

AFLATOXINA M₁ EN LECHE Y QUESO DE CABRA PRODUCIDOS EN APASEO EL GRANDE, GUANAJUATO, MÉXICO

Georgina Urbán*, J. Pérez*, F. Martínez*, R. Gutiérrez*, S. Vega*¹, Marta Coronado*, A. Escobar**

*Departamento de Producción Agrícola y Animal. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco, México, D.F. ¹Correo electrónico: svega@correo.xoc.uam.mx; **Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, La Habana, Cuba

RESUMEN: El presente estudio se realizó con el objeto de conocer el nivel de aflatoxina M₁ (AFM₁) en leche y queso de cabra. Las muestras de leche (n=60) fueron tomadas durante el periodo de julio del 2008 a junio del 2009 provenientes de 5 unidades de producción caprina. Las muestras de queso (n=20) se obtuvieron en julio de 2009. Las muestras fueron analizadas mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) bajo los métodos propuestos por la AOAC. Los resultados señalan que el 30% de las muestras de leche presentaron algún nivel de AFM₁, el 18% de las muestras estuvieron por arriba del nivel máximo permitido (0.05 µg Kg⁻¹) por la Comunidad Europea, con un nivel máximo de 1.61 µg Kg⁻¹. Las muestras de queso presentaron un 15% de incidencia de AFM₁, con un nivel máximo de 0.23 µg Kg⁻¹.

(Palabras clave: aflatoxina M₁; leche; queso; cabra; México)

AFLATOXIN M₁ IN GOAT MILK AND CHEESE PRODUCED IN APASEO EL GRANDE, GUANAJUATO, MEXICO

ABSTRACT: The present study was conducted to assess the level of aflatoxin M₁ (AFM₁) in goat milk and cheese. Milk samples (n=60) were taken during the period July 2008 to June 2009 from 5 goats production units. Cheese samples (n=20) were taken in July 2009. Samples were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) using the methods proposed by the AOAC. The results show 30% of milk samples with some level of AFM₁, 18% were above the maximum permissible level (0.05 µg Kg⁻¹) by the European Community, with a peak of 1.61 µg Kg⁻¹. Cheese samples showed a 15% incidence of AFM₁, with a maximum level of 0.23 µg Kg⁻¹.

(Key words: aflatoxin M₁; milk cheese; goat, Mexico)

INTRODUCCIÓN

La aflatoxina M₁ (AFM₁) es un metabolito hidrolizado de la aflatoxina B₁ (AFB₁) que se excreta en la leche de animales lactando en una relación entre el 0.18-3% de la concentración inicial de AFB₁ presente en el alimento consumido, variando de animal a animal, de día a día o de ordeño a ordeño (1, 2, 3). La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) en su clasificación en 2002 colocó a la AFM₁ en el grupo 1 como un probable carcinógeno (4), considerando que presenta sólo el 10% de potencial carcinogénico y genotóxico de su precursor la AFB₁.

La excreción de la AFM₁ en leche de cabra alimentadas con una dosis única (0.8 mg/cabeza) fue detectada 1 h después de la ingestión, alcanzando su máxima concentración entre 3 a 6 horas después de la administración del alimento contaminado (5). La aflatoxina M₁ al igual que otras aflatoxinas son compuestos muy estables y durante los procesos tecnológicos de la leche no presentan reducción significativa de su concentración, incluso, en quesos se ha visto un incremento significativo en la concentración de la AFM₁ (6).

El paso de la AFM₁ de la leche al queso es complejo debido a la gran diversidad de procesos de ela-

boración y conservación, pero existe la tendencia a dividirse en una proporción 40:60 entre el cuajo y el suero en leche (7).

En México se han realizado algunos estudios para conocer la incidencia de la AFM₁ en leche fluida de vaca (8,9,10,11), en leche en polvo (9) no existiendo información en productos lácteos como queso y yogurt. En caso similar de ausencia de información se encuentra la leche y el queso de cabra, por lo que el objetivo de este estudio fue conocer el nivel de aflatoxina M₁ en leche y queso de cabra que se producen en Apaseo El Grande, Guanajuato, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

Se colectaron muestras de 1 litro de leche de cabra, procedentes de cinco unidades de producción caprina (Mat, Pio, Col, Pas y Top) ubicadas en la región de Apaseo El Grande, Guanajuato, México, durante el periodo comprendido de julio de 2008 a junio de 2009, con una frecuencia mensual resultando 12 muestras por unidad productiva, haciendo un total de 60 muestras, para determinar el contenido de aflatoxina M₁. La leche se transportó refrigerada al laboratorio en frascos de plástico y se almacenó a 4°C hasta su análisis. Todas las muestras fueron tomadas de los tanques de colecta bajo las pautas establecidas en la guía para el muestreo de leche y productos lácteos (12).

