

# AFLATOXINA M1 EN QUESOS Y SU IMPORTANCIA EN LA ACTUALIDAD

Cravero Ponso, C. F.<sup>1</sup>; Juncos, N. S.<sup>2,3</sup>; Olmedo, R. H.<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Laboratorio de Lactología. Córdoba. Argentina.

<sup>2</sup>Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Laboratorio de Tecnología de Alimentos (LabTA) / Química Biológica. Córdoba. Argentina.

<sup>3</sup>CONICET. Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV). Córdoba. Argentina.

<sup>4</sup>CONICET. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos Córdoba (ICYTAC). Córdoba. Argentina.

craverocarolina@agro.unc.edu.ar

## RESUMEN

Las micotoxinas son objeto de interés mundial debido a las importantes pérdidas económicas que acarrearán sus efectos sobre la salud de las personas, la productividad de animales y el comercio nacional e internacional de alimentos, causando pérdidas y desperdicios de alimentos. Las Aflatoxinas pertenecen a un grupo mayor de micotoxinas producidas por un amplio grupo de hongos micotoxigénicos. La familia de las Aflatoxinas en particular, son producidas principalmente por los hongos de género *Aspergillus* teniendo como especies *A. flavus* y *A. parasiticus*. La Aflatoxina M1 (AFM1), motivo del presente trabajo, se generan como consecuencia de transformaciones metabólicas generadas en la vaca, a partir de la ingesta de forrajes, silos, granos, etc. contaminados naturalmente con Aflatoxinas B1 (AFB1) y Aflatoxina B2 (AFB2). La AFM1, aunque de menor toxicidad que la AFB1, se categorizó por la IARC (OMS) como toxina 2B por su posible efecto carcinogénico. Por estos motivos, en este artículo se abordará el origen de las Aflatoxinas, su importancia de estudio en los alimentos, y más precisamente como afecta en la producción de quesos. También estaremos profundizando acerca de cómo se modifica la estabilidad de AFM1 según el proceso que se realice para la elaboración de quesos, ya sea por coagulación enzimática o precipitación ácida, al ser estos dos métodos con condiciones diferentes a las que se somete la leche, en los cuales se observan diferencias en el comportamiento de la toxina y en el resultado del producto final. En el presente trabajo se muestran resultados sobre la elaboración del queso ricotta a partir de leches artificialmente contaminadas con niveles de concentración superiores a los establecidos por el Código Alimentario Argentino (CAA), mediante diferentes operaciones, asociando temperaturas, fuerza iónica y agente oxidativo, y logrando una ricotta con una disminución del 99,5% del contenido de AFM1 en relación con la leche de origen.

Palabras clave: Micotoxinas, Aflatoxina M1, queso, ricotta.

## MICOTOXINAS, AFLATOXINAS Y SU IMPORTANCIA ACTUAL

Las micotoxinas son sustancias tóxicas producidas por el metabolismo secundario de hongos que colonizan cultivos y alimentos almacenados, las cuales se sintetizan al final de la fase exponencial y al principio de la fase estacionaria del crecimiento fúngico. Las micotoxinas se clasifican en diferentes familias, tales como: Aflatoxinas, ocratoxinas, tricotecenos, fumonisinas y alcaloides del ergot, entre otras. Como característica general, estas sustancias son estables en los alimentos y resistentes a la degradación bajo procedimientos de cocción normales. Para que un alimento se contamine con alguna micotoxina es necesario una previa exposición con hongos productores

de la misma, y necesitándose, a su vez, condiciones óptimas para que el metabolismo secundario pueda llevarse a cabo; por lo tanto la simple presencia de hongos no indica siempre que la toxina este presente. La familia de Aflatoxinas son producidas principalmente por los hongos del género *Aspergillus*, como las especies *A. flavus* y *A. parasiticus*, bajo ciertas condiciones de humedad, temperatura y disponibilidad de nutrientes. Existen aproximadamente 18 tipos de Aflatoxinas y las más importantes que aparecen como contaminantes de los alimentos son las Aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 (Organización Mundial de la Salud, 2018).

