₁.

La manera en que se procedió fue la siguiente:

Se partió de una cepa de hongos de Aspergillus flavus que se conoce como productora de aflatoxina B₁, para la inoculación del alimento.

Las condiciones de incubación del alimento inoculado con hongos, se escogieron variaciones de temperatura y humedad tratando de asemejar los climas de nuestro país.

Ver diseño experimental.

El inóculo de Aspergillus flavus consistió en la molienda de 10 g de maíz donde se habían cultivado Aspergillus flavus a un grado de saturación de crecimiento que cubría completamente la superficie - después de 15 días de incubación a temperatura de laboratorio - - - (20°C), en la obscuridad y con 25% de humedad.

El inhibidor de crecimiento de hongos está hecho de Propionato de Amonio y Propionato de Calcio.

Este se aplica en proporción de 0,3% con el alimento en forma atomizada (3, 4, 15, 24, 30, 32).

Como se ha mencionado antes una de las formas para evitar el crecimiento de hongos y formación de aflatoxina es por el uso de sustancias químicas aplicando antes del almacenamiento.

El método consiste en usar dos recipientes que contengan 200 g de alimento uno tratado con Propionato de amonio y otro con Propiona-

to de Calcio. Teniendo un grupo control sin tratamiento en ambos experimentos. En total se usaron tres grupos de parejas de recipientes cada una con 13, 15 y 17% de humedad. Cada grupo se incubó uno a Temperatura Ambiente (de Laboratorio 20°C), y los otros dos restantes uno a 30 y el otro a 40°C en incubadoras de temperatura controlada.

Como sistema del control de eficacia del efecto de inhibición del crecimiento y producción de aflatoxinas se usaron los parámetros de:

Observación macroscópica del crecimiento de Aspergillus flavus y la producción de aflatoxinas. Los recipientes inoculados se observarán diariamente para la inspección del crecimiento de hongos sobre la superficie del alimento. Para verificar el efecto de inhibición de la producción de aflatoxinas se procedió a muestrear los recipientes tratados y no tratados de cada una de las parejas cada semana durante tres ocasiones.

Para la determinación de aflatoxinas se usó el método de detección múltiple de Stoloff y la confirmación de su presencia por absorción con Acido Sulfúrico y el R_f frente el estandar de aflatoxina- B_1 en Cromatografía de capa fina. (45 y 46).

Este método de detección de aflatoxinas consiste en la extracción inicial con Acetonitrilo seguido de un desengrasador (Eter de Petróleo), y limpieza de colorantes con una solución de Cloruro Férrico y una separación líquida-líquida con Cloroformo.

La lectura se practicó en Cromatografía de capa fina frente -

al estandar de aflatoxina B₁ con luz ultravioleta de onda larga, y su confirmación por la formación de un derivado con Acido Trifluoroacético.

RESULTADOS

Para estudiar el efecto del tratamiento con Acido Própionico - sobre el crecimiento de Aspergillus flavus en el alimento para cerdos, se realizaron dos experimentos usando dos de sus sales, Propionato de amonio y Propionato de calcio cada una incubándose en combinaciones de diferente humedad (13, 15 y 17%), con diferente temperatura (Temperatura Ambiente, 30 y 40°C). Los parámetros evaluados fueron el porcentaje de crecimiento de hongos que hubo por día haciéndose comparaciones con el alimento testigo. A los veintitrés y cuarenta y tres días se efectuaron dos cosechas para analizar la presencia de aflatoxina B₁.

Experimento No. I

Tratamiento con Propionato de amonio.

En el alimento incubado a Temperatura Ambiente (TA) con 13% de humedad (h), se apreció un crecimiento de 10% de Aspergillus flavus (A. flavus), en el recipiente No Tratado (NT), hacia el veintinueve día, llegando a un 60% al treintinueve. En el recipiente tratado con propionato de amonio (PA), en el vigesimoquinto día con un 10%, llegando al trigésimo¹⁴ día con el mismo porcentaje. En el análisis para aflatoxina B₁, resultó positivo en la segunda cosecha el NT que fue en el decimo¹⁰ octavo día del experimento. (cuadro I).

En el alimento incubado a TA, con 15% de h, se observó un crecimiento de 20% de A. flavus, en el recipiente NT hacia el decimosexto día, llegando a un 100% al vigésimonono. En el recipiente tratado con PA, en el decimosexto día con un 2%, llegando al trigésimoprimer con un 40%. En el análisis para aflatoxina B₁ resultó positivo en la segunda cosecha el NT (cuadro I).

En el alimento incubado a TA, con 17% de h, se detectó un crecimiento de 10% de A. flavus, en el recipiente NT, hacia el cuarto día, llegando a un 100% al vigésimosegundo. En el recipiente tratado con PA en el decimoséptimo día con un 10%, llegando al trigésimo con un 100%. En el análisis para aflatoxina B₁ resultó positivo en la segunda cosecha el NT (cuadro I).

En el alimento incubado a 30°C, con 13% de h, se identificó un crecimiento de 20% de A. flavus en el recipiente NT hacia el decimosegundo día, llegando a un 100% al trigésimo. En el recipiente tratado con PA en el vigésimo día con un 10%, llegando al trigésimoprimer con un 50%. En el análisis para aflatoxina B₁ resultaron negativos tanto la primera como la segunda cosecha esto fue en el día decimosegundo y decimoctavo del experimento. (cuadro 2).

En el alimento incubado a 30°C, con 15% de h, se vió un crecimiento de 10% de A. flavus en el recipiente NT, hacia el tercer día, llegando a un 100% al decimoctavo. En el recipiente tratado con PA en el decimosegundo día con un 5% de crecimiento, llegando al vigésimonono con un 100%. En el análisis para aflatoxina B₁ resultó positivo en la segunda cosecha el NT (cuadro 2).