El muestreo de quesos se realizó siguiendo un diseño de muestreo de aceptación para la inspección por atributos (13), considerando un tamaño de lote de 3000 unidades, con un plan de muestreo simple y nivel de inspección especial S 4 (pruebas destructivas), con lo que se estimó el tamaño de la muestra (n=20). El nivel de calidad aceptable se estableció en 0.1% determinándose un Ac=0, Re=1. Las muestras de 250 g de queso se tomaron de una de las unidades de producción caprina.

Extracción y purificación de la AFM₁

Leche. Se realizó de acuerdo a lo establecido en el método oficial propuesto por la AOAC(14). Las muestras de leche fueron descremadas mediante centrifugado refrigerado a 3000 rpm por 5 minutos. La Aflatoxina M₁ se extrajo de la leche mediante una columna de fase sólida C18 acondicionada con metanol y agua, lavada con éter dietílico sobre otra columna de sílica gel y eluida con diclorometano metanol (95:5 v/v).

Queso. La extracción se realizó según lo establecido por la AOAC (15). La AFM₁ fue extraída del que-

so mediante cloroformo por agitación mecánica. Previamente filtrada se purificó en una columna empacada con sílica gel activada al 1% y sulfato de sodio anhidro, mediante un lavado con tolueno-acido acético (9:1) seguido de un lavado con hexano y otro de hexano-éter-acetonitrilo (50:30:20), la muestra se eluyó con cloroformo-acetona (8:2).

El eluato clorofórmico-acetona se rotoevaporó casi a sequedad bajo presión reducida a una temperatura de 30°C, el residuo se termina de secar bajo una corriente de nitrógeno (99.999%).

Derivatización. La aflatoxina M₁ se derivatizó con ácido trifluoroacético. Método AOAC 986-16 (14) Al residuo seco se le adicionaron 100 µL de hexano, posteriormente se agregaron 50 µL de ácido trifluoroacético (TFA) y se colocaron en baño de agua a 40°C durante 30 minutos. Una vez transcurrido este lapso de tiempo se evaporó bajo nitrógeno (99.999%). El residuo se resuspendió en 500 µL de la fase móvil antes de someterlo a la cromatografía de líquidos.

Análisis cromatográfico. Se utilizó un detector de fluorescencia (LaCrom-7480) con longitud de onda de excitación y emisión de 365 y 425 nm respectivamente; acoplado a un cromatógrafo de líquidos de alta resolución Merck-Hitachi, empleando una columna fase reversa C 18 (Lichrocart 100).

La fase móvil empleada fue metanol-acetonitrilo-agua (20:20:60) a flujo continuo de 1 mL/min. El volumen de inyección de la muestra y el patrón fue de 50 µL.

Los cromatogramas fueron registrados usando una interfase Perkin Elmer NCI 900 y procesados con el software Totalchrom versión 6.2.1.

Identificación y cuantificación. La preparación de la solución patrón de AFM₁ (Sigma-Aldrich) se realizó bajo los preceptos recomendados por la AOAC en el método oficial 971.22 (16).

La concentración de la aflatoxina M₁ en la solución de trabajo se corrigió empleándose un espectrofotómetro Beckman Coulter Dv 650 ajustado a una densidad óptica a 350 nm, empleando como blanco la mezcla de benceno – acetonitrilo. La evaluación de desempeño del método se realizó a través del recobrado, limite de detección y linealidad según Pérez y colaboradores durante la determinación de AFM₁ en leche (8).

Análisis estadístico. Estadística descriptiva. Estadísticos de resumen univariados (media aritmética, desviación estándar, mínimo y máximo) para las variables utilizadas (aflatoxina M₁).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las condiciones cromatográficas permitieron obtener un pico definido para la aflatoxina M_1 , tanto para el patrón como para las muestras, lo que permitió evaluar las características de desempeño del método. El tiempo de retención para la Aflatoxina M_1 fue de 3.13 ± 0.10 minutos (Figura 1). La curva de calibración ($Y=103281x - 5948.7$) mostró una linealidad significativa ($p < 0.05$) y un coeficiente de determinación de 0.9982. Los límites de detección y cuantificación fueron 26.5 y 30.1 ng μL^{-1} respectivamente. El recobrado de la AFM₁ en leche fue de 91% para un nivel de 40 $\mu\text{g Kg}^{-1}$, con una precisión de 5%.

