

DETERMINACIÓN DE AFLATOXINA M₁ EN LECHE DE VACA



Edgar Duarte Portocarrero Edgar

PROFESIONAL UNIVERSITARIO, LABORATORIO DE SALUD PÚBLICA,
LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA EP EN REHABILITACIÓN
CARDIO-PULMONAR. M.Sc. TOXICOLOGÍA



RESUMEN

Este estudio se realizó con 85 muestras de leche pasteurizada y UHT provenientes del muestreo hecho para análisis toxicológico de AFM1. El método analítico utilizado fue el de cromatografía líquida de alta presión (HPLC), con detector de fluorescencia. Se elaboró curva de calibración con concentraciones de 10,0, 20,0, 40,0, 60,0 y 80,0 ppt (ng/L), con $R^2 = 0,9862$. No se detectó concentración alguna de AFM1 en las muestras analizadas en el Laboratorio de Salud Pública (Toxicología). Teniendo en cuenta estos resultados, que en principio son negativos para AFM1 en las muestras analizadas, no se descarta el que se deba mantener un programa de vigilancia y controles periódicos que garanticen la permanente inocuidad de este alimento.

Palabras claves: aflatoxina M1 , cromatografía líquida de alta presión (HPLC), leche pasteurizada.

SUMMARY

The realized Study on 85 samples of pasteurized milk and UHT coming from the realized sampling for toxicological analysis of AFM1. The analytic method utilized was high pressure Liquid Chromatography (HPLC), with Fluorescence detection, curve calibration was elaborated with concentrations of 10.0, 20.0, 40.0, 60.0, and 80.0 ppt (ng/L), with $R^2 = 0.9862$. Any concentration of AFM1 have been detected , in the analyzed samples at the Public Health Laboratory (Toxicology). Keeping in mind these results that are negative in principle for AFM1 in the analyzed samples, it 's advisable to keeping a surveillance program and periodic control that guarantees the permanent innocuousness of this food.

Keywords: aflatoxin M1 , Liquid Chromatography High-Pressure (HPLC), pasteurized milk.

INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años se ha hecho énfasis sobre la importancia de las micotoxinas en la salud del hombre y de los animales. Desde 1960, época en que se hicieron los primeros reportes de intoxicación por micotoxinas, los científicos denominaron a esta enfermedad *Turkey's X Disease* a raíz de la muerte de más de 100.000 pavos en Inglaterra por el consumo de torta de maní contaminada con hongos, procedente de Brasil y Nigeria. Posteriormente, con el avance de la química analítica, a estos compuestos se les llamó aflatoxinas, las cuales aparecen como un asunto de vanguardia en investigaciones de múltiples disciplinas: toxicología, medicina veterinaria, ciencia de los alimentos, salud pública, química analítica, etc. (1).

Una gran variedad de productos vegetales sujetos a contaminación por hongos y sus metabolitos, tales como el maíz y el maní —los más susceptibles a ella—, sufren por el crecimiento de ellos, asociado a condiciones ambientales de zonas donde la humedad y la temperatura son altas. Los hongos productores de toxinas pueden infestar los productos cosechados, las plantas en crecimiento, produciendo toxinas antes de la recolección. La contaminación es en muchos casos consecuencia de daños causados por insectos. El uso de plaguicidas y fungicidas, y un secado adecuado antes del almacenamiento, pueden reducir la infestación y por lo tanto la contaminación por aflatoxinas en alimentos (2).

El sistema de salud no dispone de información al respecto, pero adelanta actividades sistemáticas en la detección, vigilancia y control de las aflatoxinas, que no se han considerado debidamente como factor de riesgo en el consumo de alimentos (2).

Las aflatoxinas (micotoxinas) son metabolitos producidos por hongos al final de la fase exponencial y al inicio de la fase estacionaria de crecimiento; sin embargo, no son sustancias metabólicamente esenciales para los microorganismos (3). El término micotoxina proviene de *micos* (griego) y *toxin* (latín), y se refiere a aquellos metabolitos producidos por hongos que son tóxicos para el hombre y los animales, sintetizados por representantes de los géneros *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasíticas*, *Aspergillus momius*, *Penicilium* y *Fusarium* (2).

Las aflatoxinas más conocidas, denominadas B1, B2, G1 y G2, fueron aisladas por primera vez de la harina de maní. Las aflatoxinas B1 y B2 se metabolizan en aflatoxinas M1 y M2, respectivamente. Son altamente resistentes al calor y no se eliminan de los comestibles o del pienso de los

animales ni con las prácticas ordinarias de cocción ni con la pasteurización. No obstante, son relativamente inestables cuando se exponen a la luz, y particularmente a la radiación ultravioleta. Pueden ser químicamente degradadas con agentes oxidantes, álcalis, peróxido de hidrógeno y amoniaco, y destruidas cuando se las somete a autoclave en presencia de amoniaco o por tratamiento con hipoclorito (2).

