

EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE AFLATOXINA M1 EN LECHE CRUDA Y PASTEURIZADA MEDIANTE HPLC-MS/MS

Maria Paula Fernandez¹

Agustina Muela²

Lucia Pareja³

Resumo:

Las micotoxinas son metabolitos tóxicos producidos por los hongos del género *Aspergillus*, de las especies *flavus* y *parasiticus*, siendo la más importante para la industria láctea la Aflatoxina M1. Estas pueden ocasionar problemas en la salud y desde el punto de vista comercial constituyen una barrera para-arancelaria en las exportaciones. El objetivo de este proyecto fue validar dos metodologías para la determinación de aflatoxina M1 en leche cruda y pasteurizada mediante HPLC-MS/MS usando como referencia las metodologías QuEChERS ampliamente usada para el análisis de contaminantes traza en alimentos y el método oficial propuesto por la AOAC 2000.08 el cual reporta el uso de Extracción en Fase Sólida (SPE) mediante columnas de inmunoafinidad. Las metodologías evaluadas fueron: 1. QuEChERS el cual se basó en un método previamente desarrollado por nuestro grupo de trabajo para la determinación de pesticidas y drogas veterinarias en leche cruda. Consta de una etapa de extracción con acetonitrilo (ACN) y posterior salting-out de la muestra, seguido de una etapa de clean up dispersivo en fase sólida para remover las posibles interferencias de la matriz. Finalmente el extracto obtenido se analiza mediante HPLC-MS/MS. 2. SPE mediante columnas de C-18, como sustituto de las de inmunoafinidad reportadas por el método AOAC 2000.08. En dicho método la leche previamente desgrasada se pasa por el cartucho, inicialmente acondicionado. Finalmente la aflatoxina M1 se eluye con un solvente orgánico apropiado. Las cifras de mérito evaluadas para la validación de la metodología; veracidad, precisión, límites de detección y cuantificación, linealidad y efecto matriz fueron determinadas de acuerdo a la normativa de la Unión Europea, el documento SANTE/11945/2015. Los resultados obtenidos para veracidad y precisión intermedia correspondiente a ambos métodos, donde los %Rec y %RSD en QuEChERS para los niveles de 0,05 y 0,1 µg/kg y para el nivel de 0,05 µg/kg en SPE cumplen con el criterio de la guía SANTE. Si bien para el nivel de 0,5 µg/kg en QuEChERS y 0,1 µg/kg en SPE, no llegan al 70% en la recuperación según la guía es aceptable para el análisis de rutina. La aplicabilidad de las metodologías se evaluó mediante el análisis de muestras comerciales de leche pasteurizada, entera y descremada con el fin de verificar el cumplimiento de los límites máximos para aflatoxina M1, establecidos por el Codex Alimentarius y la Unión Europea. No se detectó aflatoxina M1 en las muestras analizadas. Se logró desarrollar dos metodologías para la detección de aflatoxina M1 en

leche a los niveles que exigen los organismos oficiales. Dichos métodos constituyen una alternativa más económica que el método oficial de la AOAC. Dichas metodologías se validaron según el documento SANTE /11945/2015 cumpliendo con los parámetros establecidos para las cifras de mérito.

Palavras-chave: Micotoxinas/ Aflatoxina M1/Leche/HPLC-MS/MS

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE AFLATOXINA M1 EN LECHE CRUDA Y PASTEURIZADA MEDIANTE HPLC-MS/MS

¹ Aluno de graduação. paula.fernandez@utec.edu.uy. Autor principal

² Aluno de graduação. maria.muela@utec.edu.uy. Co-autor

³ Docente. pareja.lucia@gmail.com. Orientador



EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE AFLATOXINA M1 EN LECHE CRUDA Y PASTEURIZADA MEDIANTE CROMATOGRFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM

1. INTRODUCCION

La leche puede contener diversos contaminantes que afecten su inocuidad; tal es el caso de pesticidas, drogas veterinarias y micotoxinas.