La aflatoxina M_1 se encontró presente en 18 (30%) de las 60 muestras de leche de cabra examinadas. Los niveles de contaminación variaron en los diferentes meses, no detectándose en los meses de julio, agosto, noviembre y diciembre del 2008, ni en junio

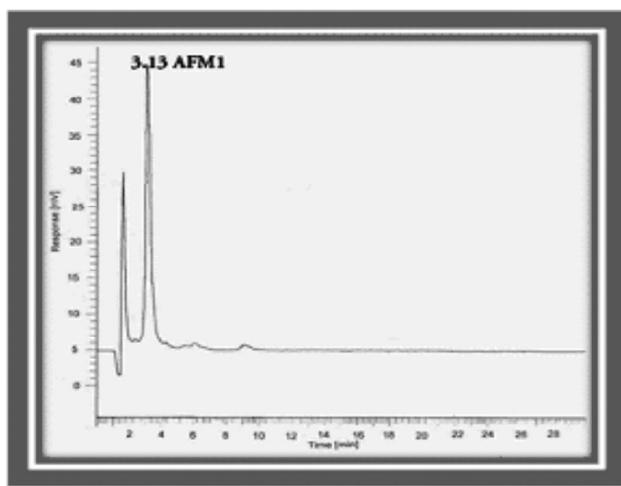


FIGURA 1. Perfil cromatográfico obtenido por el método para el patrón de AFM₁ (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) / *Chromatographic profile obtained by the standard method for AFM₁ (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$).*

de 2009. Los meses con mayor frecuencia (4 muestras de 5), fueron marzo y octubre con intervalos de 0.29 a 1.54 y 0.02 a 0.81 $\mu\text{g Kg}^{-1}$. El valor de la mediana mayor fue encontrada en el mes de marzo (0.87 $\mu\text{g Kg}^{-1}$). Estos resultados indican una ingesta de alimento con contenidos elevados de AFB₁.

El 8.3% de las muestras analizadas presentaron niveles por arriba del LMR establecido de 0.5 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ por el Codex Alimentarius (3), FDA de los Estados Unidos (17) y la Norma Oficial Mexicana (13) (Tabla 1). Las muestras que presentaron contenidos superiores a los permitidos por la normatividad mexicana pertenecen a tres de las unidades productivas, siendo la denominada Pio, la que presentó un 58% de muestras con presencia de aflatoxina M_1 , de las cuales el 30% se encuentra en niveles superiores al límite máximo establecido por la comunidad Europea (0.05 $\mu\text{g Kg}^{-1}$).

Los valores de las medianas, mínimos y máximos de los contenidos de aflatoxina M_1 ($\mu\text{g kg}^{-1}$) en muestras de leches de cabra, por unidad productiva se muestran en la Tabla 2. Las concentraciones de AFM₁ variaron de 0.01 a 1.61 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ los valores de las medianas fluctuaron de 0.12 a 0.59 $\mu\text{g Kg}^{-1}$, el valor máximo lo presentó, la unidad productiva denominada Pio (1.61 $\mu\text{g Kg}^{-1}$), seguida de denominada Pas (1.54 $\mu\text{g Kg}^{-1}$).

La incidencia de AFM₁ en leche de cabra observada en el presente estudio (30%), está por debajo de los descritos en otros trabajos (18-21); sin embargo los niveles encontrados son muy superiores a los encontrados por estos mismo autores, que reportan valores de AFM₁ en leche inferiores a 0.05 Kg^{-1} en todas las muestras estudiadas en Italia (22-23), 0.011 y 0.161 $\mu\text{g L}^{-1}$ en Brasil (20). Los estudios anteriormente mencionados hacen referencia que los niveles encontrados de AFM₁ en leche de cabra no tienen significado como factor de riesgo para los humanos, en tanto que en este trabajo el 21.6% de las muestras presen-

TABLA 1. Frecuencia de incidencia de AFM₁ en leche de cabra procedente de Apaseo, Guanajuato. / *Frequency of occurrence of AFM₁ in goat milk from Apaseo, Guanajuato*

Unidad productiva	Nd-0.05 $\mu\text{g.kg}^{-1}$	0.05 – 0.49 $\mu\text{g.kg}^{-1}$	> 0.5 $\mu\text{g.kg}^{-1}$
Mat (n=12)	10	1	1
Pio (n=12)	8	1	3
Col (n=12)	9	3	0
Pas (n=12)	11	0	1
Top (n=12)	9	3	0
SUMA	47	8	5
Incidencia %	78.3	13.3	8.33