La aflatoxina M1 es una micotoxina que aparece en la leche de mamíferos que han ingerido alimentos contaminados con aflatoxina B1, siendo este un metabolito tóxico producido por algunos hongos.

Entre el 0,3% y el 6,2% de la AFB1 presente en el alimento de las vacas es transformada en AFM1 y secretada a la leche. Existe una relación lineal entre los niveles de AFB1 en alimento contaminado y el contenido de AFM1 en la leche, la cual se muestra en la siguiente ecuación (4):

$$\frac{\text{ng de AFM1}}{\text{kg de leche}} = [1,19 \times \text{g de AFB1 consumidos por vaca por día}] + 1,9$$

En el siglo pasado, desde mediados de la década de los sesenta, varios países establecieron programas sistemáticos de muestreo en granos y leches, incluyendo sus respectivos productos derivados. Con una legislación estricta y de obligatorio cumplimiento, en Estados Unidos la FAO (5), que designó a las aflatoxinas como un constituyente peligroso de la dieta, ha reglamentado que la máxima cantidad de AFM1 en leche sea de 0,5 ug/L y de 20 ug/L de AF totales para dichos productos alimenticios.

Las aflatoxinas tienen una gran actividad cancerígena, teratogénica y mutagénica; el primer síndrome que produce es el hepatotóxico, pudiendo también ocasionar problemas renales. Los principales órganos afectados son el hígado, el riñón y el cerebro (6, 7).

Las aflatoxinas también son inmunosupresoras, ya que inhiben la fagocitosis y la síntesis proteica (los anticuerpos son proteínas), interrumpiendo la formación de ADN, ARN y proteínas en el ribosoma, por lo cual la absorción de los aminoácidos se ve alterada y la retención hepática aumenta (8, 9).

La AFB1 es absorbida vía tracto gastrointestinal, dentro del sistema portal sanguíneo, y llevada al hígado, donde se metaboliza. Una porción de aflatoxina 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, producto de degradación de la AFB1, y metabolitos no conjugados de esta, son excretados en el sistema circulatorio sanguíneo y se distribuyen de forma sistémica. Eventualmente los

residuos mencionados van a la leche, huevos, músculos y tejidos comestibles (Dennis & Hsieh, 1981). La AFM I es uno de esos derivados metabólicos que va a la leche, contaminándola.

De la AFB I se forman otros metabolitos, entre ellos el aflatoxicol (18 veces menos tóxico que la AFB I) y la aflatoxina B2a (no tóxica). El organismo animal produce generalmente esos productos metabólicos como un sistema de autodetoxificación. La reacción que tiene lugar a partir de la micotoxina original no tiene forzosamente que ser completa ni irreversible (4).

Los principales factores que tienen influencia sobre la toxicidad de las micotoxinas en los humanos son: a) la biodisponibilidad y toxicidad de la micotoxina; b) los sinergismos entre ellas; c) la micotoxina ingerida diariamente en función de la concentración de la misma y de la cantidad de alimento consumido; d) la continuidad o intermitencia de ingestión del alimento contaminado; e) el peso del individuo y su estado fisiológico y de salud; f) la edad. Así pues, los niños y los jóvenes son más susceptibles a la toxicidad de las micotoxinas debido a una mayor variación del metabolismo basal. Ellos pueden no tener suficientes mecanismos bioquímicos para la detoxificación. En los niños el cerebro continúa su desarrollo durante años y esto puede causar mayor susceptibilidad a las micotoxinas que afectan al sistema nervioso central (10).

La potencia carcinogénica de la AFM I es significativamente inferior a la de la AFB I; la AFM I y la AFB I tienen una TD50 (dosis de micotoxina con la cual el 50% de los individuos pueden desarrollar tumores malignos) de 10,38 y 1,15 microgramos/Kg p.c. (peso corporal)/día, respectivamente, lo que hace suponer que la AFM I es aproximadamente nueve veces menos carcinogénica que la AFB I. La TDI (ingesta de micotoxina diaria que puede ser tolerada) para la AFB I está comprendida entre 0,11 y 0,19 ng (nanogramos)/Kg p.c./día (0,00011 y 0,00019 microgramos/Kg p.c./día), con un factor de seguridad de 5.000 y un nivel de riesgo de 1/100.000. Los valores de NOAEL (estimación del nivel de micotoxina con el que no se observan efectos adversos) para la AFM I y la AFB I son < 2,5 y 0,75 microgramos/Kg p.c./día, respectivamente (10).

