

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL**

**DETECCIÓN DE AFLATOXINA M<sub>1</sub> EN LECHEs FRESCAS  
COMERCIALIZADAS EN LA ZONA DEL VALLE DEL CAUCA  
(COLOMBIA) MEDIANTE LA TÉCNICA DE ELISA.**

**ANDREA DEL PILAR COMBITA PRIETO  
STEPHANIE MILDENBERG ORTIZ**

**TRABAJO DE GRADO  
Presentado como requisito parcial para optar el título de  
MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL**

**Bogotá, D. C  
Enero 14 de 2009**

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946.

**DETECCIÓN DE AFLATOXINA M<sub>1</sub> EN LECHEs FRESCAS  
COMERCIALIZADAS EN LA ZONA DEL VALLE DEL CAUCA  
(COLOMBIA) MEDIANTE LA TÉCNICA DE ELISA.**

**ANDREA DEL PILAR COMBITA PRIETO  
STEPHANIE MLDENBERG ORTIZ**

---

**Adriana Páez  
Directora**

---

**Janeth Arias Palacios  
Codirectora**

---

**Nadenka Melo  
Jurado 1**

---

**Sonia Buitrago  
Jurado 2**

**DETECCIÓN DE AFLATOXINA M<sub>1</sub> EN LECHEs FRESCAS  
COMERCIALIZADAS EN LA ZONA DEL VALLE DEL CAUCA  
(COLOMBIA) MEDIANTE LA TÉCNICA DE ELISA.**

**ANDREA DEL PILAR COMBITA PRIETO  
STEPHANIE MLDENBERG ORTIZ**

**APROBADO**

---

**Decana académica  
Dra. Ingrid Schuler  
Facultad de ciencias**

---

**Directora de carrera  
Dra. Janeth Arias  
Facultad de ciencias**

## **DEDICATORIA**

A Dios por ser el guía de nuestras vidas, el que siempre nos alienta y el que nunca nos desampara.

A nuestros padres y hermano quienes son el motor de nuestra vida, por que gracias al esfuerzo de ellos tuvimos la oportunidad de vivir la experiencia universitaria que nos ha ayudado a crecer a nivel personal y a ser las mujeres que somos hoy en día, formándonos así el carácter y el criterio necesario para seguir adelante y cumplir la tarea de ser alguien en la vida, mil gracias les damos por los consejos sabios y la dicha enorme de ser sus hijas.

A nuestros novios, por la motivación generada en nuestro estudio, por brindarnos su cariño y colaboración en los momentos que más los necesitamos. Gracias por estar a nuestro lado siempre.

Andrea y stephanie.

## **AGRADECIMIENTO**

Agradecimiento a la profesora Adriana Páez, docente de la Pontificia universidad Javeriana, directora de la investigación, por su valioso aporte, su incansable apoyo y sobre todo por confiar en nosotras desde el principio. Muchas gracias por habernos tenido en cuenta, apoyado y enseñado. Quedan cortas las palabras para agradecerle todo lo que hizo por nosotras y por ayudarnos a realizar tan importante trabajo.

Al Doctor José Moreno, investigador del ICA por haber creído en nosotras, apoyándonos y colaborándonos en la culminación de nuestra trabajo de grado.

A Victoria Gonzáles directora de la línea de diagnostico de Basic Farm por toda la colaboración, enseñanza y apoyo a la hora de realizar la parte practica del estudio, sin su asistencia este proyecto no hubiera podido realizarse.

A Hevert Castillo por brindarnos su amistad, colaboración y apoyo en todo momento, por guiarnos en su bella región y porque sin el no hubiera sido posible obtener las muestras, mil gracias por su preocupación.

A Juber Herrera por guiarnos, apoyarnos y prestarnos su colaboración brindándonos su conocimiento e información para facilitar esta investigación, gracias por tendernos la mano.

A las familias Combita Prieto y Mildenberg Ortiz, por el cariño, paciencia y apoyo en todo momento durante la realización de este proyecto.

QUE DIOS LES ATRIBUYA SUS ACTOS DE BUENA VOLUNTAD.  
“MUCHAS GRACIAS”

## TABLA DE CONTENIDO

	pag.
1. INTRODUCCIÓN	16
2. MARCO TEÓRICO	18
2.1 LAS MICOTOXINAS: CONCEPTO Y ORIGEN	18
2.2 LAS AFLATOXINAS: GENERALIDADES.	19
2.2.1 Estructura.	20
2.3 AFLATOXINA M <sub>1</sub>	21
2.3.1 Aspectos generales.	21
2.3.2 Actividad biológica.	22
2.3.3 La micotoxicosis.	23
2.3.4 Mecanismos de acción de las aflatoxinas en el sistema inmune.	25
2.3.5 Otros efectos patológicos	26
2.3.6 Dosis de aflatoxina: Mortalidad.	26
2.3.7 Metabolismo: Transformación y efecto de las aflatoxinas.	27
2.3.8 Condiciones favorables para la contaminación de aflatoxinas.	32
2.4 PRINCIPALES HONGOS PRODUCTORES DE MICOTOXINAS.	34
2.4.1 Orden <i>Moniliales</i> .	37
2.4.2 Familia <i>Moniliaceae</i> .	37
2.5 Presencia de aflatoxinas en leche y productos lácteos.	39

2.6 ESTABILIDAD DE LA AFM <sub>1</sub> EN PRODUCTOS LÁCTEOS.	41
2.7 LECHE FRESCA: GENERALIDADES Y DEFINICIÓN.	42
2.7.1 Propiedades físico-químicas de la leche.	44
2.7.2 Reacción química; el pH de la leche.	44
2.7.3 Microbiología de la leche.	45
2.7.4 Calidad de la leche cruda.	47
2.7.5 Requisitos de calidad que debe cumplir la leche cruda.	48
2.8 MARCO LEGAL DE LAS MICOTOXINAS.	49
2.8.1 Legislación sobre los niveles de aflatoxinas en productos lácteos.	51
2.9 MICOTOXINAS E INOCUIDAD DE ALIMENTOS.	52
2.10 LAS MICOTOXINAS Y SEGURIDAD ALIMENTARIA.	54
2.11 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE AFLATOXINA M1 EN LECHE	54
2.11.1 Técnica de Elisa.	56
2.11.2 Cromatografía de capa fina.	59
2.11.3 Columna de inmuno afinidad.	59
2.12 PROCEDIMIENTOS PARA REDUCIR LA PRESENCIA DE MICOTOXINAS.	60
2.13 DEGRADACIÓN DE LA AFLATOXINA M1 EN LA LECHE	63
2.14 IMPORTANCIA ECONÓMICA.	64
3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.	67

3.1 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.	67
3.2 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.	68
4. OBJETIVOS.	71
4.1 OBJETIVO GENERAL.	71
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	71
5. MATERIALES Y MÉTODOS.	72
5.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO Y TOMA DE MUESTRA.	72
5.2 PREPARACIÓN DE CONTROLES POSITIVOS.	74
5.3 ELABORACIÓN DE LA CURVA PATRÓN.	75
5.4 PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA.	76
5.5 CONSIDERACIONES GENERALES.	76
5.6 IMPLEMENTACIÓN DEL ENSAYO.	77
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	81
6.1 RESULTADOS DE LOS CONTROLES POSITIVOS.	81
6.2 RESULTADOS PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN.	84

6.3 RESULTADO DE CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINA M1 PARA CADA UNA DE LAS MUESTRAS TOMADAS.	86
7. CONCLUSIONES.	97
8. RECOMENDACIONES.	99
9. BIBLIOGRAFÍA	100
10. ANEXOS.	109

## ÍNDICE DE TABLAS

	pag.
Tabla 1. Dosis mínimas nocivas para diferentes aflatoxinas.	27
Tabla 2: Tipos de hongos productores de micotoxinas.	35
Tabla 3. Especies fúngicas que comúnmente están involucradas en la síntesis de toxinas	37
Tabla 4: niveles máximos de aflatoxinas permitidos en países con legislación.	51
Tabla 5. Denominación para cada hato.	73
Tabla 6. Resultados de absorbancia de las muestras fortificadas, lectura en multiescan a 450 nm.	81
Tabla 7: Resultados de absorbancia promedio entre replica y muestra, coeficiente de variación, % de absorbancia y concentración de micotoxina en ppt, de las muestras fortificadas.	82
Tabla 8. Resultados de absorbancia de las concentraciones estándar del Kit de Elisa RIDASCREEN Aflatoxin M130/15, lectura en multiescan a 450 nm.	84
Tabla 9: resultados de absorbancia promedio entre replica y muestra, coeficiente de variación, % de absorbancia y concentración de micotoxina en ppt, de las concentraciones estándar provistas por el kit de Elisa RIDASCREEN Aflatoxin M130/15.	85
Tabla 10: Resultados de absorbancia para las muestras de leches tomadas al productor numero 1, lectura en multiscan a 450 nm.	87
Tabla 11: Resultados de absorbancia promedio entre replica y muestra, coeficiente de variación, % de absorbancia y concentración de micotoxina en ppt, de las muestras analizadas para el productor numero 1.	88
Tabla 12: Resultados de absorbancia para las muestras de leches	

tomadas al productor número 2, lectura en multiescan a 450 nm.	89
Tabla 13: Resultados de absorbancia promedio entre replica y muestra, coeficiente de variación, % de absorbancia y concentración de micotoxina en ppt, de las muestras analizadas para el productor numero 2.	90
Tabla 14: Resultados de absorbancia para las muestras de leches tomadas al productor numero 3, lectura en multiescan a 450 nm.	92
Tabla 15: Resultados de absorbancia promedio entre replica y muestra, coeficiente de variación, % de absorbancia y concentración de micotoxina en ppt, de las muestras analizadas para el productor numero 3.	93
Tabla 16: Resultados de absorbancia para las muestras de leches tomadas al productor numero 4, lectura en multiescan a 450 nm.	94
Tabla 17: Resultados de absorbancia promedio entre replica y muestra, coeficiente de variación, % de absorbancia y concentración de micotoxina en ppt, de las muestras analizadas para el productor numero 4.	94
Tabla 18: Resultados de absorbancia para las muestras de leches tomadas al productor numero 5, lectura en multiescan a 450 nm.	95
Tabla 19: Resultados de absorbancia promedio entre replica y muestra, coeficiente de variación, % de absorbancia y concentración de micotoxina en ppt, de las muestras analizadas para el productor numero 5.	95

## ÍNDICE DE FIGURAS

	pag.
Figura 1: Estructura química de las principales aflatoxinas (Palmgren y Hayes, 1987).	20
Figura 2: Biotransformación de la aflatoxina B <sub>1</sub> en M <sub>1</sub> (FAO 2001).	21
Figura 3: Transformaciones metabólicas posibles de la AF B1. La flecha continua indica reacciones mediadas por oxigenasas microsomales, la flecha continua gruesa reacciones por deshidrogenasas microsomales, la flecha de puntos reacciones químicas directas, la Flecha discontinua otras reacciones y la flecha punteada gruesa reacciones hipotéticas. (Afanador 1997; Palmgren y Hayes, 1987)	30
Figura 4. Mapa geográfico del Valle del Cauca ( <a href="http://tulua.metalogo.org.co/apc-aa-files/valle">tulua.metalogo.org.co/apc-aa-files/valle</a> ).	72
Figura 5. Muestras de leche	74
Figura 6. Controles positivos	74
Figura 7. Foto de soporte de Elisa con pozos	77
Figura 8. Foto de adición de las muestras a los pozos	78
Figura 9. Foto de lavado de los pozos	78
Figura 10. Foto de adición de conjugado	79
Figura 11. Foto de lavado de los pozos	79
Figura 12. Foto de adición de sustrato cromógeno	80
Figura 13. Foto de adición de solución stop, lectura	80
Figura 14. Curva de calibración del kit de Elisa RIDASCREEN Aflatoxin M130/15 para las concentraciones 0,5, 10 20,40 y 80 ppt.	85

## ÍNDICE DE ANEXOS

	pag.
Anexo 1. Posición de los pozos de las muestras, controles, y curva patrón dentro del soporte del kit de Elisa RIDASCREEN Aflatoxin M1 30/15.	109
Anexo 2. Certificado de calidad kit de Elisa RIDASCREEN Aflatoxin M1.	110
Anexo 3. Foto resultado final del montaje del kit de Elisa RIDASCREEN Aflatoxin M1 30/15.	111

## RESUMEN

Este estudio se desarrollo con el fin de demostrar y cuantificar si existe o no la presencia de aflatoxina M1 en leche fresca producida en el Valle del cauca (Colombia). Con este fin se recolectaron 8 muestras de 5 hatos diferentes correspondientes a distintas regiones del valle del cauca, la determinación y cuantificación de la aflatoxina M1 se realizo por medio de la técnica de Elisa competitivo (RIDASCREEN Aflatoxin M130/15). De las 40 muestras analizadas el 20% sobrepaso la concentración máxima de aflatoxina M1 reglamentada por la unión europea, pero no sobrepaso los parámetros establecidos por la FAO. Los valores medios de la concentración para este estudio fueron de 15,6 ppt. Se asocio la contaminación de la leche con aflatoxina M1 al tipo de alimento suministrado a las vacas lecheras ya que los productores que contenían niveles altos o apreciativos de aflatoxina M1 estaban alimentado su ganado con concentrado y pienso, por tanto se especula que este alimento estaba contaminado con altas concentraciones de aflatoxina B1 desencadenando la contaminación.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las micotoxinas son metabolitos secundarios fúngicos que se asocian a ciertas enfermedades en animales y seres humanos. La toxicidad producida en animales es tan diversa como las especies fúngicas que producen estos compuestos. Además de ser compuestos muy tóxicos, algunas micotoxinas se relacionan con ciertos tipos de cáncer (cáncer hepático) y otras enfermedades, este aspecto es el que ha llevado a evocar a la seguridad alimentaría para tomar precauciones sobre los alimentos.

La contaminación de alimentos por esta aflatoxina es continuamente controlada a nivel mundial, sin embargo muy poca información es desarrollada en Colombia, tal vez por la falta de interés en el tema, ya que no existen mecanismos de vigilancia y control que regulen las concentraciones de micotoxinas en los alimentos destinados para humanos y animales.

La leche es uno de los alimentos producidos por la naturaleza para funcionar exclusivamente como fuente nutritiva. Por este motivo es fundamental que esta no represente un riesgo para la salud humana, puesto que constituye una fuente nutritiva no superada por ningún otro alimento conocido por el ser humano. De allí radica la importancia de asegurar la ausencia de micotoxinas en la leche puesto que esta es fundamental en la alimentación Colombiana y es de obligatoriedad del estado asegurar la buena calidad de la leche en todos los sectores de la población.

Para realizar este estudio se escogieron 5 proveedores de leche fresca ubicados en la zona del Valle del Cauca (Colombia), esta investigación se hizo con el propósito de identificar y presenciar la aflatoxina M1 por medio de la técnica de ELISA la cual cuantifica y detecta los niveles de esta, con el

objetivo de reportar su incidencia en la leche consumida por los habitantes de la zona.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 LAS MICOTOXINAS: CONCEPTO Y ORIGEN**

El hombre conoce los hongos que crecen en los alimentos desde la antigüedad, y los han utilizado en su propio beneficio como alimento directo, para mejorar alimentos y especialmente con fines terapéuticos (antibióticos) (Carrillo, 2003).

Existen hongos benéficos que tienen funciones importantes en diferentes sistemas, como la producción de queso, antibióticos, vitaminas, enzimas y glicerol. Sin embargo, al ser los hongos microorganismos ubicuos en la naturaleza y crecer en todos los tipos de materia orgánica, se encuentran frecuentemente como contaminantes en productos alimenticios, causando pérdida de alimentos siendo quizá el agente deteriorante más común de todo tipo de alimentos dada su capacidad invasiva y su gran resistencia, estos hongos contaminantes pueden producir sustancias químicas con carácter tóxico conocidas como micotoxinas. (Jarvis Y Williams, 1987; Ellis et al., 1991).

Las micotoxinas son metabolitos fúngicos secundarios producidos por algunas cepas de hongos, solo unas pocas especies de hongos son capaces de sintetizar micotoxinas e incluso dentro de una misma especie de hongo solo ciertas cepas tienen esta capacidad. El término micotoxinas proviene de dos palabras griegas: “mykes” que significa hongo y “toxicum” que significa veneno (Céspedes, 1997).

Las micotoxinas son compuestos químicos de bajo peso molecular, policetónicos que tienen lugar cuando en determinadas condiciones físicas,

químicas y biológicas se interrumpe la reducción de los grupos cetónicos en la biosíntesis de los ácidos grasos realizada por los hongos. Estos ácidos grasos son metabolitos primarios utilizados por los hongos como fuente de energía. Las micotoxinas se suelen formar al final de la fase exponencial o al principio de la fase estacionaria del crecimiento de los hongos toxicogénicos (Gimeno & Martins, 2003; Céspedes, 1997).

Se conocen actualmente entre 300 y 400 clases de micotoxinas, aquellas que son más importantes por su ocurrencia y toxicidad son: Aflatoxinas (AF), Ocratoxina A (OTA), Citrinina (CIT), Deoxinivalenol (DON), Zearalenona (ZEA), Toxina T2 (T2) etc. (Periaca *et al.*, 1999).

Las aflatoxinas son las micotoxinas más estudiadas y de mayor importancia ya que constituyen una importante preocupación en salud humana debido a que son reconocidas como carcinógenos y juegan un importante papel en la elevada incidencia de carcinoma hepatocelular humana en ciertas áreas del mundo.

## **2.2 LAS AFLATOXINAS: GENERALIDADES.**

Se conocen más de una veintena de aflatoxinas (AF) distintas pero relacionadas estructuralmente. Estas toxinas son producidas por el metabolismo secundario de los hongos aflatoxigénicos como de las transformaciones que sufren estos compuestos al ser ingeridos y metabolizados por los animales.

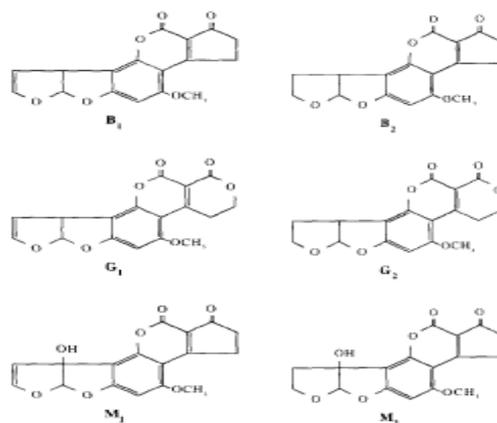
Sin embargo, la mayor parte de los estudios realizados sobre estas micotoxinas, desde su descubrimiento hasta la actualidad, se han referido fundamentalmente a las aflatoxinas B1, B2, G1, G2, M1 y M2. Las aflatoxinas pueden encontrarse en numerosos tipos de alimentos y en proporciones

variables; si bien la AF B1 aparece de forma general en mayor cantidad que las otras, y es aquella micotoxina la que presenta un poder tóxico más alto (Afanador 1997).

**2.2.1 Estructura.** La estructura química de las aflatoxinas B1 y G1, está constituida por la fusión de un núcleo cumarínico y otro bifurano a los que se añaden una pentanona en el caso de la AF B1 y un anillo ciclohexanoico en la AF G1. La AF B2 y AF G2 son dihidroderivados de la AF B1 y AF G1 respectivamente.

