

NIVELES DE AFLATOXINA M1 EN LECHE CRUDA Y PASTEURIZADA COMERCIALIZADA EN LA ZONA METROPOLITANA DE GUADALAJARA, MÉXICO

Patricia Landeros, M. Noa, Yolanda López, Delia G. González, Elizabeth Noa, M. Real, C. Juárez, Miriam S. Medina

Departamento de Salud Pública. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA). Universidad de Guadalajara. Mexico

RESUMEN: Entre los indicadores de calidad higiénico sanitaria de la leche en México, se encuentra el nivel de contaminación con aflatoxina M1 (AFM1), proveniente de animales que han consumido alimento contaminado con aflatoxina B1 (AFB1). Los tratamientos térmicos como la pasteurización, generalmente no disminuyen la concentración de AFM1, por lo que en el presente trabajo se estudió la presencia de AFM1 en leche cruda de vaca de 10 centros de acopio (n=50) y 7 marcas de leche pasteurizada (n=84) comercializadas en la zona metropolitana de Guadalajara, Jalisco, México. La determinación de AFM1 se realizó mediante un juego de reactivos tipo ELISA competitivo- directo (Agraquant® Aflatoxina M₁, Romer Labs). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante una prueba de ANOVA de una sola vía con el programa Sigma Stat 3.0. Se detectó AFM1 en el 100% de las muestras estudiadas, con niveles en el rango de < 0.005 a 0.100 µg/L y de < 0.005 a 0.637 µg/L en leche cruda y pasteurizada respectivamente. El 18.6 % (25/134) de las muestras superaron el LMR establecido por la Unión Europea (0.05 µg/kg), presentándose porcentajes en leches cruda y pasteurizada de 0.7% (1/134) y 17.9% (24/134) respectivamente, pero sólo el 0.7 % (1/134) excedió el límite de AFM1 establecido para México en la NOM-243-SSA1-2010, que es de 0.5 µg/kg. Se observaron diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) entre los meses analizados, con los niveles mayores en el mes de diciembre, pero no se encontraron diferencias entre centros de acopio (leche cruda) y tampoco entre marcas de leche pasteurizada.

(Palabras clave: leche; aflatoxina M1; ELISA; México)

AFLATOXIN M1 LEVELS IN RAW AND PASTEURIZED MILK PRODUCED IN GUADALAJARA, MEXICO

ABSTRACT: Aflatoxin M1 (AFM1) is a milk hygiene quality indicator established in Mexico. Aflatoxin M1 is a metabolite of aflatoxin B1 (AFB1), becoming from contaminated feed. The thermal treatments usually applied to raw milk did not reduce the concentrations on AFM1 in milk. The aim of the present work was to conduct a screening of AFM1 I raw (n=50) collected from raw milk collecting facilities and 7 pasteurized milk brand (n=84) samples. All the samples tested were both produced in Jalisco State and commercialized in Guadalajara, Mexico. The analyses were performed using the competitive direct ELISA kit Agraquant® Aflatoxin M₁ (Romer Labs). Statistical analysis was performed using a one-way ANOVA by Sigma Stat 3.0 program. AFM1 was found in 100% of the tested samples, ranging from < 0.005 to 0.100 µg/L in raw milk, and from < 0.005 to 0.637 µg in pasteurized milk. A total 18.6% (25/134) samples showed levels above Maximum Residue Limit (MRL) established by the European Community (0.05 µg/kg), 0.7% (1/134) for raw and 17.9% (24/134) for pasteurized milk. Only 0.7% (1/134) of the tested samples exceeded this MRL established in Mexico by NOM-243-SSA1-2010 which is 0.5 µg/L AFM1. Statistical differences were found (p<0.05) between sampling months; the highest level was detected in December, while no differences were detected among milk collecting facilities and either among pasteurized milk brands.

(Key words: milk; aflatoxin M1; ELISA, Mexico)

INTRODUCCIÓN

Las aflatoxinas son metabolitos tóxicos, inmunosupresivos y carcinógenos, producidas por diferentes especies de hongos del género *Aspergillus*, particularmente *A. flavus* y *A. parasiticus*, y se encuentran como contaminantes naturales en alimentos (1). La aflatoxina B1 (AFB1) es considerada el compuesto más tóxico producido por estos hongos; en el hígado esta micotoxina es biotransformada por el citocromo P450 microsomal en su metabolito hidroxilado: la aflatoxina M1 (AFM1), que luego se excreta en la leche de animales lactando que han consumido alimentos contaminados con AFB1 (2).