En el alimento incubado a 30°C, con 17% de h, se notó un crecimiento de 50% de A. flavus en el recipiente NT, hacia el tercer día llegando a un 100% al quinto. En el recipiente tratado con PA en el -decimotercer día con un 30%, llegando al vigesimosegundo día al 100%. En el análisis para aflatoxina B₁ resultó positivo en la segunda cosecha el NT. (cuadro 2).

En el alimento incubado a 30°C, con 15% de h, se vió un crecimiento de 10% de A. flavus en el recipiente NT, hacia el tercer día, -llegando a un 100% al decimotercer día. En el recipiente tratado con PA en el decimosegundo día con un 5% de crecimiento, llegando al vigesimono con un 100%. En el análisis para aflatoxina B₁ resultó positivo en la segunda cosecha el NT (cuadro 2).

En el alimento incubado a 30°C, con 17% de h, se notó un crecimiento de 50% de A. flavus en el recipiente NT, hacia el tercer día, llegando a un 100% al quinto. En el recipiente tratado con PA en el -decimotercer día con un 30%, llegando al vigesimosegundo día al 100%. En el análisis para aflatoxina B₁ resultó positivo en la segunda cosecha el NT. (cuadro 2).

En el alimento incubado a 40°C con 13% de h, no se apreció un crecimiento de A. flavus en el recipiente NT ni tampoco en el tratado. Así mismo el análisis para aflatoxina B₁ resultó negativo. (cuadro 3).

En el alimento incubado a 40°C con 15% de h, se observó un --

crecimiento de 30% de A. flavus en el recipiente NT hacia el vigésimo sexto día, llegando a un 50% al trigesimoprimer. En el recipiente — tratado con PA no hubo crecimiento. En el análisis para aflatoxina — B₁ resultó negativo en la primera y segunda cosecha el NT. (cuadro 3)

En el alimento incubado a 40°C con 17% de h, se detectó un — crecimiento de 50% de A. flavus en el recipiente NT hacia el tercer — día, llegando a un 100% al quinto. En el recipiente tratado con PA — no hubo crecimiento. En el análisis para aflatoxina B₁ resultó posi— tivo en la segunda cosecha el NT. (cuadro 3).

Experimento No. II.

Tratamiento con Propionato de Calcio.

En el alimento incubado a TA, con 13% de h, se identificó un — crecimiento de 25% de A. flavus en el recipiente NT hacia el decimono — vo día, llegando a un 100% al trigesimotercero. En el recipiente tra — tado con Propionato de calcio (PCa), en el séptimo día del experimento — tan solo se percibieron pequeños grumos para después desaparecer. En — el análisis para aflatoxina B₁ resultó positivo en la segunda cosecha — el NT, ésto fue en el día cuarenta y tres del experimento. (cua— dro 4).

En el alimento incubado a TA con 18% de h, se vió un crecimién — to de 3% de A. flavus en el recipiente NT hacia el duodécimo día lle — gando a un 100% al vigésimosexto. En el recipiente tratado con PCa no — hubo crecimiento. En el análisis para aflatoxina B₁ resultó positivo — en la segunda cosecha el NT (cuadro 4).

En el alimento incubado a TA con 17% de h, se notó un crecimiento de 30% de A. flavus en el recipiente NT hacia el decimosegundo día llegando a un 100% al decimosexto. En el recipiente tratado con PCa en el decimosexto día con un 1%, llegando al trigésimoséptimo día al 100%. En el análisis para aflatoxina B_1 resultó positivo en la segunda cosecha en el NT. (cuadro 4).

En el alimento incubado a 30°C con 13% de h, se apreció un crecimiento de 10% de A. flavus en el recipiente NT hacia el octavo día, llegando a un 100% al cuadragesimoprimer. En el recipiente tratado con PCa en el decimopremier día con 1% llegando al cuadragesimotercero con un 40%. En el análisis para aflatoxina B_1 resultó positivo tanto en la primera como en la segunda cosecha en el NT (cuadro 5)

En el alimento incubado a 30°C con 15% de h, se observó un crecimiento de 20% de A. flavus en el recipiente NT hacia el octavo día llegando a un 100% al decimosexto. En el recipiente tratado con PCa en el decimoquinto día con un 3%, llegando al trigésimoséptimo con un 100%. En el análisis para aflatoxina B_1 , resultó positivo tanto en la primera como en la segunda cosecha en el NT, (cuadro 6).

En el alimento incubado a 30°C con 17% de h, se detectó un crecimiento de 10% de A. flavus en el recipiente NT hacia el quinto día, llegando a un 100% al noveno. En el recipiente tratado con PCa en el octavo día con un 5%, llegando al decimoctavo con 100%. En el análisis para aflatoxina B_1 resultó positivo tanto en la primera como en la segunda cosecha en el NT. (cuadro 6).

En el alimento incubado a 40°C y con 13% de h, se identificó un crecimiento de 10% de A. flavus en el recipiente NT hacia el cuarto día, llegando a un 100% al quinto. En el recipiente tratado con -- PCa no hubo crecimiento. En el análisis para aflatoxina B₁ resultó positivo tanto en la primera como en la segunda cosecha en el NT. (cuadro 6).

En el alimento incubado a 40°C con 15% de h, se vió un crecimiento de 30% de A. flavus en el recipiente NT hacia el cuarto día, -- llegando a un 100% al decimoprimeros. En el recipiente tratado con -- PCa no hubo crecimiento. En el análisis para aflatoxina B₁ resultó positivo tanto en la primera como en la segunda cosecha en el NT. (cuadro 6).