La mayoría de las restantes aflatoxinas descritas proceden también de la hidroxilación en diferentes puntos de la estructura molecular de las cuatro aflatoxinas principales. Tal es el caso de la AF M1 y de la AF M2, derivados 4-hidroxilados de la AF B1 y AF B2 respectivamente (Figura 1.)

La parte más reactiva de la estructura de las aflatoxinas es el anillo lactónico. Por otro lado, la existencia de un núcleo bifurano confiere a las moléculas de aflatoxina una gran rigidez, lo que favorece la interacción con algunos componentes celulares (Palmgren y Hayes, 1987).



**Figura 1:** Estructura química de las principales aflatoxinas (Palmgren y Hayes, 1987).



La estructura química de aflatoxina M<sub>1</sub> es el derivado 4-hidroxi de la aflatoxina B<sub>1</sub> (figura 2). La aflatoxina M<sub>1</sub> tiene una masa molecular relativa de 328 Da y su fórmula molecular es C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub> (ver figura N° 1) (FAO 2001). Por otro lado, la existencia de un núcleo bifurano confiere a las moléculas de aflatoxina una gran rigidez, lo que favorece la interacción con algunos componentes celulares (OMS, 1983).

En vacas lecheras, el paso de aflatoxina B<sub>1</sub> a la leche en forma de aflatoxina M<sub>1</sub> está relacionado de manera lineal con la producción de leche y se calcula que el porcentaje de aflatoxina B<sub>1</sub> de la dieta excretada en la leche en forma de aflatoxina M<sub>1</sub> corresponde al 0,09% - 2% de la dosis consumida.

Tanto la aflatoxina B<sub>1</sub> como la aflatoxina M<sub>1</sub> son compuestos hepatotóxicos y carcinogénicos y sus efectos sobre la salud pública constituyen una permanente preocupación. La presencia de aflatoxina M<sub>1</sub> ha sido reportada en la leche materna y su detección es considerada como un biomarcador de exposición a la aflatoxina B<sub>1</sub> (FAO 2001).

**2.3.2 Actividad biológica.** Las aflatoxinas han sido consideradas responsables de intoxicaciones en animales por consumo de alimentos contaminados desde los años sesenta aunque hay algunas evidencias que sugieren la intervención de estas micotoxinas en procesos de intoxicación registrados antes de esas fechas.

La importancia de las aflatoxinas reside en sus efectos nocivos para la salud de los animales y del hombre ya que se trata de sustancias que pueden actuar como agentes tóxicos, carcinogénicos, teratogénicos, mutagénicos e inmunosupresores (Afanador 1997).

Estos efectos producidos se conocen como micotoxicosis, cuya gravedad depende de la toxicidad de la micotoxina, del grado de exposición, de la edad y del estado nutricional del individuo, y de los posibles efectos sinérgicos de otros agentes químicos a los que este expuesto (Wogan, 1992).

El principal órgano diana de los efectos tóxicos y carcinógenos es el hígado. La evaluación de los resultados epidemiológicos y de laboratorio llevados a cabo en 1987 por el Centro Internacional de Investigación sobre el Cáncer (CIIC) determino que existe suficientes datos demostrativos del efecto carcinógeno del Grupo 1, salvo en el caso de la aflatoxina M<sub>1</sub>, que se considera posiblemente carcinogénica para el hombre (Grupo 2B) (Periaca *et al.*, 1999).

Las propiedades carcinogénicas de las aflatoxinas (siempre refiriéndonos en mayor medida a la AF B1) se han caracterizado en la mayoría de los sistemas biológicos, comprobándose que el consumo de dietas contaminadas de forma natural o la administración de las aflatoxinas por distintas vías inducía la aparición de tumores hepáticos en la mayoría de los animales (peces, aves, roedores, carnívoros y primates).

La exposición a las micotoxinas se produce sobre todo por ingestión, pero también se produce por la inhalación y por contacto cutáneo. A menudo los profesionales de la medicina no reconocen la micotoxicosis, salvo cuando afectan a un gran número de personas (Herrera, 1998).

**2.3.3 La micotoxicosis.** En la micotoxicosis la cantidad del hongo consumida es mínima si se comparan con otros tóxicos, por lo que el trastorno en el hombre o en los animales es causado casi exclusivamente por la toxina liberada en el sustrato utilizado como alimento (Herrera, 1998). La micotoxicosis puede inducir una de las siguientes formas de intoxicación:

Micotoxicosis primarias agudas: Se producen cuando se consumen concentraciones de altas a moderadas de micotoxinas y causan manifestaciones específicas tales como síndrome de enfermedad aguda o muerte.

- Micotoxicosis primarias crónicas: Derivadas de la ingesta de niveles de micotoxinas bajos a moderados y son causantes de enfermedades crónicas específicas.
- Micotoxicosis indirectas: Producidas por la ingesta de concentraciones de micotoxinas muy bajas y suelen causar un aumento de la susceptibilidad a otras enfermedades e infecciones (Placinta et al., 1999).

Los principales efectos de la micotoxicosis son las siguientes:

- Producen principalmente en el hígado hepatotoxicosis, necrosis periportal, hemorragias y muerte del animal.

La Sintomatología del daño hepático sería:

Inapetencia

Diarrea

Indigestión

Deshidratación

Debilidad

- Riesgos cancerígenos: Pueden desarrollarse tumores cancerosos o hepatocarcinomas. Se han realizado numerosos trabajos científicos con las micotoxinas que a pesar de las dificultades que entraña la evaluación de este riesgo, demuestran la relación existente entre el

consumo de algunas de las micotoxinas y determinados tipos de cáncer (Allen, 2007).

- Inmunotoxicidad: El impacto de las micotoxinas sobre el sistema inmunitario es importante por varias razones:
  - Las micotoxinas pueden producir en los animales una disminución de defensas y aumentar la susceptibilidad a determinadas infecciones, como *Cándida*, *Listeria*, *Salmonella* y *Mycobacterium*.
  - El aumento de infecciones en el animal puede conllevar a la transmisión de patógenos al hombre, como es el caso de la *Salmonella* y la *Listeria*.
  - En el hombre, la ingestión de micotoxinas contribuye igualmente a una disminución de las defensas (wogan, 1992).

**2.3.4 Mecanismos de acción de las aflatoxinas en el sistema inmune.** El mecanismo de acción de las micotoxinas sobre el sistema inmunitario es diferente, dependiendo de la toxina en cuestión. Así, la aflatoxina B1, provoca una hipoplasia del timo y una depleción de los timocitos.

La inmunosupresión se manifiesta de diversas formas, como una disminución de los linfocitos T ó B, una supresión de los anticuerpos o un retraso en la actividad de los macrófagos/neutrófilos, también puede disminuir la actividad del complemento. La dosis diaria mínima de aflatoxina B1 que induce inmunosupresión es de 0.25 mg/kg de peso vivo (Carrillo, 2003).

### 2.3.5 Otros efectos patológicos

- Sobre el metabolismo

Las micotoxinas pueden actuar sobre el metabolismo de los glúcidos, y producen alteraciones en este metabolismo.

- Sobre determinados órganos diana

Estos suelen ser el SNC, sistema gastrointestinal, hígado, riñón y piel. (Carrillo, 2003)

**2.3.6 Dosis de aflatoxina: Mortalidad.** Del elevado número de micotoxinas, las aflatoxinas son las más estudiadas. Producidas esencialmente por *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, se conocen hasta el momento 18 variedades de aflatoxinas. Los datos relativos a la toxicidad de las más nocivas se reflejan en la siguiente (tabla 1), en orden decreciente de toxicidad (Carrillo, 2003).

Hay que tener en cuenta además las posibles interrelaciones que hay entre las micotoxinas y su efecto sobre la salud, ya que estas pueden ser sinérgicas, aditivas, antagónicas y potenciales. Se considera que las aflatoxinas son las sustancias cancerígenas más activas que se conocen. (Herrera 1998; Carrillo, 2003)

En el hombre no se tienen suficientes datos directos de los efectos de las aflatoxinas debido a la dificultad para exponerlo en forma experimental al riesgo de ingerir alimentos que contengan la sustancia tóxica. No obstante se ha comprobado que en los países donde se acostumbra consumir alimentos enmohecidos, en muchos de los cuales se ha registrado la presencia de aflatoxinas, la incidencia de cáncer de hígado es muy alta. Esto sucede, por ejemplo en algunas regiones de África, de la India y del sudeste de Asia, entre otros (Herrera, 1998).

**Tabla 1.** Dosis mínimas nocivas para diferentes aflatoxinas.

<b>AFLATOXINA</b>	<b>LD50 mg/kg peso vivo</b>
M1 (Derivado metabólico de la B1 en algunos animales, principalmente vacas)	0.320
B1	0.364
G1	0.784
M2 (Derivado metabólico de la B2 en algunos animales)	1. 228
B2	1.696
G2	3.450

**Fuente:** Carrillo, 2003.

**2.3.7 Metabolismo: Transformación y efecto de las aflatoxinas.** El metabolismo desempeña un papel muy importante en el modo de acción de las aflatoxinas. Se conoce desde hace tiempo que las aflatoxinas ingeridas son activadas por las enzimas del sistema oxidativo microsomal, primero en el hígado y probablemente después también en otros órganos (Chu, 1991). La actividad de la enzima, „citocromo P 450 CYP1A2“, desempeña un papel relevante en la metabolización de la aflatoxina B1 ocasiona una transformación en la aflatoxina M1 (Biendl, 2004).

Aunque este sistema enzimático es capaz de detoxificar una gran variedad de compuestos mediante reacciones de hidroxilación y favorecer así su excreción posterior, algunas sustancias se convierten en más reactivas, más electrofílicas y son capaces de unirse a distintas macromoléculas alterando sus funciones (Wogan, 1992); (Chu, 1991). Este es el caso de la AF B1, que requiere una activación para producir mutaciones. La ruta de activación es la

conversión de AFB1 en el metabolito electrofílico AFB1-8,9-epóxido (anteriormente denominado AFB1-2,3 epóxido) (Urrego et al., 2006).

La formación del epóxido requiere la presencia de un doble enlace entre los carbonos C8-C9, por esta razón las aflatoxinas B2 y G2 son prácticamente atóxicas en comparación con las aflatoxinas B1 y G1. La AFM1, presenta el doble enlace entre los carbonos C8 y C9.

El fenómeno de mutagenicidad puede explicarse mediante la formación de un compuesto estable por la unión covalente con el nitrógeno N-7 de los residuos guanil del DNA (o RNA) mediante la inducción de depurinación y escisión de la hebra lo que puede inducir mutación en células somáticas. Esta formación de ligandos o aductos persistentes se lleva a cabo en regiones del DNA ricas en guanina. En el proceso de replicación del DNA, el complejo formado se intercala causando mutación: la guanina sufre transversión a timina; esto ocurre en el codón 249 del gen p53 (este gen está implicado como punto de chequeo durante la síntesis y reparación del DNA. Si el daño no se repara, esta misma proteína induce apoptosis) (Urrego et al., 2006).

Después de la formación de la AFB1-epóxido pueden formarse dihidrodiolos (8,9-dihidro-8,9-dihidroxi-aflatoxina B1) metabolitos de la AFB1 que se unen a proteínas celulares mediante la formación de bases de Schiff induciendo daño celular y eventualmente muerte celular; es importante resaltar que la AFB1-epóxido puede también formar aductos con los residuos de lisina de la albúmina y otras proteínas celulares. Cerca del 5 por ciento de la dosis ingerida de AFB1 se une a la albúmina (Urrego et al., 2006).

La AFB1-epóxido puede también reaccionar con glutatión mediante un mecanismo mediado por una glutatión-S-transferasa; esta conjugación de

tipo competitivo representa el paso de detoxificación más importante con respecto a otros tipos de biotransformación en la obtención de metabolitos menos tóxicos de AFB1, incluyendo entre ellos aflatoxicol y otros derivados como la P1 y Q (Urrego et al., 2006).

La comparación entre la activación y detoxificación de la AFB1-epóxido en diferentes especies animales provee la base para entender por qué las especies varían en su sensibilidad a los efectos tóxicos y carcinogénicos inducidos por la AFB1. En contraste con experimentos en roedores se ha evidenciado que en los humanos la CYP3A4 tiene una menor afinidad por la AFB1 y en cambio la enzima CYP1A2 posee una alta afinidad. La CYP1A2 se conoce por su capacidad para bioactivar muchos procarcinógenos a su forma carcinogénica activa (Chu, 1991; Urrego et al., 2006).

En cualquier caso parece ser que existen varios factores que deben modular la formación de conjugados, fundamentalmente del epóxido de la AF B1 y el ADN y con ello la susceptibilidad de las especies a la carcinogénesis. En este sentido, los mecanismos de competencia en la unión a ácidos nucleicos, que se establecen entre el glutatión y el compuesto activado de la AF B1, dan lugar a una reducción en el potencial carcinogénico de esta aflatoxina en aquellas especies que presentan una mayor capacidad para la formación de conjugados con glutatión (Gorelick, 1990; Urrego et al., 2006).

Los intermediarios formados tras las reacciones de hidroxilación de las aflatoxinas pueden ser excretados por distintas vías. La mayoría de ellos, así como la fracción de aflatoxina ingerida y no hidroxilada, se detectan normalmente como conjugados con ácido glucurónico o sulfatos. Así por ejemplo, la AF M1, que es un metabolito formado por hidroxilación en la posición 4- de las moléculas de AF B1, se ha detectado en forma de conjugado con ácido glucurónico en excreciones de pollo (Golerick, 1990).



En algunas especies otra posibilidad conocida dentro de la metabolización de las aflatoxinas es la que conduce a la formación de aflatoxicol. Éste se produce a partir de la AF B1 en una reacción de reducción mediada por una deshidrogenasa NADHP dependiente. El interés principal del aflatoxicol, aparte de tratarse de uno de los metabolitos más tóxicos, es que su reacción de formación es reversible, sirviendo de reservorio de AF B1 en los animales que lo producen. Una reacción similar ocurre en el caso de la ingestión de AF M1 y la formación de su metabolito aflatoxicol M1 (AFL M1). Las distintas posibilidades de metabolización de la AF B1 se resumen en la siguiente figura (Figura 3) (Afanador 1997).

En resumen, la diferente sensibilidad de los animales a la acción tóxica de las aflatoxinas depende de aspectos de su cinética como son: la diferente absorción a través del tracto digestivo (por ejemplo, en el caso de la molécula de AF M1 al tratarse de un compuesto más polar que la AF B1 su nivel de absorción intestinal es menor), la distribución en el organismo y los mecanismos de metabolización y excreción utilizados por las distintas especies animales.

Los efectos principales que conlleva la unión de las aflatoxinas a macromoléculas son la alteración en la síntesis de ADN, ARN y proteínas (enzimas, inmunoglobulinas, etc.). Esto conlleva la aparición de cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial, disgregación temporal de los ribosomas, disminución en la respiración celular por desacoplamiento en el mecanismo de fosforilación oxidativa e interrupción del transporte de electrones, alteración de la glicolisis y gluconeogénesis así como disminución en la actividad de ciertas hormonas al establecerse una competencia por los receptores específicos (se sabe que la AF M1 incluso en cantidades muy bajas compite con el estradiol por los receptores localizados en el útero) (Afanador 1997) .

Así mismo, la formación de compuestos de gran reactividad que se unen a los ácidos nucleicos (fundamentalmente ADN mitocondrial) es responsable del poder carcinogénico de las aflatoxinas. Estos compuestos actúan como agentes genotóxicos, dando lugar a dos lesiones premutacionales diferentes, que pueden conllevar a la activación de oncogenes y a la iniciación de un proceso tumoral.

La primera de estas lesiones se origina tras la eliminación de forma espontánea o la reaparición enzimática de las posiciones con conjugados epóxido-N-7 guanina, dando lugar a sitiosapurínicos donde la adenina tiene una gran afinidad por insertarse en la posición correspondiente de la cadena opuesta del ADN.

Esto puede dar lugar a una mutación por sustitución de un par de bases G-C por un par T-A. La segunda lesión premutacional se produce al originarse un derivado formamidopirimidínico resistente a los procesos de reparación enzimática del ADN, que puede dar lugar a mutaciones si está presente en la fase de replicación del ADN. (Wogan, 1992)

**2.3.8 Condiciones favorables para la contaminación de aflatoxinas.** La mayoría de los productos agrícolas son susceptibles de la invasión por hongos filamentosos durante algunas de las etapas de producción, procesado, transporte o almacenamiento, se debe tener en cuenta que las diferentes cepas de una especie dada difieren en su capacidad de producir micotoxinas y es común encontrar cierta proporción de aislamientos no toxigénicos. Por otra parte, la ausencia de hongos toxigénicos no garantiza que el alimento este libre de micotoxinas, pues las toxinas pueden persistir aún cuando el hongo haya perdido su viabilidad (Silvestre, 1995). (Northolt y Van Egmond, 1982).

La presencia de micotoxinas en productos alimenticios, que depende de su formación por cepas específicas de hongos, esta sujeta a la influencia de factores ambientales como la humedad y temperatura. Por lo tanto, la contaminación micotóxica de los productos alimenticios puede variar según las condiciones geográficas y los métodos de producción y almacenamiento, y también según el tipo de alimento, ya que algunos productos alimenticios son sustratos más aptos que otros para el crecimiento fúngico (OMS 1983).

La mayoría de los hongos productores de micotoxinas son contaminantes habituales en los alimentos y productos agrícolas, ya que son capaces de crecer en cultivos, hojas, tallos cereales, semillas, carnes, grasas, productos lácteos, etc. (Jarvis Y Williams, 1987).

Las condiciones tropicales y subtropicales favorecen su proliferación (de clima cálido, húmedo y templado), la cual puede presentarse en los productos agrícolas ya que son capaces de crecer en cultivos, hojas, tallos cereales, semillas, carnes, grasas, productos lácteos, cuando estos aún están en el campo, después de la cosecha o durante su almacenamiento. (Frisvad y Samson, 1992; Periacca 1999; Jarvis Y Williams, 1987)

El desarrollo de los hongos y la producción de micotoxinas requieren ciertos condicionantes ambientales, entre ellos los siguientes:

- Factores físicos: humedad y agua disponible, temperatura, zonas de microflora (pequeñas zonas del alimento con alto contenido de humedad), e integridad física del grano o del alimento.
- Agua disponible: merece especial mención el concepto de actividad de agua o agua disponible para el desarrollo de los microorganismos, una vez se ha alcanzado el equilibrio hídrico en el sistema alimento/medio

ambiente. El  $a_w$  se expresa como la relación existente entre la tensión de vapor de agua en el sustrato (P) y la del agua pura ( $P_o$ ), a la misma temperatura, ( $a_w=P/P_o$ ). El agua pura tiene un  $a_w=1$ . En los alimentos, el  $a_w$  será siempre inferior a 1. La mayor parte de los hongos que contaminan los cereales, por ejemplo, necesitan valores superiores a 0.7.

- Factores químicos: Composición del sustrato, pH, nutrientes minerales y disponibilidad de oxígeno

Los factores ambientales mencionados son los que condicionan la contaminación fúngica de los alimentos almacenados. La investigación aplicada a la calidad de los piensos y los granos se ha dirigido en las últimas décadas al control de los hongos, pues se han identificado como una de las principales causas del deterioro nutricional y organoléptico del grano y pienso almacenado (Pohland y Wood, 1987).