La Agencia Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC) ha reportado a la AFB1 y AFM1, como compuestos carcinógenos para seres humanos (3). La presencia de AFM1 en la leche, constituye un riesgo para la población, particularmente en niños debido a la importancia de este producto en su alimentación (4), y a que son considerados más susceptibles a sus efectos adversos, ya que su capacidad de biotransformación de los compuestos carcinógenos es generalmente más lenta que en adultos (5).

La Unión Europea ha establecido el límite máximo de residuos (LMR) para la AFM1 de 0.05 µg/kg en leche fluida (6), mientras que en México las normas NMX-F-700-COFOCALEC-2004 (7) y NOM-243-SSA1-2010 (8), para leche cruda y pasteurizada respectivamente, especifican el límite máximo de 0.5 µg/L.

Estudios realizados por Reyes *et al.* (9), en el estado de Jalisco, México, mostraron contaminación por AFM1 en leche cruda en el 80 % de las muestras, detectándose valores en un rango de 0.006 a 0.065 µg/L, con valores promedio de 0.023 µg/L. En Jalisco, que es el estado de mayor producción de leche en México existe poca información sobre la concentración de AFM1 en leche por lo que el objetivo del presente estudio fue determinar los niveles de aflatoxina M1 en leche cruda y pasteurizada, comercializadas en la zona metropolitana de Guadalajara, Jalisco, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

El muestreo se llevó a cabo durante 2008, con una frecuencia mensual. Se recolectaron muestras de leche cruda (n=50) de 10 centros de acopio (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10), de enero a mayo, además se analizaron 7 marcas de leche pasteurizadas (A, B, C, D, E, F, G), obtenidas de diferentes tiendas de autoservicio de la zona metropolitana de Guadalajara, Jalisco, México, de enero a diciembre (n= 84). Las muestras se transportaron en una hielera, en frío (3-5°C) al laboratorio y

se analizaron dentro de las 24 horas siguientes a su recolección. El muestreo se realizó de acuerdo a lo establecido en la Norma Mexicana NMX-F-718-COFOCALEC-2006 (10).

Las muestras se trasladaron al Laboratorio de Micotoxicología Alimentaria del Departamento de Salud Pública del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) de la Universidad de Guadalajara, donde se realizó la determinación de AFM1 mediante la técnica de ELISA de tipo competitivo-directo (Agraquant® Aflatoxina M1, Romer Labs), cuyo límite de detección es de 0.005 µg/L.

Para la detección y cuantificación de AFM1 por ELISA, la leche se homogenizó manualmente a 37°C en baño María; posteriormente se tomaron 50 mL en tubos desechables de polipropileno, se colocaron en una centrífuga refrigerada marca Sigma modelo 2-16 K, y se centrifugaron durante 10 min a 3000 xg previo enfriamiento de la muestra a 4°C durante 30 min. Se procedió a filtrar la leche para separar la grasa. Posteriormente, se adicionaron a los pocillos 100 µL de los estándares y de las muestras de leche se incubaron en agitación a 100 rpm durante 60 min a temperatura ambiente. Después de lavar (tres veces), se adicionaron 50 µL del conjugado a cada pocillo y se incubó nuevamente en agitación a 100 rpm durante 30 min a temperatura ambiente. Luego de descartar el contenido, se lavaron nuevamente los pocillos y se agregaron 100 µL de solución de sustrato en cada pocillo y se incubaron en oscuridad durante 40 min a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 100 µL de la solución stop y se procedió a determinar la densidad óptica (DO) en un lector de Elisa (Biotek 800) utilizando los filtros de 450 y 630 nm para lectura y referencia, respectivamente. Las concentraciones fueron calculadas por extrapolación de la DO con la respectiva curva de calibración. Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante una prueba de ANOVA de una sola vía con el programa Sigma Stat 3.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se encontró la presencia de AFM1 en el 100% de las muestras estudiadas, en la Tabla 1, se presenta el contenido de AFM1, en diferentes rangos, se observa que el 18.6 % (25/134) del total de las muestras presentaron niveles superiores al LMR establecido por la Unión Europea (0.05 µg/kg), presentándose porcentajes en leche cruda y pasteurizada de 0.7 % (1/134) y de 17.9 % (24/134) respectivamente. En relación al LMR establecido en México, por la NOM-243-SSA1-2010 (8), sólo el 0.7 % (1/134) de las muestras excedió el límite que es de 0.5 µg/L de AFM1.

