

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**



**DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE AFLATOXINA
M1 EN LECHE CRUDA DE VACA DISTRIBUIDA EN UN
CENTRO DE ACOPIO UBICADO EN LA REGIÓN DE LA
COSTA SUR DE GUATEMALA 2015**

EDWIN MANOLO ADOLFO VELA MORALES

Médico Veterinario

GUATEMALA, OCTUBRE DE 2,016

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**



**DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE AFLATOXINA M1 EN
LECHE CRUDA DE VACA DISTRIBUIDA EN UN CENTRO DE
ACOPIO UBICADO EN LA REGIÓN DE LA COSTA SUR DE
GUATEMALA 2015**

TRABAJO DE GRADUACIÓN

PRESENTANDO A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD

POR

EDWIN MANOLO ADOLFO VELA MORALES

Al conferírsele el título profesional de

Médico Veterinario

En el grado de Licenciado

GUATEMALA, OCTUBRE DE 2,016

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
JUNTA DIRECTIVA**

DECANO: M.Sc. Carlos Enrique Saavedra Vélez
SECRETARIA: M.V. Blanca Josefina Zelaya Pineda
VOCAL I: M.Sc. Juan José Prem González
VOCAL II: Lic. Zoot. Edgar Amílcar García Pimentel
VOCAL III: Lic. Zoot. Alex Rafael Salazar Melgar
VOCAL V: Br. Javier Augusto Castro Vásquez

ASESORES

LIC. ZOOT. LUIS ALBERTO VILLEDA LANUZA

LIC. CARLOS FRANCISCO CHINCHILLA GARCÍA

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

En cumplimiento con lo establecido por los reglamentos y normas de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración el trabajo de graduación titulado:

DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE AFLATOXINA M1 EN LECHE CRUDA DE VACA DISTRIBUIDA EN UN CENTRO DE ACOPIO UBICADO EN LA REGIÓN DE LA COSTA SUR DE GUATEMALA 2015

Que fuera aprobado por la Honorable Junta Directiva de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Como requisito previo a optar el título de:

MÉDICO VETERINARIO

ACTO QUE DEDICO

- A DIOS:** Todo poderoso, mi creador y salvador.
- A MIS PADRES:** Ingrid Jeannette Morales Urquía (†) y Edwin Augusto Vela Castañeda.
- A MIS HERMANOS:** Edwin Ricardo Augusto Vela Morales e Ingrid María de los Angeles Vela Morales.
- A MI SOBRINO:** Diego Ricardo Vela López.
- A MI TÍO:** Manolo Estuardo Vela Castañeda.
- A MIS PRIMOS:** Rafael Ignacio Vela Hernández y Joaquín Gabriel Vela Hernández.
- A MIS ABUELOS:** Emma Urquía, María Carlota Castañeda, Ricardo Morales y Augusto Vela.

AGRADECIMIENTOS

- A DIOS:** Por darme vida, su infinito amor y haberme brindado la oportunidad de culminar con éxito mis estudios.
- A MIS PADRES:** Por todo su amor, apoyo y consejos que me han brindado a lo largo de mi vida.
- A MIS HERMANOS:** Por su afecto y apoyo incondicional.
- A MI ABUELITA:** Emma Urquía por su cariño, enseñanzas y ser parte fundamental de mi vida.
- A MIS AMIGOS:** Alan Raxón, Javier Beato, Madjorie Ruano, Roselyn Xicay, Ana Molina, Marvin Ruano, Julio Najera, Stuart Carazo, Marleny Vásquez, Denis Ovando, Mario Rauda, Dulia Alfaro, Ligia Moran, Aurora Custodio, Lester Pocón, Sergio Juárez, Carlos Chan, Manuel Hernández, Hans Conde, Pavel Matute, Erick de la Cruz, Daniel Marroquín, Henry Barillas, William Pirir, por haber compartido momentos inolvidables, brindarme su amistad y apoyo.
- A MAGDA DE LEÓN Y ELMER LÓPEZ:** Por su cariño y apoyo durante la realización de mi Ejercicio Profesional Supervisado (EPS).

A MIS ASESORES: Lic. Zoot. Luis Villeda y el Lic. Carlos Chinchilla por su colaboración, tiempo y experiencia aportada en este estudio.

A MILDRED RECINOS: Por su compromiso, esfuerzo y dedicación en el sector agropecuario.

A LA DIRECCIÓN DE INOCUIDAD DEL MINISTERIO DE AGRICULTURA, GANADERÍA Y ALIMENTACIÓN (MAGA): Por ampliar mi percepción de las diversas áreas en las que se puede desempeñar un Médico Veterinario.

AL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS CIENCIAS MORFOLÓGICAS DE LA FMVZ: Por darme la oportunidad de crecer como profesional, sus enseñanzas, cariño y aportes a mi carrera.

AL LABORATORIO DESARROLLO DE SOLUCIONES GLOBALES (DSG): Por abrirme las puertas y realizar parte importante del presente estudio.

A MIS COMPAÑEROS Y CATEDRÁTICOS: Que en algún momento formaron parte de mi vida académica y fortalecieron mi compromiso para alcanzar mis metas.

**A LA UNIVERSIDAD
DE SAN CARLOS DE
GUATEMALA:**

Por ser mi casa de estudios y el cimiento de las ciencias.

**A LA FACULTAD DE
MEDICINA
VETERINARIA Y
ZOOTECNIA:**

Por brindarme los conocimientos para poder ejercer
mi profesión dignamente.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	HIPÓTESIS.....	3
III.	OBJETIVOS.....	4
	3.1 Objetivo General.....	4
	3.2 Objetivos Específicos.....	4
IV.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
	4.1 Características de las micotoxinas.....	5
	4.1.1 Proceso de formación de las micotoxinas.....	6
	4.1.2 Clases de micotoxinas.....	6
	4.2 Importancia y características de las aflotoxinas.....	7
	4.2.1 Factores que regulan la producción de aflotoxinas.....	8
	4.2.2 Principales alimentos contaminados por aflotoxinas.....	9
	4.3 Aflotoxina B1 (AFB1) y su relación con la aflotoxina M1(AFM1).....	10
	4.4 Aflotoxina M1 (AFM1).....	10
	4.5 Metabolismo y transformación de AFB1 en AFM1.....	11
	4.6 Causas de contaminación de la leche con la AFM1.....	13
	4.6.1 Contaminación directa.....	13
	4.6.2 Contaminación indirecta.....	14
	4.7 Manifestaciones de la aflotoxicosis por AFB1 y AFM1.....	15
	4.7.1 Toxicidad aguda.....	15
	4.7.2 Toxicidad crónica.....	16
	4.8 Efectos de la AFM1 en la salud humana y animal.....	17
	4.8.1 Enfermedad en los humanos por la AFM1.....	17
	4.8.2 Enfermedad en el ganado bovino por la AFM1.....	18
	4.9 Estabilidad de la AFM1, prevención y detoxificación.....	19
	4.9.1 Estabilidad de la AFM1.....	19
	4.9.2.1 Cultivo del alimento.....	20

4.9.2.2	Período de cosecha.....	21
4.9.2.3	Almacenamiento, transporte y distribución.....	21
4.9.2	Prevención.....	20
4.9.3	Detoxificación.....	23
4.9.3.1	Métodos físicos.....	23
4.9.3.2	Métodos químicos.....	24
4.9.3.3	Métodos biológicos.....	24
4.10	Inocuidad de los alimentos.....	25
4.11	Marco legal para la AFM1.....	26
4.11.1	Normativa FDA (Food and Drug Administration).....	26
4.11.2	Normativa UE (Unión Europea).....	27
4.11.3	Normativa nacional.....	28
4.12	Discusión entre entidades internacionales.....	30
4.13	Antecedentes de investigación.....	31
V.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
5.1	Materiales.....	33
5.1.1	Materiales utilizados en el estudio.....	33
5.2	Metodología.....	34
5.2.1	Área de estudio.....	34
5.2.2	Duración de estudio.....	34
5.2.3	Selección del centro de acopio.....	34
5.2.4	Diseño de boleta y encuesta.....	35
5.2.5	Codificación de proveedores de centro de acopio.....	35
5.2.6	Codificación de muestras.....	36
5.2.7	Toma de muestras.....	36
5.2.8	Procedimiento para la toma de muestras.....	37
5.2.9	Procedimiento para la entrega de muestras al labora- torio.....	39
5.2.10	Fundamento de la prueba.....	39
5.2.11	Procedimiento de la prueba de ELISA.....	39

5.2.12	Análisis estadístico.....	41
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
6.1	Resultados de análisis de laboratorio (Prueba de ELISA).....	42
VII.	CONCLUSIONES.....	47
VIII.	RECOMENDACIONES.....	48
IX.	RESUMEN.....	49
	SUMMARY.....	51
X.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
XI.	ANEXOS.....	58

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro No. 1

Nivel de acción aceptable de la FDA para AFM1 en leche.....27

Cuadro No. 2

Nivel máximo permitido de la UE para AFM1 en leche.....28

Cuadro No. 3

Clasificación de muestreos.....37

Cuadro No. 4

Resultados de cuantificación de AFM1.....42

Cuadro No. 5

Prueba Chi cuadrado de bondad de ajuste resultados de cuantificación de AFM1y nivel de acción aceptable según la FDA.....62

Cuadro No.6

Prueba Chi cuadrado de bondad de ajuste resultados de cuantificación de AFM1 y nivel máximo tolerado por la UE.....62

Cuadro No. 7

Registros y parámetros de producción en explotaciones lecheras encuestadas.....70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No. 1

Biotransformación de la aflatoxina en B1 en M1.....11

Figura No. 2

Estructura de la AFB1, AFM1, AFB2 y AFM2 identificando el doble
Enlace entre los carbonos C8 y C9.....12

Figura No. 3

Resultados de cuantificación de AFM1 comparando el nivel máximo
y de acción aceptado por la UE y la FDA respectivamente.....43

Figura No. 4

Alimento suministrado en las explotaciones lecheras.....63

Figura No. 5

Clasificación de casas comerciales del alimento balanceado
proporcionado a los animales en ordeño.....64

Figura No.6

Forma de almacenaje del alimento en las explotaciones lecheras.....65

Figura No. 7

Utilización de tarimas por parte de los proveedores.....66

Figura No. 8

Ventilación en bodega de almacenamiento.....66

Figura No. 9	
Control de plagas en bodega de almacenamiento.....	67
Figura No. 10	
Registro de rotación del alimento en bodega de almacenamiento.....	67
Figura No.11	
Presencia de techo en bodega de almacenamiento.....	68
Figura No. 12	
Separación entre el alimento y la pared en bodega de almacenamiento.....	68
Figura No. 13	
Registro de limpieza en bodega de almacenamiento.....	69

I. INTRODUCCIÓN

En Guatemala, la producción láctea conforma uno de los complejos agroalimentarios más importantes y dinámicos dentro de la economía nacional. Solo respondiendo a las nuevas y crecientes demandas sobre la inocuidad alimentaria del mercado internacional, la producción láctea logrará alcanzar la competitividad necesaria para incursionar en las exportaciones del sector, teniendo como misión la protección de la salud de los consumidores.

La presente investigación se realizó con el propósito de generar información acerca de la presencia de la aflatoxina M1 (AFM1) en leche cruda de vaca distribuida en un centro de acopio ubicado en la región de la costa sur de Guatemala. Con la finalidad de identificar las posibles variaciones en la cantidad de AFM1 en la leche que reciben de los distintos proveedores.

La AFM1 que pasa del alimento contaminado a la leche indetectable a simple vista, puede ocasionar un serio daño a la salud de la población. Debido a su efecto carcinogénico que se relaciona con diversos factores como son: la cantidad de aflatoxina ingerida diariamente, el peso del individuo, estado de salud y la edad del consumidor. Así pues, los niños y los jóvenes, que son los mayores consumidores de leche también son los más susceptibles a la toxicidad de esta aflatoxina, por la falta de mecanismos bioquímicos de detoxificación. (Gimeno, 2004)

El centro de acopio seleccionado se abastece diariamente por una gran cantidad de leche proveniente de diversos productores que desconocen el grado de contaminación por aflatoxinas en el alimento que suministran a sus animales. Siendo este el principal factor desencadenante en la presencia de AFM1 en el alimento de estudio. (Rubio, 2011) Este desconocimiento puede deberse a la

escasa información que se posee en relación a la presencia de la AFM1 en la leche que se comercializa en el país.

Aunque en la literatura se sugieren varios niveles de tolerancia para AFM1 en la realización de este estudio se utilizaron como guía las normas establecidas por la FDA (Food & Drug Administration) de Estados Unidos de Norteamérica y las establecidas por los países miembros de la UE (Unión Europea), debido a que estas entidades determinan los estándares de referencia respecto a la inocuidad alimentaria que se deben de cumplir para el comercio internacional.

Por la limitada información desarrollada en Guatemala sobre la AFM1 es evidente carecer de una norma nacional que regule la contaminación de la leche por esta micotoxina. La presencia de la AFM1 en leche es continuamente controlada a nivel mundial, sin embargo, actualmente en el país no se dispone de un mecanismo de vigilancia y control que regulen las concentraciones de este contaminante, esto debido tal vez, a la falta de exigencias del mercado nacional y del mismo consumidor.

Por tal motivo, el presente trabajo proporciona información relevante sobre la inocuidad de la leche que se distribuye en un centro de acopio. Con el aporte adicional de valiosa documentación para las instituciones productoras de lácteos y los consumidores guatemaltecos, sobre la posible presencia de la AFM1 en un producto tan esencial como es la leche y subproductos lácteos en la nutrición de la población.

II. HIPÓTESIS

La cantidad de aflatoxina M1 (AFM1) encontrada en la leche cruda de vaca, en un centro de acopio ubicado en la región de la costa sur de Guatemala, se encuentra en los rangos permitidos por la FDA (Food and Drug Administration) y la UE (Unión Europea).

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

- Aportar información sobre la presencia de aflatoxina M1 (AFM1) en leche cruda de bovino en Guatemala.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar la presencia de aflatoxina M1 (AFM1) en leche cruda de vaca, en un centro de acopio ubicado en la región de la costa sur de Guatemala.
- Cuantificar los niveles de aflatoxina M1 (AFM1) encontrada en términos de partes por billón (ppb), en las muestras analizadas.
- Comparar la cantidad de aflatoxina M1 (AFM1) detectada, con los rangos permitidos por la FDA (Food and Drug Administration) y la UE (Unión Europea).