Sólo ciertas cepas de *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* son capaces de sintetizar aflatoxinas, cuando las condiciones ambientales y nutricionales son las adecuadas. No obstante, las cepas aflatoxigénicas del género *Aspergillus* son muy comunes y están ampliamente distribuidas en la naturaleza, sobre todo en zonas de clima cálido y húmedo. Esto aumenta en gran medida el riesgo de contaminación de alimentos por hongos capaces de sintetizar estas sustancias, fundamentalmente en el caso de que las condiciones de almacenamiento de esos alimentos no sean las adecuadas (Pohland y Wood, 1987).

#### **2.4 PRINCIPALES HONGOS PRODUCTORES DE MICOTOXINAS.**

La especie más importante de *Aspergillus* son *A. flavus*, *A. parasiticus* que solo produce aflatoxinas B y G, en los animales puede producirse una degradación metabólica de las aflatoxinas ingeridas. La aflatoxina  $B_1$  y  $B_2$  se puede convertir

en aflatoxina M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub> y es alrededor de 3000 veces inferior a la concentración de la aflatoxina B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> consumida con el pienso (OMS 1983).

No obstante, las cepas aflatoxigenicas del género *Aspergillus* son muy comunes y están ampliamente distribuidas en la naturaleza, sobre todo en las zonas de clima cálido y húmedo. Esto aumenta en gran medida el riesgo de contaminación de alimentos por hongos capaces de sintetizar estas sustancias, fundamentalmente en el caso de que las condiciones de almacenamiento de estos no sean las adecuadas (Lindner, 1995).

Las micotoxinas son producidas principalmente por 5 tipos de hongos: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* y *Alternaria* (tabal 2)

**Tabla 2:** Tipos de hongos productores de micotoxinas.

HONGO	TOXINA
<i>Aspergillus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aflatoxinas</li> <li>• Sterigmatocistina</li> <li>• Ocratoxina A</li> </ul>
<i>Fusarium</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tricotocenos (DON, NIV, Toxina T2, DAS)</li> <li>• Zearalenonas</li> <li>• Fumonisinias</li> <li>• Fusarina</li> <li>• Moniliformina</li> </ul>
<i>Penicillium</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Patulina</li> <li>• Citrinina</li> <li>• Ocratoxina A</li> </ul>
<i>Alternaria</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alternariol</li> <li>• Ácido tennazónico</li> </ul>
<i>Claviceps</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alcaloides</li> </ul>

**Fuente:** Carrillo 2003.

La presencia de hongos toxigénicos en cultivos ha sido históricamente dividida en dos grupos bien determinados:

**Hongos de los campos de cultivo:** son aquellos que invaden los granos y producen las toxinas antes de la propia cosecha. Incluye distintas especies que requieren altos niveles de humedad en el grano (20-22%). Son típicos los géneros *Alternaria* y *Fusarium* (Carrillo, 2003).

**Hongos de almacenaje:** aquellos que invaden a los cultivos, pero la producción de toxinas es posterior a la cosecha y de acuerdo a las condiciones de almacenamiento. Son típicos los géneros como *Aspergillus* y *Penicillium* (tabla 3) (Carrillo, 2003; Miller, 1995).

Muchos hongos no son productores de micotoxinas incluso pudiendo invadir el grano, por lo que un grano enmohecido no tiene por qué ser necesariamente tóxico. Del mismo modo, puede detectarse una micotoxina sin la presencia del hongo productor, ya que éste puede haber sido inactivado por procesos químicos o por alteración de los factores ambientales mientras las micotoxinas permanecen en el sustrato (Carrillo, 2003).

Una de las micotoxinas más conocidas son las aflatoxinas de *A. flavus*, con efectos carcinógenos. (Herrera, 1998) Hasta el momento, se han identificado más de 200 tipos de micotoxinas.

Sin embargo, las que pueden encontrarse con mayor frecuencia como contaminantes naturales en los alimentos para animales o humanos son las siguientes: aflatoxinas (B1, B2, G1, G2 M1) (Carrillo, 2003).

**Tabla 3.** Especies fúngicas que comúnmente están involucradas en la síntesis de toxinas

Género	Especie	Micotoxina producida
<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i> <i>fumigatus</i> <i>clavatus</i> <i>ochraceus</i>	Aflatoxinas Acido kojico Patulina Ochratoxinas
<i>Penicillium</i>	<i>Citrinum</i> <i>viridicatum</i> <i>patulum</i>	Citrinina Ochratoxina Patulina
<i>Fusarium</i>	<i>nivale</i> <i>culmorum</i> <i>myrothecium</i> <i>graminearum</i>	Nivalenola Deoxinivalenol Toxina T-2 Zearalenona

**Fuente:** Ortiz y Palacios, 2002.

**2.4.1 Orden *Moniliales*.** El orden *Moniliales* es un grupo muy grande, que comprende más de 7000 especies de hongos, muchas de ellas de inmensa importancia para el hombre, ya sea como patógenas de plantas, animales y el hombre, como hongos utilizados en la industria, o como participantes de fenómenos biológicos y ecológicos muy interesantes que suceden en el suelo, unos como saprobios y otros como parásitos o depredadores de pequeños animales.

Los *Moniliales* se dividen en las familias *Argonomycetaceae*, *Moniliaceae*, *Dematiaceae*, *Stibellaceae* y *Tuberculariceae* (Herrera, 1998).

**2.4.2 Familia *Moniliaceae*.** Esta es la familia con mayor número de especies entre los *Moniliales*, incluye todos los hongos imperfectos que producen sus conidios en conidióforos hialinos, o directamente de hifas hialinas no

diferenciadas en conidióforos; los conidióforos y conidios son hialinos o de colores claros. La mayoría de las especies son saprobias, pero muchas otras son patógenas de plantas y animales, depredadoras de pequeños animales o patógenos del hombre. (Herrera, 1998)

A esta familia pertenecen las numerosas especies de *Aspergillus*, de gran importancia en las actividades humanas. En el género *Aspergillus* han sido descritas unas 200 especies y una gran cantidad de variedades. Los conidióforos de *Aspergillus* terminan en un hinchamiento llamado vesícula, a partir de la cual nace en su superficie una hilera de fialides productoras de cadenas de conidios tipo fialospora, es decir, conidios blásticos generados en sucesión basipeta. A la vesícula junto con las cadenas de conidios se le conoce como cabeza conidial. *A.flavus* es un ejemplo de cabeza conidial biseriada. (Herrera, 1998)

Los aspergilos son de los hongos más omnívoros que existen, capaces de asimilar como alimento una enorme variedad de sustancias, debido al gran número de enzimas que pueden producir para degradarlas. Los dos requisitos principales que deben tener los diferentes sustratos para que se desarrollen estos hongos son la presencia de algún tipo de materia orgánica y un poco de humedad; si ambos factores están presentes, los aspergilos pueden crecer en casi cualquier sustancia, afectando el bienestar del hombre. Hay especies de *Aspergillus*, como *A. niger*, *A.flavus*, *A.candidus* y *A. versicolor*, entre otras, que comúnmente se desarrollan en granos, semillas y alimentos para humanos y para animales domésticos en los que, además de provocar su descomposición, producen sustancias tóxicas, que ocasionan diversos trastorno, a veces severos, en los animales y humanos que consumen dichos granos o alimentos contaminados (Herrera, 1998).

**2.5 Presencia de aflatoxinas en leche y productos lácteos.** La leche y sus derivados constituyen el principal grupo de alimentos de origen animal susceptibles de contaminación por aflatoxinas. La presencia de estas sustancias en dichos productos puede ser el resultado de dos formas de contaminación (Ellis, 1991).

- a. Directa: debida al crecimiento en el producto de hongos aflatoxigénicos y producción de toxinas sobre la leche. Las aflatoxinas que se detectan mayoritariamente en este tipo de contaminación son: AFB<sub>1</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>2</sub>, de entre las cuales la más importante, como se ha mencionado anteriormente es la AFB<sub>1</sub> (Blanco, 1986)
- b. Indirecta: derivada del consumo por parte de animales en periodo de lactación de alimentos contaminados con aflatoxinas, lo que da a lugar la aparición en la leche de estos animales diversos metabolitos tóxicos. Este es principalmente el caso de la contaminación de leche y sus derivados con AFM<sub>1</sub>, pudiendo aparecer, aunque en menores cantidades, AFM<sub>2</sub>, AFGM<sub>1</sub>, AFGM<sub>2</sub>, AFB<sub>1</sub> y AFM<sub>4</sub> (Blanco, 1986).

La cantidad de aflatoxina que aparece en los casos de contaminación directa de los alimentos es normalmente muy superior a la resultante de la contaminación indirecta (Kuiper - Goodman, 1991). No obstante, la contaminación directa no suele representar un problema ya que en el crecimiento de hongos aflatoxigénicos en un alimento da a lugar en numerosos casos a alteraciones organolépticas del mismo y a su rechazo para el consumo. Sin embargo no es posible garantizar que la ausencia de hongos aflatoxigénicos en un producto asegure que este libre de aflatoxinas, ya que estas sustancias pueden persistir después de que los hongos hayan desaparecido (Blanco, 1986)

La contaminación indirecta de productos lácteos con AFM<sub>1</sub> representa un problema grave, debido a la alta frecuencia con que se ha detectado en numerosos países y al riesgo potencial de producirse efectos tóxicos crónicos por el consumo reiterado de alimentos contaminados con dosis bajas de esta aflatoxina. Un aspecto muy importante a tener en cuenta es que la leche y sus derivados son productos con un alto nivel de consumo y representan una parte esencial en la elaboración de alimentos infantiles, con el riesgo tóxico que esto conlleva (Blanco et al., 1988).

Desde el descubrimiento de la AFM<sub>1</sub> se han realizado numerosos estudios para establecer el nivel de conversión de la AFB<sub>1</sub> ingerida en su metabolito mayoritario en leche. El primer estudio sobre esta transformación data de 1964, donde se emplearon cuatro vacas a las que se les administró diariamente 2 Kg de pienso contaminado con AFB<sub>1</sub> a un nivel de 4 mg/Kg, durante 18 días. La AFM<sub>1</sub> se detectó a las 12 horas de la ingestión, representando un valor menor del 1% de la AFB<sub>1</sub> ingerida y desapareciendo 3 días después de dejar de administrar la dieta. Después de este estudio se han realizado muchos otros, oscilando los valores de transformación entre 0,2 y 3% de la AFB<sub>1</sub> ingerida (Van der Linde et al., 1964; Patterson y Roberts, B, 1975 y Blanco, 1986).

No obstante, muchos de estos estudios se han llevado a cabo administrando a los animales niveles de AFB<sub>1</sub> muy superiores a los establecidos como tolerados para alimentación animal y que no suelen presentarse frecuentemente. Así mismo, hay que considerar las diferencias debidas a los distintos límites de detección y recuperación de las técnicas analíticas empleadas por distintos autores para la detección de AFM<sub>1</sub> (Van der Linde et al., 1964).

En cualquier caso, la transformación de AFB<sub>1</sub> en AFM<sub>1</sub> depende de varios factores, relacionados con la alimentación (cantidad, características del alimento consumido y nivel de dosis de AFB<sub>1</sub>), metabolismo del animal (nivel de producción, fase de lactación, especie, raza, etc) y otros factores (manejo y estación del año) (Blanco, 1986)

## **2.6 ESTABILIDAD DE LA AFM<sub>1</sub> EN PRODUCTOS LÁCTEOS.**

Existe un gran número de estudios acerca del efecto sobre la AFM<sub>1</sub> de los procedimientos empleados en la elaboración y conservación de la leche.

Con respecto a los tratamientos térmicos la mayoría de los autores están de acuerdo al afirmar que el tratamiento térmico de la leche (pasteurización o ultrapasteurización) no afecta significativamente a la AFM<sub>1</sub>. Las diferencias observadas en los resultados se han atribuido a la variabilidad en los parámetros analizados, al empleo de distintas técnicas de detección y a la forma de contaminación de las muestras de la leche (Kiermeier, 1973; Stoloff, 1965).

El hombre ha consumido leche desde el principio de su historia, pero es imposible establecer la cuantía de este consumo a través de los años. Es probable que el consumo regular de leche se remonte al momento en que el nómada abandono la caza como medio de subsistencia y comenzó a cultivar la tierra para alimentar a los animales que capturaba y mantenía en un cercado. En cualquier caso, la leche de vaca se utiliza habitualmente en la alimentación infantil desde hace menos de un siglo y probablemente el inicio de esta practica se vio favorecido por el progreso que entonces experimentaron las técnicas ganadera, de transporte, de conservación y de distribución (Amiot, 1991).

## **2.7 LECHE FRESCA: GENERALIDADES Y DEFINICIÓN.**

La leche es el líquido secretado por las glándulas mamarias, tanto del ser humano (leche de mujer), como los animales mamíferos, cuyo fin es servir de alimento al recién nacido. En términos ecológicos, el concepto de leche se refiere únicamente a la leche de vaca, obtenida como materia prima (leche cruda) en las explotaciones agrícolas y que se ha de tratar en las centrales lecheras. (Spreer, 1991)

La leche fresca también se puede considerar como la leche que no ha sido calentada ni sometida a ningún tratamiento con este mismo efecto. La denominación conceptual se puede mantener entonces hasta el proceso de calentamiento en la central lechera. (Spreer, 1991)

La leche se tiene por uno de los productos alimenticios más antiguos y a la vez es uno de los alimentos más importantes. Los productos alimenticios son sustancias destinadas a satisfacer las necesidades nutritivas o a ser consumidas por placer. El ser humano los ingiere en estado natural, tratados o transformados, y en forma de comida, de bebida o por cualquier otra vía.

La leche se puede considerar un alimento que cubre todas las necesidades nutritivas del ser humano. Contiene todos los nutrientes y todos los biocatalizadores necesarios para mantener y desarrollar los procesos vitales (hidratos de carbono, grasas, proteínas, sales, minerales, vitaminas y enzimas). 1 litro de leche cubre aproximadamente el 20% de las necesidades energéticas diarias de una persona. (Spreer, 1991)

La leche se puede considerar un líquido blanco y opaco, aunque puede presentar también una tonalidad ligeramente amarillenta, sobre todo cuando las vacas se encuentran en los pastos. Debe tener un sabor característica,

puro, fresco y ligeramente dulzón, así como un olor ligeramente característico y puro. Debe tener también una consistencia homogénea y carecer de grumos. (Spreer, 1991)

Los principales componentes de la leche son agua, grasa, proteína y lactosa. El agua es el componente principal de la leche, siendo su función esencial la de actuar como disolvente de los demás componentes. De todos los componentes de la leche, la fracción que más varía es la formada por las grasas, estando en una proporción que oscila entre 3,2 y el 6%. La grasa de la leche se diferencia de otras grasas animales, en especial de las grasas corporales, entre otras cosas por poseer muchos más tipos de ácidos grasos (9 o más en comparación con los 2 o 3 tipos que presentan las otras grasas). Sobretudo es más rica en ácidos grasos insaturados (Spreer, 1991).

El contenido de proteínas depende fundamentalmente de la alimentación y oscila entre el 3,0 y el 3,6%. Los componentes estructurales básicos de las proteínas son los aminoácidos, estos se forman por uniones de distintos tipos (enlaces peptídico, puentes disulfuro, puentes de hidrógenos o enlaces iónicos) determinadas estructuras polipeptídicas, que a su vez se unen entre sí formando las proteínas. La lactosa, el carbohidrato característico de la leche, es un disacárido, el cual está compuesto por dos monosacáridos, glucosa y galactosa. (Spreer, 1991)

La leche contiene todas las vitaminas necesarias para la vida, pero en cantidades diferentes que no en todos los casos son suficientes. El contenido de vitaminas de la leche cruda depende fundamentalmente de la alimentación y del estado de salud de los animales. Los tratamientos y transformaciones a los que se somete la leche pueden rebajar algo su contenido vitamínico. La leche contiene de una forma natural ácido cítrico (aproximadamente 2,45 g por Kg de leche). El ácido láctico, el ácido butírico

y todos los demás que aparecen son productos metabólicos originados en la fermentación de la lactosa por los microorganismos. (Spreer, 1991)

**2.7.1 Propiedades físico-químicas de la leche.** Desde un punto de vista físico-químico, la leche es un producto muy complejo. Para comprender las transformaciones que se producen en ella y en los productos lácteos durante los diversos tratamientos industriales. (Amiot, 1991)

Las propiedades físico-químicas de una sustancia resultan de su composición y estructura:

- La estructura comprende tanto la macroestructura, visible a simple vista, como la microestructura, perceptible mediante el microscopio óptico, y la ultraestructura, solamente perceptible mediante la microscopía electrónica.
- La textura responde a como se caracterizan, fundamentalmente por métodos sensoriales, pero también reológicos y ópticos, las propiedades estructurales del producto alimenticio.

Las características físico-químicas de la leche dependen fundamentalmente de la concentración y del grado de distribución de las partículas de sus componentes (Spreer, 1991). Los componentes de la leche se encuentran en diferentes formas físicas, El estado físico depende principalmente del grado de dispersión. (Amiot, 1991)

**2.7.2 Reacción química; el pH de la leche.** La acidez química de la leche tiene una importancia extraordinaria para la industria lechera, ya que es un

parámetro bastante constante en la leche y su aumento indica una anomalía (Spreer, 1991).

La leche recién ordeñada de una vaca sana presenta un índice de SH (acidez) de 6,4-7,0. Aproximadamente la mitad se debe a las sales ácidas, por ejemplo el hidrogenocarbonato sódico ( $\text{NaHCO}_3$ ) y a los ácidos orgánicos (ácido cítrico) que contiene la leche, el resto se debe a la caseína que reacciona ante el hidróxido sódico ( $\text{NaOH}$ ) como un ácido de mediana fuerza. (Spreer, 1991)

El incremento del índice de SH durante el transporte de la leche y de sus tratamientos posteriores en la central lechera se debe a que las bacterias, sobretodo las bacterias lácticas, transforman la lactosa en ácido láctico. Esta nueva acidez se llama acidez desarrollada y origina la desestabilización de las proteínas (Amiot, 1991).

**2.7.3 Microbiología de la leche.** Su elevada actividad de agua, su pH mediano (6,4-6,6) y su abundante aporte de nutrientes hacen de la leche un excelente medio para el crecimiento de microorganismos. (Adams, 1997)

Esto exige unas rigurosas normas de higiene tanto en su producción como en su tratamiento; hecho que se reconoce en la mayoría de los países en los que la leche fue el primer alimento de ser el foco de atención de la actual legislación relativa a la higiene de los alimentos (Adams, 1997)

Los microorganismos que se encuentran en la leche tienen tres orígenes: el interior de la ubre, el exterior de los pezones y sus alrededores próximos, y el ordeño y los utensilios que se utilizan para manipular la leche (Adams, 1997)

Los microorganismos son, en su mayoría, pequeños seres vivientes unicelulares que individualmente solo son visibles recurriendo al microscopio. (Spreer, 1991)

Según su acción y las correspondientes transformaciones tecnológicas que provocan en la leche y en los productos lácteos, se puede establecer la siguiente clasificación en 3 grupos:

- **Microorganismos beneficiosos para la industria:** tienen una gran importancia en la industria lechera ya que son necesarios para las fermentaciones, la formación del aroma y de los gases, así como para descomponer las proteínas.
- **Microorganismos perjudiciales para la industria:** provocan transformaciones indeseadas en los procesos tecnológicos, por ejemplo, coagulación de la leche, variaciones del color y del sabor, descomposición de las proteínas.
- **Microorganismos causantes de enfermedades (patógenos):** pueden originar en los macroorganismos (el hombre, los animales y las plantas) enfermedades causadas por la producción de toxinas (sustancias venenosas).

