

## INVESTIGACION DE AFLATOXINAS EN LECHE NATURAL, ESTERILIZADA Y EN POLVO.

(INVESTIGATION OF AFLATOXINS IN NATURAL, STERILIZED AND POWDERED MILK).

por

Jodral Villarejo, M., Zurera Cosano, G., Jordano Salinas, R., Polo Villar, L.M. y Pozo Lora, R.

Departamento de higiene, inspección y microbiología de los alimentos. Facultad de veterinaria. Universidad de Córdoba; y Sección de bromatología. Instituto de zootecnia..C.S.I.C.

Con la colaboración de la Srta. M<sup>a</sup> Gloria Fernández Marín. Ayudante de Investigación del C.S.I.C.

Palabras clave: Bromatología. Toxicología. Lactología. Micotoxinas. Aflatoxina M. Aflatoxina B. Leche natural. Leche esterilizada. Leche en polvo. Leche maternizada en polvo.

Keywords: Milk industry. Toxicology. Micotoxins. M Aflatoxin. B aflatoxin. Natural milk. Sterilized milk. Powdered milk. Artificial mothers. Milk in powder.

### Summary

Aflatoxins of groups M and B have been investigated in 1150 samples of natural milk from Andalusian (Spain), collected during the four seasons; in 330 samples of sterilized milk from 49 Spanish dairy centers, and in 77 samples of powdered milk (10 whole milk, 14 of skimmed milk and 54 of artificial mothers'milk).

15.2 p.100 of the samples of natural milk collected in winter contained M<sub>1</sub> aflatoxins; 8.5 p.100 of those collected in spring showed traces of M<sub>1</sub> aflatoxin and only 0.17 p.100 of all the samples analysed contained B<sub>1</sub> aflatoxin. The presence of aflatoxins was not detected in preserved milk.

### Resumen

Se han investigado aflatoxinas de los grupos M y B en 1150 muestras de leche natural de Andalucía (España), recogidas en las cuatro estaciones del año; en 330 muestras de leche esterilizada procedentes de 49

Recibido para publicación el 29-6-1983.

JODRAL ET AL.: AFLATOXINAS EN LECHE NATURAL, ESTERILIZADA Y EN POLVO.

centrales lecheras españolas, y en 77 muestras de leche en polvo (10 de leche entera, 14 de leche descremada y 54 de leche maternizada).

El 15,2 p.100 de las muestras de leche natural recogidas en invierno contenía aflatoxinas M<sub>1</sub>; el 8,5 p.100 de las recogidas en primavera contenía trazas de aflatoxina M<sub>1</sub>; y sólo el 0,17 p.100 de todas las muestras analizadas estaba contaminado con aflatoxina B<sub>1</sub>. No se detectó la presencia de aflatoxinas en leches conservadas.

Introducción y revisión bibliográfica

Allcroft y Carnaghan<sup>1)</sup> demostraron que la leche de vacas alimentadas con piensos conteniendo harina de cacahuets con aflatoxina B<sub>1</sub> contenían un factor tóxico que inducían similares lesiones en el hígado de pato que las causadas por la ingestión de la aflatoxina. Posteriormente se aclaró que la toxicidad de esta leche está determinada por la presencia de un componente fluorescente que se denominó aflatoxina M<sub>1</sub>, que era un metabolito hidroxiderivado de la aflatoxina B<sub>1</sub> y que presentaba una toxicidad similar (De Long y col.9); Buttler y Clifford<sup>7)</sup>; Allcroft y col.<sup>2)</sup>; Holzapfel y col.<sup>16)</sup>; Nabney y col.<sup>32)</sup> y Polan y col.<sup>34)</sup>).