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Características de las micotoxinas

Los hongos son organismos cosmopolitas y pueden encontrarse en todo tipo de alimentos, ingredientes alimenticios, galpones, pisos, silos y otros; se han clasificado muchas especies benéficas para el hombre pues se emplean en procesos industriales como la producción de ácido cítrico, la fabricación de quesos y en el área de la salud se han utilizado para la producción de antibióticos como la penicilina, el cloranfenicol, la estreptomycinina y la anfotericina B. (Arango, 2002)

En el hombre y los animales los hongos pueden producir infección en los tejidos, alergia asociada a inhalación de esporas o por contacto directo con el mismo, a esto se le denomina micosis. Cuando los alimentos poseen productos tóxicos (micotoxinas) producidos por los hongos se produce una intoxicación por alimentos o micotoxicosis. (Arenas, 1993)

El término micotoxinas proviene de dos palabras griegas: “mykes” que significa hongo y “toxicum” que significa veneno. (Combita y Mildenberg, 2009) Las micotoxinas son metabolitos secundarios de hongos toxigénicos capaces de crecer en gran variedad de sustratos y bajo las más diversas condiciones ambientales, contaminando con frecuencia las cosechas y los alimentos almacenados, en especial los de origen vegetal. (Murria y Thompson, 1995)

Cuando esta contaminación ocurre en los alimentos para humanos o para animales, puede presentarse un riesgo potencial de enfermedades como el síndrome de reyé o el ergotismo. En conjunto con una disminución en la producción agrícola y pecuaria. (Jurado, 1989)

El interés por el estudio de las micotoxinas se vio estimulado a partir de los años sesenta, con el descubrimiento de las aflatoxinas como los compuestos más hepatotóxicos y hepatocarcinogénicos conocidos en ese momento, este hallazgo incrementó las investigaciones sobre las toxinas producidas por los hongos y sus efectos sobre la salud humana y animal, así como la forma de prevenir la contaminación micótica en los alimentos. (Cruz, 1984)

Los cultivos en las áreas tropicales y subtropicales son los más susceptibles de ser contaminados que los de zonas templadas, ya que la elevada humedad y temperatura proporcionan las condiciones óptimas para la formación de las toxinas. Prácticas inadecuadas durante la recolección, el almacenamiento, el transporte, la comercialización, el manejo y un procesado deficientes pueden contribuir al crecimiento de los hongos e incrementar el riesgo de producir micotoxinas. (Rubio, 2011)

4.1.1 Proceso de formación de las micotoxinas

Las micotoxinas son compuestos químicos de bajo peso molecular, policetónicos que tienen lugar en determinadas condiciones físicas, químicas y biológicas. Cuando 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, 2004)

4.1.2 Clases de micotoxinas

Se conocen actualmente entre 300 y 400 clases de micotoxinas, aquellas que son más importantes por su ocurrencia y toxicidad son: Aflatoxinas (AF), Deoxinivalenol (DON), Zearalenona (ZEA), Toxina T2 (T2), Fumonisinias B1 y B2 (FB1, FB2) entre otras. En investigaciones sobre micotoxinas transmitidas a la

leche, determinaron que la única micotoxina con posibilidad de presencia en la leche cruda de forma natural es la AFM1. (Gimeno y Martins, 2002)

Otras micotoxinas como la Zearalenona (ZEA), Toxina T2 (T2), Fumonisinias B1 y B2 (FB1, FB2) no constituyen un grave riesgo de contaminación en la leche, debido a la existencia de estas o sus metabolitos en este producto, cuando las concentraciones en la ración o suministros diarios de los animales son tan elevados, que es improbable de que esos niveles de toxinas sean encontrados como contaminantes naturales. (Gimeno y Martins, 2002)

4.2 Importancia y características de las aflatoxinas

El nombre de la aflatoxina hace referencia al hecho de ser biosintetizadas por el hongo *Aspergillus flavus*. La letra A, hace referencia al género *Aspergillus*, las tres siguientes FLA proceden de la especie *flavus* y el término toxina se refiere a su efecto tóxico. En cuanto a las aflatoxinas B y G se le denomina así por el color de la fluorescencia que emite bajo la luz ultra violeta azul (blue), verde (green), respectivamente. (Bermudez, 2011)

Las aflatoxinas son metabolitos de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, los cuales producen las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2, se trata de mohos toxigénicos capaces de desarrollarse en gran variedad de sustratos, pudiendo contaminar los alimentos cuando éstos son cultivados, procesados, transformados o almacenados en condiciones adecuadas que favorezcan su desarrollo. (Soriano, 2007)

Las aflatoxinas son un grupo de compuestos que cobraron importancia a partir de la muerte repentina en Escocia de cien mil pavos en 1960. Estos eran alimentados con maní contaminado con una especie fúngica: *Aspergillus flavus* proveniente de Brasil. Los micelios de ésta y otras especies afines productoras de

aflatoxinas, son capaces de colonizar semillas y tortas oleaginosas de maní, girasol, algodón, soya, avellanas, almendras, cereales y sus derivados dispuestos en sacos o silos. (Bermudez, 2011)

La aflatoxina más importante por su frecuencia, a nivel de contaminación natural y por sus propiedades tóxicas superiores a las demás es la AFB1. El metabolito más importante de esta toxina es la AFM1, la letra M corresponde al metabolito encontrado en la leche (milk) de vacas después de la ingestión de alimentos contaminados con AFB1. (Cruz, 1984)

4.2.1 Factores que regulan la producción de aflatoxinas

Los hongos productores de aflatoxinas forman parte de la microflora normal del suelo y sus esporas pueden ser transportadas a través del aire. Entre sus cepas existe una amplia variación en cuanto a su habilidad para acumular toxinas y en algunos casos no se detecta producción, lo cual indica que el crecimiento del hongo no implica necesariamente la formación de aflatoxinas. (Ruíz y Peña, 1980)

El ataque de los hongos y la acumulación de toxinas también pueden ocurrir bajo condiciones de campo, pero se presentan principalmente durante el periodo de almacenamiento, cuando los productos están expuestos a la acción de diversos factores que favorecen el desarrollo de los hongos y la síntesis de aflatoxinas en condiciones naturales. (Ruíz y Peña, 1980)

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

- Factores físicos: Contenido de humedad del sustrato entre 7-15%, humedad relativa del aire entre 85-90% y la temperatura entre 12-42 °C. (Cruz, 1984)

- Factores químicos: Composición del sustrato que estimula la síntesis de aflatoxina como zinc, hierro, cadmio, sacarosa, glucosa, fructosa entre otros. Un pH entre 4-7 y la composición del gas atmosférico con bajos niveles de dióxido de carbono (CO₂). (Cruz, 1984)
- Factores biológicos: Depende de las particularidades biológicas de las cepas productoras de aflatoxinas. Dependiendo del producto agrícola y de las condiciones ambientales de las áreas cultivadas. Respecto a las relaciones microbiológicas, depende de las relaciones entre diferentes especies de hongos que ocupan el mismo ecosistema, pueden ser entre otras de sinergismo y antagonismo. (Cruz, 1984)

Los factores ambientales son los que condicionan la contaminación fúngica de los alimentos almacenados. La investigación aplicada a la inocuidad 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. (Combita y Mildenberg, 2009)

4.2.2 Principales alimentos contaminados por aflatoxinas

De forma general, las aflatoxinas pueden encontrarse como contaminantes naturales en los cereales y subproductos de cereales, los ensilados, los forrajes, las tortas de oleaginosas y en toda una serie de alimentos para humanos de los que cabe destacar los frutos secos, las especias, las leguminosas, las frutas, la leche y sus derivados. (Rubio, 2011)

En particular, los cultivos que más se ven afectados por la presencia de aflatoxinas son el maíz, el arroz y la semilla de algodón. Siendo el maíz uno de los cultivos más importantes a nivel mundial debido a su alto potencial de rendimiento

y su valor nutritivo, se convierte en un ingrediente frecuentemente utilizado para la elaboración de las raciones para los animales. (Rubio, 2011)

4.3 Aflatoxina B1 (AFB1) y su relación con la aflatoxina M1 (AFM1)

La AFB1 es absorbida vía tracto gastrointestinal, dentro del sistema portal sanguíneo y es llevada al hígado donde es metabolizada por las monooxigenasas de las células hepáticas, una porción de aflatoxina es activada y fijada en los tejidos hepáticos, algunos metabolitos conjugados de la AFB1 solubles en agua son excretados dentro de la bilis y van a las heces. (Gimeno, 2004)

Otras formas conjugadas solubles en agua, productos de la degradación de la AFB1 y metabolitos no conjugados de ésta, son excretados en el sistema circulatorio sanguíneo y se distribuyen de forma sistémica. Eventualmente esos residuos mencionados van a la leche, huevos, músculo y tejidos comestibles. Siendo la AFM1 uno de esos derivados metabólicos que contamina a la leche. (Gimeno, 2004)

4.4 Aflatoxina M1 (AFM1)

La importancia de la transferencia de micotoxinas o de sus metabolitos del pienso a la leche y sus derivados resulta de gran interés, tanto desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, como de la normativa legal. Estos alimentos son los que mayor potencial poseen para introducir residuos de aflatoxinas concretamente de AFM1 en la dieta humana. (Rubio, 2011)

Entre 1962 y 1963, se descubrió que vacas alimentadas con harina de maní contaminada con AFB1 secretaban en la leche un factor tóxico, con efecto similar al de la aflatoxina ingerida. La AFM1 fue el primer producto conocido procedente de la metabolización de las aflatoxinas. Este es excretado en la leche de las

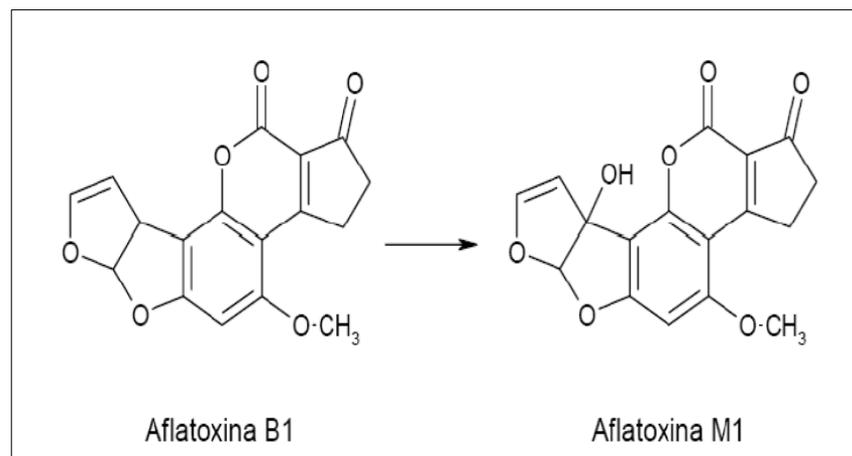
hembras de mamíferos que consumen AFB1 en la dieta. (Combita y Mildenberg, 2009)

Debido a esta aflatoxina se incrementó el control sanitario de los animales productores de leche. La aflatoxina M1 es un metabolito oxidativo de la aflatoxina B1. Producido por los animales tras la ingestión de la AFB1. Aparece en la leche materna (tanto animal como humana), la orina y las heces. (Combita y Mildenberg, 2009)

4.5 Metabolismo y transformación de AFB1 en AFM1

El metabolismo desempeña un papel muy importante en el modo de acción de las aflatoxinas. Las aflatoxinas ingeridas son activadas por las enzimas del sistema oxidativo microsomal, primero en el hígado y probablemente también en otros órganos. (Chu, 1991)

Figura No.1 Biotransformación de la aflatoxina B1 en M1



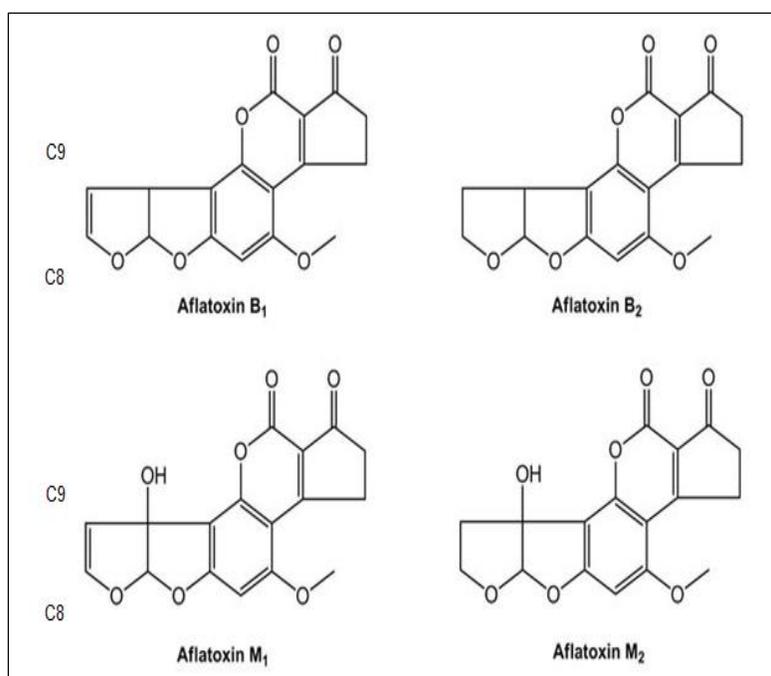
Fuente: Combita y Mildenberg, 2009

La actividad de la enzima, citocromo P 450 CYP1A2, desempeña un papel relevante en la metabolización de la AFB1 ocasionando una transformación en la

AFM1. 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. (Chu, 1991)

Este es el caso de la AFB1, que requiere una activación para producir mutaciones. La ruta de activación es la conversión de AFB1 en el metabolito electrofílico AFB1-8,9-epóxido. La formación del epóxido requiere la presencia de un doble enlace entre los carbonos C8-C9, por esta razón las aflatoxinas B2 y M2 son prácticamente atóxicas en comparación con las aflatoxinas B1 y M1. La AFM1, presenta también el doble enlace entre los carbonos C8 y C9. (Combita y Mildenberg, 2009)

Figura No. 2 Estructura de la AFB1, AFM1, AFB2 y AFM2 identificando el doble enlace entre los carbonos C8 y C9



Fuente: Combita y Mildenberg, 2009

Una reacción similar ocurre en el caso de la ingestión de AFM1 y la formación de su metabolito aflatoxicol M1 (AFLM1) en los humanos. El interés principal del aflatoxicol, aparte de tratarse de uno de los metabolitos más tóxicos y de gran reactividad. Es debido a la unión que tiene en los ácidos nucleicos, siendo el responsable del poder carcinogénico de las aflatoxinas. (Afanador, 1997)