En el alimento incubado a 40°C con 17% de h, se notó un crecimiento de 10% de A. flavus en el recipiente NT hacia el tercer día, -- llegando a un 100% en el décimo. En el recipiente tratado con PCa no hubo crecimiento. En el análisis para aflatoxina B₁ resultó positivo en la segunda cosecha en el NT. (cuadro 6).

EFECTIVIDAD DEL PROPIONATO DE AMONIO COMO INHIBIDOR DEL CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE AFLATOXINAS EN EL ALIMENTO CONCENTRADO PARA CERDO

INCUBACION A TEMPERATURA AMBIENTE										RESULTADO DEL ANALISIS PARA AFLATOXINAS									
DIA DE INCUBACION	TEMPERATURA MEDIA	TEMPERATURA MAXIMA	TEMPERATURA MINIMA	TIPO DE SUSTRATO	CERDO					CERDO									
					1	2	3	4	5	1	2	3	4	5					
20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
17	16.8	16.8	16.0	15.4	15	15.8	16.8	16.5	16.1	17	16.8	16.8	16.0	15.4	15	15.8	16.8	16.5	16.1
22.4	22.2	20.5	22.5	22.0	22	21.8	25.8	22.3	23.3	22.4	22.2	20.5	22.5	22.0	22	21.8	25.8	22.3	23.3
11.4	11.8	11.6	12.7	11	12.4	10.1	8.6	10.6	12.0	11.4	11.8	11.6	12.7	11	12.4	10.1	8.6	10.6	12.0
10	10	20	20	20	20	20	20	20	20	10	10	20	20	20	20	20	20	20	20
10	10	20	20	20	20	20	20	20	20	10	10	20	20	20	20	20	20	20	20

µl = microlitro

EFECTIVIDAD DEL PROPIONATO DE AMONIO COMO INHIBIDOR DEL CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE AFLATOXINAS EN EL ALIMENTO CONCENTRADO PARA CERDO

		INCUBACION A TEMPERATURA 30°C																			
DIA DEL MES		28	29	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
DIA DE INCUBACION		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
TIPO DE MUESTRA		T	NT	T	NT	T	NT	T	NT	T	NT	T	NT	T	NT	T	NT	T	NT	T	NT
PORCENTAJE DEL CRECIMIENTO DE PORCOS	MUESTRA																				
		10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

cuadro 2

* = Suplemento
 ♦ = Ovilina
 T = Muestra tratada
 NT = Muestra no tratada

**EFFECTIVIDAD DEL PROPIONATO DE AMONIO COMO
INHIBIDOR DEL CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE
AFLATOXINAS EN EL ALIMENTO CONCENTRADO
PARA CERDO**

INCUBACION A TEMPERATURA 30°C													RESULTADO DEL ANALISIS PARA AFLATOXINAS											
													1ª COLECCION						2ª COLECCION					
DIAS DEL MES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	6/11	10/11	20/11	6/11	10/11	20/11						
DIAS DE INCUBACION	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31													
TIPO DE PUERTAS	T	MT	T	MT	MT	MT	T	MT	MT	MT														
PERCENTAJE DE CRECIMIENTO DE MORTOS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-							
PERCENTAJE DE MORTOS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-							
PERCENTAJE DE MORTOS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-							

EFECTIVIDAD DEL PROPIONATO DE AMONIO COMO INHIBIDOR DEL CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE AFLATOXINAS EN EL ALIMENTO CONCENTRADO PARA CERDO

INCUBACION A TEMPERATURA 40°C																								
DIA DEL MES		21	22	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18			
DIA DE INCUUBACION		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20			
TIPO DE MUESTRA		T	NT	T	NT	T	NT	T	NT	T	NT	T	NT	T	NT	T	NT	T	NT	T	NT			
PORCENTAJE DE CRECIMIENTO DE CERDOS	MUESTRA																							

cuadro 5

* Septiembre
 ♦ Octubre
 T Muestra tratada
 NT Muestra no tratada

**EFFECTIVIDAD DEL PROPIONATO DE AMONIO COMO
INHIBIDOR DEL CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE
AFLATOXINAS EN EL ALIMENTO CONCENTRADO
PARA CERDO**

INCUBACION A TEMPERATURA 40°C												RESULTADO DEL ANALISIS PARA AFLATOXINAS								
DIA DEL MES	DIA DE INCUBACION	TIPO DE ALIMENTO	T.M.T.				T.M.T.				T.M.T.				DESCOCHA	DESCOCHA				
			1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4						
10	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	1	2	3	4	1	2	3	4

EFECTIVIDAD DEL PROPIONATO DE CALCIO COMO INHIBIDOR DEL CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE AFLATOXINAS EN EL ALIMENTO CONCENTRADO PARA CERDO

INCUBACION A TEMPERATURA AMBIENTE																					
DIA DEL MES	#	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
DIAS DE INCUBACION		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
TEMPERATURA MEDIA		10.0	10.7	12.2	11.4	11.7	2.6	8	10.9	11.1	1.1	8.8	9.8	10	11.7	12.8	12.5	13.5	14.5	15.2	15.8
TEMPERATURA MAXIMA		18.8	17.2	18.5	18.8	17	6.8	12.8	17.4	18.4	16.8	17	16.8	19.2	22.7	24.6	19.8	21.9	2.4	22.6	25.3
TEMPERATURA MINIMA		8.2	8.4	6.8	6.5	7	5.8	3	8	4.7	4.2	2.3	8	1.8	2.4	3.8	7	8.3	8.8	8	8.8
TIPO DE MUESTRA		T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M
# CERDOS																					
+ VEDADO																					
T TRATADO																					
M NO TRATADO																					

CERDOS
+ VEDADO
T TRATADO
M NO TRATADO

cuadro 4

EFECTIVIDAD DEL PROPIONATO DE CALCIO COMO INHIBIDOR DEL CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE AFLATOXINAS EN EL ALIMENTO CONCENTRADO PARA CERDO