Masri y col.<sup>31)</sup> observaron que las condiciones para una eliminación importante de aflatoxina M<sub>1</sub> por la leche se dan en la ingestión del 1 al 3 p.100 de micotoxina con el pienso. Lafont y Lafont<sup>27)</sup> han señalado que la conversión de aflatoxina B<sub>1</sub> en M<sub>1</sub>, por el organismo de la vaca, parece ser ligeramente más activa cuando la ingestión es continuada durante varios meses. Allcroft y Carnaghan<sup>1)</sup> estimaron que la pasterización y la obtención de leche en polvo no reducen la toxicidad debida a la aflatoxina de la leche. Sin embargo Purchase y col.<sup>37)</sup> han demostrado que durante el procesado de la leche se reduce el contenido de aflatoxina M<sub>1</sub>, llegando a la conclusión de que a más alta temperatura más bajo nivel de aflatoxina residual.

La aflatoxina M<sub>1</sub> es tan potente cancerígeno como la aflatoxina B<sub>1</sub> (Purchase y Voster<sup>35)</sup>; Sinnhuber y col.<sup>40)</sup>). La FAO<sup>11)</sup> considera que las aflatoxinas deben ser eliminadas del consumo humano y animal, ya que debilitan la vida y además reducen la productividad agrícola y ganadera.

La investigación de las aflatoxinas de la leche y en los productos lácteos han sido objeto de numerosos estudios (Robinson<sup>38)</sup>; Purchase y col.<sup>36)</sup>; Lück y col.<sup>30)</sup>; Fishbein y col.<sup>12)</sup>; Brewington y col.<sup>6)</sup>; Jacquet y col.<sup>17)</sup>; Jacquet<sup>18)</sup>; Lemiesgek-Chodorowska<sup>29)</sup>; Janicki y col.

19); Indestad y col. 46); Veringa y col. 45); Brandl 5); Kiermeier y col. 23); Kiermeier y col. 26); Hanssen 13); Hanssen y Jung 14); Jung y Hanssen 22) y Neuman-Kleinpaul y col. 33)).

### Material y métodos

Se analizaron 1.150 muestras de leche natural, procedentes de la región andaluza (tabla I).

Tabla I. Número de muestras de leche natural y procedencias.

Provincia	Puntos de recogida	Nº de muestras recogidas				Total de muestras
		Primavera	Verano	Otoño	Invierno	
Málaga	10	100	50	50	50	250
Granada	18	50	50	50	50	200
Córdoba	16	100	50	50	50	250
Jaén	7	50	50	50	50	200
Sevilla	21	50	50	50	50	200
Cádiz	16	50	--	--	--	50
6	88	400	250	250	250	1.150

Las muestras se recogieron de las cántaras de entrega de los productores, en el andén de recepción de las centrales lecheras, y se transportaron al laboratorio bajo refrigeración.

De leche esterilizada se analizaron 330 muestras procedentes de 49 centrales lecheras españolas: 4, de la región gallega; 8, de la región asturiana, vascongada y cantábrica; 4, de León, Burgos, Salamanca y Segovia; centrales lecheras de Pamplona, Zaragoza y Huesca; 10, de Cataluña; centrales lecheras de Valencia, Murcia y Albacete; centrales lecheras de Córdoba, Sevilla, Jaén y Jerez; y 2, de Baleares. Las muestras de leche esterilizada fueron adquiridas en establecimientos comerciales, embotelladas en recipientes de plástico, cartón o cristal.

Se analizaron también 77 muestras de leche en polvo (tabla II).

Tabla II. Número de marcas y de muestras.

Tipos de leche	Nº de marcas analizadas	Nº de muestras analizadas
Entera	2	10
Descremada	3	14
Maternizada	11	54
Total: 3	16	78

Patrones de aflatoxinas: B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> procedían de Makor Chemical Ltd. Jerusalén, Israel.

M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub> procedían del Departamento de agricultura de los EEUU, de Peoria, y del National Research Institute for Nutritional Diseases, Africa del Sur.

#### Métodos utilizados:

Prueba presuntiva. Para la extracción y separación de aflatoxinas seguimos la técnica de Schuller y col.<sup>39)</sup>; y para la cuantificación objetiva de aflatoxinas, en placa de cromatografía, se utilizaron las ecuaciones de las líneas de regresión de las aflatoxinas B<sub>1</sub>, M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub> (Jodral y Herrera<sup>21)</sup>).