La AFM I es, en general, estable en algunos productos lácteos, en los cuales los procesos de pasteurización que varíen en tiempo y temperatura la concentración de contaminación original de la leche permanece prácticamente inalterada (11).

Bloques económicos de la Comunidad Europea (CE) y Mercosur han promulgado legislaciones diferentes sobre las cantidades máximas de micotoxinas toleradas en alimentos destinados al consumo humano (12).

- Leche líquida: 500 ng/L de AFM1 (máximo permitido 400 ng/L).
- Leche en polvo: 50 ug/K de AFM1 .
- Maíz en grano: 20 ug/K de AF total "B1 +B2+G1 +G2"
- Harinas de maíz: 20 ug/K de AF total.
- Maní: 20 ug/Kg de AF total.
- Mantequilla de maní: 20 ug/K de AF total.

Por lo tanto, el propósito de este estudio consiste en determinar la concentración de aflatoxina M1 en leche de vaca, para consumo humano, tomando como muestras las leches que se transportan desde las diversas partes de Cundinamarca para ser pasteurizadas y distribuidas en Bogotá.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para este estudio descriptivo de prevalencia de corte transversal, realizado en el Laboratorio de Salud Pública (Toxicología), de la Secretaría Distrital de Salud, se utilizaron solventes como metanol, benceno, dimetilsulfóxido, isoctanol, y equipos como embudos de decantación, columnas cromatográficas (AflaprepM), Micotox Ltda (13) para la separación y purificación del analito, y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para su cuantificación (Konik Instruments), columna Licrocart 125/4 RP 18 (5 um).

El método de análisis se desarrolló bajo la preparación de controles de concentración conocida: 10,0, 20,0, 40,0, 60,0, y 80,0 ppt (ng/L), leídos por HPLC con 4 réplicas cada uno.

RESULTADOS

El gráfico 1 muestra los resultados obtenidos en las lecturas de cada uno de los puntos de concentración, mostrando la línea de tendencia central y la ecuación de la recta con su R^2 (coeficiente de correlación). El gráfico 2, la

curva derivada de los promedios resultantes de los puntos de concentración de la figura anterior, señalando la ecuación de la recta y su R^2 .

GRÁFICO 1:
 DATOS OBTENIDOS EN LA LECTURA DE LAS 4 RÉPLICAS,
 SEGÚN LAS CONCENTRACIONES
 ($CD = 0,96$).

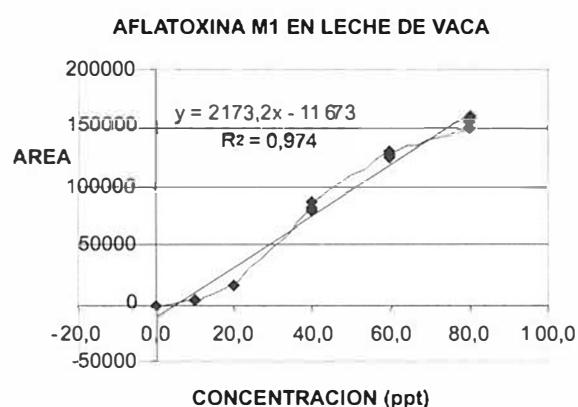
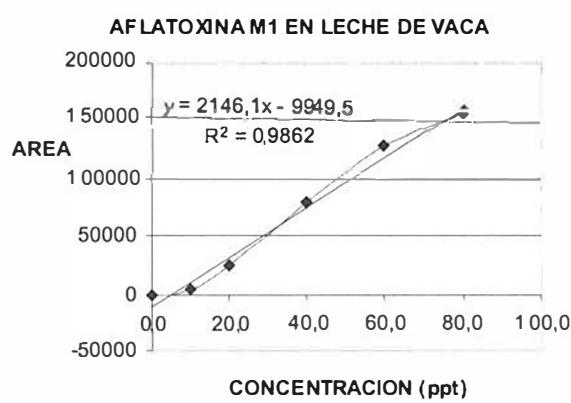


GRÁFICO 2:
 CURVA DE LOS PROMEDIOS DE LOS PUNTOS DE LA FIGURA 1
 ($CD = 0,9956$)



Con base en esta curva de estandarización, se hizo la determinación por el método de cromatografía líquida de alta presión (HPLC), con detector de fluorescencia.