Las micotoxinas, son metabolitos tóxicos producidos por hongos. En particular las aflatoxinas (AF), son micotoxinas producidas por hongos del género *Aspergillus* (*A. flavus* y *A. parasiticus*). Son 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. (Rodríguez M. et al., 2012).

Las aflatoxinas M1 y M2 fueron aisladas de la leche de animales alimentados con ración contaminada; la designación con la letra M, proviene de leche (Milk). Las aflatoxinas han recibido más atención que cualquier otra micotoxicosis debido a su potente efecto carcinógeno demostrado en animales de laboratorio susceptibles y sus efectos toxicológicos agudos en seres humanos. (Jaime C., Orialis G, 2004). Estos metabolitos ingresan al sistema de producción animal a través del alimento, proliferan en el alimento como AFB, la vaca lo consume, lo metaboliza y excreta en la leche como AFM. Se ha reportado que entre el 1 y el 3% de la AFB1 ingerida por el organismo, se elimina en la leche materna en forma de AFM1. (Díaz et al., 2004)

Es por esto que en términos de inocuidad alimentaria, es una de las principales preocupaciones de la industria láctea ya que además, son estables en los alimentos y termo-resistentes.

Esta toxina es controlada mediante legislación oficial en muchos países, siendo el límite máximo admisible por la Unión Europea (EU) en leche fluida y destinada a fabricación de productos lácteos de 0,05 µg/kg y 0,025 µg/kg en leche destinada a lactantes (fórmulas infantiles) y sus derivados. El MERCOSUR establece el nivel máximo de 0,5 µg/kg en leche fluida y 5 µg/kg en leche en polvo. En cuanto Estados Unidos establece un límite máximo igual al que establece el MERCOSUR, de 0,5 µg/kg. (Food and Agriculture Organization [FAO], 2004).

Este tema es de gran relevancia a nivel mundial, no solo para la industria láctea sino también para el productor lechero y sobre todo para el consumidor, ya que es uno de los alimentos de mayor importancia en nuestra dieta y uno de los más consumidos por poblaciones sensibles. El desarrollo de una metodología que permita cuantificar esta toxina permitiría realizar un seguimiento de la misma a lo largo del proceso productivo, permitiendo a la industria tomar medidas correctivas de forma más confiable.

El objetivo de este estudio fue evaluar dos metodologías diferentes a la oficial propuesta por la AOAC para la cuantificación de AFM1 en leche con el fin de obtener metodologías alternativas al alcance de los productores y organismos de contralor en Uruguay. Así mismo, se aplicaron dichas metodologías a muestras reales para evaluar el contenido de aflatoxina M1 en leche cruda y pasteurizada con el fin de asegurar la inocuidad del alimento.

2. METODOLOGÍA

En este trabajo se utilizaron como referencia las metodologías QuEChERS comúnmente usada para el análisis de pesticidas y el método oficial de la AOAC para aflatoxina M1 en leche, pero utilizando cartuchos de extracción en fase sólida de C-18 en lugar de los de inmunoafinidad. (AOAC, 2000.08).

La leche utilizada para realizar los ensayos fue obtenida del tambo de la Estación Experimental Mario A. Cassinoni (Facultad de Agronomía-UdelaR).

El método basado en QuEChERS, consiste en la extracción con disolvente orgánico y una etapa posterior de salting-out con sales apropiadas, una etapa de purificación mediante extracción en fase sólida dispersiva con diferentes sorbentes y análisis mediante HPLC-MS/MS.

El método de Extracción en Fase Sólida (SPE) consistió en una etapa inicial de desgrasado de la leche. Posteriormente la leche se pasa por cartuchos de C-18, previamente acondicionados y se eluye la aflatoxina M1 con un disolvente apropiado para ser analizada mediante HPLC-MS/MS.