Estos compuestos actúan como agentes genotóxicos, dando lugar a lesiones premutacionales diferentes, que pueden conllevar a la activación de oncogenes y a la iniciación de un proceso tumoral. (Combita y Mildenberg, 2009)

4.6 Causas de contaminación de la leche con la AFM1

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; la contaminación directa y la contaminación indirecta. (Ellis y Smith, 1991)

4.6.1 Contaminación directa

La contaminación directa de los productos lácteos tiene lugar por la presencia de hongos en estos alimentos, que producirán principalmente las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2. Si esta contaminación ocurre en la leche en polvo que se utiliza para elaborar un producto lácteo específico, por ejemplo yogur, las aflatoxinas aparecerán en esa leche fermentada sin que haya habido contaminación fúngica previa. (Sengun y Yaman, 2008)

Este tipo de contaminación no suele representar un problema importante, ya que el crecimiento de hongos aflatoxigénicos en un alimento da 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 dichos hongos en un producto asegure que éste se encuentre libre de aflatoxinas, debido a que dichas sustancias pueden persistir después de que los hongos hayan desaparecido. (Rubio, 2011)

4.6.2 Contaminación indirecta

Esta ocurre derivada del consumo por parte de animales en periodo de lactación de alimentos contaminados con aflatoxina AFB1, posteriormente la hidroxilarán y la transformarán en AFM1 que aparecerá en la leche y los productos derivados. Estos alimentos son básicos para niños y jóvenes en crecimiento, consumidos prácticamente en todo el mundo, por lo que la vulnerabilidad de estos grupos de edad es notable y potencialmente más sensible en el caso de los infantes. (Agus y Sigit, 2009)

Por tal motivo, la presencia de AFM1 en leche cruda, leche para lactantes y productos lácteos, es uno de los problemas más serios para la salud pública. El inconveniente que se presenta con este tipo de contaminación es más grave que con la contaminación directa, ya que existe el riesgo potencial de producir efectos tóxicos crónicos por el consumo reiterado de alimentos contaminados incluso con dosis bajas de aflatoxina. (Agus y Sigit, 2009)

La AFM1 es 10 veces menos carcinogénica que la AFB1, excretándose en la leche tanto de humanos como de animales. Una vaca es capaz de transformar la AFB1 en AFM1 dentro de las 12-24 horas de ingestión del alimento contaminado, incluso a las 6 horas ya pueden aparecer residuos de AFM1 en la leche. Ahora bien, después del cese de la fuente de contaminación en la alimentación. La concentración de la AFM1 en leche, se vuelve indetectable alrededor de las 72 horas posteriores. (Rubio, 2011)

Desde el descubrimiento de la AFM1 se han realizado numerosos estudios para establecer el nivel de conversión de la AFB1 ingerida, con la concentración de AFM1 excretada en leche. Sin embargo, ninguno de ellos ha podido establecer una fórmula exacta que determine esta relación. Esto debido a que la concentración de AFM1 en la leche varía según la raza de la vaca, la concentración de AFB1 en la ración, la cantidad y duración del consumo de alimento contaminado y el estado de salud del animal. (Gimeno, 2004)

Sin embargo, a todos estos factores debemos añadir que las posibles variaciones entre concentraciones de AFM1 en la leche. Serán también debidas, al 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. (Gimeno, 2004)

4.7 Manifestaciones de la aflatoxicosis por AFB1 y AFM1

En la aflatoxicosis causada por AFB1 y AFM1 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. (Combita y Mildenberg, 2009) Los efectos nocivos de la intoxicación por estas aflatoxinas en los animales y humanos han sido clasificados en dos formas generales; toxicidad aguda y toxicidad crónica.

4.7.1 Toxicidad aguda

Los signos de la intoxicación aguda tienen lugar cuando se ingieren grandes cantidades de AFB1 y AFM1, las cuales, como se ha mencionado anteriormente, son absorbidas en el intestino delgado llegando hasta el hígado. La presencia de las aflatoxinas en el hígado da lugar a una infiltración de lípidos que originará necrosis y muerte celular hepática. (Bermudez, 2011)

En el hígado las enzimas oxidasas la biotransforman en una serie de metabolitos algunos altamente reactivos (aflatoxicol) y tienen la capacidad de unirse covalentemente con el ADN, ARN y proteínas. Los metabolitos originados reaccionan con diferentes proteínas celulares lo cual origina la inhibición de la síntesis de proteínas, además de la inhibición del metabolismo de carbohidratos y lípidos. (Bermudez, 2011)

Paralelamente, se observa falta de apetito (anorexia), depresión, ictericia, diarrea y fotosensibilización, llegando a la muerte en el caso de animales, en un período que puede variar entre 12 y 27 días tras el consumo del alimento contaminado. (Soriano, 2007)

4.7.2 Toxicidad crónica

La intoxicación crónica que es la forma más frecuente de presentación, se debe al consumo de alimentos contaminados con niveles bajos de AFB1 y AFM1 durante semanas y/o meses. Los signos en animales no son muy específicos: demostrando reducción de la ganancia de peso, menor índice de conversión alimenticia, disminución en la producción leche y mayor susceptibilidad frente a diversas enfermedades infecciosas como candidiasis, leptospirosis, salmonelosis y tuberculosis. (Soriano, 2007)

Este último signo se debe a los efectos inmunosupresores ocasionados por la reactividad de las aflatoxinas con células T y por la disminución en la actividad fagocitaria de los macrófagos. Pudiéndose desarrollar tumores cancerosos o hepatocarcinomas. Demostrando la relación existente entre el consumo de algunas de las micotoxinas y determinados tipos de cáncer. (Bermudez, 2011)

4.8 Efectos de la AFM1 en la salud humana y animal

El Comité Científico de Alimentación Humana de la Unión Europea ha señalado que la AFB1 es un agente cancerígeno genotóxico que contribuye al riesgo de padecer cáncer hepático, incluso a dosis sumamente bajas. La IARC (International Agency for Research on Cancer) en 1988, clasificó a la AFB1 dentro de la categoría de sustancias del tipo 1 en base a la existencia de suficientes evidencias acerca de su carácter carcinogénico para el hombre. (IARC, 2015)

Asimismo la IARC clasificó a la AFM1 en la categoría 2B correspondiente a un agente carcinogénico para el hombre, basándose en los estudios realizados con animales de experimentación, aunque con evidencias insuficientes por el momento. (IARC, 2015) Debido al riesgo que implica para los humanos el ingerir alimentos que contengan sustancias tóxicas.

Los principales factores que tienen influencia sobre la toxicidad de las micotoxinas en los humanos y animales son:

- La biodisponibilidad y toxicidad de la micotoxina.
- Los sinergismos entre ellas.
- La cantidad de micotoxina ingerida diariamente en función de la concentración de micotoxina y de la cantidad de alimento ingerido.
- La continuidad o intermitencia de ingestión del alimento contaminado.
- El peso del individuo y el estado fisiológico y de salud de éste.
- La edad del individuo. (Gimeno, 2004)

4.8.1 Enfermedad en los humanos por la AFM1

Dentro de los efectos de la aflatoxicosis por AFM1 en los humanos se han descrito los síndromes de Kwashiorkor y de Reyé. Ambos afectan a niños y

adolescentes y se relacionan con una severa malnutrición, encefalopatía y degeneración grasa de las vísceras. (Rubio, 2011)

Los niños y los jóvenes son los más susceptibles a la toxicidad de las micotoxinas, debido a una mayor variación del metabolismo basal y no tener suficientes mecanismos bioquímicos para la detoxificación. (Gimeno, 2004)

A largo plazo, la AFM1 puede reaccionar y modificar el ADN, dando lugar a la formación de lesiones pro-mutagénicas que provocan la activación de protooncogenes y la inactivación de genes supresores de tumores. Teniendo también efectos genotóxicos, teratogénicos y efectos antinutricionales. (Rubio, 2011)

El hígado es el principal órgano afectado por la toxicidad y carcinogenicidad de las aflatoxinas. Los primeros signos de la hepatotoxicidad ocurren a nivel proteico y pueden confundirse por otras muchas toxemias, con manifestaciones de anorexia, malestar general y fiebre. Las aflatoxicosis pueden progresar a hepatitis aguda potencialmente mortal con vómitos, dolor abdominal y finalmente la muerte. (Rubio, 2011)

4.8.2 Enfermedad en el ganado bovino por la AFM1

La aflatoxicosis en el ganado bovino, es fundamentalmente una enfermedad hepática. La susceptibilidad de los animales a las aflatoxinas varía considerablemente dependiendo de la especie, la edad, el sexo, y el estado de nutrición. Siendo los animales jóvenes los más afectados. En el caso de los rumiantes, la ingestión durante largos períodos de tiempo, llega a afectar la producción, la reproducción y el crecimiento. (Rubio, 2011)

A diferencia de los no rumiantes, estos suelen tener una menor sensibilidad a las micotoxinas. Por poseer una primera barrera de defensa que la constituye la microflora ruminal. Sin embargo, las enzimas bacterianas no son capaces de degradar a las aflatoxinas. (Rubio, 2011)

Todos los animales son susceptibles, pero en distintos grados para las diversas especies. Los signos clínicos de la aflatoxicosis por AFB1 y AFM1 en los bovinos incluyen la disfunción gastrointestinal, fertilidad reducida, utilización y eficacia reducida de la alimentación, anemia e ictericia. (Cornejo y Villarroel, 2012)

4.9 Estabilidad de la AFM1, prevención y detoxificación

Es importante hacer énfasis en los procesos de prevención y detoxificación; debido a que en la actualidad es muy difícil evitar la contaminación de los sustratos con hongos y micotoxinas. Por tal motivo, los métodos que proporcionen la solución a esta problemática, se convertirán en el santo grial de la industria alimenticia.

En el caso de que no se pueda prevenir la contaminación con aflatoxinas, muchos autores han sugerido el empleo de métodos de descontaminación en las etapas posteriores de la producción de alimentos. Sin embargo, son de difícil aplicación y se incrementan los costos de producción, no proporcionando siempre resultados satisfactorios. (Rubio, 2011)

4.9.1 Estabilidad de la AFM1

La AFM1 es estable en algunos quesos, yogures, leche pasteurizada, leche desnatada o entera y helados. En procesos de pasteurización a 63°C durante 30 minutos, pasteurización a 77°C durante 16 segundos, temperaturas entre 64-100°C durante 15-20 minutos, calentamientos directos durante 3-4 horas y en

algunos procesos de pasteurización y esterilización, la concentración de la AFM1 de la leche cruda permanece prácticamente inalterada. (Gimeno, 2004)

Por el contrario, a temperaturas entre 71-120°C durante 30 minutos, se han conseguido reducciones de contaminación del 12 al 35%, en algunos quesos y dentro de su proceso de elaboración y con temperaturas entre 82-100°C entre 5 a 30 minutos. No se han conseguido reducir las tasas de contaminación de la AFM1. (Gimeno, 2004)

4.9.2 Prevención

En el tratamiento de la leche por parte de la industria alimenticia, puede que se utilice alguno de los sistemas mencionados anteriormente, reduciendo cierto porcentaje de la contaminación, sin embargo, el mejor método de prevención en la contaminación con AFM1 es el de suministrar a los animales raciones libres de AFB1. (Gimeno, 2004)

Siendo necesario el control de las micotoxinas dentro de un programa que se suele denominar "Control Integrado". Esto supone aplicar medidas preventivas en todas las fases de producción del alimento en cuestión. (Combata y Mildenberg, 2009) Los controles y las medidas a aplicar deben hacerse extensivas a las siguientes etapas:

4.9.2.1 Cultivo del alimento

- Selección de variedades.
- Control de insectos y plagas.
- Fertilización.
- Rotación de cultivos.

4.9.2.1 Período de cosecha

- Procedimiento de recogida.
- Limpieza.
- Secado.

4.9.2.2 Almacenamiento, transporte y distribución

- Control de insectos.
- Control de humedad.
- Control de temperatura.
- Limpieza de las instalaciones.

Las medidas antes mencionadas pueden variar dependiendo de la micotoxina que se quiera controlar. (Combita y Mildenberg, 2009)

En la fábrica de alimentos compuestos y en la granja con respecto a las materias primas secas es aconsejable, almacenarlas con una humedad entre 8-9% y entre 11-11.5% para oleaginosas como el girasol integral y la soja integral, respectivamente, o entre 12-13% para amiláceas como los cereales, lo que daría a 25-30°C unas actividades de agua (A_w) del orden de 0.65-0.70, evitándose de esta forma, el crecimiento del moho y la probable producción de la micotoxina. (Gimeno, 2004)

Sin embargo, el problema se origina cuando la materia prima viene ya contaminada con AFB1 y desgraciadamente esto sucede en la mayoría de los casos, siendo difícil la devolución del producto. (Gimeno, 2004)

Respecto a los forrajes el mayor problema se presenta en la elaboración de los ensilados. Debido a las excelentes condiciones de humedad y actividad de agua (A_w) que la materia prima base tiene de una forma natural. (Gimeno, 2004) En este caso las medidas a tomar son:

- Asegurarse de que la materia prima a ensilar este bien empacada, con la menor cámara de aire posible y que el silo este bien cerrado para conseguir una atmósfera anaerobia.
- Ensilar en buenas condiciones de anaerobiosis produce un buen proceso de fermentación e inhibe el crecimiento fúngico y la posible formación de aflatoxinas y otras micotoxinas visto que la mayor parte de los hongos son aerobios. (Gimeno y Martins, 2002)
- Utilizar fungistáticos eficaces y de amplio espectro, inhibe el crecimiento y proliferación fúngica y pueden evitar, si está el hongo y no la micotoxina que ésta se forme. En el caso de que coexistan el hongo y la micotoxina, evitarán que se forme más micotoxina pero no actuarán contra ésta.