TABLA 2. Valores de las medianas, mínimos y máximos de los contenidos de aflatoxina M_1 ($\mu\text{g kg}^{-1}$) en muestras de leches de cabra./ *Mean, Minimum and Maximum values of aflatoxin M_1 concentration ($\mu\text{g kg}^{-1}$) in goat milk sample*

	Mediana	Mínimo	Máximo
Mat	0.59	<LD	0.81
Pio	0.41	<LD	1.61
Col	0.06	<LD	0.42
Pas	0.12	<LD	1.54
Top	0.03	<LD	0.24

LD 0.221 $\mu\text{g kg}^{-1}$

taron niveles superiores a 0.05 $\mu\text{g Kg}^{-1}$, con 8.3% de valores por arriba de 0.5 $\mu\text{g kg}^{-1}$, lo que corrobora que los animales están expuesto a concentraciones elevadas de alfatoxina B1 en el concentrado.

Los resultados encontrados en las muestras de queso de cabra permiten observar que 3 de ellas presentaron algún nivel de AFM₁, con un valor máximo de 0.23 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ y un mínimo de 0.1 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ (Tabla 3), lo que representa un 15% de incidencia con valores no significativos en cuestiones de salud pública. La incidencia en esta investigación es similar a la informada para quesos de cabra en Italia (24-25); sin embargo los valores encontrados en quesos de cabra italianos oscilaron entre 19 a 200 ng/kg (25), es decir hasta 10 veces el valor máximo encontrado en el presente trabajo. En otros estudios realizados en quesos producidos en Turquía, se obtuvieron valores mayores a los de este estudio; el valor máximo fue 860 ng Kg^{-1} , (26).

La Norma Mexicana sobre quesos frescos, madurados y procesados no tiene nivel máximo permitido para la AFM₁ explícito; sin embargo establece en el inciso 6.1 que la leche con que se elaboran estos productos debe cumplir con las especificaciones sanitarias marcadas en la norma de leche pasteurizada (27). Sin embargo, al considerar el nivel de tolerancia de AFM₁ en queso (0.25 $\mu\text{g Kg}^{-1}$), establecido por algunos países como Australia, Honduras, Suiza y Turquía (28), los resultados de este trabajo indican que todas las muestras están por debajo de este límite.

TABLA 3. Presencia de aflatoxina M_1 en quesos de cabra en Apaseo, Guanajuato./ *Occurrence of aflatoxin M_1 in goat cheese in Apaseo, Guanajuato*

Número de muestras			Contaminación ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	
Analizadas	Positivas	Negativas	Media	Intervalo
20	3	17	0.14	0.1 – 0.23

Finalmente, de acuerdo al criterio de nivel de calidad aceptable propuesto en el diseño experimental, el lote de quesos de cabra cumple con la especificación para ser aceptado, al no implicar ningún riesgo para la salud.

Los resultados de este estudio indican la necesidad de elevar los niveles de conocimiento sobre la inocuidad de los productos lácteos respecto a la contaminación con AFM₁, implicando un mayor énfasis en la aplicación de las buenas prácticas en el almacenamiento de alimentos de animales en México.

REFERENCIAS

1. Van Egmond HP. Current situation on regulations for mycotoxins. Overview of tolerances and status of standard methods of sampling and analysis. *Food Additives & Contaminants*. 1989;6(2):139-88.
2. Martins ML, Martins HM. Aflatoxin M1 in raw and ultra high temperature-treated milk commercialized in Portugal. *Food Additives & Contaminants*. 2000;17(10):871-4.
3. IPCS. Aflatoxin M1. En: Safety evaluation of certain mycotoxins in food. FAO Food and Nutrition PAPER 74, WHO Food Additives SERIES 47. 2001:1-102.
4. IARC. Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene En: IARC Monographs on the evaluations of carcinogenic risks to humans. 2002;Vol 82.
5. Mazzette A, Decandia M, Acciaro M, Fenu A, Díaz Francesconi A, Battacone G. Excretion of aflatoxin M1 in milk of goats fed diet contaminated by aflatoxin B1. *Ital J Anim Sci*. 2009;8(2):631-3.
6. Galvano F, Galofaro V, Galvano G. Occurrence and stability of aflatoxin M1 in milk and milk products: A worldwide review. *J Food Prot*. 1996;59:1079-90.
7. Oruc HH, Cibik R, Yilmaz E, Gunes E. Fate of aflatoxin M1 in kashar cheese. *J Food Safety*. 2007;27(1):82-90.