Los microorganismos importantes desde el punto de vista de la industria lechera se clasifica de la siguiente manera:

- ✓ Bacterias: Se reproducen por división celular.
- ✓ Levaduras: Se reproducen por gemación.
- ✓ Hongos: Producen micelio

Otros factores ambientales como la temperatura, el pH y el oxígeno del aire, aparte de los nutrientes y el agua como elemento disolvente, juegan un importante papel para el crecimiento, la reproducción y el metabolismo de estos organismos. (Spreer, 1991)

El contenido microbiano de la leche cruda la higiene mantenida en el proceso de obtención de la leche, es decir la limpieza de las instalaciones de ordeño, de las condiciones de almacenamiento y del transporte y, por otra parte del estado sanitario de la vaca, especialmente de la ubre dice mucho de su calidad;. (Spreer, 1991)

La leche obtenida de una vaca sana contiene entre 100 y 1000 microorganismos por  $\text{cm}^3$ , algunos de estos llegan a la leche procedentes del ambiente que rodea al animal (aire, alimento, etc) y la presencia de otras decenas de miles y hasta millones de microorganismos se debe a una insuficiente limpieza de las instalaciones de ordeño, de las tuberías y de los medios de transporte. (Spreer, 1991)

**2.7.4 Calidad de la leche cruda.** La leche es un alimento muy delicado cuya calidad solo se puede mantener si se conserva en un medio favorable y en las mejores condiciones. Las vacas lechera deben estar sanas, limpias y alojadas en locales adecuados. El ordeño y la refrigeración de la leche deben efectuarse utilizando los equipos apropiados y escrupulosamente limpios. El éxito de estas operaciones depende principalmente de las precauciones tomadas por el productor (Amiot, 1991).

En primer lugar se debe controlar la aptitud para la puesta en circulación de todo alimento crudo o producto terminado. Este control analiza tanto aspectos higiénicos y toxicológicos como los procesos tecnológicos

empleados. Los organismos legisladores disponen para este fin de una serie de medidas encaminadas a preservar la salud y evitar los fraudes. (Spreer, 1991) El valor nutritivo y alimenticio de un alimento esta determinado por su composición y por las transformaciones a las que es sometido durante su tratamiento. Las normas de calidad reúnen los requisitos exigidos o recomendados que han de cumplir los productos alimenticios. (Spreer, 1991)

En segundo lugar se debe controlar la calidad de un producto, ya que este es la totalidad de las características (naturaleza, categoría y aptitud) que determina su grado de idoneidad para un determinado uso previsto y por último se debe hacer un examen organoléptico que consiste en la determinación, a través de pruebas sensoriales rutinarias, comprobadas y realizadas con una metodología y en unas condiciones que aseguran su repetibilidad, de determinadas características del producto. (Spreer, 1991).

**2.7.5 Requisitos de calidad que debe cumplir la leche cruda.** Disponer de leche cruda de buena calidad es una condición fundamental se pretende elaborar productos lácteos de excelente calidad. El concepto de “*calidad de la leche cruda*” comprende, según *Bruncke*, los siguientes aspectos:

- El contenido de sustancias nutritivas y en biocatalizadores
- La naturaleza físico - químicas
- El contenido total de microorganismos y la composición de la microflora; por ejemplo la proporción en la carga microbiana total de las bacterias con capacidad de esporulación, de las coliformes o de los microorganismos psicrotrofos y termorresistente.
- La presencia o ausencia de gérmenes patógenos.
- La presencia o ausencia de toxinas.

- La presencia o ausencia de sustancias perjudiciales como pueden ser las sustancias inhibidoras (antibióticos, detergentes y desinfectantes)
- El aroma y sabor
- La limpieza de la leche

El concepto de “calidad higiénica de la leche” limita considerablemente el concepto de calidad de la leche cruda ya que solo abarca los aspectos higiénicos ignorando, tanto el contenido de la leche en nutrientes y principios activos, como su naturaleza físico-química. (Spreer, 1991)

Los factores que más influyen en la granja sobre la calidad de la leche son los siguientes:

- ✓ La alimentación y el alojamiento del ganado.
- ✓ El estado sanitario de las vacas productoras.
- ✓ Los procedimientos utilizados para la obtención y el tratamiento de la leche (Spreer, 1991).

## **2.8 MARCO LEGAL DE LAS MICOTOXINAS.**

En la actualidad existen leyes de alimentos que prohíben o limitan la presencia de ciertas sustancias contaminantes naturales o artificiales y dentro de los contaminantes naturales se contemplan las micotoxinas. Luego del descubrimiento de las aflatoxinas hacia comienzos de la década de los 60, muchos países desarrollaron una legislación específica para estas micotoxinas. (Van egmond, 1989)

Las concentraciones máximas permisibles se expresan en unidades de concentración denominadas “partes por billón” (ppb), que en unidades de peso equivalen a un ng de toxina por g de alimento (ng/g). (Diaz 1995)

En los estados unidos la administración de alimentos y drogas (FDA), fijo inicialmente el “nivel de acción” para las aflatoxinas en 30 ppb a comienzos de la década de los 60. Esta decisión se baso en el límite de detección de las técnicas disponibles en ese momento. De acuerdo con la FDA, el nivel de acción es el nivel por encima del cual un testigo calificado experto podrá testificar en una corte federal que la presencia de toxina en el alimento hace que este cause efectos adversos sobre la salud. (Diaz, 1995)

En 1989 la FDA fijo el nivel de acción de la aflatoxina M1 en 0.5 ppb, debido a que niveles de aflatoxinas de 20 ppb en la dieta de las vacas lecheras resultan en niveles de aflatoxina M1 por debajo de 0,5 ppb en la leche (Diaz, 1995).

Según un estudio de reglamentación mundial de niveles de micotoxinas realizado por Van Egmon (1989), 50 países tienen regulación con respecto a aflatoxinas B1, B2, G1 y G2, mientras que 14 países han legislado con respecto a la aflatoxina M1.

La mayoría de países han fijado un limite máximo de 5 ppb de aflatoxinas B1 para alimentos de consumo humano, mientras que los niveles máximos para la suma de las cuatro aflatoxinas naturales (B1, B2, G1 y G2 = aflatoxinas totales) han sido fijados entre 10 y 20 ppb en la mayoría de los países. Para el caso de la aflatoxina M1, la mayoría de países tiene límites máximos de 0.05 y 0.5 ppb (tabla 4) (Diaz, 1995).

**Tabla 4:** niveles máximos de aflatoxinas permitidos en países con legislación.

Nivel máximo permitido en la mayoría de países		Promedio	Rango
Aflatoxina B1	5 ppb	9.5 ppb	0-50 ppb
Aflatoxinas totales (B1, B2, G1 y G2)	10-20 ppb	14.8 ppb	0.50 ppb
Aflatoxina M1	0.05-0.5 ppb	0.3 ppb	0-1 ppb

**Fuente:** Díaz, 1995

### 2.8.1 Legislación sobre los niveles de aflatoxinas en productos lácteos.

En el caso de las aflatoxinas como contaminantes de productos lácteos, las medidas reguladoras afectan tanto a estos alimentos como a los destinados al consumo por el ganado lechero (Stoloff, 1991).

Las razones para establecer límites en el contenido de AFM<sub>1</sub> en productos lácteos fueron presentadas por la FDA y por las autoridades sanitarias holandesas. Los argumentos propuestos por la FDA están basados en la mayor susceptibilidad de los niños a los efectos de las aflatoxinas y en los posibles efectos de la AFM<sub>1</sub> en la salud. Las razones argumentadas por Holanda se basaban en diferentes estudios experimentales sobre la carcinogenicidad de la AFB<sub>1</sub> y su comparación con la AFM<sub>1</sub> (Stoloff, 1991).

Desde 1981 ha habido un marcado aumento en el número de países que tienen establecidos niveles de tolerancia para la AFM<sub>1</sub> en productos lácteos.

La mayoría de estos países presentan niveles de tolerancia para distintos productos, siendo más bajos los niveles de aflatoxina permitidos en los productos destinados a la elaboración de alimentos infantiles. En la mayoría de los casos los límites tolerados se ajustan a los límites de detección de las técnicas analíticas recomendadas (Stoloff, 1991).

La presencia de AFM1 ha sido reportada en leche producida en todos los países del mundo en donde se han realizado estudios de monitoreo y sus niveles máximos permisibles están estrictamente regulados por diversas agencias internacionales. En la mayoría de países de la Unión Europea no se aceptan para el consumo humano leches cuyo contenido de AFM1 sea superior a 50 ng/litro, mientras que la agencia de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos (Food and Drug Administration, FDA) permite hasta 500 ng/litro (FAO, 2004). En Colombia, el Instituto Colombiano de Normas Técnicas ICONTEC ha fijado un límite máximo provisional de 400 ng/litro para leche cruda, basándose en los estudios realizados en otros países y en regulaciones establecidas por agencias externas. Sin embargo, no existen en Colombia estudios de incidencia y niveles de contaminación con aflatoxina M1 que permitan establecer estos límites con un criterio más racional acorde con la situación local (Diaz, 2005).

## **2.9 MICOTOXINAS E INOCUIDAD DE ALIMENTOS.**

Las micotoxinas juegan un papel importante en la protección de alimentos para consumo humano garantizando la inocuidad. Las características del metabolismo de las micotoxinas, indican que hay una eliminación del metabolito de la aflatoxina B<sub>1</sub> en la leche como aflatoxina M<sub>1</sub>, que representa el único factor de riesgo en los alimentos de origen animal para los humanos (Duarte, 2004)

Es posible que en los hatos lecheros se puedan consumir alimentos libres de aflatoxinas y así evitar la formación del metabolito. Por las características carcinogénicas de esta micotoxina es fundamental crear mecanismos de control en la cadena de la leche que permitan identificar las zonas de mayor índice de contaminación con el fin de establecer acciones que permitan dar soluciones (Duarte, 2004)

Con el advenimiento de los tratados de libre comercio el tema de la inocuidad de los alimentos va a ser el punto más importante que permitirá que una nación comercialice sus productos y compita con otras por el mercado (Duarte, 2004)

Muchos países han establecido niveles máximos de aflatoxina M<sub>1</sub> en la leche y sus derivados de ahí que los países que no se preparen para producir con estos indicadores de calidad no tendrán oportunidad de entrar en el mercado internacional y estarán exponiendo a su población a un agente posiblemente carcinogénico, tal como lo ha descrito la IARC (Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer) (Duarte, 2004).

La aflatoxina es muy resistente frente al calor. Los procedimientos de extracción son complicados y caros. Es posible destruirla con sustancias químicas como SO<sub>2</sub>, clorgas, oxipropilen, ácidos y álcalis. Sin embargo las manipulaciones disminuyen el valor alimenticio (Lindner, 1995).

De todas las micotoxinas conocidas, las aflatoxinas son las más investigadas debido al interés que despertaron a principios de la década de los 60, cuando se reconocieron sus efectos cancerígenos potentes sobre diversas especies animales y su amplia distribución como contaminantes naturales en los alimentos. Se han aislado 20 compuestos pertenecientes a la familia de las aflatoxinas, pero las más importantes son las aflatoxinas B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>) G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>) Y G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>) que suelen presentarse juntas, en diferentes proporciones, en los alimentos contaminados por *A. flavus* o *A. parasiticus*. (Silvestre, 1995).

## **2.10 LAS MICOTOXINAS Y SEGURIDAD ALIMENTARIA.**

Según la FAO (2001) la seguridad alimentaría se define como “la disponibilidad local de alimentos y su distribución, y el acceso de la persona a los alimentos para una vida saludable”.

Las aflatoxinas juegan un papel importante en este campo ya que el principal problema generado por estas se refiere a la disminución de los parámetros productivos en la mayoría de las especies destinadas a la producción de alimentos, ya que las intoxicaciones y el daño que causan estas en el sistema inmune pueden predisponer a las especies a enfermedades infecciosas enmascarando la etiología principal (Duarte, 2004).

El interés de los hongos y las micotoxinas es enorme, no solo desde el punto de vista científico, sino desde la perspectiva económica. Son muchos los problemas que originan, desde el agricultor hasta el consumidor final. Por ejemplo, las bajadas de rendimientos de las cosechas, los empeoramientos en los índices técnicos de los animales de granja, enfermedades de los mismos, alteraciones en los alimentos, pérdidas de características organolépticas y nutricionales, coste derivados con la prevención o el tratamiento (Carrillo, 2003).

## **2.11 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE AFLATOXINA M1 EN LECHE**

Desde el descubrimiento de las aflatoxinas y de sus propiedades tóxicas se han realizado muchas investigaciones sobre el desarrollo de métodos para el análisis de estas sustancias. Estos métodos son necesarios para el establecimiento de programas adecuados de control de alimentos, así como para la investigación sobre aspectos relacionados con las aflatoxinas tales

como su producción por los hongos aflatoxigénicos o el metabolismo de estas sustancias en los animales (Duarte 2004).

La estructura cumarínica de la aflatoxina, las insaturaciones y la presencia de grupos cetónicos en la molécula, le confieren dos propiedades importantes para la detección cromatográfica: la polaridad y la fluorescencia bajo luz UV (Céspedes, 1997)

Independientemente del método de análisis empleado, la determinación específica del nivel de aflatoxinas en un alimento implica generalmente: la recogida de una muestra representativa, la homogenización de la misma, la separación de una cantidad más pequeña a partir de la muestra original y el análisis posterior. El muestreo es un aspecto muy importante a la hora de realizar una valoración de la cantidad de aflatoxinas presentes en un alimento ya que puede ser fuente de un alto porcentaje de error. En este sentido, hay que tener en cuenta que la distribución de las aflatoxinas en los alimentos no suele ser homogénea, salvo en el caso de productos líquidos. Además, el nivel de aflatoxinas en un alimento puede variar en función de cuando se realice el muestreo. También influye el tamaño de la muestra ya que esta debe ser representativa y suficiente para realizar el análisis (en el caso de alimentos líquidos suelen precisarse cantidades menores) (Stoloff, 1991).

Los métodos analíticos para aflatoxina M1 se pueden dividir en dos grupos principales: métodos de screening y métodos analíticos cuantitativos. El screening utiliza principalmente ELISA (enzimo-inmuno análisis) o el radioinmunoanálisis raramente utilizado. La cuantificación implica generalmente la cromatografía de capa fina o la cromatografía líquida del alta performance (HPLC). Las columnas de Inmunoafinidad (IAC) para purificación fueron introducidas, y la combinación de IAC con HPLC ahora

ofrece el mejor método en lo que respecta a sensibilidad y confiabilidad para la detección de aflatoxina M1. (Romer labs, 2007)

**2.11.1 Técnica de Elisa.** Un grupo de técnicas que se vienen desarrollando desde los años ochenta para el análisis de aflatoxinas son las técnicas inmunológicas, basadas en los procedimientos de enzimoanálisis (ELISA) para la detección y cuantificación (Chu, 1991).

El ELISA se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmunoabsorbente) la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmobilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro (Chu, 1991).

Las técnicas analíticas para la detección de micotoxinas están en continuo desarrollo, existen kits ELISA comerciales de análisis basados en la técnica enzimo-inmuno análisis competitivo (Chu, 1991).. El principio básico de estos kits como se nombro anteriormente se basa en la afinidad de las aflatoxinas por anticuerpos específicos fijados a un soporte. La reacción de competición entre la aflatoxina y un producto enzimo/conjugado (coloreado) que contiene el kit indica la ausencia de aflatoxina cuando el resultado de la prueba es una señal coloreada, y presencia de las mismas en caso de ausencia de color. Estas técnicas permiten el control de las aflatoxinas in situ, de un modo rápido, fiable y sencillo (Biofarm 2007).

Los diferentes tipos de ELISA son los que se enumeran a continuación:

- ✓ Anticuerpos marcados:
- ✓ ELISA Directo
- ✓ ELISA Indirecto
- ✓ ELISA sándwich
- ✓ Antígeno marcado
- ✓ ELISA competitivo (Biofarm 2007).

- **RIDASCREEN Aflatoxin M130/15.**

Es un inmunoensayo enzimático competitivo para el análisis cuantitativo de aflatoxina M1 en leche.

La base del ensayo es la reacción antígeno-anticuerpo. Los pozos de la microplaca están sensibilizados con anticuerpos específicos dirigidos contra Aflatoxina M1. Se agregan los estándares de Aflatoxina M1 o las soluciones de muestras y, luego de un paso de lavado, se agrega el conjugado enzimático. La Aflatoxina M1 libre y el conjugado Aflatoxina M1- enzima compiten por los sitios de unión de los anticuerpos anti-Aflatoxina M1 (inmunoensayo enzimático competitivo); cualquier conjugado enzimático no unido se remueve en el paso de lavado.

Se agrega el sustrato/cromógeno a los pozos y se incuba. El conjugado enzimático unido convierte al cromógeno incoloro en un producto azul. La adición de la solución stop lleva a un cambio de color del azul al amarillo. La medición se hace fotométricamente a 450 nm y la absorbancia es inversamente proporcional a la concentración de Aflatoxina M1 en la muestra (Biofarm 2007).

- **Desempeño de la Prueba.**

- *Precisión* - los resultados son comparables a resultados publicados en HPLC.
- *Alta sensibilidad* – el límite de detección para leche fresca es de 5 ppt.
- *Repetibilidad* – se obtienen resultados consistentes en pruebas inter e intra laboratorios.
- *Reacción cruzada* – Aflatoxina M1: 100%
- *Alta recuperación* – Para leche fresca: 95%. (Biofarm 2007).

- **Beneficios.**

- Buen rango de cuantificación- cubre los estrictos niveles de regulación de la Unión Europea.
- Costo/ beneficio: Tiene 96 micro pozos que se pueden separar, haciendo más eficiente el uso del kit.
- Estable: Tiempo de caducidad es de 9 meses.
- Conveniente: Se tienen hasta 30 minutos para la lectura después de parar la reacción. (Biofarm 2007).

El formato de pozos de microtitulación en el sistema ELISA se adapta al análisis en serie de gran número de muestras. Esto permite economizar gastos. ELISA permite la inclusión de controles positivos durante el análisis.

Esto no ocurre en el sistema de la Columna de Inmuno Afinidad. La única forma de asegurarse que el sistema está siendo efectivo es mediante algún tipo de control concomitante. El formato de pozo de titulación permite el uso de controles, lo que asegura el buen funcionamiento del ensayo (Biofarm, 2007)

**2.11.2 Cromatografía de capa fina.** La cromatografía de capa fina es un método de multidetección por el que pueden determinarse la mayoría de las micotoxinas de interés. La extracción de las micotoxinas se realiza en un único disolvente, utilizando posteriormente disolventes de desarrollo específicos y reacciones de identificación selectivas para cada una de las micotoxinas. Mediante este método de multidetección se pueden cuantificar, entre otras, las siguientes micotoxinas: Aflatoxinas, Ocratoxina A, Citrinina, Zearalenona, Patulina (Carrillo, 2003).

Otro método empleado en el análisis de aflatoxinas es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección por fluorescencia. En este caso se emplea una columna de fase inversa (C18), seguida de la separación de una reacción de derivatización para proveer a la aflatoxina de la fluorescencia necesaria para poder cuantificarse. Previamente a la separación por HPLC se puede aislar selectivamente una micotoxina en concreto, mediante una columna de inmunoafinidad conteniendo anticuerpos específicos de la micotoxina en cuestión (Carrillo, 2003).