INCUBACION A TEMPERATURA AMBIENTE																					
DIA DEL MES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
DIAS DE INCUBACION	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41
TEMPERATURA MEDIA	24,6	24,2	23,8	23,7	23,6	23,4	23,3	23,2	23,0	22,5	22,0	21,2	20,7	20,7	20,4	20,4	20,1	22,3	22,2	22	24,0
TEMPERATURA MAXIMA	32	32	31,8	31,5	31,3	31,2	31,1	31,0	30,8	30,3	29,7	29,0	28,5	28,5	28,3	28,3	28,1	30	30	30	31
TEMPERATURA MINIMA	18	18,2	18,3	18,7	19	19,7	19,2	19,1	19,3	19,6	19,6	19,2	18,7	18,7	18,7	18,7	18,7	18,7	18,7	18,7	18,7
TIPO DE ALIMENTACION	T	MT																			
CONCENTRADO CRECIMIENTO DE POLLOS	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42

**EFFECTIVIDAD DEL PROPIONATO DE CALCIO COMO
INHIBIDOR DEL CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE
AFLATOXINAS EN EL ALIMENTO CONCENTRADO
PARA CERDO**

INCUBACION A TEMPERATURA AMBIENTE						RESULTADO DEL ANALISIS PARA AFLATOXINAS					
DIA DEL MES	22	23				1ª COBECHE		2ª COBECHE			
DIAS DE INCUBACION	42	43									
TEMPERATURA MEDIA	21.3	19.7									
TEMPERATURA MAXIMA	28.7	28.3									
TEMPERATURA MINIMA	13.3	11.9									
TIPO DE MUESTRA	1	1									
PORCENTAJE DE CRECIMIENTO DE MUESTRAS											

EFECTIVIDAD DEL PROPIONATO DE CALCIO COMO INHIBIDOR DEL CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE AFLATOXINAS EN EL ALIMENTO CONCENTRADO PARA CERDO

		INCUBACION A TEMPERATURA 30 °C																			
DIA DEL MES		12*	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
DIA DE INCUBACION		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
TIPO DE MUESTRA		T	MI	T	MI	T	MI	T	MI	T	MI	T	MI	T	MI	T	MI	T	MI	T	MI
PROPIONATO DE CALCIO	CANTIDAD EN G/KG																				
										70	75	80	85	90	95	100	100	100	100	100	100
										30	60	100	100			3	16	40	20	60	80
										10	40	80	50	100	5	15	35	50	70	100	

cuadro 5

* Septiembre 1963
 * Octubre 1963
 Trabajo hecho
 en el laboratorio de la Universidad de Chile

EFECTIVIDAD DEL PROPIONATO DE CALCIO COMO INHIBIDOR DEL CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE AFLATOXINAS EN EL ALIMENTO CONCENTRADO PARA CERDO

		INCUBACION A TEMPERATURA 37°C																				
DIA DEL MES		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
DIA DE INCUBACION		21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	
TIPO DE MUESTRA		T	NT	NT	T	NT	NT															
PORCENTAJE DEL CRECIMIENTO RESPECTO AL CONTROL	C	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
	P	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
AFLATOXINA B ₁	C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
AFLATOXINA B ₂	C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* Temperatura 37°C
 C: Control
 P: Propionato de Calcio
 T: Muestra tratada
 NT: Muestra no tratada

**EFFECTIVIDAD DEL PROPIONATO DE CALCIO COMO
INHIBIDOR DEL CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE
AFLATOXINAS EN EL ALIMENTO CONCENTRADO
PARA CERDO**

INCUBACION A TEMPERATURA 30°C										RESULTADO DEL ANALISIS PARA AFLATOXINAS							
DIA DEL MES	DIAS DE INCUBACION	TIPO DE PULVERA								1ª COSECHA				2ª COSECHA			
			21	22	23						5A	10A	20A	5A	10A	20A	
			T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	
			+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
			-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
			-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-

EFECTIVIDAD DEL PROPIONATO DE CALCIO COMO INHIBIDOR DEL CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE ' AFLATOXINAS EN EL ALIMENTO CONCENTRADO PARA CERDO.

		INCUBACION A TEMPERATURA 40°C																				
DIA DEL MES		12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	
DIAS DE INCUBACION		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
TIPO DE MUESTRA		T	NT	T	NT	T	NT	T	NT	T	NT	T	NT	T	NT	T	NT	T	NT	T	NT	
PORCENTAJE DEL CRECIMIENTO DE CERDOS	NÚMERO																					
					10	10	20	20	40	50	70	70	85	85	100	100						
					20	20	30	50	70	70	100											
				10	10	10	40	50	70	100												

*-Septiembre 1962
 ♦-Octubre 1962
 T-Muestra tratada
 NT-Muestra no tratada

cuadro 6

EFECTIVIDAD DEL PROPIONATO DE CALCIO COMO INHIBIDOR DEL CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE AFLATOXINAS EN EL ALIMENTO CONCENTRADO PARA CERDO

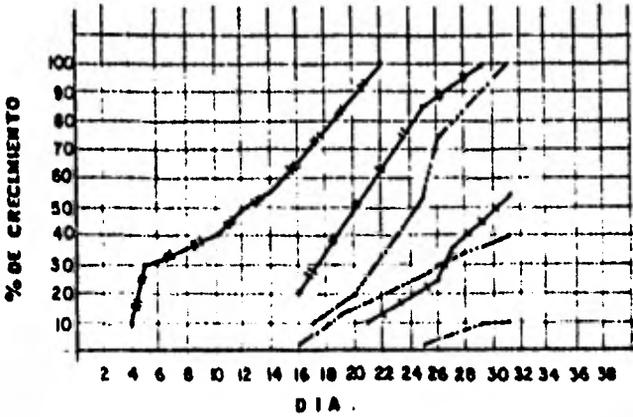
INCUBACION A TEMPERATURA 40°C																				
DIA DEL MES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
DIAS DE INCUBACION	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
TIPO DE MUESTRA	T	MT																		
PUNTAJE DEL INCREMENTO DE PESO																				
PUNTAJE DE AFLATOXINAS																				