Prueba confirmativa: Se han utilizado dos pruebas confirmativas de tipo químico, para confirmar la presencia de aflatoxinas en placas de cromatografía. La propuesta por Smith y col.<sup>41)</sup>, para la aflatoxina B<sub>1</sub>; y para las aflatoxinas del grupo M, la prueba propuesta por Stack y col.<sup>43)</sup>).

### Resultados y discusión

Sólo el 15,20 p.100 de las doscientas cincuenta muestras de leche natural recogidas en invierno fue positivo a la presencia de aflatoxinas M<sub>1</sub>; y de éstas, únicamente el 1,60 p.100 presentaba cantidades cuantificables de aflatoxinas M<sub>1</sub> (entre 0,01365 y 0,01888  $\mu\text{g}$  de aflatoxinas M<sub>1</sub>/l. de leche; el resto sólo presentaba trazas.

En primavera se analizaron cuatrocientas muestras de leche natural, de las cuales el 8,50 p.100 tenía aflatoxinas M<sub>1</sub> pero en cantidades no cuantificables (trazas). No se detectaron aflatoxinas en las 500 muestras de leche natural analizadas en las estaciones de verano y otoño. La aflatoxina M<sub>2</sub> no se ha descubierto en ninguna de las muestras analizadas. Los autores consultados no hablan de su detección en leches naturales. Suponemos que su ausencia puede ser debida a la gran facilidad de destrucción que tienen al ponerse en contacto con la luz. Sólo el 0,17 p.100 de las muestras analizadas de leche natural contenía aflatoxina B<sub>1</sub>. Fue detectada en muestras de leche obtenidas en los meses de invierno, en cantidades que oscilaban entre 0,2729 y 0,3601  $\mu\text{g}$  de aflatoxina B por litro de leche. Jacquet<sup>18)</sup> encuentra esta aflatoxina en el 6,25 p.100 de las muestras analizadas de leche natural, y aparece unida, en algunos casos, a la aflatoxina M<sub>1</sub>.

Los resultados obtenidos de las 1.150 muestras de leche natural analizadas se pueden resumir en un 6,26 p.100 de muestras positivas a la presencia de aflatoxina M<sub>1</sub>; lo que corresponde a uno de los porcentajes más bajos de la bibliografía consultada, a excepción de Noruega (Indestad y col.<sup>47)</sup>) y Polonia (Lemieszek-Chodorowka<sup>29)</sup>), que no encuentran aflatoxinas en las leches analizadas. En Africa del Sur, Purchase y col.<sup>36)</sup> hallaron positivo sólo el 4,76 p.100 de las muestras analizadas de leche natural.

En los trabajos realizados por Kiermeier y col.<sup>23)</sup>; Kiermeier<sup>25)</sup>; Hanssen y col.<sup>14)</sup>; Kiermeier y col.<sup>26)</sup> y Veringa y col.<sup>45)</sup>, la cantidad de aflatoxinas presentes en la leche va disminuyendo del invierno al otoño, debido, según estos autores, a que en los meses de verano y otoño existe más alimento natural y se conserva para el invierno y primavera. Si esta conservación no es perfecta y las condiciones ambientales son favorables se pueden producir aflatoxinas que contaminan el alimento.

Consideramos que el bajo porcentaje de aflatoxinas existente en las leches naturales analizadas, de la región andaluza, con respecto a otros países, puede ser debido a las condiciones ambientales reinantes

en verano y otoño, en esta región (temperatura extrema y humedad relativa muy baja (Jodral<sup>20</sup>)), que impide la formación de aflatoxinas en los alimentos en las épocas de verano y otoño.

No fueron detectadas aflatoxinas en ninguna muestra de leche esterilizada. Nuestros datos coinciden con los obtenidos en otros países, a excepción de Africa del Sur, donde Purchase y col.<sup>35</sup>) analizaron 21 muestras de leche comercial y encontraron que un 4,6 p.100 contenía trazas de aflatoxina M<sub>1</sub>. Tampoco detectamos aflatoxina B<sub>1</sub> (tabla III).