En el análisis instrumental, se trabajó con un HPLC Agilent serie 1200 con una columna cromatográfica Agilent modelo Eclipse XDB-C18 de 5 µm de tamaño de partícula. Para el análisis por MS/MS se utilizó un espectrómetro de masas del tipo 4000 QTRAP de ABSciex con fuente de ionización por Electrospray en modo positivo.

La validación de las metodologías, se realizó siguiendo las directrices de la Guía Europea SANTE/11945/2015. Los parámetros de validación evaluados fueron: Veracidad a partir del porcentaje de recuperación (% Rec), Precisión como la desviación estándar relativa porcentual (% RSD), Límite de Detección y Límite de Cuantificación, Linealidad (evaluada mediante inspección visual y determinación de los residuales) y Efecto Matriz (%EM). (DG-SANTE, 2015).

La **veracidad** de las metodologías analíticas fue evaluada a tres niveles de concentración 0,05; 0,1 y 0,5 µg/kg para la metodología basada en QuEChERS y 0,05 y 0,1 µg/kg para SPE. El análisis se realizó a partir de 5 réplicas genuinas.

Se evaluó la **precisión** en condiciones de repetitividad y reproducibilidad, la repetitividad mediante el cálculo de la desviación estándar relativa porcentual de las cinco réplicas evaluadas para cada nivel de fortificación estudiado y la reproducibilidad mediante la realización del ensayo por diferentes analistas.

Asimismo se determinaron los **límites de detección y cuantificación** (LOD y LOQ), como el menor nivel de concentración validado, donde el analito puede ser cuantificado con una exactitud y precisión adecuada.

La **linealidad** fue estudiada construyendo curvas de calibración en matriz, en el rango 1-20 µg/kg para QuEChERS y entre 1 y 13 µg/kg para SPE. Se evaluó mediante la inspección visual y el cálculo de porcentaje de residuales.

El **efecto matriz** (EM) se calculó mediante la ecuación 1 y se clasificó dicho EM para la AFM1 según el criterio del Documento SANTE/11945/2015. (DG-SANTE, 2015).

$$\%EM = \left[\left(\frac{\text{Pendiente de la curva en matriz}}{\text{Pendiente de la curva en solvente}} \right) - 1 \right] * 100$$

Ecuación 1: Cálculo de EM.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con respecto al desarrollo del método cromatográfico se realizaron diferentes experimentos con diferentes proporciones de FM de forma de optimizar el programa de gradiente a utilizar. El flujo óptimo de fase móvil fue de 0,6 mL/min. El volumen de inyección fue 10 µL, suficiente para alcanzar una buena sensibilidad.

Según el documento SANTE para lograr una correcta identificación y confirmación de los analitos mediante LC-MS/MS es necesario la optimización de dos transiciones. Se optimizó el ión precursor y dos iones fragmento, de forma que la transición menos intensa (329,1/259,5) se utilizó para la confirmación, mientras que la más abundante (329,1/273,2) se usó para la cuantificación de AFM1.

Como se mencionó anteriormente se evaluó la veracidad y repetitividad para ambas metodologías mencionadas. Las **Figura 1** y **Figura 2**, muestran los resultados obtenidos para veracidad y repetitividad correspondiente a ambos métodos, donde los %Rec y %RSD en QuEChERS para los niveles de 0,05 y 0,1 µg/kg y para el nivel de 0,05 µg/kg en SPE cumplen con el criterio de la guía SANTE. Si bien para el nivel de 0,5 µg/kg en QuEChERS y 0,1 µg/kg en SPE, no llegan al 70% en la recuperación, según la guía es aceptable para el análisis de rutina. (DG-SANTE, 2015).