* = Dieta controlada
 ⊕ = Dieta con A.M.C.
 T = Muestra tratada
 MT = Muestra no tratada

**EFFECTIVIDAD DEL PROPIONATO DE CALCIO COMO
INHIBIDOR DEL CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE
AFLATOXINAS EN EL ALIMENTO CONCENTRADO
PARA CERDO**

INCUBACION A TEMPERATURA 40°C										RESULTADO DEL ANALISIS PARA AFLATOXINAS										
DIA DEL MES	CIAD DE INCUBACION	TIPO DE MUESTRA	Nº DE CERDOS	Nº DE MUESTRAS	1960ECHA				1960ECHA											
										1	2	3	4	1	2	3	4			
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

COMPARACIO DEL PORCENTAJE DEL CRECIMIENTO
 ENTRE LAS HUMEDADES 13,15,17.
 INCUBADAS A TEMPERATURA AMBIENTE

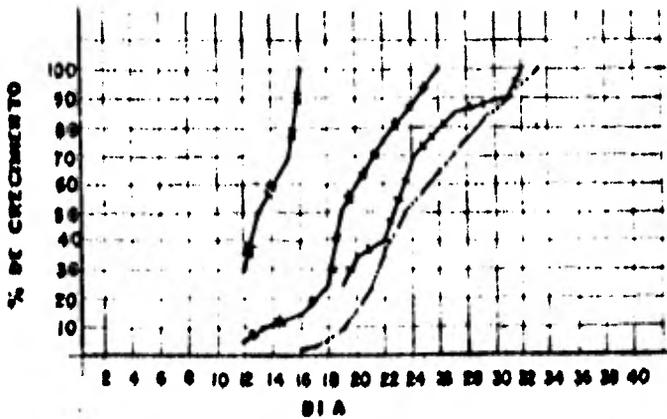


TRATADO PA.

NO TRATADO

13 - - - -
 15 - - - -
 17 - - - -

13 - - - -
 15 - - - -
 17 - - - -



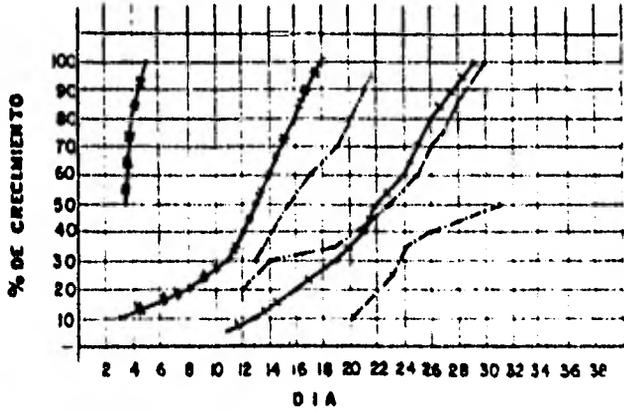
TRATADO PEA.

NO TRATADO

13 - - - -
 15 - - - -
 17 - - - -

13 - - - -
 15 - - - -
 17 - - - -

COMPARACION DEL PORCENTAJE DEL CRECIMIENTO
 ENTRE LAS HUMEDADES 13,15,17.
 INCUBADAS A 30°C

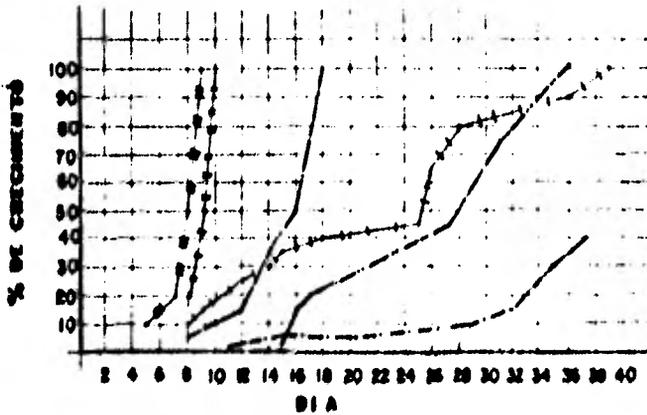


TRATADO PA.

NO TRATADO

13 - - - -
 15 - - - -
 17 - - - -

13 - - - -
 15 - - - -
 17 - - - -



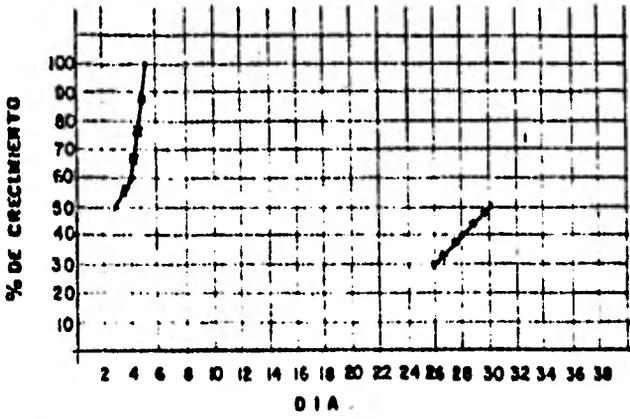
TRATADO RES.