Sin embargo hay que tener en cuenta que el uso indebido de fungistáticos en concentraciones sub-inhedoras, puede ocasionar que éstos sean metabolizados por algunas especies de mohos toxicogénicos favoreciendo la producción de micotoxinas. (Gimeno y Martins, 2002)

La contaminación con AFM1 en la leche no puede ser completamente prevenida porque la AFB1 ocurre naturalmente en los granos. No es práctico eliminar por completo la AFB1 de los alimentos, ni de la leche. Sin embargo, es posible controlar la cantidad de AFM1 presente en la leche, limitando la cantidad de aflatoxina en los alimentos para animales y mediante tratamientos de detoxificación en la leche. (Rubio, 2011)

4.9.3 Detoxificación

Entre los métodos de detoxificación se pueden agrupar según sus propiedades en físicos, químicos y biológicos:

4.9.3.1 Métodos físicos

Los métodos físicos básicos consisten en la eliminación, mediante selección manual de granos contaminados por mohos. Este procedimiento requiere mucho tiempo y a veces es imposible realizarlo. El método físico más efectivo que se puede utilizar es el empleo de adsorbentes. (Rubio, 2011)

Los adsorbentes son sustancias que pueden suprimir o reducir la absorción, promover la excreción o modificar el modo de acción de las micotoxinas. Los adsorbentes utilizados para las aflatoxinas se pueden clasificar en compuestos inorgánicos a base de sílice o polímeros orgánicos a base de carbón. Los adsorbentes inorgánicos que se pueden encontrar actualmente en el mercado incluyen productos de arcilla naturales y de polímeros sintéticos. (EFSA, 2015)

Entre las arcillas los aluminosilicatos son el grupo más estudiado entre los que caben destacar: la bentonita, utilizada tanto para la AFB1 como para la AFM1, la montmorillonita, zeolita y la aluminosilicato de hidratado de calcio y sodio. Todos estos compuestos, han demostrado ser eficaces a la hora de evitar la exposición a las aflatoxinas y destacando especialmente la bentonita. (EFSA, 2015)

En cuanto al carbón activo uno de los adsorbentes más efectivos y utilizado habitualmente en el tratamiento de intoxicaciones agudas, también ha sido estudiado en distintas formas comerciales para su uso en leche de vaca, mostrando una alta eficiencia del 93% para eliminación de la concentración de AFM1. (Rubio, 2011)

4.9.3.2 Métodos químicos

Los principales agentes químicos estudiados para la eliminación de las aflatoxinas son el amonio, la sosa cáustica, el peróxido de hidrógeno, los bisulfitos, los agentes clorados, el formaldehído y el ozono. Sin embargo, no existen informes detallados disponibles sobre los efectos secundarios del uso de estos agentes o en algunos casos como los bisulfitos o el ozono, su uso en piensos no es económicamente factible. (Scott, 1998)

La descontaminación química es muy eficaz, pero no siempre cumple con los requisitos de la organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura (FAO), ya que algunos compuestos dejan metabolitos tóxicos y otros reducen el valor nutricional de los alimentos y piensos tratados, por lo que no sería la opción más recomendable. (Rubio, 2011)

4.9.3.3 Métodos biológicos

Microorganismos como las levaduras concretamente su pared celular y las bacterias ácido lácticas como *Lactobacillus*, *Propionibacterium* y *Bifidobacteria*, han sido estudiados por su capacidad de unirse a las aflatoxinas y limitar su biodisponibilidad en la dieta actuando como adsorbentes biológicos. (EFSA, 2015)

Algunos productos naturales derivados de plantas como las especias (pimentón picante, nuez moscada o canela), las hierbas (aromáticas y medicinales) y aceites esenciales (de canela, de clavo o de tomillo) se sabe que contienen compuestos que pueden inhibir el crecimiento de hongos y la producción de aflatoxinas. (Rubio, 2011) Abriendo las puertas a nuevas investigaciones, sobre el uso de estos compuestos naturales en la detoxificación de productos alimenticios.

4.10 Inocuidad de los alimentos

El Codex Alimentarius (2005) define a la inocuidad de los alimentos como “la garantía de que los alimentos no causaran daño al consumidor cuando se preparen y/o consuman de acuerdo con el uso a que se destinan”. (p.9) Todas las personas tienen derecho a esperar que los alimentos que comen sean inocuos y aptos para el consumo. (Codex Alimentarius, 2005)

Las enfermedades de transmisión alimentaria y los daños provocados por los alimentos son en el mejor de los casos desagradables y en el peor pueden ser fatales. El comercio internacional de productos alimenticios va en aumento, proporcionando importantes beneficios sociales y económicos. Por consiguiente es imprescindible cumplir con los estándares de inocuidad y calidad internacionales a fin de evitar daños a la salud de los consumidores y el cierre de mercados. (Codex Alimentarius, 2005)

Las aflatoxinas juegan un papel importante en la inocuidad de los alimentos garantizando la ausencia de estas en el alimento. Las características del metabolismo de las aflatoxinas indican que hay una eliminación del metabolito de la AFB1 en la leche como AFM1 que representa el único factor de riesgo en los alimentos de origen animal para los humanos. (Combita y Mildenberg, 2009)

Muchos países han establecido niveles máximos de AFM1 en la leche y sus derivados. Por lo que los países que no se preparen para cumplir con estos indicadores de inocuidad, no tendrán oportunidad de entrar en el mercado internacional y estarán exponiendo a su población a un agente con potencial carcinogénico tal como lo ha descrito la IARC. (Combita y Mildenberg, 2009)

El interés en 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 los bajos rendimientos en las cosechas, disminución en los índices productivos de los animales, enfermedades de los mismos, alteraciones en los alimentos, daño al consumidor, pérdidas en las características organolépticas y nutricionales, aumento de costos por la prevención o el tratamiento. (Combita y Mildenberg, 2009)

4.11 Marco legal para la AFM1

En la actualidad existen leyes de alimentos que prohíben o limitan la presencia de ciertas sustancias contaminantes naturales o artificiales. Dentro de los contaminantes naturales se contempla a la aflatoxina M1. Luego del descubrimiento de la misma a inicios de la década de los 60 muchos países desarrollaron una legislación específica para este contaminante. (Combita y Mildenberg, 2009)

Las concentraciones máximas permisibles se expresan en unidades de concentración denominadas “partes por billón” (ppb), que en unidades de peso equivalen a un nanogramo (ng) de toxina por gramo (g) de alimento (ng/g). Esto equivale también a un microgramo (μg) de toxina por litro (L) de leche ($\mu\text{g/L}$). (Combita y Mildenberg, 2009)

4.11.1 Normativa FDA (Food and Drug Administration)

En Estados Unidos la FDA, se fijó inicialmente el “nivel de acción” para las aflatoxinas en 30 ppb a comienzos de la década de los 60. Esta decisión se basó 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 a la salud. (Combita y Mildenberg, 2009)

En 1989 la FDA fijo el nivel de acción de la AFM1 en 0.5 ppb en leche entera, semidescremada y descremada, debido a que niveles de aflatoxinas de 20 ppb en la dieta de vacas lecheras resultan en niveles de AFM1 por debajo de 0.5 ppb en la leche. Las razones para que la FDA estableciera límites en el contenido de AFM1 en productos lácteos. Está basado, en la mayor susceptibilidad de los niños a los efectos de las aflatoxinas y el posible daño a la salud. (Bermudez, 2011)

Esto se relaciona con diferentes estudios sobre la carcinogenicidad de la AFB1 y su comparación con la AFM1. Aunque en la literatura se sugieren diferentes niveles de tolerancia para las aflatoxinas en los alimentos. Los siguientes son los establecidos en la norma CPG Sec. 527.400 por la FDA de Estados Unidos de Norteamérica. (Bermudez, 2011)

Cuadro No. 1 Nivel de acción aceptable de la FDA para AFM1 en leche

Producto alimenticio	Nivel de acción AFM1 (ppb)
Leche entera, semidescremada y descremada.	0.5

Fuente: Carlson, Ensley, Grant y Smith, 2002

4.11.2 Normativa UE (Unión Europea)

La legislación de la UE establece para alimentos completos y alimentos complementarios destinados al ganado bovino, ovino y caprino lechero una concentración máxima permitida de 5 ppb en el alimento con una humedad del 12%. Según el reglamento de la CE (Comisión Europea) No. 1881/2006 por el que

se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. (Gimeno, 2004)

Para leche cruda, leche destinada a la fabricación de productos a base de leche y leche de consumo tratada térmicamente, la concentración máxima permitida de la AFM1 es de 0.05 µg/L o Kg (0.05 ppb). (Gimeno, 2004)

En el caso de preparados para lactantes, preparados de continuación (incluidas la leche para lactantes y la leche de continuación) y alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales dirigidos específicamente a los lactantes, la concentración máxima permitida de AFM1 es de 0.025 µg/L o Kg (0.025 ppb). (Gimeno, 2004) Debido a la alta susceptibilidad mencionada anteriormente de parte de los infantes a estas toxinas.

Cuadro No. 2 Nivel máximo permitido de la UE para AFM1 en leche

Producto alimenticio	Nivel de AFM1 (ppb)
Leche cruda, leche tratada térmicamente y leche para la fabricación de productos lácteos.	0.05

Fuente: Comisión de la comunidad europea, 2006

4.11.3 Normativa nacional

Según la constitución política de la república de Guatemala, en el artículo 99.- Alimentación y nutrición, la asamblea nacional constituyente (1993) especifica que: " El Estado velará porque la alimentación y nutrición de la población reúna los requisitos mínimos de salud. Las instituciones especializadas del Estado deberán coordinar sus acciones entre sí o con organismos internacionales dedicados a la salud, para lograr un sistema alimentario nacional efectivo". (p.98)

Con la premisa de que todos los habitantes tienen derecho a consumir alimentos inocuos y de calidad aceptable. Según el artículo 128.- Derecho de la población del código de salud. (MSPAS, 1997) Se estableció el acuerdo gubernativo 969-99 reglamento para la inocuidad de los alimentos. Donde se desarrollan un conjunto de normas, para el control sanitario de productos alimenticios, desde la producción hasta la comercialización. (VISAR/MAGA, 2003)

Sin embargo, en Guatemala no existe aún un mecanismo de vigilancia y control que regule las concentraciones de la AFM1 en los alimentos destinados para humanos y animales. Esto debido a la falta de conocimiento y exigencias del mercado nacional y del mismo consumidor. Teniendo normado solo la contaminación con AFB1, AFB2, AFG1 y la AFG2 en la Comisión Guatemalteca de Normas (COGUANOR). En almendras, maíz blanco y amarillo, harina de maní, harina de algodón, maní, mantequilla de maní y nueces de pistacho. (COGUANOR, 1992)

Lamentablemente no se posee la suficiente información en el país, para establecer un parámetro nacional en relación a la concentración de AFM1 en leche de bovino. Por tal motivo, la presente investigación busca aportar datos de referencia sobre esta interrogante. Con el afán de establecer en un futuro la regularización nacional de este contaminante en la leche de bovino en Guatemala.

Con respecto a la reglamentación en territorio centroamericano, sobre la contaminación de la leche y productos lácteos con AFM1. Se hace referencia al reglamento técnico centroamericano (RTCA) 67.04.66:12 y al RTCA 67.04.70:14. En donde especifica que estos productos deben cumplir con la norma general del Codex Alimentarius para los contaminantes y las toxinas presentes en los alimentos y piensos (Codex STAN 193-1995). (Comité técnico de normalización centroamericana, 2014)

En la cual indica que la AFM1 tiene potencial carcinogénico, estimado en niveles específicos de residuos. Siendo el nivel máximo permisible por el Codex Alimentarius de 0.5 ppb en la leche. (Comisión Codex Alimentarius, 1995) Sin embargo, no existen en Guatemala estudios de incidencia y niveles de contaminación con AFM1 que permitan establecer estos límites con un criterio más racional acorde con la situación local.

4.12 Discusión entre entidades internacionales

El nivel de contaminación máximo permitido en Estados Unidos y otros países del continente americano es 10 veces superior al permitido por la UE. Está marcada diferencia entre los dos límites para la AFM1, ha dado lugar a discusiones en el Codex Alimentarius que resultaron en la solicitud de reevaluación de estos niveles al Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios. (Rubio, 2011)

Este organismo científico consultivo, tras evaluar los riesgos para la salud de dicha toxina, remitió el proyecto con un nivel máximo de 0.5 ppb, adoptado por la Comisión del Codex Alimentarius (CCA), frente al que los países de la UE y la organización internacional de asociaciones de consumidores mostraron su desacuerdo. Esta situación ha dado lugar a que ambos límites permanezcan en vigor actualmente. (Rubio, 2011)

Teniendo en cuenta las preocupaciones en salud pública, la UE continua manteniendo el nivel máximo de 0.05 ppb de AFM1 en la leche y de 0.025 ppb en los alimentos lácteos para lactantes. Teniendo como soporte el análisis de 10,778 muestras de leche en Europa, con un valor medio de contaminación de 0.023 ppb, por tal motivo especifican que el nivel de 0.05 ppb puede conseguirse perfectamente. (Gimeno, 2004)

Sin embargo hay países que defienden el nivel máximo de 0.5 ppb de AFM1, debido a que podrían producirse consecuencias económicas negativas, debido a la dificultad de exportación de leche a países que solo aceptan el nivel máximo de 0.05 ppb. A todo esto se añadió que los países en desarrollo podría tener una reducción significativa de la disponibilidad de la leche y consecuencias negativas en la nutrición de la población, en caso de que hubiera una reducción significativa del nivel máximo de 0.5 ppb. (Gimeno, 2004)

Aunque la AFM1 tenga una potencia carcinogénica 10 veces menor que la AFB1, el riesgo de padecer cáncer de hígado por la exposición a cualquier nivel cuando se trata de un carcinógeno genotóxico, como es el caso de la AFM1, puede suponer un grave riesgo sanitario para los consumidores en especial para los niños. (Gimeno, 2004)

Esto refuerza la aplicación del principio ALARA (As Low As Reasonable Achievable), es decir, que el nivel máximo debe ser tan bajo como sea razonablemente posible. Especificando 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 a padecer cáncer de hígado que pueda ser provocado por las aflatoxinas en general. (Gimeno, 2004)

4.13 Antecedentes de investigación

En Guatemala se dispone de poca información referente a estudios efectuados acerca de la presencia de la AFM1 en leche cruda de bovino. Las investigaciones realizadas hasta el momento ofrecen una limitada perspectiva de la situación actual de este contaminante en uno de los productos más importantes en la nutrición guatemalteca.