8. Pérez J, Gutiérrez R, Vega S, Díaz G, Urbán G, Coronado M, et al. Ocurrencia de Aflatoxina M1 en leches crudas, ultrapasteurizada y orgánica producidas y comercializadas en el altiplano Mexicano. *Rev Salud Anim.* 2008;30(2):103-9.
9. Esqueda M, Higuera-Ciapara I, Nieblas J. Aflatoxina M1 en leche comercializada en Hermosillo, Sonora, México. *Rev Mex Mic* 1995;11:179-83.
10. Carvajal M, Bolaños A, Rojo F, Méndez I. Aflatoxin M1 in pasteurized and ultrapasteurized milk with different fat content in Mexico. *J Food Protection.* 2003;66(10):1885-92.
11. Cordova A, Oaxaca J, Lang G, Suárez S, Campos V, Betancourt S, et al. Identification of M1 aflatoxin in milk of the collector tank. *J Ani Vet Advances.* 2007;6(2):194-7.
12. COFOCALEC. Sistema producto leche-Producto leche-Alimentos-Lácteos. Guía para el muestreo de leche y productos lácteos. México. Norma Mexicana NMX-F-718-COFOCALEC-2006 2006:P. 31.
13. NOM. Productos y servicios. Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado. Especificaciones sanitarias. Secretaría de Salud. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 23 de octubre de 2002. Norma Oficial Mexicana. 2002;NOM- 184 SSA1-2002.
14. AOAC. Aflatoxins M1 y M2 in fluid milk. Liquid Chromatographic Method 986.16. In: Official Method of Analysis of AOAC International 17th Edition Volume II Ed Patricia Cinnif Cap 49(49306 E) Natural Toxins Peter M Scott P 40-41, 2000.
15. AOAC. Aflatoxin M1 in milk and Cheese. Method 980.21. In: Official Method of Analysis of AOAC International 16th Edition Volume II Food composition; additives; natural contaminants Cap 49(49302 C y D) Natural Toxins P 37-38. 2000.
16. AOAC. Standards for Aflatoxins. Method 971.22. In: Official Method of Analysis of AOAC International 17th Edition Volume II Food composition; additives; natural contaminants Cap 49(49203 B y C) Natural Toxins P 4-5. 2000.
17. FDA. Compliance Policy Guides Section. (7106.210, Section 527.400 Whole Milk, Low Fat Skim Milk-Aflatoxin M1). Office of Regulatory Affairs, Washington D.C. 1996:p.219.
18. Ghanem I, Orfi M. Aflatoxin M1 in raw, pasteurized and powdered milk available in the Syrian market. *Food Control.* 2009;20(6):603-5.
19. Motawee M, Bauer J, McMahon D. Survey of aflatoxina M1 in cow, goat, buffalo and camel milks in Ismailia – Egypt. *Bull Environ Contam Toxicol* 2009;83:766-9.
20. Oliveira C, Ferraz O. Occurrence of aflatoxin M1 in pasteurised, UHT milk and milk powder from goat origin *Food Control.* 2007;18(4):375-8.
21. Özdemir M. Determination of aflatoxina M1 level in goat milk consumed in Kilis province. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2007;54(2):99-103.
22. Saccà E, Boscolo D, Vallati A, Ventura W, Bigaran F, Piasentier E. Aflatoxin occurrence in milk and supplied concentrates of goat farms of north-eastern Italy. *J Sci Food Agricult.* 2009;89(3):487-93.
23. Viridis S, Corgiolu G, Scarano C, Pilo A, De Santi E. Occurrence of aflatoxin M1 in tank bulk goat milk and ripened goat cheese. *Food Control.* 2008;19(1):44-9.
24. Montagna M, Napoli C, De Giglio O, Iatta R, Barbuti G. Occurrence of aflatoxin M1 in dairy products in Southern Italy. *Int J Mol Sci.* 9. 2008;9:2614-21.
25. Finoli C, Vecchio A. Aflatoxin M1 in goat dairy products. *Microbiologie Aliments Nutrition.* 1997;15(1):47-52.
26. Ardic M, Karakaya Y, Atasever M, Adiguzel G. Aflatoxin M1 levels of Turkish white brined cheese. *Food Control* 2009;20(3):196-9.
27. NOM. Norma Oficial Mexicana Bienes y servicios. Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias. Secretaría de Salud. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 23 de febrero de 1996. NOM-121 SSA1-1994 1994.
28. Colak H, Hampikyan H, Ulusoy B. Comparison of a competitive ELISA with an HPLC method for the determination of aflatoxin M1 in turkish white, kasar and tulum cheeses. *Eur Food Res Technol.* 2006;223(6):719-23.

(Recibido 20-11-2009; Aceptado 22-1-2010)