NO TRATADO

13 - - - -
 15 - - - -
 17 - - - -

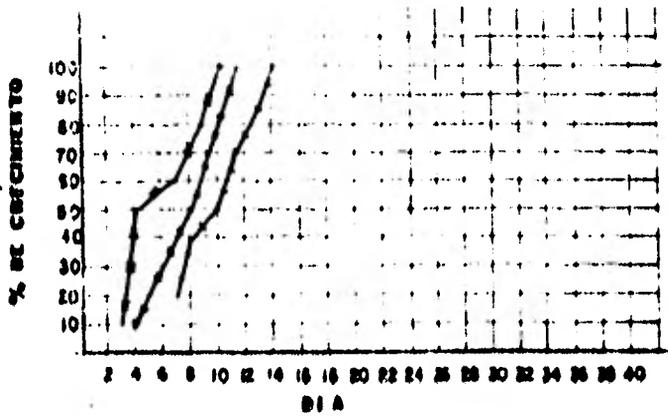
13 - - - -
 15 - - - -
 17 - - - -

COMPARACION DEL PORCENTAJE DEL CRECIMIENTO
 ENTRE LAS HUMEDADES 13,15,17.
 INCUBADAS A 40° C



TRATADO PA.
 13 ---
 15 —
 17 ·-·

NO TRATADO
 13 -|-|-
 15 -|-|-
 17 -|-|-



TRATADO PA.
 13 ---
 15 —
 17 ·-·

NO TRATADO
 13 -|-|-|-
 15 -|-|-|-
 17 -|-|-|-

DISCUSION

Por los resultados obtenidos se encontró que el Propionato de Calcio (PCa), es más efectivo que el Propionato de Amonio (PA), en cuestión de inhibición del crecimiento del Aspergillus flavus (A. flavus), y en los casos en que éste creció, su desarrollo fué más lento-comparándolo con el de PA. Posiblemente las causas por las cuales el PA no resultó ser tan eficaz pueden deberse a que éste no tenga un poder de disociación a Acido Propionato cuando está en contacto con el agua, (éste necesita bastante humedad y un pH adecuado para actuar como lo indican en su Boletín Informativo los Laboratorios BASF (5), -- otra desventaja sería que al encontrarse en estado líquido se volatilice, provocando que se pierda parte de la dosis, al someterse éste a temperaturas como fué el caso de las 30 y 40°C ayudado por la humedad (17 y 15%), permitiendo que éste se volatilice más rápidamente. Probablemente una ventaja del PA sobre el PCa sea el manejo.

Dentro de los recipientes los que más se asemejaban a las condiciones ambientales que necesita el A. flavus para crecer y producir sus aflatoxinas estaban las de 40°C a 17% de humedad la de 30°C con 17 y 15, en éstas fueron donde creció más rápidamente ya que desde el tercer día ya había crecimiento en las recipientes llegando rápidamente al 100% de crecimiento, aparte de la formación de aflatoxinas, -- Siendo en el de 40°C con 17% de humedad donde hubo la máxima cantidad de ellas que fué 1,6 ppm en el día cuarenta y tres del experimento.

En los recipientes tratados el crecimiento fue en el orden de los no tratados, pero en los primeros el crecimiento fue mucho más --

lento y en ninguno de los recipientes tratados de todo el experimento se produjo la formación de aflatoxinas siendo éstas inhibidas totalmente.

Todo lo anteriormente expuesto concuerda con lo reportado por el Boletín Informativo de BASF, Lugo y Jones (24, 31 y 26), ya que — mencionan que la humedad que necesita el A. flavus es de 18.9% y la temperatura de 24°C siendo según BASF la óptima 30°C y según los resultados de nuestro estudio ésta es la más acertada.

El hecho de que haya habido crecimiento de hongos en los recipientes tratados es posible que se debiera a;

1) La concentración de esporas fué de 742 187 500 en 200g de alimento, siendo 37 109 375 por gramo. Siendo lo normal 80 en 1000 g de alimento.

2) La dosis de PA y PCA se debieron haber aumentado de acuerdo al incremento de la humedad como lo indica BASF (6) que con 13% de humedad se debe de usar 0.3% de PA o PCA; con 15% de humedad se usará 0.4% y con 17% de humedad 0.7%. No se menciona la temperatura a que están sometidas estas humedades. Nosotros usamos en todas la misma cantidad — 0.3% y aunque hubo crecimiento en algunos de los tratados con humedad de 17 y 18% con temperatura de 30 y 40°C no se produjeron las aflatoxinas apesar de que éstas son temperaturas óptimas para su crecimiento y la cantidad de Propionato fuera igual.

Por otro lado Jensen (27), dice que dosis de 0.35% son suficientes para humedades de 18% inhibiendo el crecimiento de hongos, al igual que BASF no menciona la temperatura.

BASF sometió alimento para cerdo con una humedad de 13 a -- 16.5% con una dosis de 0.3% inhibiéndose el crecimiento por tres meses (4).

Otros autores como Stewart (44), experimentaron con 0.3% de -- Acido Propiónico en un medio de sacarosa con extracto de levadura inoculando esporas de A. flavus incubándolo a 25°C por diez días demostrando la actividad fungicida que tiene el Acido Propiónico.

Nelson (34), usó dosis de 0.75% de Acido Propiónico sometiendo a diferentes humedades 16, 21 y 26%, llegando al día 60 sin encontrar enmohecimiento del alimento.

Los cambios macroscópicos fueron semejantes a los observados por Smith (42), aunque él usa el Acido Propiónico combinado con Acido Acético, a dosis de 0.25%. Estos son parecidos a los incubados a 30°C con 17% de humedad. Él no menciona a que temperatura ni a que humedad fueron incubados.

Otros agentes antifúngicos son el Acido Acético, y el Fórmico que tienen un menor poder de inhibición, pero al usarse con el Acido Propiónico éste aumenta. El metileno-bis-propionato se puede asemejar con el poder de inhibición del Acido Propiónico y el formaldehído pero éste puede provocar efectos de pérdida de ganancia de peso en los animales. El Isobutirato y Butirato de Amonio son ácidos grasos volátiles prometedores para la inhibición de crecimiento de hongos. El -- Acido Bórico es efectivo en solución con etanol pero no cuando está suministrado en polvo. (10, 19, 29, 41, 48, 49 y 51).