Entre las investigaciones realizadas en Guatemala sobre la presencia de AFM1 en leche y subproductos lácteos se encuentran las siguientes:

- En 1995 Marroquín Pozos, H. Identificó y cuantificó a través de un estudio comparativo la AFM1, en leches fluidas pasteurizadas y no pasteurizadas que se distribuyen en la ciudad de Guatemala, mediante Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC). Las muestras analizadas no presentaron contaminación de dicha toxina. (Carballo, 2003)
- En 2011 Bermúdez Valle, R. Determino la presencia de la AFM1 en leche cruda de bovino, proveniente de explotaciones lecheras asociadas a COOPROLECHE, en la región de la costa sur de Guatemala, mediante la prueba de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Las muestras analizadas presentaron AFM1 en cada una de ellas. Sin embargo todas las concentraciones se encontraban debajo del límite permisible que establece la FDA (Food & Drug Administration) de Estados Unidos de Norteamérica, según la norma CPG Sec. 527.400. (Bermudez, 2011)
- En 2014 Aragón González, S. Determino la presencia de AFM1 por el método de ELISA en queso seco y oreado que se expende en cinco mercados municipales de la ciudad de Guatemala. Las muestras analizadas presentaron AFM1 en queso seco en un promedio de (0.001164 ppb) y oreado (0.001167 ppb) no encontrando diferencia significativa en la cantidad de AFM1 entre ambos. (Aragón, 2014)

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales

5.1.1 Materiales utilizados en el estudio

- Bata blanca.
- Botas de hule de color blanco.
- Cofias.
- Guantes de látex.
- Etiquetas de identificación de muestras.
- Tape.
- Jabón antibacterial.
- Cucharón de mango largo.
- Bolsas estériles de polietileno con capacidad de 500 ml.
- Hielera.
- Hielo.
- Automóvil.
- Lápiz y lapicero.
- Computadora.
- Programa MegaStat 2007.
- Boleta de inspección proveedores del centro de acopio.
- Boleta de toma de muestras de leche.

5.2 Metodología

5.2.1 Área de estudio

El estudio se realizó en un centro de acopio de leche, ubicado en la región de la costa sur de Guatemala. El mismo posee 10 proveedores, distribuidos en distintas ubicaciones del área antes mencionada. Este territorio se caracteriza por ser una región geográfica cálida, teniendo altitudes que varían de 800 a 1,500 msnm, en una zona de vida bosque seco subtropical y bosque húmedo subtropical cálido. Teniendo una temperatura que oscilan entre 22 a 29°C, con una precipitación entre 500 a 1,400 mm/año. (De La Cruz, 1982) Con una humedad relativa entre 65 a 75%. (Girón, Estrada y Reyna, 2011)

5.2.2 Duración del estudio

El estudio se realizó en los meses de mayo y junio del año 2015, teniendo una duración aproximada de 5 semanas, donde se recopiló información de los proveedores del centro de acopio y se llevó a cabo la toma de muestras.

5.2.3 Selección del centro de acopio

El centro de acopio seleccionado es uno de los principales centros de distribución de productos lácteos de Guatemala. El mismo es abastecido por diferentes fincas lecheras localizadas en distintas zonas en la costa sur del país. El establecimiento mostró disponibilidad en participar en el estudio, con previo consentimiento de los productores para su colaboración en la realización del mismo.

5.2.4 Diseño de boleta y encuesta

Para la recolección de información en la realización del estudio. Se elaboró una boleta de toma de muestras (ver anexo 1), para llevar un mejor control de las muestras recolectadas. Así mismo, se realizó una boleta de encuesta para los proveedores del centro de acopio (ver anexo 2), con el fin de conocer las siguientes características:

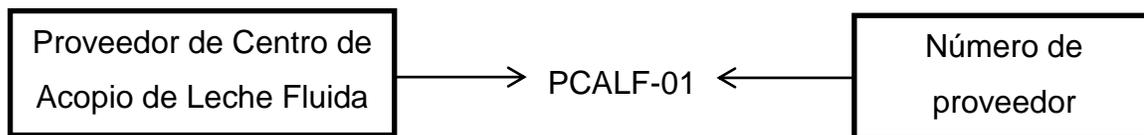
- El tipo de alimento que se suministra a los animales en las diferentes explotaciones lecheras.
- Como almacenan el alimento.
- Características generales de la producción del hato.

La recolección de datos por medio de las encuestas a los proveedores se realizó visitando las diferentes explotaciones lecheras el día asignado al muestreo de cada proveedor, el horario para las visitas fue de 6:00 a.m. a 8:00 a.m. antes del envío de la leche al centro de acopio.

5.2.5 Codificación de proveedores de centro de acopio

Por motivos de salvaguardar la confidencialidad del centro de acopio y la de sus proveedores, los nombres de los establecimientos y la ubicación de los mismos fueron omitidos. Para fines de identificación a los distribuidores se les asignó una codificación en base a las siguientes especificaciones:

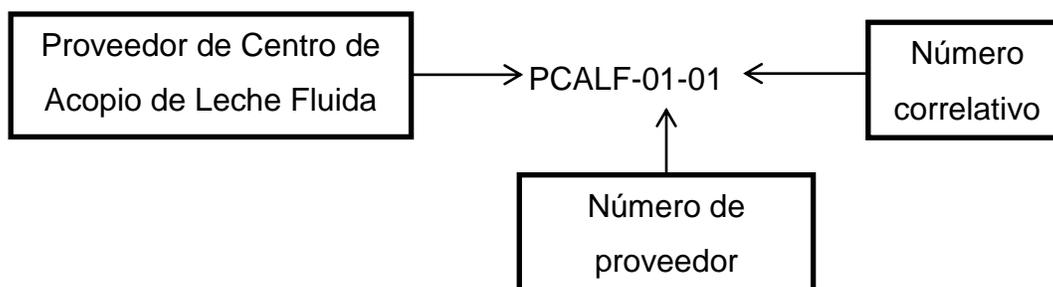
- Abreviación: Proveedor de Centro de Acopio de Leche Fluida (PCALF).
- Número de proveedor (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10).



5.2.6 Codificación de muestras

Se realizó un código para las muestras recolectadas con el motivo de facilitar la identificación de las mismas en base a las siguientes especificaciones:

- Abreviación: Proveedor de Centro de Acopio de Leche Fluida (PCALF).
- Número de proveedor (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10).
- Número correlativo (1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16).



5.2.7 Toma de muestras

Se utilizó el método de muestreo por conveniencia debido a la escasa información acerca de la AFM1 en Guatemala y la buena disposición del personal del centro de acopio. (Piloña, 2014) Procediendo a recolectar una muestra por

cada proveedor, realizándose cada semana una toma de muestra a dos proveedores.

Estos muestreos se realizaron de 8:00 a.m. a 12:00 p.m. horario en el cual se realiza la recepción de la leche por parte del centro de acopio. La distribución de los muestreos y la codificación de los proveedores se describen en el cuadro siguiente:

Cuadro No. 3 Clasificación de muestreos

	Muestreo de proveedores	
Semana 1	PCALF-01	PCALF-02
Semana 2	PCALF-03	PCALF-04
Semana 3	PCALF-05	PCALF-06
Semana 4	PCALF-07	PCALF-08
Semana 5	PCALF-09	PCALF-10

Fuente: elaboración propia

5.2.8 Procedimiento para la toma de muestras

La toma de muestra se realizó de acuerdo a la norma guatemalteca COGUANOR NGO 34 046 H1 de toma de muestras de leche y productos lácteos. (COGUANOR, 1975)

- Para la toma de muestras se utilizaron bolsas estériles de polietileno con capacidad de 500 ml, proporcionada por el Laboratorio Desarrollo de Soluciones Globales (DSG). Estas se identificaron por medio de un código de muestra antes mencionado.

- Una vez identificadas las bolsas estériles se realizó el lavado de manos con agua y jabón antibacterial para mantener la higiene del proceso.
- Previo a la toma de muestra se procedió con la colocación de bata blanca, cofia y guantes de látex.
- Agitación del tanque de enfriamiento: se tomó la muestra inmediatamente cuando el agitador estaba encendido al momento de llegar al centro de acopio; en los casos donde el agitador no estuvo funcionando se encendió el agitador durante 5 minutos.
- Se abrió la tapa del tanque.
- Se abrió la bolsa estéril y se sostuvo la tapa con la misma mano.
- Se introdujo el cucharón, previamente lavado y desinfectado.
- Se tomó la muestra introduciendo el cucharón estéril de mango largo, como mínimo de 15 a 20 cm por debajo del nivel de leche del tanque.
- Cada muestra extraída del tanque se colocó dentro de una bolsa estéril de 500 ml, previamente identificada.
- Se cerró herméticamente y se colocó dentro de una hielera, para mantener la cadena de frío a una temperatura entre 0 a 4°C.

5.2.9 Procedimiento para la entrega de muestras al laboratorio

- Luego de haber recolectado las muestras de cada proveedor, estas fueron transportadas en una hielera a una temperatura entre 0 a 4°C hacia el laboratorio DSG, ubicado en Ciudad San Cristóbal, zona 8 de Mixco de la ciudad capital.
- Posteriormente se realizó la prueba de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) el mismo día de la toma de muestra, con el fin de identificar la presencia o ausencia de AFM1 en la leche cruda de bovino recolectada.

5.2.10 Fundamento de la prueba

La prueba de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 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 (inmunoadsorbente). (Aragón, 2014)

La reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y, por lo tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un substrato específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de espectrofotómetro. (Aragón, 2014)

5.2.11 Procedimiento de la prueba de ELISA

Para el análisis de las muestras de leche se utilizó el kit de ELISA Veratox® siguiendo el presente procedimiento:

- Se añadieron 250 μl de los controles, positivos y negativos, y de las muestras de leche en los respectivos pozos marcados de color rojo.
- Se transfirieron 100 μl de los pocillos de mezcla a los pocillos recubiertos por los anticuerpos de la AFM1. Los controles positivos y negativos se añadieron a los pozos en donde la AFM1 se liga a la pared de los pozos recubiertos con anticuerpos de la AFM1.
- La placa se colocó en un agitador de placas automático y se agitó de forma continua durante 20 minutos a temperatura ambiente.
- Se procedió a lavar con la solución diluida de lavado para eliminar materiales sueltos. Este proceso de lavado se repitió 5 veces.
- Se agregaron 100 μl del conjugado de la AFM1, la placa se colocó nuevamente en un agitador de placas automático y se agitó de forma continua durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Se procedió a lavar nuevamente con la solución diluida de lavado para eliminar conjugado suelto. Este proceso de lavado se repitió 5 veces.
- Tras el paso de lavado, se agregaron 100 μl de la solución de sustrato, la placa se colocó nuevamente en un agitador de placas automático y se agitó de forma continua durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- El resultado es el desarrollo de un color azul, se procedió a detener el desarrollo de color mediante la adición de 100 μl de solución de parada. El color azul cambió a un color amarillo.

- Los pozos con el color amarillo resultante se midieron ópticamente mediante un espectrofotómetro con un filtro de absorbancia óptica de 650 nm. La prueba trae estándares con controles negativos y positivos que van de 0 a 2000 partes por trillón (ppt). (Neogen, 2013)

5.2.12 Análisis estadístico

En el presente estudio exploratorio de corte transversal (Piloña, 2014) los resultados del análisis de laboratorio respecto a los niveles de AFM1 encontrados en el muestreo, fueron comparados con los límites establecidos por la FDA norma CPG Sec. 527.400 y los establecidos por la UE reglamento 1881/2006 de la comunidad económica europea (CEE).

Con el propósito de conocer si existen diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de AFM1 obtenidas y los límites máximos establecidos por la FDA y la UE, se aplicó la prueba de Chi cuadrado de bondad de ajuste con un 95% de confianza.

Para ejemplificar las variables obtenidas en las encuestas efectuadas a los proveedores se utilizaron promedios como estimadores estadísticos y gráficas para ilustrar la relación existente entre los distintos resultados.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Resultados del análisis de laboratorio (Prueba de ELISA)

En el siguiente cuadro se presentan los resultados obtenidos de las 10 muestras de leche cruda analizadas a través de la prueba ELISA.

Cuadro No.4 Resultados de cuantificación de AFM1

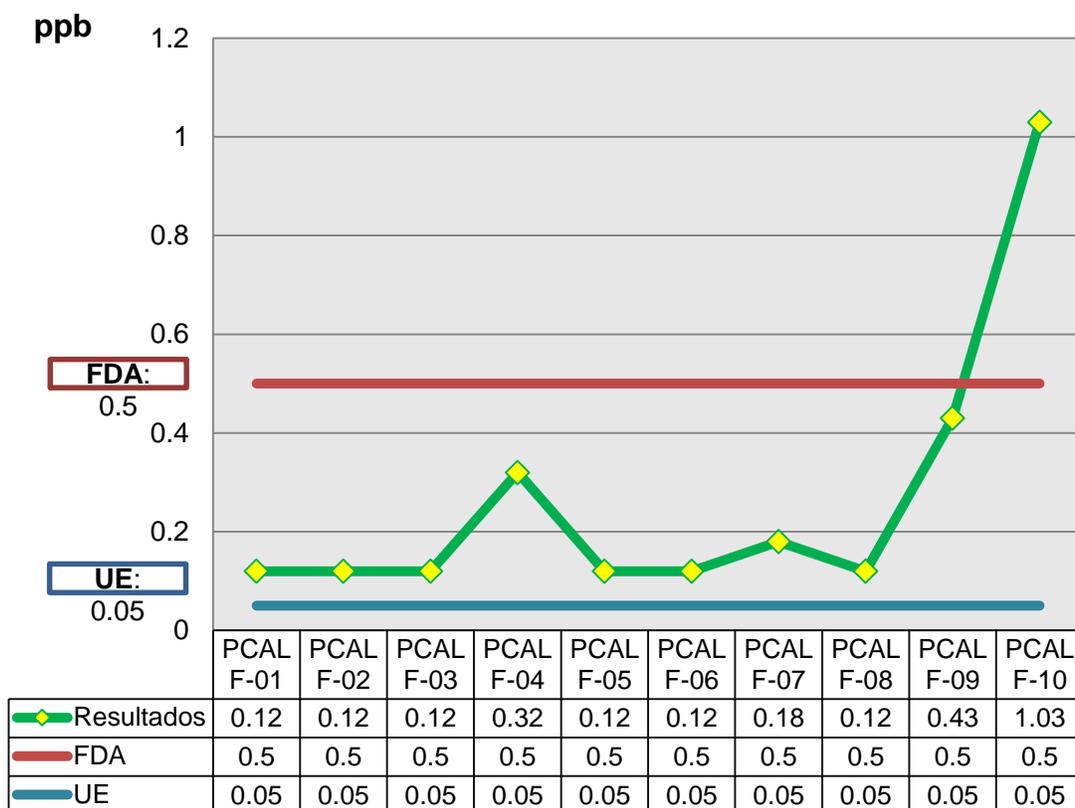
Proveedores	Resultado de AFM1 (ppb)
PCALF-01	0.12
PCALF-02	0.12
PCALF-03	0.12
PCALF-04	0.32
PCALF-05	0.12
PCALF-06	0.12
PCALF-07	0.18
PCALF-08	0.12
PCALF-09	0.43
PCALF-10	1.03

Fuente: elaboración propia

Los resultados mostrados en el cuadro anterior indican la presencia de AFM1 en todas las muestras analizadas. Dentro de los posibles factores que conllevaron a la contaminación de estas muestras con AFM1 está el manejo deficiente en el almacenaje del concentrado comercial, la raza del animal, concentración de AFB1 en la ración, la cantidad y duración del consumo del alimento contaminado, el estado de salud del animal y el periodo que transcurre desde la retirada del alimento contaminado a la toma de muestras para el análisis de residuos.