**2.11.3 Columna de inmuno afinidad.** El principio se basa en extraer la aflatoxina M<sub>1</sub> haciendo pasar la porción a analizar a través de una columna de inmunoafinidad. La columna contiene anticuerpos específicos ligados a un soporte sólido. A medida que la muestra pasa a través de la columna, los

anticuerpos se unen selectivamente con la aflatoxina M<sub>1</sub> (antígeno) formando un complejo antígeno-anticuerpo. Los demás componentes de la matriz de la muestra se lavan de la columna con agua. La aflatoxina M<sub>1</sub> es luego eluída de la columna, colectando el eluato. La cantidad de aflatoxina M<sub>1</sub> presente en este eluato se determina por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con detección fluorométrica (ICONTEC, 2003).

## **2.12 PROCEDIMIENTOS PARA REDUCIR LA PRESENCIA DE MICOTOXINAS.**

Es importante hacer énfasis en los procesos de detoxificación; se ha visto que es muy difícil evitar la contaminación de los sustratos con hongos y por lo tanto la detoxificación se ha convertido en la mejor herramienta frente a la problemática. La detoxificación busca disminuir las concentraciones de micotoxinas en los sustratos a través de métodos físicos, químicos o biológicos. No todas las micotoxinas se comportan de la misma manera por lo cual es importante tener en cuenta que no todos los métodos son aplicables siempre (Duarte, 2004)

El control de las micotoxinas debería ser enfocado dentro de un programa que se suele denominar "Control Integrado".

Esto supone aplicar unas medidas preventivas en todas las fases de producción del alimento en cuestión. Los controles y las medidas a aplicar deben hacerse extensivas a las siguientes etapas:

- Cultivo del alimento:
  - ✓ Selección de las variedades
  - ✓ Control de insectos y plagas

- ✓ Fertilización
- ✓ Rotación de cultivos
  
- Período de cosecha:
  - ✓ Procedimiento de recogida
  - ✓ Limpieza
  - ✓ Secado
  
- Almacenamiento, transporte y distribución:
  - ✓ Control de insectos
  - ✓ Control de humedad
  - ✓ Control de temperatura
  - ✓ Limpieza de las instalaciones

Las medidas a aplicar pueden variar dependiendo de la micotoxina que se quiera controlar. (Carrillo, 2003)

En cuanto a los tratamientos industriales de los alimentos contaminados con micotoxinas, éstos pueden ser:

- Métodos físicos de eliminación
  - ✓ Limpieza y separación. Se trata de eliminar aquellos granos y fracciones más contaminadas. Se pueden aplicar métodos manuales de separación y métodos de flotación y de segregación por densidad, por ejemplo para el maíz o el cacahuete. En efecto, en el caso del cacahuete, el 95% de las aflatoxinas se localizan en los granos que flotan. En el maíz, los granos rotos contienen más micotoxinas que los granos enteros. El inconveniente de estos métodos es que no permiten la separación total de las fracciones contaminadas. (Carrillo, 2003)

✓ Molienda húmeda. Se sabe que la aflatoxina B1 y la zearalenona, durante la molienda húmeda se concentran en las aguas de lavado y en la fibra. Sin embargo, el almidón resultante está prácticamente desprovisto de aflatoxinas. Por tanto, es un procedimiento interesante para el almidón obtenido, pero no así para los "subproductos" utilizados en alimentación animal, en los que por el contrario, las micotoxinas sufrirían un proceso de concentración. (Carrillo, 2003)

- Métodos físicos de detoxificación

✓ Desactivación térmica. Las aflatoxinas son bastante resistentes a la temperatura y por lo tanto, no se destruyen completamente por procedimientos como el autoclave, la ebullición en agua, u otros procesos térmicos. Por ejemplo, la aflatoxina M1 es estable durante la pasteurización de la leche. Sin embargo, las aflatoxinas pueden destruirse, por ejemplo, con una fritura en aceite o en seco, en el caso de los cacahuetes. También parece ser una buena opción el tostado en microondas. (Carrillo 2003)

✓ Irradiación. No existe mucha información sobre el efecto de irradiar alimentos contaminados con radiaciones gamma y UV. Son además procesos costosos y existe cierta reticencia a aplicarlos. (Carrillo, 2003)

- Adsorción

Las aflatoxinas se adsorben con gran eficacia a diversos materiales, cuando están en solución acuosa. Se han empleado carbones activos y ciertos aluminosilicatos. Estos últimos se utilizan en alimentación animal con eficacia, ya que diversos estudios demuestran que el grado de adsorción puede ser superior al 90%. No sucede lo mismo con otras micotoxinas, por

ejemplo la zearalenona, para la cual este mecanismo se muestra muy ineficaz. (Carrillo, 2003)

- Degradación química

El tratamiento con NH<sub>3</sub> ha sido objeto de numerosos estudios. Se utiliza actualmente en alimentos como la semilla de algodón y el cacahuate, particularmente contra aflatoxinas y fumonisina. Es particularmente eficaz si se realiza a altas temperaturas y presión elevada.

Hay otros tratamientos físico-químicos utilizados, según el caso, por ejemplo con bisulfito sódico en autoclave contra aflatoxinas, y utilizando glucosa o fructosa y calor para inactivar las fumonisinas.

Un tratamiento habitual es el realizado a base de álcalis y calor en el maíz, que reduce el nivel de aflatoxinas y fumonisina. Se denomina "nixtamalización". Su eficacia es controvertida y se ha sugerido modificar el mismo, usando peróxido de hidrógeno y bicarbonato sódico.

Como se puede afirmar que ningún tratamiento por sí mismo puede eliminar totalmente el agente contaminante, el control debe realizarse desde un punto de vista integrado. (Carrillo, 2003). Los métodos químicos y los biológicos buscan hidrolizar las micotoxinas ya sea a través de compuestos químicos, por la acción de microorganismos como hongos y levaduras o con la utilización de sustancias de origen vegetal como las saponinas (Duarte, 2004)

## **2.13 DEGRADACIÓN DE LA AFLATOXINA M1 EN LA LECHE**

Es de gran importancia determinar las posibilidades de eliminación o inactivación de la aflatoxina M1 en la leche, según estudios realizados este

procedimiento se puede realizar por 2 tratamientos: químico y físico; el estudio químico tiene la habilidad de degradar la aflatoxina M1 por medio de aditivos alimentarios, como sulfitos, bisulfitos y peróxido de hidrógeno. Cuando la leche cruda es contaminada con aflatoxina M1 esta es tratada con 0.4 % de bisulfito de potasio a 25°C por 5 horas, la concentración decrece a un 45%. Una concentración mayor de bisulfito es menos efectivo. La aflatoxina M1 contaminada naturalmente en la leche no fue afectada en la presencia de 1% de peróxido de hidrógeno a 30° C por 30 minutos, pero la adición de peróxido de hidrógeno a una concentración de 0,05-0,1% con lactoperoxidasas reduce una cantidad del 50% (FAO, 2001)

Los procesos físicos estudiados para la remoción de aflatoxina M1 de la leche incluyen adsorción y radiación. Se encontró en un estudio que el 5% de bentonita en la leche absorbe 89% de la aflatoxina M1. En un estudio el efecto de radiación ultravioleta con y sin peróxido de hidrógeno, la concentración de aflatoxina M1 fue reducida de 3,6 – 100%, dependiendo del tiempo de exposición de la leche a la radiación, el volumen de la leche tratada, la presencia de peróxido de hidrógeno y otros aspectos del diseño del experimento (FAO, 2001).

Los tratamientos físicos y químicos descritos no son aplicables de forma inmediata diariamente en la industria, por lo menos en la actualidad, ya que se sabe muy poco acerca de la seguridad (FAO, 2001).

## **2.14 IMPORTANCIA ECONÓMICA.**

La evaluación de las pérdidas económicas derivadas de la presencia de aflatoxinas en alimentos es compleja, debido a que son muchos los factores que hay que tener en cuenta para poder realizar la valoración. Por una parte,

la detección de materias primas o alimentos contaminados puede ocasionar desde la pérdida absoluta del producto o cultivo a la pérdida de mercados o la disminución de ingresos por la venta de las mercancías a menor precio (Palmgren y Hayes, 1987; Moss, 1991).

Hay que tener en cuenta que la trascendencia de estos hechos en algunos países productores es a veces notablemente elevada, sobre todo si se considera que muchos de estos países están en vías de desarrollo y su mayor fuente de ingresos es la exportación de materias primas para la elaboración de alimentos. Además, en la mayoría de los casos los países afectados presentan una climatología favorable para la producción de aflatoxinas y muchas veces los sistemas de almacenamiento y procesado no son los más adecuados. Un ejemplo del problema que puede plantear la contaminación con aflatoxinas fue en Turquía, donde se vio cerrado su mercado de higos secos en toda la región escandinava por detectarse aflatoxinas en un 30% de las muestras analizadas (Moss, 1991).

Cuando se detecta la presencia en partidas agrícolas de estas micotoxinas en concentraciones superiores a las establecidas por la legislación o, en su defecto, a las recomendadas por diferentes organismos, existen pocas alternativas. Una de ellas es la destrucción total del producto contaminado, como ocurrió a finales de los años setenta en Arizona donde se tuvieron que destruir miles de galones de leche (Palmgren y Hayes, 1987).

Por otro lado, es necesario considerar las pérdidas económicas derivadas de la aparición de brotes de intoxicación en animales de abasto. Este tipo de pérdidas son muy altas cuando se produce la muerte de un elevado número de animales. No obstante, y dado que los casos de intoxicaciones masivas no son muy frecuentes en la actualidad, hay que tener más en consideración el efecto del consumo reiterado de pequeñas dosis de aflatoxinas por los

animales. Esto se traduce, como hemos señalado anteriormente, en una mayor susceptibilidad frente a procesos infecciosos y parasitarios, como son: salmonelosis, brucelosis, listeriosis, coccidiosis, fasciolosis, candidiasis, etc., pérdidas en la productividad de los animales y retraso en el crecimiento, entre otras consecuencias mucho más difíciles de valorar desde el punto de vista económico (Corrier, 1991).

### **3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.**

#### **3.1 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.**

Desde el punto de sanidad podemos considerar que las aflatoxinas son sin duda las micotoxinas con mayor riesgo potencial para la salud humana. El contacto del hombre con las aflatoxinas puede provenir tanto del consumo directo de productos agrícolas contaminados (maíz, cacahuetes, etc) como del consumo de productos de animales que contengan residuos de aflatoxinas, en este caso los alimentos susceptibles de presentar contaminación van desde la leche y sus derivados, hasta la carne e hígado.

Son numerosos los factores que pueden influir para la contaminación con hongos productores de micotoxinas, entre estos están la resistencia genética del cultivo, las condiciones climatológicas caracterizada por temperaturas y humedades relativas altas, condiciones de transporte y almacenamiento inadecuado y secado deficiente (Wood, 1992). Por tanto la contaminación del producto puede ocurrir en cualquier punto de la cadena alimenticia, desde la cosecha, pasando por la recolección, almacenaje, transporte, elaboración y conservación.

El riesgo real para el hombre proviene de la ingestión de productos lácteos contaminados. Estudios científicos han reportado una mayor incidencia de aflatoxinas en la salud de las vacas productoras de leche debido al tipo de dieta que consumen; una vez estos animales ingieren la aflatoxina, por procesos de metabolismo esta es convertida contaminando el producto más importante para el hombre “la leche” aunque esta pase por un procesos de pasteurización, no logra eliminar las aflatoxinas ya que son resistentes a estos tipos de procesos.

En el hombre, las aflatoxinas han sido responsables de casos como: hepatitis aguda, síndrome de Reye y cirrosis en niños mal nutridos. La mayoría de estas enfermedades afectan principalmente a los niños ya que son mucho más susceptibles que los adultos a los efectos de las aflatoxinas, debido a su menor peso, menor capacidad para la detoxificación, metabolismo más rápido y desarrollo incompleto de diversos tejidos y órganos. El consumo en altas concentraciones de aflatoxina M1 puede llegar a causar hasta la muerte.

La presencia de micotoxinas causa la pérdida de la calidad de la leche, lo que conlleva a pérdidas económicas y un riesgo en inocuidad alimentaria para el consumidor, la detección de materias primas o alimentos contaminados puede ocasionar desde la pérdida absoluta del producto o cultivo a la pérdida de mercados o la disminución de ingresos por la venta de las mercancías a menor precio.

Ya que no existe evidencia suficiente sobre la ocurrencia de las micotoxinas en la leche en Colombia, es necesario empezar por detectar la presencia o ausencia de de la aflatoxinas M1 en leches y las zonas de incidencia, para su posterior control.

### **3.2 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.**

La leche es uno de los materiales producido por la naturaleza para funcionar exclusivamente como fuente de alimento y ha sido durante mucho tiempo el alimento número uno consumido por todos. Por este motivo es fundamental que esta no represente un riesgo para la salud humana, puesto que constituye una fuente nutritiva no superada por ningún otro alimento conocido por el ser humano. De allí radica la importancia de asegurar la ausencia de

micotoxinas en la leche puesto que esta es fundamental en la alimentación Colombiana y es de obligatoriedad del estado asegurar la buena calidad de la leche en todos los sectores de la población.

La ocurrencia de la contaminación con aflatoxinas en alimentos, humanos o animales es continuamente monitoreada a nivel mundial. Actualmente decenas de estudios son realizados cada año en países industrializados, mientras que en países subdesarrollados como Colombia muy poca información es generada por la falta de laboratorios adecuados, recursos humanos y económicos; también cabe nombrar la carencia de regulaciones sobre micotoxinas y la ausencia de vigilancia y control por parte de los organismos encargados de realizar estas labores.

Los hongos productores de aflatoxinas son comunes en lugares geográficos que presentan altos niveles de humedad y temperaturas promedio superiores a los 25°C, condiciones que se presentan en las zonas de producción de cereales de nuestro país (Díaz, 2005). Cuando el ganado que se utiliza para la producción de alimentos ingiere piensos contaminados con micotoxinas, no solo puede haber un efecto tóxico directo en los animales, sino también un traspaso de las toxinas a la leche, abriéndose así una nueva vía de exposición humana a las micotoxinas (OMS 1983).

La importancia de este tema es aún más crítica si pensamos en bebés, madres embarazadas y madres lactantes de esta población: los efectos negativos de las sustancias tóxicas son más severos en su caso, debido al tipo de alimento que reciben, especialmente para los bebés en sus primeros años de vida. Los infantes pueden tener una ingesta muy alta de alimentos tales como las fórmulas de leche, donde la aflatoxina M1 se puede encontrar en estos tipos de alimento. Además, los infantes y los niños, corren mayor riesgo que los adultos de intoxicación, a menos que los fabricantes de

alimentos supervisen y restrinjan la presencia de Aflatoxina M1 en los productos terminados.

Si se piensa en infantes y niños, ellos son los principales consumidores de leche y productos lácteos. Los controles estrictos y pruebas frecuentes son las únicas maneras de reducir los riesgos de enfermedades graves para los niños.

El desarrollo de una legislación Colombiana referentes a los niveles máximos permisibles de micotoxinas en materias primas y alimentos terminados deberá basarse en estudios preliminares llevados a cabo en nuestro país, para lo cual se requiere del apoyo económico y logístico de varios sectores de la economía Colombiana y del trabajo multidisciplinario de universidades, institutos de investigación, industria, y entes reguladores gubernamentales.

En este trabajo se pretende analizar o verificar si existe o no la presencia de aflatoxina M<sub>1</sub> en leches frescas que se distribuyen y comercializan en la zona del Valle del Cauca, ya que la legislación Colombiana no ampara a la leche de este tipo de contaminación, aclarando que este factor representa un gran riesgo para la salud de los Colombianos.

Al igual se busca abordar la problemática del consumo de leche de mala calidad, donde está presente la aflatoxina M1 afectando gravemente la salud del consumidor, el cual tiene que confiar en los procedimientos del control de calidad que se le realiza a la leche que consume.

## **4. OBJETIVOS.**

### **4.1 OBJETIVO GENERAL.**

Determinar y cuantificar por medio de la técnica de Elisa la presencia de aflatoxina M1 en leches frescas en la zona del Valle del Cauca (Colombia).

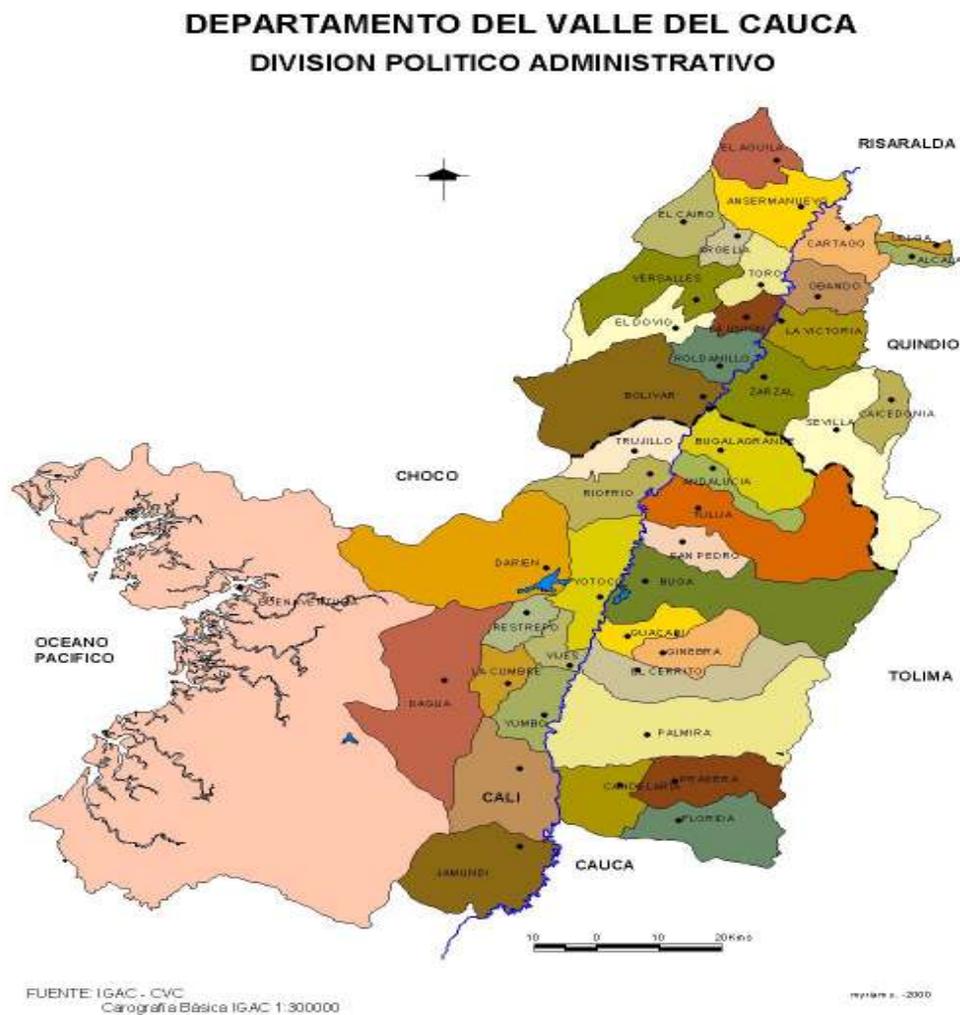
### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

- Implementar la técnica de Elisa para la detección de aflatoxinas M<sub>1</sub> en la leche, y así comprobar la existencia de esta en las leches frescas distribuidas en el valle del Cauca, Colombia.
- Cuantificar y detectar la presencia de aflatoxina M1 en leches frescas.
- Determinar la incidencia de la aflatoxina M<sub>1</sub> en la leche fresca, en el Valle del Cauca ya que los trabajos en Colombia acerca del tema son muy escasos.
- Aportar investigación a la problemática de las micotoxinas en Colombia dadas las condiciones incipientes que se tienen en la investigación sobre el tema.
- Determinar pautas para establecer el límite de tolerancia máxima permitido para Colombia.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 5.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO Y TOMA DE MUESTRA.