TABLA 1. Presencia y distribución de AFM1 ($\mu\text{g/L}$) en leches cruda y pasteurizada./ *Presence and distribution of AFM1 ($\mu\text{g/L}$) in raw and pasteurized milk*

	AFM1 ($\mu\text{g/L}$)			
	Rango			
	< 0.005	0.005 -0.05	0.051- 0.5	> 0.5
Leche cruda (n=50)	4	45	1	0
Leche pasteurizada (n=84)	5	55	23	1
Total	9	100	24	1
Porcentajes Totales (%)	6.7	74.6	17.9	0.7

En otros países como Irán (11), se han encontrado concentraciones de AFM1 en leche pasteurizada, con rangos de 0.0058 a 0.5285 $\mu\text{g/L}$, similares a las detectadas en nuestro estudio; sin embargo ellos reportan una incidencia mayor (26.7%) de muestras por encima del LMR establecido por la Unión Europea, en Turquía (12), reportaron una incidencia del 88.23 % con niveles de 0.0052 a 0.1276 $\mu\text{g/L}$.

Los resultados del presente estudio difieren de lo reportado por Pérez *et al.*, (13), donde mencionan una incidencia de 59 % de contaminación por AFM1 en leches cruda, ultrapasteurizada y orgánica, en el Altiplano Mexicano, excediendo en todos los casos el LMR propuesto por la Unión Europea. Si bien el porcentaje de muestras (18.6 %), de nuestra investigación, que exceden el LMR de AFM1 establecido por la Unión Europea es inferior al encontrado en otros estudios (11, 13), la presencia de esta micotoxina, implica un riesgo al consumidor por ser considerada un compuesto carcinógeno en humanos.

En Argentina, López *et al.* (5), reportó la presencia de AFM1 en el 23 % de muestras estudiadas (leche cruda, en polvo y pasteurizada), en todos los casos los niveles fueron inferiores a los permitidos para este producto.

Los niveles de AFM1 reportados en diferentes estudios muestran amplias discrepancias, lo cual puede deberse a diversos factores como los sistemas de alimentación, factores propios de los animales (raza, producción de leche, individualidad de los animales, etc.) y a las condiciones ambientales, así como a los procedimientos analíticos utilizados (9).

En la zona metropolitana de Guadalajara, Jalisco, la leche cruda recolectada de los centros de acopio (No. 1 al 10), es utilizada como materia prima, por la planta que produce la marca de leche pasteurizada identificada en nuestro estudio como marca A. De las muestras de leche cruda analizadas, durante los meses de enero a mayo de 2008, la contaminación por

AFM1 se presentó en niveles en un rango de <0.005 a 0.100 $\mu\text{g/L}$, encontrándose únicamente un centro de acopio (No. 2) por arriba del LMR establecido por la Unión Europea, el promedio general determinado en la leche cruda proveniente de los diez centros de acopio, fue 0.019 $\mu\text{g/L}$, niveles similares al promedio (0.020 $\mu\text{g/L}$) encontrado en la marca A de leche pasteurizada, en este mismo periodo (Tabla 2), lo cual indica que, procesos térmicos como la pasteurización tanto lenta (63°C, 30 min), como rápida (77°C, 16 seg) no afectan la concentración de la AFM1 (14), por lo que este no sería un tratamiento indicado para eliminar o disminuir la contaminación por AFM1 de la leche y sus productos.

Respecto a la leche pasteurizada, los resultados se muestran en la Tabla 3, se encontraron concentraciones de AFM1 en un rango de <0.005 a 0.637 $\mu\text{g/L}$. De acuerdo a los valores promedio de AFM1 encontrados, el centro de acopio No. 2 y las marcas B (0.054 $\mu\text{g/L}$), E (0.084 $\mu\text{g/L}$) y F (0.090 $\mu\text{g/L}$), de leche cruda y pasteurizada respectivamente, excedieron el LMR establecido por la Unión Europea (0.05 $\mu\text{g/L}$).

Al relacionar la época del año con los niveles de AFM1 detectados en las diferentes marcas de leche, se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los meses analizados, con niveles promedio (0.250 $\mu\text{g/L}$) de AFM1 mayores en el mes de diciembre, excediendo el LMR establecido por la Unión Europea (Tabla 4). Resultados similares fueron reportados en Tailandia (15), donde se encontró contaminación con AFM1 en el 100% de las muestras analizadas, detectándose las concentraciones más altas en la época de invierno, aunque dentro de los límites máximos permitidos por Estados Unidos (0.5 $\mu\text{g/L}$), así mismo en Irán (16), la incidencia de AFM1 en leche pasteurizada fue de 94.49%, con niveles mayores en invierno, con valores promedio de 0.022 $\mu\text{g/L}$ de AFM1.