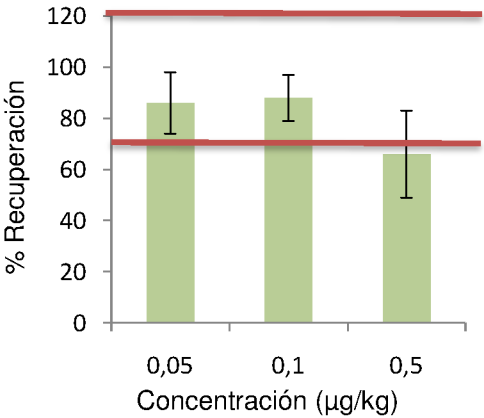


Figura 1. Veracidad y repetitividad del método QuEChERS.

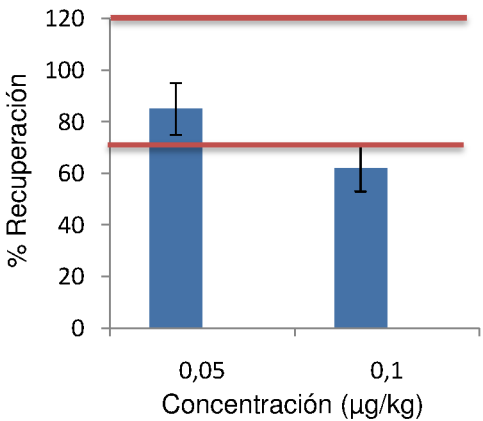


Figura 2. Veracidad y repetitividad del método SPE.

Método	r ²	LOD & LOQ (µg/kg)	%EM
QuEChERS	0,9983	0,05	-14
SPE	0,9966	0,05	74

Tabla 1. Linealidad, límites de detección, cuantificación y efecto matriz para ambos métodos.

La **Tabla 1**, muestra el LOD y LOQ para ambos métodos. Como se puede observar el método permite la evaluación de este contaminante a los niveles que exigen los organismos oficiales. El método basado en QuEChERS presentó una mejor linealidad y un menor % EM respecto al método SPE, por lo que podemos destacar que la metodología basada en QuEChERS demostró un mejor desempeño analítico.

4. CONCLUSIONES

Se logró desarrollar y validar dos metodologías para la detección de AFM1 en leche a los niveles que exigen los organismos oficiales. Ambas metodologías son sencillas y más económicas que la propuesta por la AOAC. Ambas metodologías son viables de ser empleadas en laboratorios de rutina para la determinación de esta toxina. Se evaluó la aplicabilidad de las metodologías mediante el análisis de muestras reales, no detectándose AFM1 en las muestras analizadas. Estas metodologías permiten el análisis de AFM1 en leche, con el fin de brindarle a las empresas una manera de controlar la inocuidad de su producto y por lo tanto obtener una mayor calidad.

5. REFERENCIAS

AOAC. Aflatoxin M1 in Liquid Milk. Immunoaffinity Column by Liquid Chromatography. International; Rockville, MD, USA: 2004. AOAC Official Method 2000.08-2004; pp. 1–3.

COMISIÓN EUROPEA. Documento SANTE/11945/2015. Guía sobre el control analítico de la calidad y los procedimientos de validación de métodos para el análisis de residuos de pesticidas en alimentos y ración.

DIAZ, D.; HAGLER, W.; BLACKWELDER, J.; EVE, J.; HOPKINS, B.; ANDERSON, KL.; JONES F.; WHITLOW, L. Aflatoxin binders II: reduction of aflatoxin M1 in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed. 2004. 157(2):233-41

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO) Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones en el año 2003.

JAIME C., ORIALIS G. 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. Gobierno de Chile Ministerio de Salud. 2004. [ultimo acceso 6 de setiembre 2017] Disponible en: <http://web.minsal.cl/portal/url/item/72fd6274dad8792ee04001011f0109e4.pdf>

RODRIGUEZ, M.; SALA, A.; SALAZAR, P. Aflatoxinas. Universidad de Los Andes. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Cátedra de Toxicología. 2012 [último acceso 11 de setiembre 2017] Disponible en: <http://webdelprofesor.ula.ve/farmacia/lunajr/escuela/aflatoxina.ppt>