La evaluación y determinación de aflatoxina M1 en leches frescas de la zona del valle del cauca se realizó en muestras tomadas de 5 hatos de las regiones de **Yumbo, Jamundí, Cali, Palmira, Buga** (figura 4).



**Figura 4.** Mapa geográfico del Valle del Cauca ([tulua.metalogo.org.co/apc-aa-files/valle](http://tulua.metalogo.org.co/apc-aa-files/valle)).

Para facilidad de manipulación de las muestras y de la información cada hato se nombró como se indica en la tabla 5. De cada hato se recolectaron 8 muestras cada una de un volumen de 500 ml, estas fueron tomadas al azar de cantinas que correspondieron al lote de producción del día.

**Tabla 5.** Denominación para cada hato.

Nomenclatura	Ciudad
Productor 1	Jamundí
Productor 2	Palmira
Productor 3	Buga
Productor 4	Cali
Productor 5	Yumbo

Las muestras se tomaron con todas las respectivas medidas de asepsia. Las cantinas que contenían las leches de donde se extrajo la muestra fueron agitadas 15 veces antes del muestreo. Para obtener cada una de las muestras se introdujo una cuchara en acero inoxidable a la mitad de la cantina extrayendo el líquido, luego fue envasada en un frasco shot de 500 ml previamente esterilizado y marcado con número de muestra, fecha, nombre del hato y región. Las muestras fueron almacenadas en una nevera de refrigeración portátil a una temperatura entre 0 a 4 °C, estas se mantuvieron conservadas con geles sintéticos, los cuales no eliminaron agua a las muestras durante el proceso de conservación tal como lo sugiere la Norma Técnica Colombiana “manual de métodos fisicoquímicos para el control de calidad de la leche y sus derivados”.

En los laboratorios de la Universidad Javeriana para cada una de las muestras (frascos shot de 500 ml) se extrajo 10 ml de leche y se envasaron un tubo tapa rosca de 16 x 150 ml previamente esterilizado y marcado con número de muestra fecha nombre del hato y región (figura 5).



**Figura 5.** Muestras de leche

Adicionalmente se tomó del productor 1, con todas las medidas de asepsia 250 ml de leche, esta fue envasada en un frasco shot de 250 ml y almacenada en la nevera de refrigeración, para el montaje de los controles positivos. Después del muestreo, las leches fueron llevadas inmediatamente a los laboratorios de la Pontificia Universidad Javeriana para su posterior procesamiento.

## **5.2 PREPARACIÓN DE CONTROLES POSITIVOS.**

Para el análisis de los controles se prepararon 2 concentraciones una de 5 ppt correspondiente al límite mínimo de detección y otra de 50 ppt correspondiente a la concentración máxima permitida por la unión europea. Con todas las medidas de bioseguridad, se tomó del frasco shot de 250 con una probeta previamente estéril 50 ml de leche fresca para cada uno de los controles y se envasaron en dos frascos shot estériles de 50 ml (figura 6).



**Figura 6.** Controles positivos

Por otro lado con todas las medidas de bioseguridad y en una cabina de flujo laminar tipo vertical, a partir de la solución fortificadora de aflatoxina M1 donada por el Instituto Colombiano Agropecuario de Mosquera (ICA) se tomaron 25 µl de micotoxina para cada una de los controles y se envasaron en cada uno de los frascos shot que contienen la leche, se agitaron en forma circular.

### **5.3 ELABORACIÓN DE LA CURVA PATRÓN.**

Para la elaboración de la curva patrón correspondiente a este estudio se realizó con 6 sensibilizados con anticuerpos anti-aflatoxina cada una de 1,3 ml a concentraciones de 0 ppt (estándar 1), 5 ppt (estándar 2), 10 ppt (estándar 3), 20 ppt (estándar 4), 40 ppt (estándar 5), 80 ppt (estándar 6), por duplicado.

Se utilizó 12 pozos para montar la curva patrón (anexo 1); se agregó 100 µl de las soluciones estándar en pozos separados por duplicado, seguido se mezcló la placa suavemente por rotación y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente (20-25°C) en oscuridad, luego se eliminó el líquido de los pozos, se llenó cada pozo con 250 µl de buffer de lavado y nuevamente se eliminó el líquido (se repitió el paso de lavado dos veces más). A continuación se agregó 100 µl del conjugado enzimático diluido, posteriormente se mezcló la placa suavemente por rotación y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente (20-25°C) en oscuridad. Se repitió el paso de lavado dos veces más. Finalmente se agregó 100 µl de sustrato/cromógeno a cada pozo, se mezcló la placa y en seguida se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente (20-25°C) en oscuridad, se agregó 100 µl de la solución stop a cada pozo, se mezcló suavemente por rotación y se leyó a una absorbancia de 450 nm dentro de los 15 minutos posteriores a

la adición de la solución. Se analizaron los resultados por el software RIDA SOFT Win.

El trazado de la curva de los estándares se mostró en el certificado de Aseguramiento de la calidad que estaba incluido en la caja del ensayo (anexo 2). El estándar cero será por lo tanto igual a 100% y los valores de absorbancia se representan como porcentajes.

#### **5.4 PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA.**

Las muestras se almacenaron en refrigeración a una temperatura de 0 a 4 °C en un lugar fresco protegidas de la luz, en los laboratorios de la Pontificia Universidad Javeriana. Cada muestra de leche se centrifugó para descremarlas por 10 min / 3500 g /10 °C en una centrifuga refrigerada, de esta manera se mantuvo la temperatura de refrigeración, según lo establecido por el protocolo de RIDASCREEN Aflatoxin M1 30/15, luego de la centrifugación, se removió la capa superior de crema completamente por aspiración con pipeta Pasteur, y se usó la leche descremada (sobrenadante desnatado) directamente en el ensayo (100 µl por pozo).

#### **5.5 CONSIDERACIONES GENERALES.**

Posteriormente se llevaron todos los reactivos a temperatura ambiente (20 – 25 °C / 68- 77 °F) antes de su uso.

El conjugado aflatoxina M1 estaba concentrado, como el conjugado enzimático diluido tiene una estabilidad limitada, se reconstituyó solamente la cantidad que se necesita para el ensayo. Antes de pipetear,

el conjugado enzimático se agitó cuidadosamente. Para su reconstitución, el conjugado enzimático se diluyó 1:11 (1 + 10) en Buffer de dilución de conjugado.

Se utilizó como buffer de lavado un buffer PBS tween y se disolvió la totalidad de las sales en 1 litro de agua destilada.

### 5.6 IMPLEMENTACIÓN DEL ENSAYO.

- ✓ Se colocó un número suficiente de pozos en el soporte de la microplaca para las muestras las cuales fueron analizadas por duplicado. Se documentó la posición de las muestras (anexo 1, figura 7).



**Figura 7.** Foto de soporte de Elisa con pozos

- ✓ Se agregó 100  $\mu$ l de las muestras procesadas, según la preparación de la muestra mencionada anteriormente, en pozos separados por duplicado, luego se mezcló la placa suavemente por rotación manual y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente (figura 8).



**Figura 8.** Foto de adición de las muestras a los pozos

1. Se eliminó el líquido de los pozos y se golpeó la microplaca vigorosamente hacia abajo sobre un papel absorbente (3 veces) para asegurarse una completa remoción del líquido de los pozos, posteriormente se llenó cada pozo con 250  $\mu$ l de buffer de lavado, según las consideraciones generales nombradas anteriormente y se eliminó nuevamente el líquido. Se repitió el paso de lavado dos veces más (figura 9).



**Figura 9.** Foto de lavado de los pozos

2. Se agregó 100  $\mu$ l del conjugado enzimático diluido, luego se mezcló la placa suavemente por rotación manual y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente (20-25  $^{\circ}$ C / 68-77  $^{\circ}$ F) en oscuridad (figura 10).



**Figura 10.** Foto de adición de conjugado

3. Se eliminó el líquido de los pozos y se golpeó la microplaca vigorosamente hacia abajo sobre un papel absorbente (3 veces) para asegurar una completa remoción de líquido de los pozos. Se llenó cada pozo con 250  $\mu$ l de buffer de lavado, según las consideraciones generales nombradas anteriormente y se eliminó nuevamente el líquido. Se repitió el paso de lavado 2 veces (figura 11).



**Figura 11.** Foto de lavado de los pozos

4. Se agregó 100  $\mu$ l sustrato-cromógeno a cada pozo. Se mezcló suavemente la placa en forma manual e incubó por 15 minutos a temperatura ambiente (20 -25  $^{\circ}$ C / 68 -77  $^{\circ}$ F), en oscuridad (figura 12).



**Figura 12.** Foto de adición de sustrato cromógeno

5. Se agregó 100  $\mu$ l de solución stop a cada pozo, se mezcló suavemente por rotación manual de la placa y se leyó la absorbancia a 450 nm dentro de los 15 minutos posteriores a la adición de la solución stop (figura13).



**Figura 13.** Foto de adición de solución stop, lectura

Estuvo disponible un software especial, RIDA SOFT WIN, para evaluar los ensayos RIDASCREEN ELISA.

Los valores de absorbancia se representarán como porcentajes. Para obtener la concentración de Aflatoxina M1 en ng/L contenida en la muestra, la concentración leída de la curva de calibración se multiplicó por el correspondiente factor de dilución. Se trabajó de acuerdo a las indicaciones detalladas, el factor de dilución para leche fue de 1.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 6.1 RESULTADOS DE LOS CONTROLES POSITIVOS.

Para una mayor confiabilidad y comparación de los resultados reportados se analizaron controles positivos “muestras fortificadas” con sus respectivas replicas (tabla 6), se tomaron dos concentraciones una de 5 ppt que corresponde al limite mínimo de cuantificación del kit de Elisa y una de 50 ppt que corresponde al máximo nivel tolerable de aflatoxina M1 para los países europeos según la OFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN UNION.

**Tabla 6.** Resultados de absorbancia de las muestras fortificadas, lectura en multiescan a 450 nm.

<b>Muestra (ppt)</b>	<b>Absorbancia</b>	<b>Absorbancia Replica</b>
5	1,095	1,045
50	0,420	0,436

La lectura de las absorbancias de las muestras fortificadas (tabla 7) revelaron una diferencia no significativa con las absorbancias y las concentraciones reportadas por la curva de calibración del certificado de calidad del Kit de Elisa (anexo 2) como también con los datos de la curva elaborada para este estudio (tabla 9), se cree que la razón es debido a la leche que se utilizó para los controles, proveniente del productor 1, ya que esta leche contenía concentraciones mínimas de aflatoxina M1 (tabla 9) que en unión con la adición del fortificado aumentó la concentración de la aflatoxina. Sin embargo esto no quiere decir que los resultados informados fueran erróneos, simplemente deberá de realizarse un factor de corrección.

Con respecto al coeficiente de variación (tabla 7) este no sobrepasó el 10%, el cual es el valor estipulado por la casa comercial que elaboró el kit de Elisa, confirmando así la veracidad de los resultados.

**Tabla 7:** Resultados de absorbancia promedio entre replica y muestra, coeficiente de variación, % de absorbancia y concentración de micotoxina en ppt, de las muestras fortificadas.

<b>Concentración (ppt)</b>	<b>Abs promedio</b>	<b>Coeficiente de variación</b>	<b>% de abs</b>	<b>Concentración (ppt)</b>
5	1,07	3,3	69,8	11,32
50	0,428	2,6	27,9	53,56

Para este estudio se tomó como referencia la norma internacional europea (50 ppt) la cual es estricta en cuanto a los niveles tolerables de aflatoxina M1, los datos fueron analizados bajo este criterio ya que si consideramos que los factores como la cantidad de micotoxina ingerida diariamente en función de la concentración de micotoxina, la cantidad de alimento ingerido, la continuidad o intermitencia de ingestión del alimento contaminado, el peso corporal, el estado fisiológico y de salud del individuo conllevan a la influencia y disponibilidad de la toxicidad de las micotoxinas en los humanos (Gimeno & Martins, 2003), es posible establecer que al ser mayor el valor de la concentración de aflatoxina reglamentada por la FAO (0,5 ppb) los consumidores tendrían una probabilidad más alta de adquirir las enfermedades producidas por esta toxina. El caso sería crítico para los niños y los jóvenes ya que estos 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

(Kuiper, 1994). En los niños el cerebro continúa su desarrollo durante muchos años después del nacimiento y esto puede causar una mayor susceptibilidad a las micotoxinas que afectan al sistema nervioso central (Kuiper, 1994).

Gimeno, 2004 referenció el resultado de las discusiones establecidas al respecto del nivel máximo de contaminación con AFM1 de 0,05 ppb (unión europea) Vs 0,5 ppb (FAO), se citaron datos aportados por investigadores durante estos últimos años con respecto a la aparición de AFM1 en leches, citados en el apartado 3 de este artículo, se destaca uno de los reportes más importantes, el de análisis de 10778 muestras de leche en Europa, el cual informó que el valor medio de contaminación fue de 0,023 ppb, de donde se concluye que el nivel de 0,05 ppb puede conseguirse perfectamente; por este motivo Gimeno, 2004 y Stoloff et al., 1991 describen que debe aplicarse el principio de ALARA (As Low As Reasonable Achievable), es decir, que el nivel máximo debe ser tan bajo como sea razonablemente posible, por el contrario de la opinión de los países que están contra ese nivel y defienden el de 0,5 ppb. También comenta que la exposición a cualquier nivel cuando se trata de un carcinógeno genotóxico, como es el caso de la AFM1, puede suponer un riesgo sanitario para los consumidores, en especial para los niños. Esto refuerza la aplicación del principio de ALARA, que dice que para ese tipo de carcinógenos, no hay una dosis máxima por debajo de la cual no se produzcan tumores malignos, por lo que el nivel de exposición debería ser de 0 para tener un riesgo nulo de padecer cáncer de hígado que pueda ser provocado por las aflatoxinas en general.

El Comité científico de la Comunidad Europea indica que hay que valorar cuidadosamente los riesgos derivados de la exposición a estas micotoxinas, ya que la ingesta de leche y derivados entre lactantes y niños puede ser considerable. Los países que defienden el nivel máximo de 0,5 ppb de AFM1,

afirmaron que se podrían producir consecuencias económicas negativas, debido a la dificultad de exportación de leche para países que solo aceptan el nivel máximo de 0,05 ppb. Sin embargo, no fue presentada ninguna información detallada de la magnitud, importancia, relevancia o impacto estimado de tales consecuencias económicas.

## 6.2 RESULTADOS PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN.

La curva de calibración para este estudio fue construida a partir de concentraciones de 0, 5, 10, 20, 40, 80 ppt de aflatoxina M1 con sus respectivas replicas (tabla 8 y figura 13).

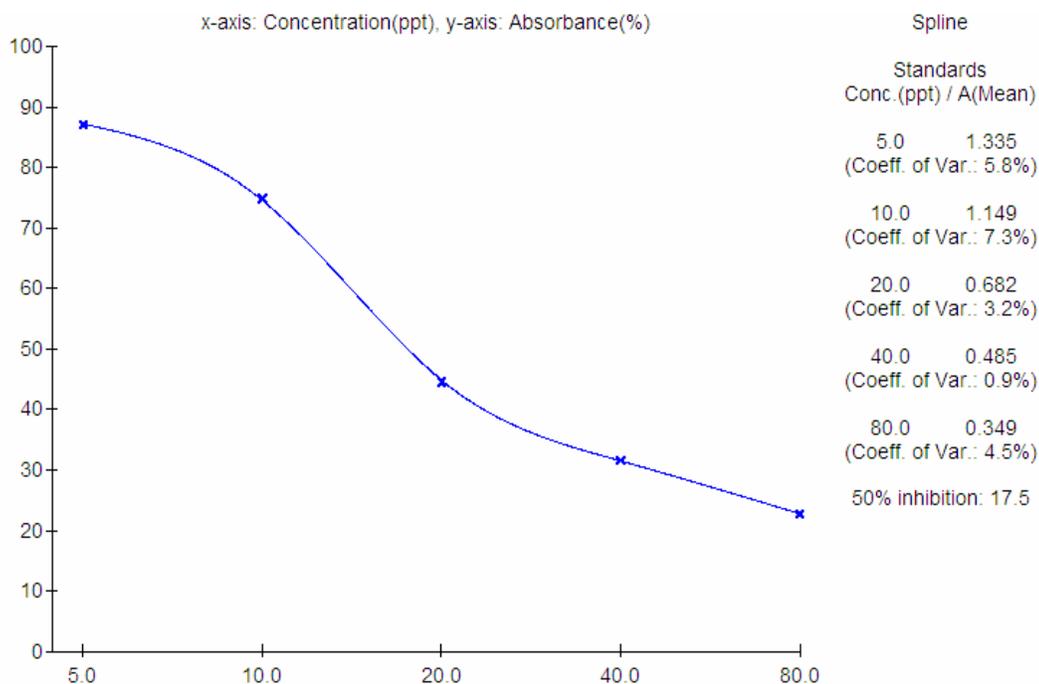
**Tabla 8.** Resultados de absorbancia de las concentraciones estándar del Kit de Elisa RIDASCREEN Aflatoxin M130/15, lectura en multiescan a 450 nm.

<b>Concentración estándar (ppt)</b>	<b>Absorbancia</b>	<b>Absorbancia promedio</b>
0	1,541	1,525
5	1,281	1,39
10	1,209	1,09
20	0,698	0,667
40	0,482	0,488
80	0,338	0,36

Al realizar la curva de calibración estándar para la técnica de Elisa RIDASCREEN Aflatoxin M130/15, los resultados arrojados de absorbancia y concentración (tabla 9) dieron valores similares en comparación con los datos de referencia incluidos en el Kit como controles de calidad (anexo 2).

**Tabla 9:** resultados de absorbancia promedio entre replica y muestra, coeficiente de variación, % de absorbancia y concentración de micotoxina en ppt, de las concentraciones estándar provistas por el kit de Elisa RIDASCREEN Aflatoxin M130/15.

Concentraciones estándar (ppt)	Absorbancia promedio	Coeficiente de variación	% de absorbancia	Concentración (ppt)
0	1,533	0,7	100	No contable
5	1,335	5,8	87,1	5,06
10	1,149	7,3	75	9,9
20	0,682	3,2	44,5	20,22
40	0,485	0,9	31,6	39,56
80	0,349	4,5	22,8	80,03



**Figura 14.** Curva de calibración del kit de Elisa RIDASCREEN Aflatoxin M130/15 para las concentraciones 0,5, 10 20,40 y 80 ppt.

Para los datos del estándar 1 que equivalen a la concentración de 0 ppt la absorbancia promedio fue de 1,533 al ser comparada con la absorbancia del certificado de calidad del kit, la cual fue de 1,459 se puede observar que hay una aproximación entre los datos, de manera que si se analiza la tabla 9 (resultado de absorbancia promedio de las concentraciones estándar) y el anexo 2 (certificado de calidad del kit de Elisa RIDASCREEN Aflatoxin M130/15), se detalla que para todos los datos el comportamiento fue similar. Para el caso del coeficiente de variación ninguno de los datos superó el 10%, demostrando así que los datos son verídicos (figura 14).