Se analizaron 85 muestras de leche líquida de diferentes marcas provenientes de las diversas zonas de Cundinamarca y que circulan para la venta en la ciudad de Bogotá, demostrando que los niveles de aflatoxina, en este estudio, no se detectaron en concentración alguna. La norma (13-14) establece: 0.4 ug AFM1/L (400ng/L = ppt), y aflatoxina total de 20 ug/L.

DISCUSIÓN

Respecto de otras fuentes (2) que obtuvieron resultados de aflatoxinas M1 en leche de vaca, superiores a los establecidos en la norma (14), la Secretaría Distrital de Salud, en el Laboratorio de Salud Pública, Toxicología, confirmó con sus ensayos de curva de calibración y análisis de muestras de leche que sin temor a dudas estas leches analizadas no presentaron niveles de aflatoxina M1, por lo tanto el producto es apto para consumo.

Se debe, por otra parte, lograr unificar los criterios en materia de normalización de los procedimientos para el muestreo, los análisis para la detección y los niveles permisibles, tratando de estandarizar el problema de las micotoxinas y las acciones, de ser necesario, para contrarrestarlo.

Es importante señalar, además, que estas reglamentaciones varían según las normativas de los países o las comunidades de comercialización internacional (Unión Europea, Mercosur, etc.) (12), de manera que no existe una legislación internacional al respecto, y en algunos países ni siquiera existen directrices vigentes para su control.

CONCLUSIONES

1. Las muestras analizadas no presentan niveles de aflatoxina.
2. A pesar de que el análisis realizado no mostró niveles de aflatoxina en leches, no descarta que se deban implementar controles periódicos

hasta que su récord de ausencia nos permita mantener la calidad del producto, en cuanto a contaminantes naturales o productos del metabolismo fúngico respecta.

3. La situación actual de la investigación sobre micotoxinas en Colombia destaca la falta de desarrollo en el área y por tanto la importancia de crear mecanismos de vigilancia y control de los alimentos destinados para consumo humano y de especies animales en cuanto a los niveles máximos permitidos de micotoxinas.

REFERENCIAS

1. GIMENO A. Aflatoxina M1 en la leche. Riesgos para la salud pública, prevención y control. [s. d.].
2. DÍAZ JG. Aflatoxina M1: un carcinógeno en la leche. [s. d.].
3. BUTLER WH. Aflatoxin. In IFH, editor. *Mycotoxins*. Amsterdam: Purchase, Elsevier Press; 1974, p. 19.
4. DENNIS P, HSIEH H. Metabolisme and Transmission of Mycotoxins. [International Symposium and Workshop on Mycotoxins. September 6-16, Cairo, Dokki, Egypt]. Proceedings International Symposium on Mycotoxins; 1983, p. 151-165
5. FORO MUNDIAL FAO/OMS DE AUTORIDADES DE REGLAMENTACIÓN SOBRE INOCUIDAD DE LOS ALIMENTOS [ACTAS]. Marruecos; 2002.
6. HESSELTINE CW. Conditions Leading to Mycotoxin Contamination of Foods Feeds. In Rodricks JV. *Mycotoxins Other Fungal Related Food Problems*. Washington D. C.: American Chemical Society; 1976, p. 122.
7. JECFA. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives Fifty sixth meeting. Geneva; 6-15 February 2001. p. 1-33.
8. SMITH TK. Influence of mycotoxins on protein and aminoacid utilization. Federation Proceedings. 1982; (41):2828-2832
9. SHARMA RP. Immunotoxicity of Mycotoxins. *J Dairy Sci.* 1993; 76(3):892-7.
10. KUIPER-GOODMAN T. Prevention of Human Mycotoxicoses Through Risk Assessment and Risk Management. In *Mycotoxins*. Miller JD and Trenholm HL. Grain, Compounds Other Than Aflatoxin [Chapter 12]. St. Paul: Eagan Press; 1994, p. 439-469.
11. YOUSEF AE, MARTH EH. Stability and Degradation of Aflatoxin M1. In Van

- Egmond HP. *Mycotoxins in Dairy Products* [Chapter 5]. London and New York: London and New York: Elsevier Applied Science; 1989, p. 127-161.
- 12. MERCUSUR/GMC/RES. N° 25/02. Tratado de Asunción. [Protocolo de Ouro Preto y Resoluciones N° 91/93, 56/94, 152/96 y 38/98 del grupo Mercado Común].
 - 13. MICOTOX [s. d].
 - 14. NTC 5219 (ISO 14501/1988). Leche líquida y en polvo. Determinación de AFM I, purificación por columna de inmunoafinidad y cromatografía de líquidos (HPLC).