(Combita y Mildenberg, 2009) Estos residuos no solo implican que el animal se vea afectado por la contaminación de la AFB1 en la ración, sino también el riesgo para los humanos al ingerir leche contaminada con AFM1.

Figura No. 3 Resultados de cuantificación de AFM1 comparando el nivel máximo y de acción aceptado por la UE y la FDA respectivamente



Fuente: elaboración propia.

En la figura anterior se puede observar que el 100% de las muestras presentan contaminación con AFM1 y en todos los casos se encontró niveles por encima de 0.05 ppb siendo este el límite máximo tolerado por la UE. Sin embargo, el 90% de las muestras se encuentran en un nivel de acción aceptable establecido por las normas de la FDA.

Lo anterior se puede ver reflejado en el análisis estadístico efectuado de Chi

cuadrado de bondad de ajuste (ver anexo 3) con ayuda del programa MegaStat 2007. En el cual se establece que los resultados obtenidos de la cuantificación de AFM1 no muestran diferencia estadísticamente significativa con el nivel de acción aceptable por la FDA, no siendo así en el caso de la UE en donde se presenta una marcada diferencia entre las distribuciones de los resultados obtenidos y el límite máximo tolerado.

Del total de muestras de leche cruda analizadas en el presente estudio un 90% se encontró en un rango aceptable de 0.12 - 0.43 ppb con la FDA y un 10% en el rango de 1.03 ppb representando la concentración más elevada de AFM1 duplicando el nivel de acción aceptable establecido por la FDA norma CPG Sec. 527.400, convirtiéndose a su vez en un rango que sobrepasa 20 veces el nivel máximo permitido por la UE reglamento CE (Comisión Europea) No. 1881/2006. (Gimeno, 2004)

Por medio de los resultados de las encuestas efectuadas a los proveedores del centro de acopio (ver anexo 4), se determinó la posible relación que existe entre el almacenamiento deficiente del alimento y el incremento en la concentración de AFM1.

Observándose en los proveedores PCALF-09 y PCALF-10 los niveles de contaminación más altos de AFM1 siendo estos de 0.43 ppb y 1.03 ppb respectivamente. Dichos proveedores son los únicos que no poseen bodegas para almacenar el alimento balanceado y este se encuentra expuesto a las inclemencias del medioambiente. Transformándose en un factor de grave riesgo para la salud del consumidor y el propio ganado de la explotación lechera.

Es necesario destacar que el almacenamiento deficiente del alimento para animales es uno de los factores más importantes que propicia el desarrollo de hongos productores de micotoxinas como el *Aspergillus flavus* y *Aspergillus*

parsiticus. (Cruz, 1984) Sin embargo, no es el único factor a tener en cuenta debido a los hallazgos de Rubio (2011) donde cuantificó micotoxinas en maíz, sorgo y trigo aún no cosechados, en la cosecha y durante el transporte de granos utilizados en la elaboración de concentrados.

Los factores ambientales como temperatura, humedad, composición del sustrato y relaciones microbiológicas también condicionan la contaminación fúngica de los alimentos almacenados. (Cruz, 1984)

Combita y Mildenberg (2009) mencionan que: "Estudios realizados en Bogotá en 2004 han demostrado que la contaminación de AFM1 en la leche y los productos lácteos es el resultado de la exposición de AFB1 al ganado lechero a través del alimento balanceado contaminado" (p.91). Vinculando esta afirmación a los resultados obtenidos en la cuantificación de AFM1, donde el 90% de las fincas lecheras muestreadas proporcionan alimento balanceado como principal suplemento alimenticio.

La cuantificación de AFM1 realizada en el presente estudio refuerza la necesidad de establecer un mecanismo de vigilancia y control nacional que regule las concentraciones de la AFM1 en los alimentos destinados para humanos y animales. Con el afán de establecer en un futuro la regularización nacional de este contaminante en la leche de bovino en Guatemala. Especificando 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. (Gimeno, 2004)

En referencia a la normativa internacional de la FDA y la UE respecto a los límites establecidos para la AFM1 en leche cruda, se confirma la dificultad que representaría para un país en desarrollo como Guatemala cumplir el riguroso nivel máximo permitido de 0.05 ppb que establece la UE. Los resultados obtenidos en el

presente estudio coinciden con lo observado en países tales como: Estados Unidos, India y México donde se reflejan concentraciones de AFM1 cercanas al nivel acción aceptable de 0.5 ppb establecido por la FDA. (Bermudez, 2011)

VII. CONCLUSIONES

- Se determinó la presencia de aflatoxina M1 (AFM1) en todas las muestras de leche cruda analizadas de los diferentes proveedores del centro de acopio seleccionado.
- Los resultados obtenidos a través de la cuantificación de la AFM1 demostró que el 100% de las concentraciones se encuentra por encima del límite máximo aceptado por la UE reglamento No. 1881/2006. Sin embargo, 90% de las muestras se encuentran en un nivel de acción aceptable según la FDA de Estados Unidos de Norteamérica norma CPG Sec. 527.400.
- El almacenamiento deficiente de alimento en los proveedores PCALF-09 y PCALF-10 manifiesta una posible relación directa con los niveles de contaminación de AFM1, proviniendo de estas explotaciones lecheras las concentraciones más elevadas de dicha micotoxina.
- Los resultados obtenidos sobre las 10 muestras analizadas para detectar la presencia de AFM1 oscilaron desde el nivel de concentración más bajo que fue de 0.12 ppb a la concentración más elevada de 1.03 ppb. Siendo esta última concentración la única que duplica el nivel de acción aceptable establecido por la FDA y que sobrepasa 20 veces el nivel máximo permitido por la UE.

VIII. RECOMENDACIONES

- Es imperativo realizar estudios de monitoreo en el país para establecer el parámetro nacional en relación a la concentración de AFM1 en leche de bovino. Con el afán de establecer en un futuro la regularización nacional de este contaminante en leche y subproductos lácteos en Guatemala.
- Se deben elaborar normas que regulen los niveles máximos tolerables de micotoxinas en las diferentes materias primas y alimentos para consumo humano y animal sustentados en investigaciones realizadas a nivel nacional.
- Se recomienda duplicar el presente estudio a más proveedores de leche cruda de bovino en otras áreas geográficas del país y mostrar la posible diferencia entre la concentración de AFM1 en época seca y lluviosa.
- Se recomienda divulgar la importancia del adecuado almacenamiento del alimento en las explotaciones lecheras, debido al riesgo que representa el desarrollo de hongos y la producción de micotoxinas durante este importante punto crítico de control.
- Es aconsejable realizar estudios sobre la biotransformación de la AFB1 en AFM1 en bovinos teniendo en cuenta la dosis ingerida, la frecuencia de ingestión, tiempo de biotransformación, metabolismo, entre otros.
- Elaborar estudios rigurosos sobre los diferentes efectos que pueden provocar las aflatoxinas en las vacas lecheras, como por ejemplo: la baja producción de leche, problemas reproductivos, entre otros.

IX. RESUMEN

El estudio se realizó en un centro de acopio de leche ubicado en la región de la costa sur de Guatemala, con el propósito de generar información acerca de la presencia de la aflatoxina M1 (AFM1) en la leche cruda de bovino, que se recibe de 10 proveedores en uno de los principales centros de abastecimiento de leche del país.

La contaminación de leche por la AFM1 representa un serio peligro para la salud de los consumidores de este alimento debido a su actividad cancerígena, teratogénica y mutagénica. Teniendo la capacidad de afectar diferentes órganos como: el hígado, riñón y cerebro. (Gimeno, 2004)

Para detectar la presencia de este contaminante se recolectó una muestra de 500 ml de leche por cada proveedor del centro de acopio realizándose cada semana una toma de muestra a dos proveedores. La investigación tuvo una duración de 5 semanas en las cuales se llevó a cabo el muestreo y recolección de información de los productores a través de encuestas.

En el presente estudio exploratorio de corte transversal (Piloña, 2014) los resultados del análisis de laboratorio respecto a los niveles de AFM1 encontrados en el muestreo, fueron comparados con los límites establecidos por la FDA norma CPG Sec. 527.400 y los establecidos por la UE reglamento 1881/2006.

Los resultados del estudio determinaron la presencia de AFM1 en todas las muestras de leche cruda analizadas, demostrando que el 100% de las concentraciones se encuentra por encima del límite máximo aceptado por la UE. Sin embargo, 90% de las muestras se encuentran en un nivel de acción aceptable según la FDA. Los niveles de contaminación más altos de AFM1 encontrados se

relacionaron con los resultados obtenidos en la encuesta efectuada, donde se identificaron ciertas deficiencias en el almacenamiento del alimento.

La investigación demuestra la dificultad que representaría para un país en desarrollo como Guatemala cumplir el riguroso nivel máximo permitido que establece la UE. Mostrando resultados que concuerdan con lo observado en países tales como: Estados Unidos, India y México donde se reflejan concentraciones de AFM1 cercanas al nivel acción aceptable de 0.5 ppb establecido por la FDA. (Bermudez, 2011)

SUMMARY

The study was carried out in a milk collection center located in the south coast region of Guatemala in order to generate information of the existence of aflatoxin M1 (AFM1) in bovine raw milk which is received from 10 suppliers in one of the main milk supply centers of the country.

Milk contamination by AFM1 is a serious health hazard for consumers of this food due to carcinogenic, teratogenic, and mutagenic activity which may affect different parts of the body such as: liver, kidney and brain (Gimeno, 2004).

In order to detect the presence of this contaminant, a sample of 500 ml of milk was collected from each supplier of the collection center; every week was taken a sample from two suppliers. The research took five weeks, in which sampling and data collection of the producers were carried out through surveys. In this exploratory cross-sectional study (Piloña, 2014) the laboratory test results in regards of AFM1 levels found in the sampling, were compared with the limits established by the FDA standard CPG Sec. 527.400 and the limits established by the EU rule 1881/2006.

The results of the study determined the presence of AFM1 in all raw milk samples analyzed, demonstrating that 100% of the concentrations are above the maximum limit accepted by the EU. However, 90% of the samples are in an acceptable action level according to the FDA. Highest levels of contamination of AFM1 found were related to the results obtained in the survey where some failures were identified in product storage.

The research demonstrates how difficult would be for a developing country such as Guatemala to fulfill the strict maximum level established by the EU, showing results that are according to the observed data in countries such as:

United States, India, and Mexico, where concentrations of AFM1 are near the acceptable action level of 0.5 ppb established by the FDA (Bermudez, 2011).

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Afanador, J. (1997). *Efecto de las aflatoxinas sobre la salud y producción porcinas*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
2. Agus, A., Y Sigit, F. (2009). *Límites máximos de aflatoxina M1 en leche de indonesia por el método de ELISA*. . Viena: Elsevier.
3. Aragón , S. (2015). *Determino la presencia de aflatoxina m1 por el método de ELISA en queso seco y oreado que se expende en (5) mercados municipales de la ciudad capital*. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala.
4. Arango Mejía, M. C. (2002). Micotoxinas y Salud Humana. *Biosalud*, 45-50.
5. Arenas, R. (1993). *Micología médica*. México: Interamericana.
6. Asamblea nacional constituyente. (1993). *Constitución política de la república de Guatemala*. Guatemala: Corte de constitucionalidad.
7. Bermudez Valle, R. A. (2011). *Determinación de la presencia de aflatoxina (M1) en leche cruda proveniente de explotaciones lecheras asociadas a cooproléche en la región de la costa sur de Guatemala*. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala.
8. Carballo, C. Y. (2003). *Evaluación de la calidad de alimentos balanceados producidos en una industria avícola de la ciudad de Guatemala*. Guatemala: USAC.

9. Carlson, M., Ensley, S., Grant , R., Y Smith, D. (2002). *Engormix*. Recuperado el 20 de Noviembre de 2014, de file:///C:/Users/PC1/Documents/U/Tesis/Tesis%20micotoxina%20M1/Micotoxinas%20leche/micotoxinas%20online/Tabla%20de%20Aflatoxina%20M1%20en%20Leche%20-%20Engormix.html
10. Chu, E. (1991). *Micotoxinas: contaminación en los alimentos, mecanismo, efecto cancerígeno y medidas preventivas*. Londres: Academic Press.
11. Codex Alimentarius. (2005). *Higiene de los alimentos* . Roma: FAO/OMS.
12. Combita Prieto, A. d., Y Mildenberg Ortiz, S. (2009). *Detección de aflatoxina M1 en leches frescas comercializadas en la zona del valle del cauca (Colombia) mediante la técnica de ELISA*. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.
13. Comisión Codex Alimentarius. (1995). *Norma general del codex para los contaminantes y las toxinas presentes en los alimentos y piensos*. Roma: FAO/OMS.
14. Comisión de la comunidad europea. (2006). *Reglamento (CE) No 1881/2006, contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios*. Bruselas: Diario Oficial de la Unión Europea.
15. Comisión Guatemalteca de Normas (COGUANOR). (1975). *Norma COGUANOR NGO 34 046 h1 leche y productos lácteos, toma de muestras*. Guatemala: COGUANOR.
16. Comisión Guatemalteca de Normas (COGUANOR). (1992). *Norma COGUANOR NGO 34 052 h2 granos comerciales y otros alimentos*,

determinación de aflatoxinas, método de Romer. Guatemala: COGUANOR.