El 50% de inhibición para la curva de calibración realizada para este estudio arrojado por el software RIDA SOFT Win fue de 17,5 (figura 13), matemáticamente es el dato que se encuentra a la mitad de la curva de calibración, este dato no superó el 30% lo cual es lo estipulado por la casa comercial del kit y es similar a la curva de calibración del certificado de calidad que fue de 27.3 (anexo 2).

Este valor se aplica cuando se trabaja con pruebas ELISA competitivas y teóricamente es la cantidad de toxinas que tiene que tener una muestra para inhibir el 50 % de la reactividad de la toxina marcada adicionada (conjugado).

### **6.3 RESULTADO DE CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINA M1 PARA CADA UNA DE LAS MUESTRAS TOMADAS.**

Estos resultados corresponden a las muestras tomadas para el productor 1 y el análisis de la concentración de aflatoxina M1 para cada una de ellas. La concentración de la aflatoxina M1 según los datos arrojados para este productor oscilan en un rango de 2,94 a 8,96 ppt (tabla 10).

**Tabla 10:** Resultados de absorbancia para las muestras de leches tomadas al productor numero 1, lectura en multiscan a 450 nm.

<b>PRODUCTOR 1</b>		
<b>N° de muestras</b>	<b>Absorbancia de la muestra</b>	<b>Abs de la Replica</b>
<b>1</b>	1,388	1,424
<b>2</b>	1,473	1,315
<b>3</b>	1,348	1,326
<b>4</b>	1,305	1,242
<b>5</b>	1,195	1,197
<b>6</b>	1,256	1,285
<b>7</b>	1,346	1,425
<b>8</b>	1,42	1,317

El coeficiente de variación de los resultados no sobrepasaron el 10 % (tabla 11) según lo estipulado por la casa comercial del kit, esto quiere decir que los resultados no tienen una variación representativa entre la réplica y la muestra. Si las absorbancias son comparadas con los datos arrojados por la curva patrón del estudio, se puede observar que estas tienen una similitud y es correspondiente a las concentraciones, este es el caso de la muestra

numero 3 el cual tiene un absorbancia de 1,337 con una concentración de 4,99 ppt (tabla 11), si se compara con el dato de la concentración de 5 ppt de la curva patrón para la cual da una absorbancia de 1,335 (tabla 9) se puede ver que los valores son similares.

**Tabla 11:** Resultados de absorbancia promedio entre replica y muestra, coeficiente de variación, % de absorbancia y concentración de micotoxina en ppt, de las muestras analizadas para el productor numero 1.

PRODUCTOR 1				
N° de muestras	Absorbancia promedio	Coeficiente de variación	% de absorbancia	Concentración (ppt)
1	1,406	1,8	91,7	2,94
2	1,394	8	90,9	3,25
3	1,337	1,2	87,2	4,99
4	1,273	3,5	83	7,09
5	1,196	0,1	78	8,96
6	1,27	1,6	82,8	7,18
7	1,385	4	90,3	3,49
8	1,368	5	89,2	3,99

Por otro lado se considera que el nivel de concentración de aflatoxina para este productor no es peligroso para la salud de sus consumidores ya que se encuentra en los niveles mínimos y no próximos al nivel máximo permisible por la Unión Europea, por tanto es posible que este productor no tenga problemas de contaminación con hongos como *A. flavus* y *A. parasiticus* o posiblemente le esté dando un buen manejo a la comida que ingiere los animales de su hato, la característica importante de resaltar para este productor es que su ganado no consume alimento concentrado ni pienso, se

alimenta por pastoreo, método que reduce la probabilidad de contaminación en el ganado por aflatoxina B1.

Para el caso del productor 2 el rango de concentración de aflatoxina M1 para las muestras analizadas se encuentra entre los 54,39 ppt a los 70,2 ppt (tabla 12).

**Tabla 12:** Resultados de absorbancia para las muestras de leches tomadas al productor número 2, lectura en multiescan a 450 nm.

<b>PRODUCTOR 2</b>		
<b>N° de muestra</b>	<b>Absorbancia de la muestra</b>	<b>Absorbancia de la replica</b>
<b>1</b>	0,372	0,39
<b>2</b>	0,381	0,396
<b>3</b>	0,398	0,421
<b>4</b>	0,416	0,384
<b>5</b>	0,373	0,378
<b>6</b>	0,44	0,41
<b>7</b>	0,38	0,436
<b>8</b>	0,433	0,399

Los datos reportados mostraron que las concentraciones (tabla 13 y anexo 3) superaron los parámetros dictados por la unión europea más no

sobrepasan los niveles dictados por la FAO, pero como se nombró anteriormente se adoptaran los parámetros fijado por OFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN UNION, lo que significa que esta leche es un potencial riesgo para la salud humana, destacando que este productor dota de leche a una zona y comercializadora representativa e importante del valle del cauca, por

tanto la mayoría de habitantes de esta zona del país la consumen, aumentando más el riesgo sanitario. Los posibles factores que conllevaron a la contaminación de estas leches y que fueron visualizados a la hora del muestreo fueron: clima cálido, humedad alta, mal manejo en el almacenaje del concentrado y pienso para los animales; sin embargo existen otros factores que influyen en la concentración de AFM1 en la leche que son: la raza de la vaca, la concentración de AFB1 en la ración, la cantidad, la duración del consumo de alimento contaminado y el estado de salud del animal. Sin embargo, a todo esto se debe añadir el sistema metabólico de un animal poligástrico, lo que provoca que las concentraciones de AFM1 en la leche varíen entre animales, de un día para otro y de una producción de leche a la siguiente (Rosiles y bautista 2002).

**Tabla 13:** Resultados de absorbancia promedio entre replica y muestra, coeficiente de variación, % de absorbancia y concentración de micotoxina en ppt, de las muestras analizadas para el productor numero 2.

<b>PRODUCTOR 2</b>				
N° de muestras	Absorbancia promedio	Coefficiente de variación	% de absorbancia	Concentración (ppt)
1	0,381	3,3	24,9	68,1
2	0,388	2,7	25,3	65,73
3	0.409	4	26,7	59,06
4	0,4	5,7	26,1	61,84
5	0,375	0,9	24,5	70,2
6	0,425	5	27,7	54,39
7	0,408	9,7	26,6	59,36
8	0,416	5,8	27,1	56,98

La concentración de aflatoxina B1 es uno de los factores más importantes ya que la AFM1 es uno de sus derivados metabólicos que va a la leche contaminándola, se estipula que la vaca puede transformar AFB1 en AFM1 dentro de las 12 a 24 horas de ingestión del alimento contaminado, incluso a las 6 horas ya pueden aparecer residuos de AFM1 en la leche (Rodricks & Stoloff, 1977; Gimeno & Martins, 2000).

Estudios anteriores han demostrado que la contaminación de AFM1 en la leche y los productos lácteos es el resultado de la exposición de AFB1 a ganado lechero a través de los piensos como es el caso para este productor, confirmando así que este podría ser uno de los factores de mayor peso para que las leches estuvieran contaminadas con aflatoxina M1 (Rastogi et al., 2004). Rosiles y Bautista, 2002 describen que las concentraciones de aflatoxina B1 en alimento para vacas lecheras están presentes en el alimento de tipo pienso, en cambio en alimento fresco recién cortado de la pradera no existen. Esto de alguna forma afirma que este productor por utilizar pienso y concentrado como alimento sumando un mal manejo aumenta el riesgo de consumo y de transmisión de la aflatoxina B1 del alimento a la leche como M1, aunque no se puede determinar con precisión la cantidad de aflatoxina B1 que cada animal consume (Rosiles y Bautisata, 2002).

Gimeno 2004 comenta que con una ingesta de AFB1 correspondiente a 2-60 mg/vaca/día, los residuos de AFM1 en leche podrían oscilar entre 1 y 50 ppb. Investigadores como Rastogi, 2004 han sugerido que la tasa de conversión de aflatoxina B1 a aflatoxina M1 que se excreta en la leche es de 1,6%. Otros autores como Patterson et al., 1980; Van egmond, 1989 refieren que el nivel de residuos de AFM1/día (mg) en leche podría ser aproximadamente del 2,2% de la ingesta diaria de AFB1 (mg). Algunos autores como Sieber & Blanc, 1978; Van Egmond, 1989 dicen que esta relación estaría comprendida entre 0 y 4% con una media del 1%; incluso estos autores proponen la

siguiente ecuación:  $y = -2,55 + 0,84x$  ( $r^2 = 0,73$ ;  $n = 43$ ), donde  $x = \text{mg AFB1/vaca/día}$ ;  $y = \text{microgramos AFM1/litro de leche}$  (calculando una media de 20 litros de leche/vaca/día). La importancia de estos datos residen en que si se saca correctamente el porcentaje de conversión de la AF B1 a la M1, se podría establecer el porcentaje de concentración máxima permitido de aflatoxina M1 en la leche; como también el porcentaje de concertación de aflatoxina B1 en pienso y concentrado para los animales ya que como se puede ver en los datos anteriormente nombrados están estrechamente ligados. Sin embargo este tema continúa siendo un debate.

Los datos obtenidos de concentración de aflatoxina M1 para el productor 3 se encontraron en un rango de 15 ppt a 18 ppt, (tabla 14 y 15) ninguna de las muestras superaron el valor de establecido por la unión europea ni por la FAO, siendo así producto apto para el consumo y sin riesgo para la salud pública.

**Tabla 14:** Resultados de absorbancia para las muestras de leches tomadas al productor numero 3, lectura en multiescan a 450 nm.

<b>PRODUCTOR 3</b>		
<b>N° de muestra</b>	<b>Absorbancia de la muestra</b>	<b>Absorbancia de la replica</b>
<b>1</b>	0,766	0,752
<b>2</b>	0,817	0,853
<b>3</b>	0,849	0,774
<b>4</b>	0,772	0,866
<b>5</b>	0,778	0,963
<b>6</b>	0,912	0,871
<b>7</b>	0,88	0,82
<b>8</b>	0,787	0,821

**Tabla 15:** Resultados de absorbancia promedio entre replica y muestra, coeficiente de variación, % de absorbancia y concentración de micotoxina en ppt, de las muestras analizadas para el productor numero 3.

<b>PRODUCTOR 3</b>				
N° de muestras	Absorbancia promedio	Coeficiente de variación	% de absorbancia	Concentración (ppt)
1	0,756	1,3	49,5	17,73
2	0,835	3	54,5	15,84
3	0.811	6,5	52,9	16,4
4	0,819	8,1	53,4	16,21
5	0,87	1,5	56,8	15,08
6	0,891	3,3	58,1	14,64
7	0,85	5	55,4	15,51
8	0,804	3	52,4	16,57

Sin embargo se encuentran niveles de aflatoxina M1 levemente altos, por tanto es posible que la comida (pienso) que sé le suministro al ganado este contaminada con *A. flavus* o *A.parasiticus*, lo cual es de sumo cuidado ya que si se tiene un descuido la población del microorganismo podría subir aumentando el nivel de concentración de aflatoxina B1, la cual sería ingerida por el animal siendo convertida en aflatoxina M1 y finalmente desencadenando la contaminación de la leche

Para los productores 4 y 5 las concentraciones de aflatoxina M1 fueron mínimas (tabla 17 y 19), para algunas de las muestras el nivel era tan bajo (< 5 ppt) que no pudo ser cuantificado por el kit de Elisa, la característica a resaltar de estos productores es el tipo de alimento “pasto fresco” que se le suministra a su ganado, estos productores no utilizan ni pienso ni concentrado.

**Tabla 16:** Resultados de absorbancia para las muestras de leches tomadas al productor numero 4, lectura en multiescan a 450 nm.

<b>PRODUCTOR 4</b>		
<b>N° de la muestra</b>	<b>Absorbancia de la muestra</b>	<b>Absorbancia de la replica</b>
1	1,382	1,57
2	1,547	1,519
3	1,642	1,56
4	1,585	1,494
5	1,566	1,413
6	1,515	1,445
7	1,552	1,531
8	1,527	1,414

**Tabla 17:** Resultados de absorbancia promedio entre replica y muestra, coeficiente de variación, % de absorbancia y concentración de micotoxina en ppt, de las muestras analizadas para el productor numero 4.

<b>PRODUCTOR 4</b>				
<b>N° de muestras</b>	<b>Absorbancia promedio</b>	<b>Coeficiente de variación</b>	<b>% de absorbancia</b>	<b>Concentración (ppt)</b>
1	1,476	9	96,3	1,48
2	1,533	1,3	100	0,664
3	1,601	3,6	104,4	No detectable
4	1,539	4,2	100,4	No detectable
5	1,486	7	96,9	1,31
6	1,48	3,3	96,5	1,41
7	1,541	1	100,5	No detectable
8	1,47	5,4	95,1	1,58

**Tabla 18:** Resultados de absorbancia para las muestras de leches tomadas al productor numero 5, lectura en multiescan a 450 nm.

<b>PRODUCTOR 5</b>		
<b>N° de la muestra</b>	<b>Absorbancia de la muestra</b>	<b>Absorbancia de la replica</b>
<b>1</b>	1,554	1,573
<b>2</b>	1,449	1,555
<b>3</b>	1,523	1,53
<b>4</b>	1,534	1,336
<b>5</b>	1,494	1,509
<b>6</b>	1,392	1,33
<b>7</b>	1,274	1,395
<b>8</b>	1,529	1,369

**Tabla 19:** Resultados de absorbancia promedio entre replica y muestra, coeficiente de variación, % de absorbancia y concentración de micotoxina en ppt, de las muestras analizadas para el productor numero 5.

<b>PRODUCTOR 5</b>				
<b>N° de muestras</b>	<b>Absorbancia promedio</b>	<b>Coeficiente de variación</b>	<b>% de absorbancia</b>	<b>Concentración (ppt)</b>
1	1,563	0,9	102	No detectable
2	1,502	5	98	1,07
3	1,526	0,3	99,5	0,749
4	1,435	9,8	93,6	2,26
5	1,502	0,7	98	1,07
6	1,361	3,2	88,8	4,2
7	1,334	6,4	87	5,1
8	1,449	7,8	94,6	1,97

Con estos valores de concentración de aflatoxina se demuestra que en este país es posible realizar y mantener una reglamentación estricta con un nivel de aflatoxina M1 de máximo 50 ppt y contradecir lo dicho por delegaciones de algunos países que afirman que el nivel de 0,05 ppb es difícil de lograr en varias regiones del mundo y aún más para los países en desarrollo ya que podría haber una reducción significativa de la disponibilidad de la leche y consecuencias negativas en la nutrición, en caso de que hubiera una reducción significativa del nivel máximo de 0,5 ppb, ellos establecen que lo más razonable es un nivel de 0,5 ppb para la protección de la salud pública. A todo esto se añadió que hubo países que afirmaron que un límite máximo de 0,5 ppb de AFM1 debería ser considerado como el nivel mínimo que se podía conseguir debido a problemas de gestión de las concentraciones máximas de AFB1 en el alimento compuesto.

Finalmente de las 40 muestras tomadas y en total analizadas se encontraron 8 muestras que corresponde al productor 2 contaminadas con niveles altos de aflatoxina M1, los niveles de contaminación se encuentran en un rango entre 54 y 70,2 ppt, y equivale a un 20 % de las muestras analizadas. Los valores medios de la concentración para este estudio fueron de 15,6 ppt respectivamente, evidentemente a partir de los resultados el rango de contaminación no fue muy alto, sin embargo tiene incidencia que puede afectar notoriamente la salud de los colombianos.

## 7. CONCLUSIONES.

Los niveles de concentración de aflatoxina M1 encontrados no fueron muy altos.

El productor 2 el cual suministra leche a una de las comercializadora más importante de esta región estaba contaminado con niveles altos de aflatoxina M1 encontrándose fuera de los parámetros reglamentados por la unión europea.

El porcentaje de las muestras encontradas fue tan solo del 20 %, es un nivel en donde debe haber más alerta ya que en cualquier momento podría incrementar la concentración de aflatoxina M1 arriesgando la salud pública.

La población más preocupante sigue siendo los lactantes y los niños ya que tienen mayor riesgo, por tanto este estudio demostró que es de suma importancia reglamentar la concentración de aflatoxina M1 y ajustarla a los parámetros europeos.

Debe ser habitualmente evaluado la concentración de aflatoxina B1 en los piensos y concentrados que séle suministre como alimento al animal.

Se demostró en este estudio que los productores que suministraban pienso como alimento a las vacas productoras de leche tuvieron concentraciones mínimas de aflatoxina M1.

Finalmente se llegó a la conclusión de que en lo que respecta a la AFM1, se debe continuar manteniendo el nivel de riesgo lo más bajo posible y estar siempre alerta. El riesgo que se corre hoy en día a la exposición de otras

micotoxinas, metales pesados, hidrocarburos, dioxinas,..etc, conduce a que la aplicación del principio de ALARA sea estrictamente necesario, y por tanto en el caso de la AFM1, el nivel máximo de 0,05 ppb es perfectamente razonable y admisible.

## 8. RECOMENDACIONES.

1. En todos los casos hay que asegurarse de que el nivel de aflatoxina B1 del pienso terminado es adecuado a su uso previsto (es decir, según la madurez y la especie de los animales a que se vaya a dar) y se ajusta a los códigos y directrices nacionales o a los dictámenes veterinarios.
2. Considerar la restricción de piensos contaminados con aflatoxina B1 a un porcentaje de la ración diaria de forma que la ingesta diaria de aflatoxina B1 no ocasione la presencia de residuos significativos de aflatoxina M1 en la leche.
3. Si no se puede llevar a la práctica la restricción de los piensos, es necesario desviar el uso de piensos muy contaminados hacia animales no lecheros exclusivamente”.
4. Es ineludible para Colombia realizar una reglamentación conforme dictan los parámetros de la unión europea para la concentración de aflatoxina M1 tanto para leche fresca como para derivados de la leche asegurando así la vida de los consumidores.
5. Es necesario realizar el análisis y por tanto reglamentar los productos lácteos destinados a lactantes y personas de la tercera edad ya que es la población de mayor importancia y la más susceptible a este tipo de toxinas.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

ADAMS, M. MOSS, M. 1997. Microbiología de los alimentos. Editorial Acribia. Págs. 130 -139.

AFANADOR, J. 1997. Efecto de las aflatoxinas sobre la salud y producción porcinas. Trabajo de grada. Universidad Nacional de Colombia. Bogota, Colombia.

ALLCROFT, R., H. ROGERS, O. LEWIS, E. NABNEY. (1966). Metabolism of aflatoxin in sheep. Excretion of the "milk-toxin". Nature, 209:154-155.

Allen, C. 2007 Micotoxicosis. Memorias y estudios experimentales. Revista Ciencia; Nat y Clima.

AMIOT, J.1991.Ciencia y tecnología de la leche. Editorial Acribia. Pág. 3, 55,99

BETINA, V. 1989. Mycotoxins. Chemical, Biological and Enviromental Aspects. Ed. Elsevier. Bratislava, 350 págs.

BIENDL, M. 2004. Actividad anticancerígenas: un nuevo aspecto de las sustancias contenidas en el lúpulo. Orverde pg 2.

BIOFARM 2007. Manual de instrucciones de manejo para kit de Elisa RIDASCREEN Aflatoxin M130/15.

BLANCO, J. 1986. Investigación sobre la problemática de la presencia de aflatoxinas en la leche y productos lácteos fermentados (yogur y queso). Tesis doctoral. Universidad Computense. Madrid, España.