La presencia de aflatoxinas no fue detectada en las 77 muestras de leche en polvo analizadas (10, de leche en polvo entera; 14, de leche en polvo descremada; y 53, de leche maternizada) (Tabla IV).

La presencia nula o muy baja de aflatoxinas en leches conservadas se debe, según Purchase y col.<sup>37</sup>), al tratamiento térmico a que son sometidas y a las mezclas de leche, que hacen que las aflatoxinas se diluyan y por lo tanto resulta prácticamente imposible descubrir aflatoxinas en leches conservadas, teniendo en cuenta, además, que se fabrican a partir de leche natural con muy baja concentración de aflatoxinas.

Según la FDA<sup>10)</sup>, lo ideal sería la ausencia total de aflatoxinas pero como esto no es posible, arbitra medidas restrictiva, siempre que el alimento o pienso en cuestión contenga 20  $\mu\text{g}$  de aflatoxinas por kg de alimento; lo que acabará por reducirse, probablemente, a 15  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , con lo cual las leches naturales están muy por debajo de estas cantidades y, por lo tanto, su consumo no es peligroso.

Tabla III. Resultados de la investigación de aflatoxinas del grupo M en leche esterilizada procedente de 49 centrales lecheras españolas.

Centrales lecheras	Número de muestras	Prueba presuntiva (g de aflatoxinas por litro de leche)	Prueba confirmativa
Región Gallega	45	ND	-
Región Asturiana, Vascongadas y Santander	54	ND	-
León, Burgos, Salamanca y Segovia	25	ND	-
Pamplona; Zaragoza y Huesca	20	ND	-
Cataluña	46	ND	-
Valencia, Murcia y Albacete	28	ND	-
Córdoba, Sevilla, Jaén y Jerez	90	ND	-
Baleares	22	ND	-

ND= No detecta

JODRAL ET AL.: AFLATOXINAS EN LECHE NATURAL, ESTERILIZADA Y EN POLVO.

Tabla IV. Resultados de la investigación de aflatoxinas del grupo M en leches en polvo y maternizadas\*.

Marca	Nº de muestras	Prueba presuntiva	Prueba confirmativa
Entera			
A	5	ND	-
B	5	ND	-
Descremada			
C	5	ND	-
D	5	ND	-
E	4	ND	-
Maternizada			
F	5	ND	-
G	5	ND	-
H	5	ND	-
I	4	ND	-
J	5	ND	-
K	5	ND	-
L	5	ND	-
M	5	ND	-
N	5	ND	-
O	5	ND	-
P	4	ND	-
TOTAL: 16	77	ND	-

\* Leches de regímenes especiales.

### Bibliografía

1. Allcroft, R. y Carnaghan, R.B.A. Vet. Rec. 74, 863 (1962).
2. Allcroft, R., G. Lewis, J. Nabney y P.E. Best. Nature, 209, 154-155 (1966).
3. Allcroft, R. y Roberts, B.A. Vet. Rec. 82, 619-625 (1968).
4. Bänwart, G. Microbiología básica de los alimentos. Ediciones Bellaterra, S.A., Barcelona (1982).
5. Brandl, E. Osterreichische Milchwirtschaft. 29, 305-309 (1974).
6. Brewington, C.R., J.L. Weihrauch y C.L. Ogg. J. Dairy Sci. 53, 1.509-1.510 (1970).
7. Butler, W.H. y J.I. Clifford. Nature. 206, 1.045-1.046 (1965).
8. De Iong, H., J.G. Van Pelt, W.O. Ord y C.B. Barrent. Vet. Rec. 76, 901-903 (1964).
9. De Iong, H., R.O. Vles y J.G. Pelt. Nature. 202, 466-489 (1964).
10. FDA. Bacteriological Analytical Manual Foods, 4 th. Edition. U.S. Food and Drug Administration, Washington D.C. (1976).
11. FAO. Mycotoxin Surveillance. A guideline. FAO Food Control. Roma. p. 75 (1976).
12. Fishbein, L. y H.L. Falk. Bromatol. Rev. 12, 42-87 (1970).
13. Hanssen, E. Naturwissenschaften. 56, 90 (1969).
14. Hanssen, E. y M. Jung. Chimie Pure et Appliquée 35, 239-250 (1973).
15. Herz, K.O. Alimentación y Nutrición. 2, 17-19 (1976).
16. Holzappel, C.W., P.S. Steyn e I.F.H. Purchase. Tetrahedron Letters. 25, 2.799-2.803 (1966).
17. Jacquet, J., P. Boutibonnes y A. Téhérani. Extrait du procès verbal de la Séance du 11 Février 187-200 (1970).
18. Jacquet, J. Extrait de La technique Laitière. 775 (1973).