En diversos países se ha reportado que la mayor incidencia de aflatoxina M1 en leche y productos lácteos aparecen en la época de invierno (17; 18), esto se explica porque se consume más alimento concentra-

TABLA 2. Niveles de AFM1 ($\mu\text{g/L}$) determinados en leche cruda, (enero a mayo de 2008)./ *Levels of AFM1 ($\mu\text{g/L}$) in raw milk (January- May 2008)*

	AFM1 ($\mu\text{g/L}$)			
	No.	Promedio	Rango	\pm SD
Centros de Acopio (Leche cruda)	1	0.016	< 0.005- 0.028	0.009
	2	0.052	< 0.005 - 0.100	0.036
	3	0.014	< 0.005 - 0.023	0.008
	4	0.016	< 0.005 - 0.031	0.010
	5	0.017	0.011 - 0.030	0.009
	6	0.017	0.008 - 0.023	0.006
	7	0.014	0.007 - 0.021	0.007
	8	0.016	0.013 - 0.018	0.002
	9	0.015	0.006 - 0.028	0.009
	10	0.018	0.010 - 0.027	0.008
	n = 50	0.019 *		
Leche Pasteurizada	Marca A	0.020	0.013 – 0.026	0.005

SD: desviación estándar/ *Standard deviation** Promedio de AFM1 en leche cruda (n=50)/ *Average value for raw milk (n=50)***TABLA 3.** Niveles de AFM1 determinados en marcas de leche pasteurizada (enero a diciembre de 2008)./ *Levels of AFM1 in pasteurized milk brands (January- December 2008)*

Marcas de Leche	AFM1 ($\mu\text{g/L}$)			
	Muestras analizadas	Promedio	Rango	\pm SD
A	12	0.042	0.013 – 0.102	0.031
B	12	0.054	0.010 – 0.260	0.064
C	12	0.032	0.011 – 0.127	0.029
D	12	0.034	0.008 – 0.072	0.020
E	12	0.084	< 0.005 – 0.439	0.290
F	12	0.090	< 0.005 – 0.637	0.168
G	12	0.039	< 0.005 – 0.120	0.043

SD: desviación estándar/ *Standard deviation*

do debido al déficit de pasto en esa temporada (19). Estudios realizados en México han reportado la presencia de AFB1 en alimento destinado al consumo animal (20).

Los resultados indican que, a pesar de que se detectó contaminación por AFM1 en el 100% de las muestras analizadas, los niveles encontrados en su mayoría, fueron inferiores al límite máximo permitido por la Norma Oficial Mexicana (indicando ser apto este producto para consumo humano).

La mayor o menor proporción entre la AFB1 en las raciones para animales y la AFM1 excretada en la le-

che y reportadas por diferentes autores, puede estar influenciada por la raza, la cantidad y duración del consumo del alimento contaminado y el estado de salud del animal (14); sin embargo, el denominador común es la presencia de AFB1 en el alimento, por lo que sería recomendable controlar los niveles de AFB1 en el alimento destinado a consumo de animales productores de leche, tanto en campo, almacenamiento y procesado. De igual forma, es importante realizar un seguimiento sistemático de la contaminación de la leche y sus productos, para asegurar que los niveles de AFM1 no excedan los LMR establecidos por la normatividad.

TABLA 4. Niveles de AFM1 detectados en 7 marcas de leche pasteurizada (enero a diciembre de 2008./ *AFM1 levels detected in 7 brands of pasteurized milk (January- December 2008)*)

Meses	AFM1 (µg/L)		
	Promedio	Rango	± SD
Enero	0.021 ^b	0.011 – 0.024	0.004
Febrero	0.018 ^b	0.008 – 0.029	0.006
Marzo	0.010 ^b	< 0.005 - 0.026	0.006
Abril	0.013 ^b	< 0.005 – 0.031	0.009
Mayo	0.019 ^b	0.015 – 0.044	0.010
Junio	0.026 ^b	0.012 – 0.033	0.007
Julio	0.018 ^b	0.011 – 0.041	0.010
Agosto	0.058 ^b	0.015 – 0.109	0.026
Septiembre	0.061 ^b	0.031 – 0.102	0.025
Octubre	0.079 ^{ab}	0.026 – 0.192	0.055
Noviembre	0.067 ^{ab}	0.038 – 0.106	0.026
Diciembre	0.250 ^a	0.072 – 0.637	0.197