17. Comité técnico de normalización centroamericana. (2014). *Reglamento técnico centroamericano RTCA 67.04.70:14, productos lácteos, quesos, especificaciones.* Guatemala: Ministerio de economía (MINECO).
18. Cornejo, J., Y Villarroel, O. (2012). *Antecedentes generales sobre las aflatoxinas y otras micotoxinas y elementos a tener en cuenta para el diseño de prácticas correctas de cultivo y elaboración de nueces.* Santiago de Chile: Gobierno de Chile departamento de Alimentos y Nutrición, Ministerio de Salud.
19. Cruz de Montoya, L. (1984). Aflatoxinas una amenaza para la salud y la economía. *Instituto colombiano agropecuario*, 173-182.
20. EFSA. (2015). *European Food Safety Authority.* Recuperado el 14 de Enero de 2015, de <http://www.efsa.europa.eu>
21. Ellis, W., Y Smith, J. (1991). *Aflatoxinas en alimentos: ocurrencia, biosíntesis, efectos en el organismo, detección y metodos de control.* Penang: Food Science and Nutrition.
22. Gimeno, A. (2004). Aflatoxina M1 en la Leche, riesgos para la salud pública, prevención y control. *Associação Portuguesa dos Industriais de Alimentos Compostos para Animais (IACA)*, 32-44.
23. Gimeno, A., Y Martins, M. L. (2002). *Engormix.* Recuperado el 15 de Noviembre de 2014, de <file:///C:/Users/PC1/Documents/U/Tesis/Tesis%20micotina%2>

0M1/Micotoxinas%20leche/micotoxinas%20online/micotoxinas%20en%20leche%20importancia%20AFM1.htm

24. Girón, W., Estrada, J., Y Reyna, V. (2011). *Litoral del pacífico*. Guatemala: SEGEPLAN.
25. IARC. (2015). *International Agency for Research on Cancer*. Recuperado el 13 de Enero de 2015, de <http://www.iarc.fr>
26. Jurado, R. (1989). *Toxicología veterinaria*. Barcelona: Salvat.
27. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. (1997). *Decreto 90-97 Código de salud*. Guatemala: MSPAS.
28. Murria, P., Y Thompson , J. (1995). *Microbiología médica*. Madrid: Mosby/Doy-
ma Libros.
29. Neogen. (2013). *Determinación de aflatoxina M1 por medio de la prueba veratox* . Michigan: Europe.
30. Piloña Ortiz, G. A. (2014). *Guía práctica sobre métodos y técnicas de investigación documental y de campo*. Guatemala: ISBN.
31. Rubio Martínez , R. (2011). *Incidencia de aflatoxinas en leche de oveja y derivados en Castilla-La Mancha*. Albacete: Universidad de Castilla-La Mancha.
32. Ruíz, N., Y Peña, N. (1980). *Niveles de aflatoxina B1 en sorgo recolectado en dos zonas del país*. Bogotá: ICA.

33. Scott, P. (1998). *Procesos de desintoxicación industriales y de granja para las micotoxinas*. Viena: Elsevier.
34. Sengun, I., Y Yaman, D. (2008). *Las micotoxinas y la contaminación del molde en quesos*. Izmir : World Mycotoxin Journal.
35. Soriano, J. (2007). *Micotoxinas en alimentos*. Madrid: Díaz de Santos.
36. VISAR-MAGA. (2003). *Acuerdo gubernativo número 969-99 reglamento para la inocuidad de los alimentos*. Guatemala: Dirección inocuidad de alimentos VISAR-MAGA.

XI. ANEXOS

ANEXO I

Boleta de toma de muestras



Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Dirección investigación y extensión
Proyecto de investigación

Boleta No. _____

BOLETA DE TOMA DE MUESTRAS DE LECHE

1. Código de proveedor de centro de acopio: _____

2. Código de muestra: _____

3. Fecha de toma de muestras: _____

4. Hora de la toma de muestra: _____

5. Sitio de la toma de muestra: _____

6. Fecha de entrega de la muestra al laboratorio: _____

7. Hora en que se entregó la muestra al laboratorio: _____

8. Análisis que se va a realizar:

Producto	Análisis	Verificación
Leche Cruda	Aflatoxina M1	✓

9. Responsable: _____

ANEXO II

Boleta de encuesta para proveedores de centro de acopio

Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Dirección investigación y extensión
Proyecto de investigación



Fecha: / /

Boleta No. _____

BOLETA DE INSPECCIÓN PROVEEDORES DEL CENTRO DE ACOPIO

Boleta de caracterización de la inocuidad de leche cruda distribuida en un centro de acopio de la costa sur de Guatemala.

INTRODUCCION: Conocer acerca de la inocuidad de la leche cruda distribuida en un centro de acopio, ubicado en la costa sur de Guatemala. Los datos obtenidos se manejaran con suma confidencialidad.

1. Código de proveedor: _____

2. Nombre del Encargado: _____ Tel.: _____

3. ¿Qué alimento utiliza para su ganado lechero?

-Concentrado -Ensilaje -Heno -Pastoreo -Otro _____

4. Concentrado: -Comercial _____ -Hecho en finca _____

Ingredientes: _____

5 ¿Cómo almacena el concentrado?

Punto de control	Si	No
El alimento esta al aire libre.		
Bodega		
Cuenta con tarimas para colocar el alimento.		
La bodega cuenta con buena ventilación.		
Existe control de plagas.		
Se tienen registros de la rotación del alimento.		
La bodega cuenta con techo.		
Existe separación entre el alimento y la pared.		
Realiza frecuentemente limpieza de pisos, paredes y techo.		

6. ¿Qué tipo de ensilaje utiliza?

- Es de maíz
- Es de sorgo
- Es de napier
- Es de maralfalfa
- Otros _____

7. Número de animales en ordeño: _____

8. Litros de leche producidos diariamente: _____

**Resultados de prueba estadística Chi cuadrado de bondad de ajuste
utilizando el programa MegaStat 2007**

**Cuadro No. 5 Prueba Chi cuadrado de bondad de ajuste resultados de
cuantificación de AFM1 y nivel de acción aceptable según la FDA**

observed	expected	O - E	(O - E) ² / E	% of chisq
0.12	0.500	-0.380	0.289	11.22
0.12	0.500	-0.380	0.289	11.22
0.12	0.500	-0.380	0.289	11.22
0.32	0.500	-0.180	0.065	2.52
0.12	0.500	-0.380	0.289	11.22
0.12	0.500	-0.380	0.289	11.22
0.18	0.500	-0.320	0.205	7.96
0.12	0.500	-0.380	0.289	11.22
0.43	0.500	-0.070	0.010	0.38
1.03	0.500	0.530	0.562	21.83
2.68	5.000	-2.320	2.574	100.00

Warning: sums should be equal.
2.57 chi-square
9 df
.9788 p-value

Fuente: elaboración propia

**Cuadro No. 6 Prueba Chi cuadrado de bondad de ajuste resultados de
cuantificación de AFM1 y nivel máximo tolerado por la UE**

observed	expected	O - E	(O - E) ² / E	% of chisq
0.12	0.050	0.070	0.098	0.40
0.12	0.050	0.070	0.098	0.40
0.12	0.050	0.070	0.098	0.40
0.32	0.050	0.270	1.458	5.96
0.12	0.050	0.070	0.098	0.40
0.12	0.050	0.070	0.098	0.40
0.18	0.050	0.130	0.338	1.38
0.12	0.050	0.070	0.098	0.40
0.43	0.050	0.380	2.888	11.80
1.03	0.050	0.980	19.208	78.46
2.68	0.500	2.180	24.480	100.00

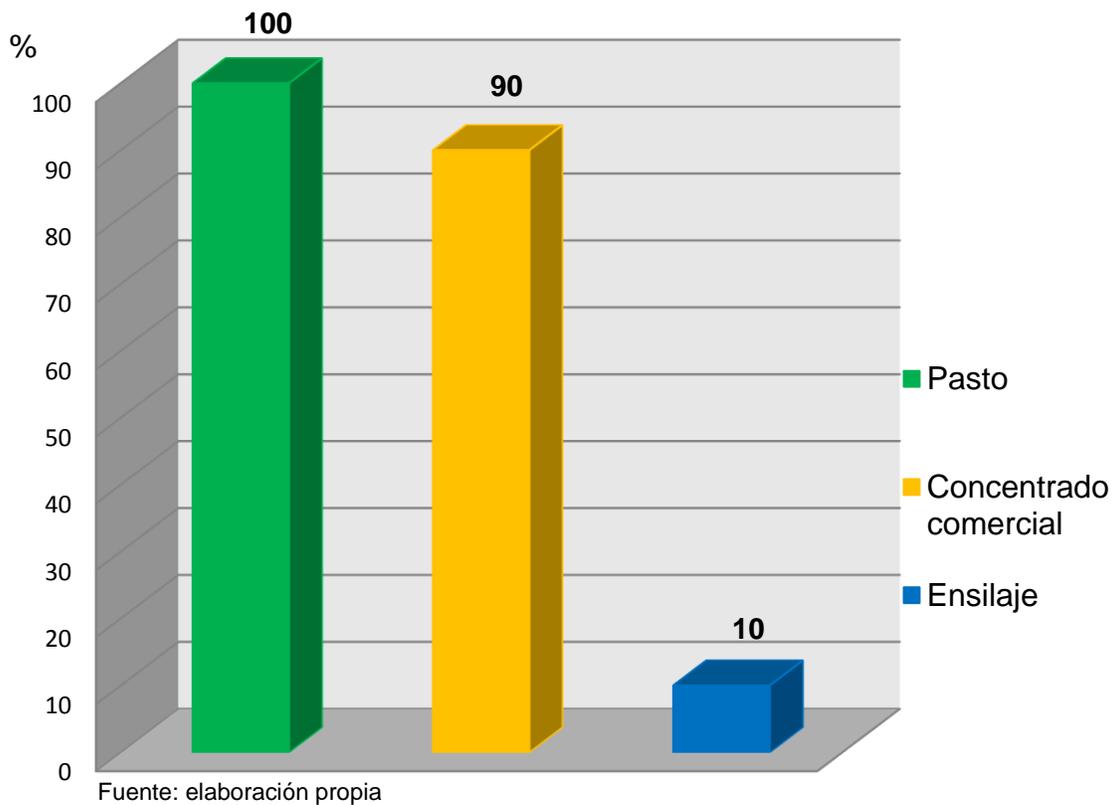
Warning: sums should be equal.
24.48 chi-square
9 df
.0036 p-value

Fuente: elaboración propia

Resultados estadísticos de encuestas

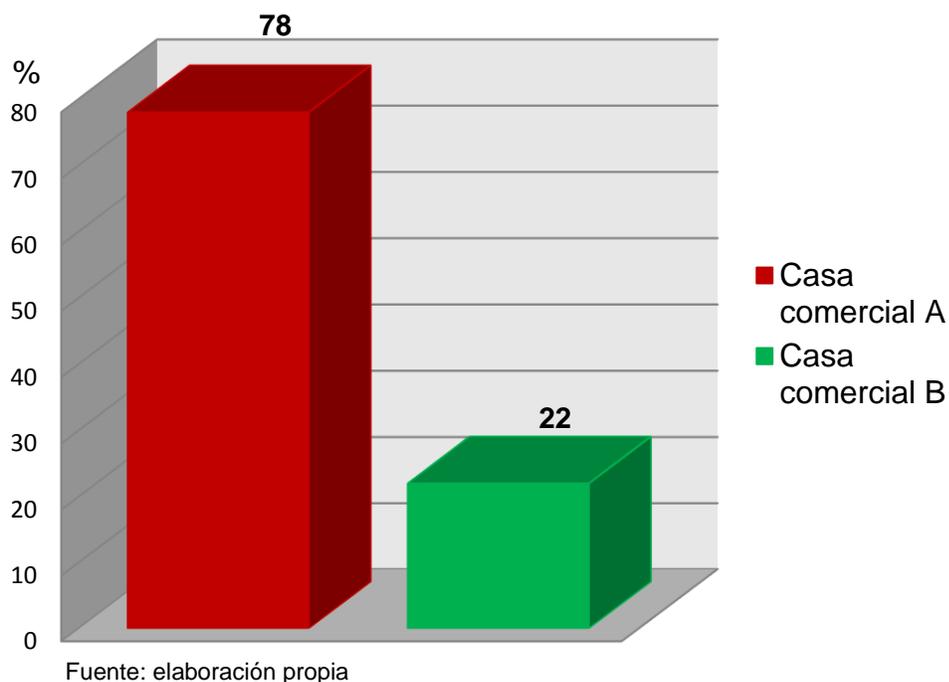
Utilización de cuadros y gráficas para presentar los resultados de las encuestas realizadas a los proveedores del centro de acopio.

Figura No. 4 Alimento suministrado en las explotaciones lecheras



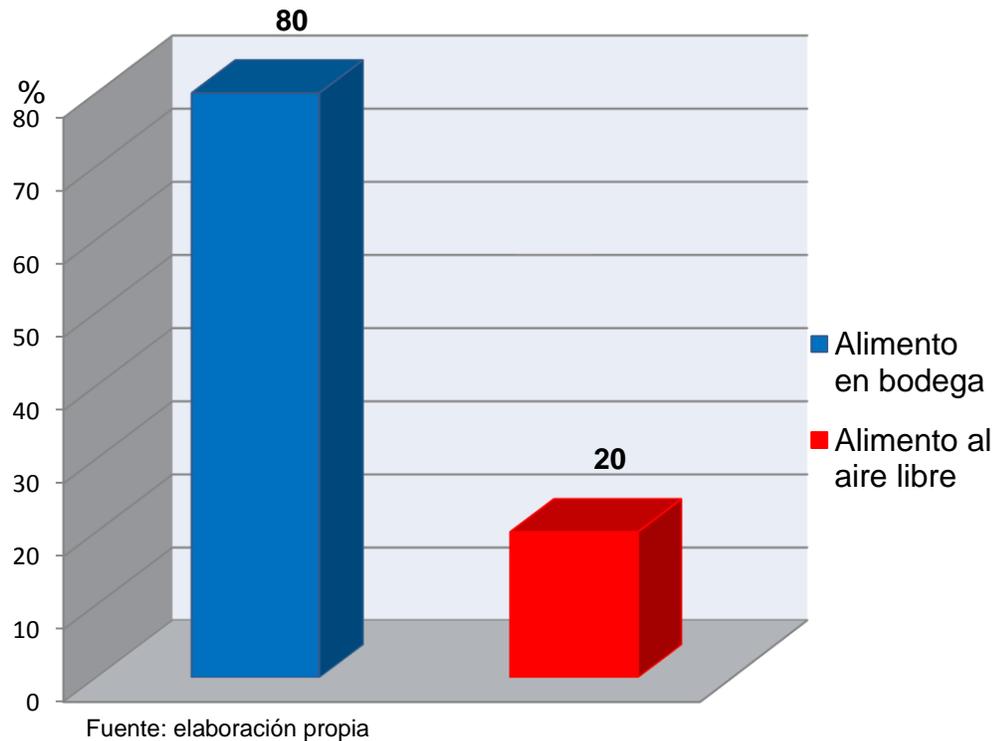
El 100% de las explotaciones lecheras visitadas suministran pasto a sus animales. Como suplemento alimenticio el 90% de los proveedores utiliza concentrado comercial y únicamente el 10% ensilaje de maíz y sorgo.