Se prefiere el uso de las sales (Propionato de Calcio y Propionato de Amonio), del Acido Propiónico a éste, ya que éste es corrosivo. Por principio deben tomarse ciertas precauciones y los tanques ó depósitos, tuberías y bombas destinadas para Acido Propiónico puro deben ser construidas con materiales resistentes a la corrosión. Prácticamente deben usarse solamente aceros de aleación y aluminio puro.

Los alimentos de animales tratados con Acido Propiónico no son prácticamente corrosivos. Por consiguiente pueden ser transportados mediante instalaciones corrientes, no resistentes a la corrosión y también pueden almacenarse en recipientes o depósitos de cualquier tipo. Una excepción la forman los productos cosechados húmedos con muy altas cantidades de Acido Propiónico en estos casos los recipientes previstos para el almacenaje deberían construirse con materiales a prueba de corrosión deberían aplicarse manos de pintura o revestimiento apropiados.

Una reducción notable y hasta la exclusión de la corrosividad del Acido Propiónico puro la proporciona una mezola con melaza.

En conclusión el Propionato de Calcio es más efectivo que el Propionato de Amonio, pero ambos son efectivos en la inhibición de aflatoxinas. Además al aumentar la humedad se deberá aumentar la dosificación.

Nosotros tuvimos la certeza de controlar la temperatura y la humedad en nuestro experimento haciéndolo a éste más exacto, cosa que otros autores sólo tomaban en cuenta la humedad.

El hecho de haber tenido combinaciones de temperatura y diferentes humedades fue para igualar el clima de todo el país y así hacer comparaciones entre los estados para ver cuales son más propensos a que se contamine. El alimento. Encontrándose que los que pusimos a Temperatura Ambiente que es la temperatura semejante a la de los estados que están alrededor del Distrito Federal (Eco. de México, Puebla, Tlaxcala etc.), en los cuales el crecimiento de hongos es más difícil por la temperatura que hay, siendo la dosis de 0,3% de Propionato de Amonio o de Propionato de Calcio suficientes para inhibir completamente el crecimiento de hongos.

Los incubados a 30°C asemejan la temperatura y humedad de los estados tropicales como son Veracruz, Yucatán, Tabasco etc. que es donde es muy fácil el crecimiento de hongos en el alimento ya que las condiciones son muy propicias para el desarrollo de éstos. Teniéndose que usar más de Propionato de Amonio o del Propionato de Calcio, ya que la dosis de 0,3% inhibe la producción de aflatoxinas pero no el crecimiento de hongos.

Los incubados a 40°C asemejan a la temperatura del Norte del país y aunque no llega a esta temperatura si llega a ser alta, siendo igualmente propicios para el crecimiento si su humedad es de 17%. La dosis de Propionato de Amonio o de Propionato de Calcio es suficiente para inhibir el crecimiento de hongos cuando la humedad es de 15 o de 13%.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Alimentación Animal Investigación y Práctica. BASF., 2/73, 1-7 (1980).
- 2.- Alimentación Animal Investigación y Práctica. Efecto de la Alimentación con pienso compuesto conservado con Luprosil. BASF., 11 — (1980).
- 3.- Alimentación Animal Investigación y Práctica. Inocuidad higiénico-médica del ácido propionico en la alimentación de ganado. — BASF., 4/73, 1-8 (1980).
- 4.- Alimentación Animal Investigación y Práctica. Luprosil. Efecto, aplicación y economía en el sector de piensos compuestos para animales. BASF., 7, 1-21 (1980).
- 5.- Alimentación Animal Investigación y Práctica. Sal Luprosil- Eficacia y Aplicación. BASF., 5, 1-16 (1980).
- 6.- AYRES, G.; "Análisis Químico Cuantitativo" Harper & Row Publishers Inc., E.U.A., 148, 583-585 (1968).
- 7.- BAECHLER, R.H.; "Toxicity fo normal aliphatic alcohol, acids, and sodium salts" American Wood Preservers association., 364-372 - - (1939).
- 8.- BOTHAST, R.J.; "Methylene-bis Propionate preservation of High-Moisture Corn" J. of Anim. Sci., 46, 484-489 (1978).
- 9.- BOTHAST, R.J.; "Preservation of High-Moisture Corn; A Microbiological Evaluation" J. of Dairy Sci., 58, 386-391 (1974).

- 10.- BRITT, O.C.; "Fungal Growth and acid Production During Fermentation and Refermentation of Organic Acid treated Corn Silages" J. of Dairy Sci., 58, 532-539 (1974).
- 11.- BROWN, G.H; "Química Cuantitativa" Reberté S.A, Barcelona., - - 26-29, 57-60 (1967).
- 12.- COLE, D.J.A.; "Further Studies on the Control of E. coli in - - Weaned Pigs by Chemical Supplementation of the Feed" Vet. Rec., - 85, 400-404 (1970).
- 13.- COLE, D.J.A.; "Propionic acid-treated Barley in the Diets of Bacon Pigs" Anim. Prod., 21, 295-302 (1975).
- 14.- COLE, D.J.D.; "The effect on Performance and Bacterial flora of Lactic acid, Propionic acid, Calcium propionate and Calcium acrylate in the Drinking Water of weaned Pigs" Vet. Rec., 83, 459--464 (1968).
- 15.- Conservación con el Sistema Luprosil. BASF., 1-65 (1980).
- 16.- Conservación de alimentos para Animales. BASF., 2-8 (1980).
- 17.- DILWORTH, B.C.; "Fungistatic Compounds in Broiler Production 1.- Effect on on Rate of Gain and Feed Utilization" Poul. Sci., 58, - 1443-1450 (1979).
- 18.- DORN, P.; "Manual de Patología Aviar" Acribia., España, 181-184, 265 (1973).
- 19.- FOSTER, G.; "Control of storage diseases of grain" Ann. Rev. --- Phytopathol., 343-366 (1979).