Letras iguales no son significativas para $p < 0.05$

SD: desviación estándar/ Standard deviation

REFERENCIAS

- Yapar K, Elmali M, Kart A, Yaman H. Aflatoxin M1 levels in different type of cheese products produced in Turkey. *Medycyna Wet.* 2008;64(1):53-55.
- Battacone G, Nudda A, Palomba M, Pascale M, Nicolussi P, Pulina G. Transfer of aflatoxin B1 from feed to milk and from milk to curd and whey in dairy sheep fed artificially contaminated concentrates. *J Dairy Sci.* 2005;88(9):3063-3069.
- IARC. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. Summary of data reported and evaluation. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk to Humans. International Agency for Research on Cancer. Lyon, France 2002:82.
- Prandini A, Tansini G, Sigolo S, Filippi L, Laporta M, Piva, G. On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food Chem Toxicol.* 2009;47(5):984-991.
- López C, Ramos L, Ramadán S, Bulacio L. Presence of aflatoxin M1 in milk for human consumption in Argentina. *Food Control* 2003;14:31-34.
- European Commission. Commission Regulation (EC) No. 1881/2006 of 19 December 2006. OJEU. L364/5-24.
- NMX-F-700-COFOCALEC-2004: Sistema producto leche- alimento lácteo- leche cruda de vaca: especificaciones fisicoquímicas, sanitarias y métodos de prueba.
- Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.
- Reyes W, Patricio S, Isaías V, Nathal M, De Lucas E, Rojo F. Aflatoxinas totales en raciones de bovinos y AFM1 en leche cruda obtenida en establos del estado de Jalisco, México. *Téc. Pec. Méx.* 2009;47(2):223-230.
- Norma Mexicana NMX-F-718-COFOCALEC-2006. Sistema producto leche-Producto leche-Alimentos- Lácteos- Guía para el muestreo de leche y productos lácteos. México.
- Falla AA. Assessment of aflatoxin M1 contamination in pasteurized and UHT milk marketed in central part of Iran. *Food Chem Toxicol.* 2010;48(3):988-991.
- Celik T, Sarimehmetoglu B, Küplülü Ö. Aflatoxin M1 contamination in pasteurized milk. *Vet Archiv.* 2005;75(1):57-65.
- Pérez J, Gutiérrez, R, Vega S, Díaz G, Urbán G, Coronado M, et al. Ocurrencia de aflatoxina M1 en leches cruda, ultrapasteurizada y orgánica

- producidas y comercializadas en el Altiplano Mexicano. *Rev. Salud Anim.* 2008;30(2):103-109.
14. Gimeno A. Aflatoxina M1 en la leche. Riesgo para la salud pública, prevención y control. *Alim Anim.* 2004;49:32-44.
15. Ruangwises S, Ruangwises N. Occurrence of aflatoxin M1 in pasteurized milk of the School Milk Project in Thailand. *J Food Prot.* 2009;72(8):1761-1763.
16. Mohammadian B, Khezri M, Ghasemipour N, Mafakheri Sh, Poorghafour Langroudi P. Aflatoxin M1 contamination of raw and pasteurized milk produced in Sanandaj, Iran. *Arch Razi Inst.* 2010;65(2):99-104.
17. Kamar, A. A study on the occurrence of aflatoxin M1 in raw milk produced in Sarab city of Iran. *Food Control.* 2005;16(7):593-599.
18. Tajkarimi M, Aliabadi-Sh F, Salah Nejad A, Poursoltani H, Motallebi A, Mahdavi H. Aflatoxin M₁ contamination in winter and summer milk in 14 states in Iran. *Food Control.* 2008;19:1033-1036.
19. Urban G, Pérez J, Martínez F, Salas J, Díaz G, Ramírez M, *et al.* Niveles de aflatoxina M1 en quesos frescos producidos en diferentes zonas de México. *Rev Salud Anim.* 2009;31(2):115-121.
20. Flores O, Hernández P, Vázquez M. Contaminación por micotoxinas en alimento balanceado y granos de uso pecuario en México en el año 2003. *Tec Pec Méx.* 2006;44(2):247-256.

(Recibido 27-12-2010; Aceptado 8-6-2011)