Figura No. 5 Clasificación de casas comerciales del alimento balanceado proporcionado a los animales en ordeño



Para identificar las dos casas comerciales que proveen el alimento balanceado se identificaron con las letras (A) y (B) respectivamente, las cuales están divididas de la siguiente manera. Un 78% de las explotaciones consumen alimento balanceado de la casa comercial (A) y solo un 22% consume alimento balanceado de la casa comercial (B).

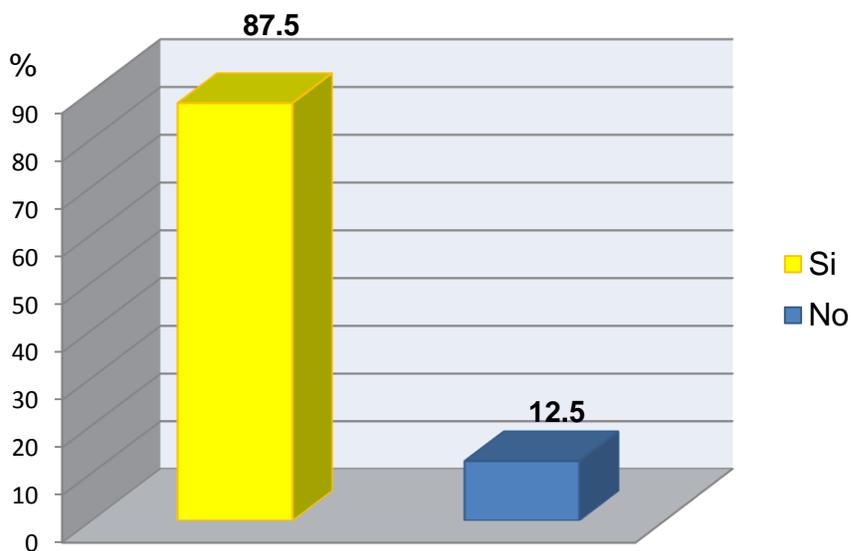
Figura No. 6 Forma de almacenaje del alimento en las explotaciones lecheras



Del total de explotaciones lecheras encuestadas se observó que el 80% cuenta con bodegas para almacenar el alimento, mientras que el 20% no posee aun dichas instalaciones por falta de recursos económicos y por ende el alimento se encuentra expuesto al medioambiente, este es el caso de los proveedores identificados como PCALF-09 y PCALF-10.

Para representar el cumplimiento de los distintos puntos de control en las bodegas de almacenamiento de las explotaciones lecheras se presentan las siguientes gráficas:

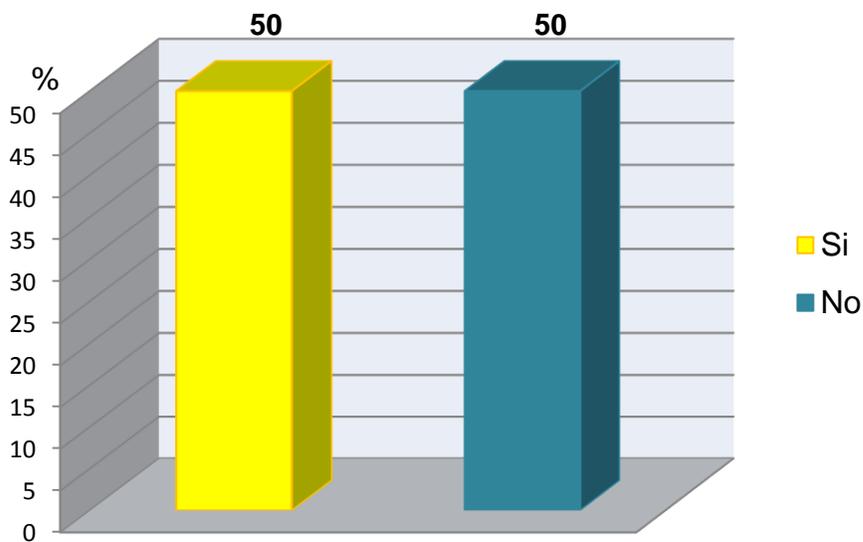
Figura No. 7 Utilización de tarimas por parte de los proveedores



Fuente: elaboración propia

El 87.5 % de las bodegas observadas cuentan con tarimas de madera y/o plástico para aislar al alimento de la humedad y la temperatura del piso. El 12.5 % no cuenta con dichas tarimas por lo cual el alimento se encuentra sobre el suelo.

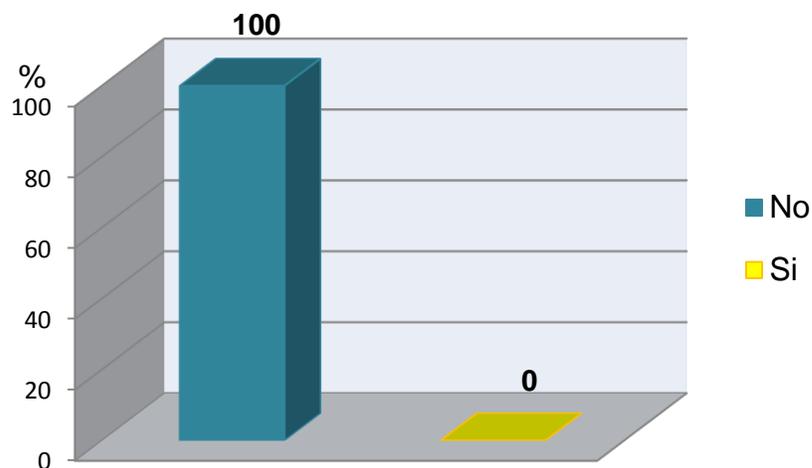
Figura No. 8 Ventilación en bodega de almacenamiento



Fuente: elaboración propia

El 50% de las bodegas examinadas posee entradas controladas de aire provocando un ambiente con una adecuada ventilación. Sin embargo, el otro 50% carece de estas estructuras y no permiten el flujo de aire apropiado dentro de la bodega.

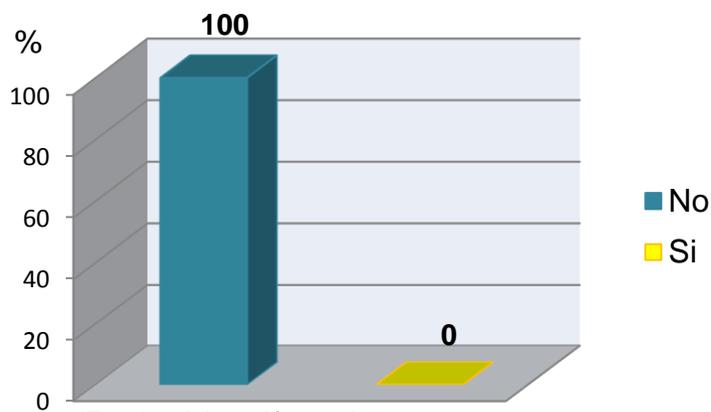
Figura No. 9 Control de plagas en bodega de almacenamiento



Fuente: elaboración propia

El 100% de las bodegas de almacenamiento no cuentan con un programa de control de plagas.

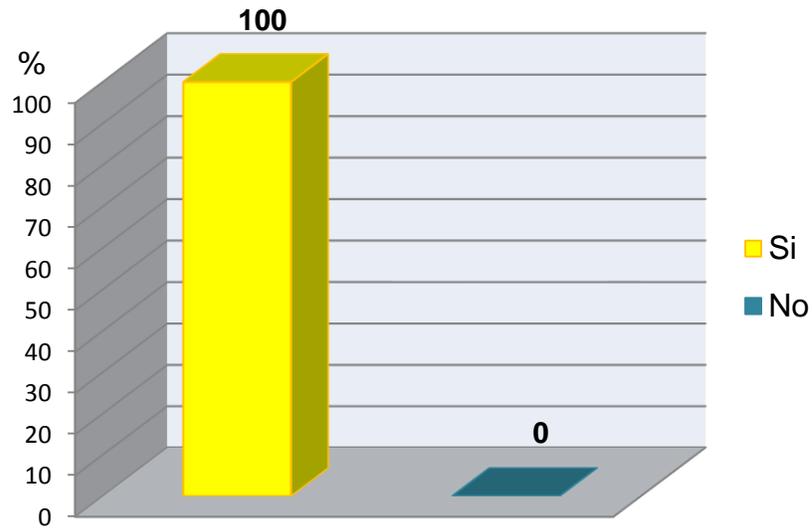
Figura No. 10 Registro de rotación del alimento en bodega de almacenamiento



Fuente: elaboración propia

El 100% de las bodegas de almacenamiento no cuentan con registros de la rotación del alimento.

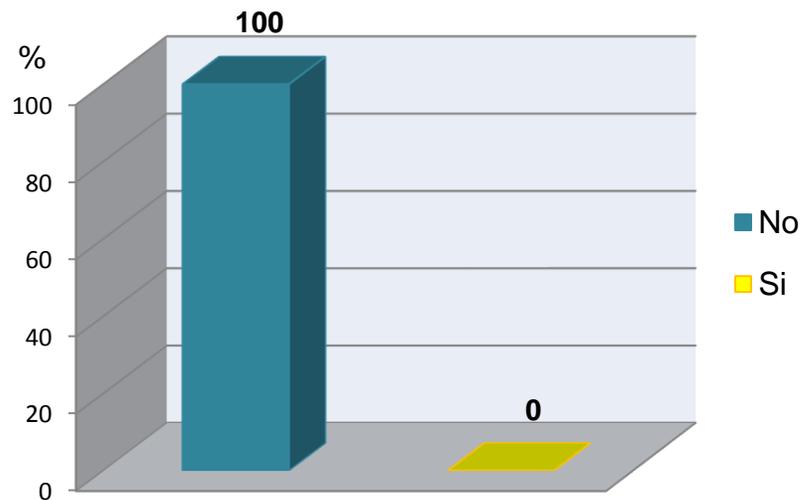
Figura No. 11 Presencia de techo en bodega de almacenamiento



Fuente: elaboración propia

El 100% de las bodegas de almacenamiento están perfectamente techadas.

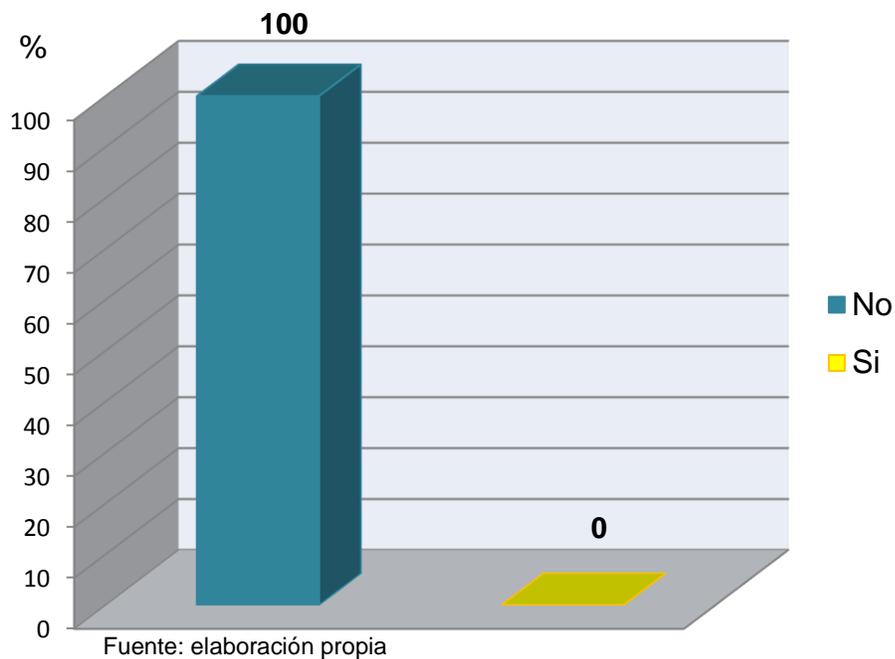
Figura No. 12 Separación entre el alimento y la pared en bodega de almacenamiento



Fuente: elaboración propia.

El 100% de las bodegas de almacenamiento no cumplen con separación entre el alimento y la pared, esto dificulta la realización de una adecuada limpieza y la eficiencia en el control de plagas.

Figura No. 13 Registro de limpieza en bodega de almacenamiento



De las bodegas inspeccionadas el 100% no cumple con un registro de limpieza frecuente de pisos, paredes y techo.

Cuadro No. 7 Registros y parámetros de producción en explotaciones lecheras encuestadas

Proveedores	Animales en ordeño	Litros/leche/vaca/día	Kg/Concentrado/vaca/día ^a	Ensilaje (Kg)
PCALF-01	47	8.12	3	0
PCALF-02	51	8.03	4.5	0
PCALF-03	37	7.56	0	10
PCALF-04	60	7.51	6	0
PCALF-05	67	5.05	3	0
PCALF-06	45	10.66	4	0
PCALF-07	60	13.33	5	0
PCALF-08	55	13.76	4.5	0
PCALF-09	53	8	5	0
PCALF-10	44	8.06	4	0
\bar{X} ^a	52	9	4	1

Fuente: elaboración propia

a. \bar{X} : media o promedio.

Del total de explotaciones lecheras visitadas el promedio de animales en ordeño fue de 52 vacas, con un promedio de producción diaria de 9 litros de leche por animal y un consumo de alimento balanceado (concentrado comercial) promedio de 4 kilogramos al día. Únicamente 1 de las 10 fincas lecheras evaluadas incluye como suplemento alimenticio ensilaje de maíz y sorgo en la dieta de su ganado, correspondiente al proveedor identificado como PCALF-03 que ofrece un promedio de 10 kilogramos por animal al día.

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**

**DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE AFLATOXINA M1 EN
LECHE CRUDA DE VACA DISTRIBUIDA EN UN CENTRO DE
ACOPIO UBICADO EN LA REGIÓN DE LA COSTA SUR DE
GUATEMALA 2015**

f. _____
Edwin Manolo Adolfo Vela Morales

f. _____
Lic. Zoot. Luis Alberto Villeda Lanuza
ASESOR PRINCIPAL

f. _____
Lic. Carlos Francisco Chinchilla
García
ASESOR

f. _____
M.V. Dra. Jacqueline Escobar Muñoz
EVALUADOR

IMPRÍMASE

f. _____
M.Sc. Carlos Enrique Saavedra Vélez
DECANO