- 20.- GARLICH, J.D.; "The metabolizable energy value of high moisture-corn preserved with a mixture of acetic and propionic acids" --- Poul. Sci., 55, 225-228 (1976).
- 21.- GEAY, Y.; "Utilization Du maïs grain humide conservé a L' Acide-propionique pour L' engraissement des taurillons" Ann. Zotech., 25, 299-311 (1976).
- 22.- HAROLD, F.W.; "Elementary Quantitative Analysis" Prentice Hall Series., E.U.A. 27-32 (1958).
- 23.- HARPSTER, H.W.; "A nutritive evaluation of dried, High Moisture-and acid-treated corn and Sorghum grains for sheep" J. of Anim.-Sci., 41 1124-1133 (1975).
- 24.- Investigación y Práctica. Aspergillus flavus. BASF., (1980).
- 25.- Investigación y Práctica. Sal Luprosil. BASF. (1980).
- 26.- JENSEN, L.S.; "Effect of Calcium Propionate on Performanse of --- Laying hense" Poul. Sci., 55, 816-817 (1976).
- 27.- JONES, G. M.; "Organic acid preservation high moisture corn and-other grains and the nutritional value; Areview" Can. J. Anim. --- Sci., 54, 499-517. (1974).
- 28.- JUNGEMÁN, P.F; "Micología Medica Veterinaria" C.E.C.S.A., Méxi--co, 95-105 (1977).
- 29.- KNAPP, W.R.; "Propionic Acid as a Hay Preservative" Agronomy J., 63, 120-123 (1974).
- 30.- KUZAKIEWICZ, Z.; "Techniques for determining toxicity of propio-nic acid to fungi from stored grain" Trans. Br. mycol. Soc., 61, 355-367 (1973).

- 31.- LUGO, R. J.; "Evaluacion del Acido Propionico como Inhibidor del crecimiento de Hongos en Alimento para Pollos" Tesis de Licenciatura Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM. (1981).
- 32.- Luprosil NC. BASF., 1-11 (1980).
- 33.- MILWARD, Z.; "Orther Experiments to Determine the toxicity of -- Propionic acid to fungi Infesting Stored Grain" Br. mycol. Soc., 66, 319-324 (1976).
- 34.- NELSON, L. R.; "Storage of Hig Moisture Grain Sorghum treated -- with Propionic acid" Agronomy J., 65, 423-425 (1973).
- 35.- PASTER, N.; "A Commercial Scale Study of the Efficiency of Propionic Acid and Calcium Propionate as Fungistats in Poultry --- Feed" Poul. Sci., 58, 572-576 (1979).
- 36.- PELLETIER, R. L.; "Test with Mold Ban as a treatment for the control of mold in Animal feed" Macdonal Collegs., (1978).
- 37.- PEÑALVER, P.; "Micotoxiosis en alimentacion animal" XVII Jornadas Cientificas DA S.I.N.A., España 95-106 (1980).
- 38.- RICHARDS, C. R.; "Some Observations on the use of sodium propionate for the prevention of ketosis in Dairy Cattle" Delaware - - Agricultura Exp. Station Miscellanous., 1580-1584 (1958).
- 39.- ROSILES, R. M.; "Estudio de Aflatoxinas en el ensilado de maiz"- Vet. Méx., 19, (1978).
- 40.- ROSILES, R. M.; "Las Aflatoxinas en las Tortillas" Vet. Méx., -- 10, 37-49 (1979).

- 41.- SIMON, J. A.; "Chemical Control of Microorganisms in stored — grains" Cereal Chemistry., 51,74 (1970).
- 42.- SMITH, B.; "A Laboratory evaluation of organic acids and formaldehyde as preservative for with cage layer excreta intended for recycling by feeding to livestock" Can. J. Anim. Sci., 52, 209--216 (1978).
- 43.- STEWART, R. G.; "Effect of commercial antifungal compounds on — the performance of Broiler Chickens" Poul. Sci., 56, 1664-1666 - (1977).
- 44.- STEWART, R. G.; "The effect of various antifungal agents on aflatoxin production and growth characteristics of *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus* in Liquid Medium" Poul. Sci., 56, 1630-1635 (1977).
- 45.- STOLOFF, S.; "A multimycotoxin in detection method for aflatoxins, ochratoxin, zeralenone, sterigmatocystin and patulin." J. Assoc. Official Anal. Chem., 54,91-97 (1971).
- 46.- STOLOFF, L.; "Analytical methods for mycotoxins, Clinical Toxicology" 5, 465-494 (1972).
- 47.- TADUE, C. P.; "Aflatoxicosis en Aves Domesticas" Vet, Méx., 11,-13-22 (1980).
- 48.- THOMAS, J. W.; "Effect of Propionic acid and Ammonium isobutyrate on preservation and nutritive values of alfalfa haylage" J. of Anim. Sci., 41, 1458-1467 (1975).
- 49.- THORNTON, R. H.; "Antifungal Activity of Fatty acids to *Pithomyces carterum*" N.Z.J. agric. Res., 6, 469-483 (1963).

50.- TUCKER, S. J.; "Sodium Propionate in Veterinary Therapeutics" --
The Vet. Rec., 64, 95-97 (1952).

51.- WILCOX, R.A.; "Chemical Mold Inhibitors" Cooperative Extension -
Service, Kansas State University, Manhattan, Kansas., (1972).