BLANCO, J; DOMINGUEZ, E; GOMEZ, L; GARAYZABAL, J; GARCIA, A AND SUAREZ, G. 1988. Presence of aflatoxin M<sub>1</sub> in comercial ultra-high-temperature treated milk. *Applied Enviromental Microbiology*. 54:1622-1623.

CARRILLO, L. 2003. *Microbiología Agrícola*. Capitulo 6. 7.

CAWOOD, M; GELDERBLOM, W; VLEGGAR, R; BEHREND, Y; THIEL, P; AND MARASAS, W. 1991. Isolation of Fumonisin mycotoxins: A cuantittive approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 39(11): 1958-1962.

CELIK, T; SARIMEHMETOUGLU, B AND KUPLULU, O. 2005. Aflatoxin M1 contamination in pasteurised milk. *Veterinarski arhiv*. 75(1): 57-56.

CÉSPEDES, A. 1997. Desarrollo y estandarización de tres técnicas analíticas por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y determinación de los niveles de contaminación con aflatoxinas zearalenona y ocratoxina A en materias primas y alimento terminado empleado para la nutrición de aves y credos en Colombia. Trabajo de grado en Salud y producción animal. Universidad nacional de Colombia

CHU, F. *Immunoassays for mycotoxins*. 1986. *Modern methods in the analysis and structural elucidation of mycotoxins*. Editorial Academic Press: London. p. 207-237.

CHU, E. 1991 *Mycotoxins: food contamination, mechanism, carcinogenic potential and preventive measures*. *Mutation Res.*, 259:291-306.

CORRIER, D. 1991. *Mycotoxicosis: mechanisms of immunosuppresion*. *Vet. Immunol. Immunopathol*, 30:73-87.

DIAZ, G. 1995. Regulación de niveles máximos tolerables de micotoxinas en materias primas y alimentos terminados. *Veterinaria al día*. 1 (3): 22-27.

DIAZ, G. 2005. Aflatoxina M1: un carcinógeno de potencial presencia en la leche. Grupo Conciencias COL0010403 .Seminario Nacional en Producción y Sanidad Bovina. Bogota, Colombia.

DUARTE, S. 2004. Las micotoxinas, conceptos básicos y su perspectiva desde la salud pública veterinaria. Trabajo de Grado. Universidad Nacional de Colombia. Bogota, Colombia.

ELLIS, W; SMITH, J; SIMPSON, B AND OLDHAM, J. 1991. Aflatoxins in food: Occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 30(3): 403-439.

FAO. 2004. Manual sobre la aplicación del sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC) en la prevención y control de las micotoxinas. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia.

FAO.2001.Safety evaluation of certain mycotoxins in food. Pags: 1-103

FRISVAD, J Y SAMSON, S. 1992. Filamentous fungi in foods and feed: ecology, spoilage and mycotoxin production. In Arora D.K; Mukerji K.G; Marth E.H (Editores): *Handbook of applied mycology*. Vol 3. Foods and feeds. New York: Dekker Inc. Pp 31-68.

GORELICK, N. 1990. Risk assessment for aflatoxin: Metabolism of aflatoxin B1 by different species. *Risk Analysis*, 10:539-559.

GIMENO, A.; MARTINS, M.L. (2003). "Micotoxinas y Micotoxicosis en Animales y Humanos". Special Nutrients, Inc. USA (Ed.). Talleres graficos del SRL, Buenos Aires (Argentina). pp. 1-160.

GIMENO, A. (2004). Aflatoxina M1 en leche. Riesgo para la salud pública prevención y control. Associação Portuguesa dos Industriais de Alimentos Compostos para Animais (IACA), Alimentação Animal (2004), nº 49, pp. 32-44.

GIMENO, A.; MARTINS, M.L. (2000). "Residuos de micotoxinas en leche, huevos y tejidos comestibles de aves, cerdos y rumiantes (parte I)", Albéitar, 36: 40-42.

GOTO, T. 1990. mycotoxins: current situation. Food Reviews International. 6:265-290.

HERRERA, T. ULLOA, M. 1998. El reino de los hongos. Segunda Edición. Universidad Nacional Autonoma de Mexico. Págs.: 183 .184

ICONTEC. 2003. Leche y leche en polvo. Determinación del contenido de aflatoxina M<sub>1</sub> purificación mediante columna de inmunoafinidad y determinación por cromatografía líquida de alta eficiencia. Norma Técnica Colombiana (NTC 5219). Bogota, Colombia.

ICONTEC. 2003. manual de métodos fisicoquímicos para el control de calidad de la leche y sus derivados. Norma Técnica Colombiana. Bogota, Colombia.

JARVIS, B AND WILLIAMS, A. 1987. Methods for detecting fungi in foods and beverages. En "Food and beverage mycology". Ed. Beuchat. New York. Pp 599-636.

KIERMEIER, F AND MASHALEY. 1997. Influence of raw milk processing on the aflatoxina M<sub>1</sub> content of milk products. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 164:183-187.

KIERMEIER, F. 1973. Aflatoxin residues in fluid milk. Applied environmental Microbiology. 35:271-273.

KUIPER T. 1994. "Prevention of Human Mycotoxicoses Trough Risk Assesment Risk Management". In: J.D.Miller H.L.Trenholm (eds.), Mycotoxins In Grain, Compouns Other Than Aflatoxin. Eagan Press, St.Paul, Minnesota, pp. 439-469.

KUIPER – GOODMAN, T. 1991. Risk assessment to humans of mycotoxins in animal derived food products. Vet Hum Toxicol. 33:325-333.

LINDNER, E. 1995. Toxicologia de los alimentos. Segunda edicion. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. 262 pags.

MILLER, J. 1995. Fungi and mycotoxins in grain: Implications for stored product research. Journal of stored products research. 31(1): 1-16

MOSS, M. 1991. Economic importance of mycotoxins - Recent incidence. International Biodeterioration, 27: 195-204.

NAHM, K. 1990. Conditions for mould grow and aflatoxina production in feedstuffs. Pig News and Information. 11:349-352.

ICONTEC. Norma técnica Colombiana. "Manual de Métodos Fisicoquímicos para el Control de Calidad de la Leche y sus Derivados".

NORTHOLT, M Y VAN EGMOND, H. 1982. Contamination of ripening cheeses with *Aspergillus versicolor* and sterigmatocystin. In: Proceedings of a fourth meeting on micotoxinas in animal disease. Patterson, D y Gray, D (editors). Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Alnwick, Northumberland. Pp: 90-92.

OMS. 1983. Criterios de salud ambiental 11. Micotoxinas. Póublicación científica N° 453. Washington, D.C. USA. 131 p.

OMS. 2002. Evaluación de algunas micotoxinas en los alimentos. Informe de la 56ª reunión del comité mixto FAO/OMS de expertos en aditivos alimentarios, OMS serie de informes técnicos series 906, organización mundial de la salud (OMS), Ginebra, Suiza.

ORTIZ, M Y PALACIOS, C. 2002. Aislamiento y caracterización de la carga microbiana presente en el proceso maltero y determinación del efecto antagonico de *Geotrichum candidum*. Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

PALMGREN, M.S. AND A.W. HAYES. 1987. Aflatoxins in foods. En: Mycotoxins in food. Editorial Academic Press: London, p. 65-95.

PATTERSON, D AND ROBERTS, B. 1975. An improved semi-quantitative method for the estimation of aflatoxina M<sub>1</sub> un liquid milk. Food Cosmet. Toxicol. 13:542-542.

PATTERSON, D.S.; GLANCY, E.M.; ROBERTS, B.A. (1980). "The carry-over of aflatoxin M1 into the milk of cows fed rations containing a low concentration of aflatoxin B1". Food Cosmet. Toxicol. 18: 35-37.

PERAICA, M. RADIC, B; LUCIC, A AND PAVLOVIC. 1999. Toxic effects of mycotoxins in human. Bulletin of the World Health Organization. 77(9): 754-766.

PITT, J. 1996. What are mycotoxins?. Australian Mycotoxin Newslettter. 7(4): 1.

PLACINTA, C. D'MELLO, J. and MACDONALD, A. 1999. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with Fusarium mycotoxins. Animal Feed Science and Technology 78: 21-37.

POHLAND, A AND WOOD, G. 1987. Occurrence of mycotoxins in food. En: Myrotoxins in food. Editorial Academic Press: London. p. 35-64.

Rastogi, S. Premendra, D. Dwivedi, K. Khanna, D. 2004. Detection of Aflatoxin M1 contamination in milk and infant milk products from Indian markets by ELISA. Science direct. Food Control 15: 287-290.

RODRICKS J.V.; STOLOFF, L. 1977. "Aflatoxin Residues from Contaminated Feed in Edible Tissues of Food-Producing Animals" in Mycotoxins in Human and Animal Health. Edited by : Joseph V. Rodricks, Clifford H. Hesseltine and Myron A. Melhman. Pathotox Publishers, INC . Park Forest South Illinois., pp.67-79.

ROSILES, M. BAUTISTA, O. 2002. Concentración de aflatoxinas M1 y B1 en alimento y leche de vacas que reciben alimento fresco y henificado.

Departamen de nutrición y farmacia de medicina veterinaria y zootecnia.  
Universidad Unam, mexico.

Romer labs. 2007. Spotlights. Volumen 4. (En línea). [http:  
www.romerlabs.com/downloads/Mycotoxins/Aflatoxins.pdf](http://www.romerlabs.com/downloads/Mycotoxins/Aflatoxins.pdf).

SIEBER, R. Y BLANC, B. (1978). Excreción y presencia de alfatoxina M1 en  
leche y productos lacteos- una revisión de la literatura. Mitteilungen aus dem  
Gebiete der Lebensmittel-untersuchung un Hygiene, 69: 477-491.

SILVESTRE, A. 1995. Toxicología de los alimentos. Primera edicion. Editorial  
hemisferio sur. Buenos aires, Argentina. 161 pags.

SPREER. E. 1991. Lactologia Industrial. Segunda Edicion. Editorial Acribia.  
617 pags

STOLOFF, L; VAN EGMOND AND PARK, D. 1991. Rationales for the  
establishment of limits and regulations for mycotoxins. Foods Addit. Contam.  
8:213-222.

[tulua.metalogo.org.co/apc-aa-files/valle](http://tulua.metalogo.org.co/apc-aa-files/valle). 2008 (en linea). Consulta: 22/12/08.

STOLOFF, L AND TRAGER, W. 1965. Recomendad decontamination  
procedure for aflatoxin. Agriculture Chemistry. 48:681-682.

URREGO, J. DIAZ, G. 2006. Aflatoxinas: mecanismos de toxicidad en la  
etiología de cáncer hepático celular. Revista Facultad de Medicina  
Universidad Nacional de Colombia. vol. 54 no.2 Bogotá.

VAN DER LINDE, J; FRENS, A; JONGH, M AND VLES, R. 1964. Inspection of milk from cows fed aflatoxin containing groundnut meat. Tijdschr Diergeneeskd. 89:1082-1088.

VAN EGMOND, H.P. 1989. "Aflatoxin M1: Occurrence, Toxicity, Regulation" in Mycotoxins in Dairy Products. Hans P. Van Egmond (Ed.) Elsevier Applied Science, London and New York. Chapter 2, pp.11-55.

WOGAN, O. (1992). Aflatoxins as risk factors for hepatocellular carcinoma in humans. Cancer Res. Suppl. 52:21145-21185.

## 10. ANEXOS.

**Anexo 1.** Posición de los pozos de las muestras, controles, y curva patrón dentro del soporte del kit de Elisa RIDASCREEN Aflatoxin M1 30/15.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P1	P5	P9	P13	P17	Std1	Std5	P21	P25	P29	P33	P37
B	P1	P5	P9	P13	P17	Std1	Std5	P21	P25	P29	P33	P37
C	P2	P6	P10	P14	P18	Std2	Std6	P22	P26	P30	P34	P38
D	P2	P6	P10	P14	P18	Std2	Std6	P22	P26	P30	P34	P38
E	P3	P7	P11	P15	P19	Std3	P41	P23	P27	P31	P35	P39
F	P3	P7	P11	P15	P19	Std3	P41	P23	P27	P31	P35	P39
G	P4	P8	P12	P16	P20	Std4	P42	P24	P28	P32	P36	P40
H	P4	P8	P12	P16	P20	Std4	P42	P24	P28	P32	P36	P40

**P=** Muestras

**Std=** Estándares (curva de calibración)

**P41=** Control positivo 5 ppt

**P42=** Control positivo 50 ppt

**Columna 1 y 2=** Productor 1

**Columna 3 y 4=** Productor 2

**Columna 5 =** Productor 3

**Columna 6 y 7 =** Estándares (curva de calibración) y controles positivos

**Columna 8 =** Productor 3

**Columna 9 y 10 =** Productor 4

**Columna 11 y 12 =** Productor 5

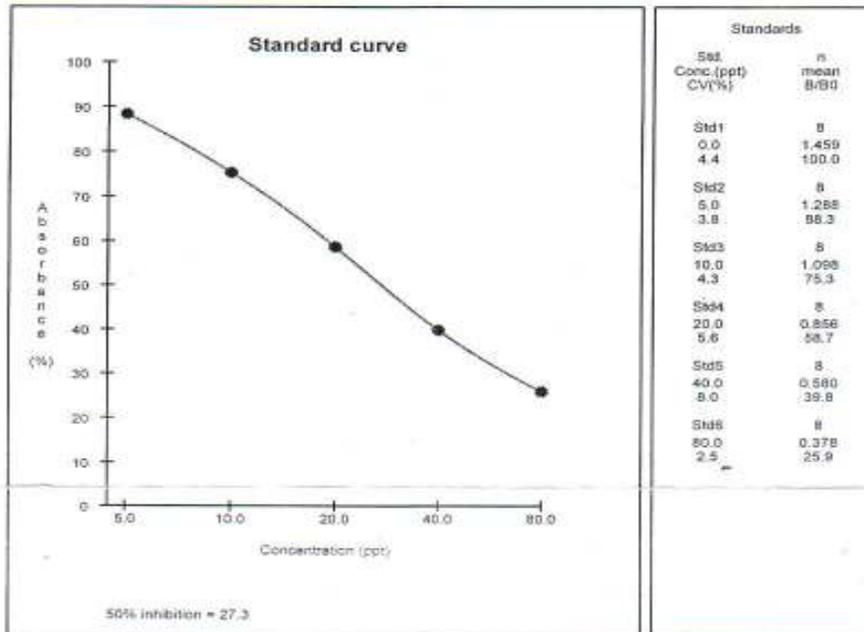
**Anexo 2. Certificado de calidad kit de Elisa RIDASCREEN Aflatoxin M1.**

**QUALITY ASSURANCE CERTIFICATE**

**RIDASCREEN® Aflatoxin M1 30/15**

**Art. No.: R1111 Lot: 05158 Expiry: 2009-05**

R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany certifies that this batch has been approved by the Quality Assurance Department and conforms with specifications



	Lot No.	Expiry
Microwell plate	03517	2009-05
Standards	02138	2009-08
Conjugate	04138	2009-05
Buffer1	01148	2009-08
Buffer2	05138	2009-08
Substrate/Chromogen	04377	2010-03
Stop solution	01497	2012-11
Washing buffer salt	100207	2010-10

Please note:

The absorbance for the standards may decrease during the shelf life of the kit. The general shape of the curve will remain similar, while the slope might change slightly. Furthermore refer to product leaflet 8. Indication of instability or deterioration of reagents.

sign.: Edda Rohm  
Quality Assurance Representative

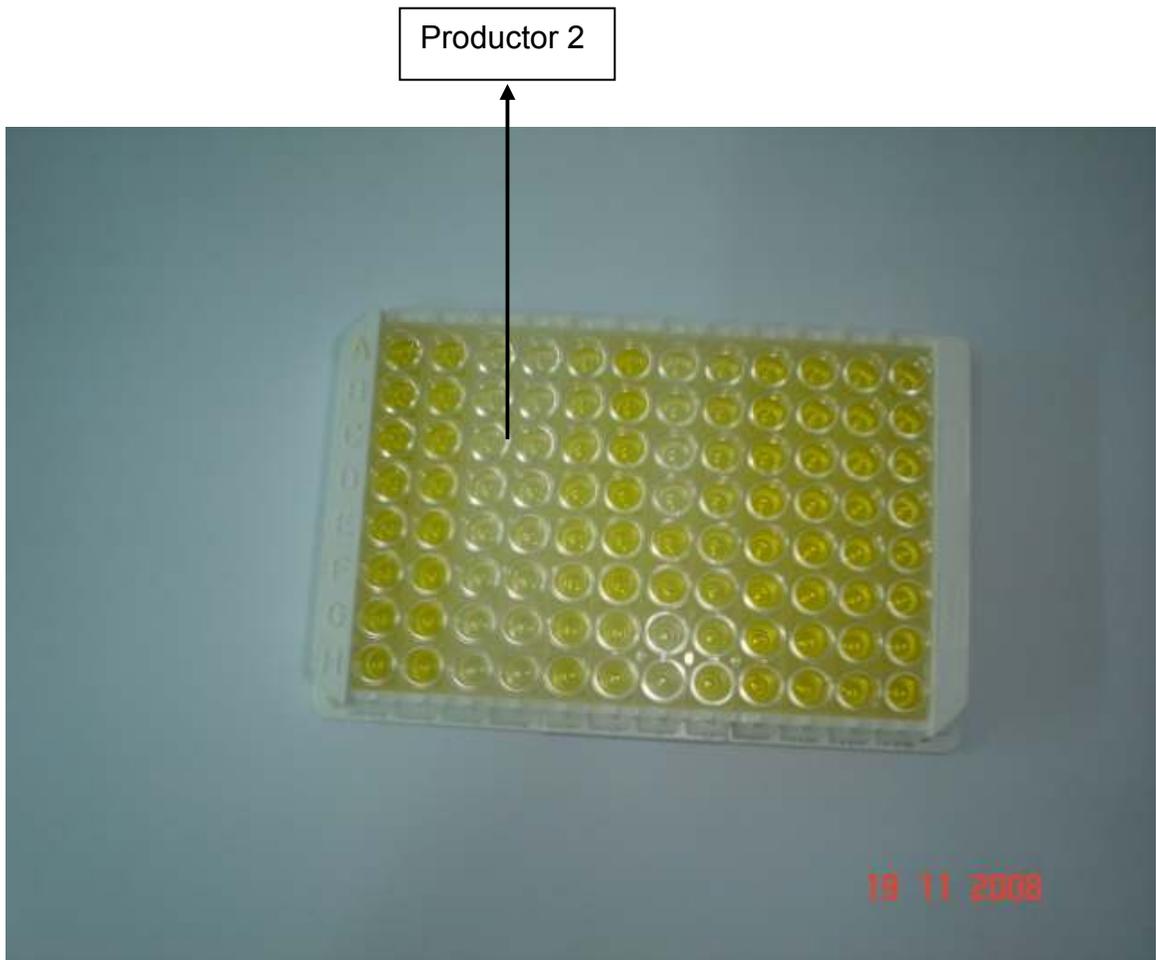
Date: 2008-04-11

Remark:  
This document has been created electronically and is therefore valid without a signature.

The R-Biopharm group is DIN EN ISO 9001 certified.



**Anexo 3.** Foto resultado final del montaje del kit de Elisa RIDASCREEN Aflatoxin M1 30/15.



Se puede observa que los pozos que están incoloros son los pozos que dieron concentraciones de aflatoxina M1 superiores a al 50 ppt máximo tolerable por la unión europea.