19. Janicki, J., K. Szebiotko, J. Chelkowski, M. Kokorniak, B. Godlewska y M. Wiewiorowska. Acta Alimentaria Polonica. 1, 207-219(1975).
20. Jofral Villarejo, M. Arch. Zootec. 28, 351-361 (1979).
21. Jodral Villarejo, M. y A. Herrera Marteache. Anal. Bromatol. 31-1, 7-10 (1979).
22. Jung, M. y E. Hanssen. Fd. Cosmet. Toxicol. 12, 31-138 (1973).
23. Kiermeier, F. y W. Mucke. Lebensm. Unters. Forsch. 150, 137-140 (1972).
24. Kiermeier, F. Milchwissenschaft, 28, 683-685 (1973).
25. Kiermeier, F. Lebensm. Unters. Forsch. 151, 237-240 (1973).
26. Kiermeier, F., V. Reinhardt y G. Behringer. Deutsche Lebensmittel-Rundschau. 71, 35-38 (1975).
27. Lafont, P. y J. Lafont. Cah. Nut. Diét. 10, 57-58 (1975).
28. Lafont, P. y J. Lafont. Ann. Nutr. Alim. 34, 699-708 (1980).
29. Lemieszek-Chodorowska, K. Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny. 25, 489-494 (1974).
30. Lück, H., M. Steyn y F.C. Wehner. South African Journal of Dairy Technology. 8, 85-86 (1976).
31. Masri, M.S., V.C. García y J.P. Page. Vet. Record. 84, 146-147 (1969).
32. Nabney, J., M.B. Burbage, R. Allcroft y G. Lewis. Fd. Cosmet. Toxicol. 5, 11 (1967).
33. Neumann-Kleinpaul, A. y G. Terplan. Arch. Lebensmittelhyg. 23, 128-132 (1972).
34. Polan, C.E., J.R. Hayes y T.C. Campbell. J. Agric. Fd. Chemistry. 22, 235-238 (1974).
35. Purchase, I.F.H. y L.J. Vorster. Tydskrif vir Geneeskunde, 2 Maart, 219 (1968).
36. Purchase, I.F.H. y L.J. Vorster. South Afr. Med. J. 42, 219-224 (1968).
37. Purchase, I.F.H. y M. Steyn. Fd. Cosmet. Toxicol. 10, 383-387 (1972).

38. Robinson, R. Clin. Pediatr. 6, 57 (1967).
39. Schuller, P.L., C.A.H. Verhúlsdonk y W.E. Paulsch. Pure and Appl Chemistry. 35, 291-296 (1973).
40. Sinnhuber, R.O., D.J. Lee, J.H. Wales, M.K. Landers y A.C. Keyl. Fedn. Proc. Fen. Am. Socs. Exp. Biol. 29, 568 (1970).
41. Smith, R.H. y W. McKernam. Nature. 195, 1.301 (1962).
42. Smith, R.H. Biochem. J. 95, 43-44 (1965).
43. Stack, M.E., A.E. Pohland, J.G. Dantzman y S. Nesheim. J.A.O.A.C. 55 (1972).
44. Van der Linde, J.A., A.M. Frens, H. De Jong y Vles, en R.O. Tijdschr. Diergeneesk. 89, 1.082-1.088 (1964).
45. Veringa, H.A., J. Standhouders y M. Harten. Znívelzicht. 67, 774-776 (1975).
46. Indestad, M. y B. Underdal. Nordisk Veterinaermedicin. 27, 42-48 (1975).