En este artículo, nos centraremos principalmente en las AFM1 que constituye un metabolito producido a través del citocromo P450 de los hepatocitos de la vaca lechera a partir de la ingesta de los alimentos contaminados con

AFB1, con una tasa promedio de biotransformación del 1,5 al 3% (según razas lecheras) respecto a los niveles de contaminación en los forrajes. Se sabe que AFM1 puede atravesar las barreras fisiológicas y ser excretada en leche, orina y heces (Acosta et al., 2016). Por lo tanto, ésta toxina se puede encontrar en leche o productos lácteos, constituyendo un peligro para la salud pública. Los niveles de concentración máximos de Aflatoxina en leche se dan entre el tercer y quinto día luego de la ingesta por la vaca del alimento contaminado. La exposición crónica en la alimentación a niveles bajo de Aflatoxinas se ha asociado con trastornos en la digestión, la absorción y/o el metabolismo de los nutrientes, con cirrosis y con el desarrollo de carcinoma hepatocelular (Fung et al., 2004). En consecuencia como las AFB1 y AFM1 tienen efectos adversos en la salud se están estudiando métodos para detoxificar los alimentos y mejorar la inocuidad de los mismos.

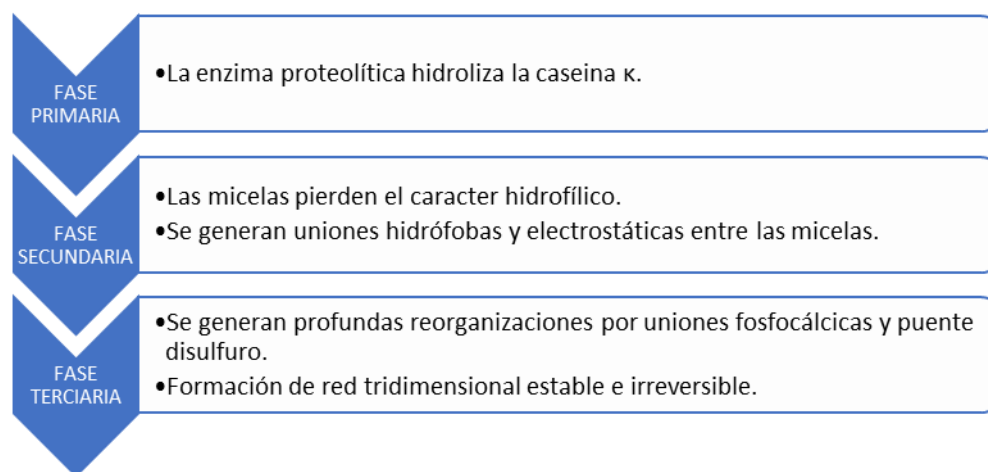
### ESTABILIDAD DE LAS AFM1 Y COAGULACIÓN ENZIMÁTICA

La leche es un triple sistema disperso, donde la grasa en estado globular se presenta emulsionada en la fase acuosa, las proteínas están dispersas en un sistema coloidal como lo son las caseínas que se encuentran en micelas, la lactosa y las sales minerales en solución. Las micelas de caseína de la leche poseen una resultante de cargas negativas que por repulsiones electrostáticas se oponen a su acercamiento y agregación contribuyendo a la estabilidad de la suspensión coloidal, pudiéndose precipitarse de dos formas diferentes: coagulación ácida y coagulación por vía enzimática, siendo ésta última en la que nos centraremos en este apartado. La coagulación enzimática de las caseínas, realizado por medio de enzimas proteolíticas de origen animal y/o vegetal, es el procedimiento habitual y generalizado para la

elaboración de la mayoría de los diferentes tipos de quesos del mercado (siendo la renina la enzima más utilizada), obteniéndose como resultado de la precipitación el para-caseinato fosfocálcico. Dicho procedimiento consta de tres etapas: fase primaria o enzimática, fase secundaria o agregación de micelas desestabilizadoras y fase terciaria o fase de reticulación (Figura 1).

Mediante este procedimiento las caseínas incrementan notoriamente su hidrofobicidad durante la etapa de proteólisis y esta condición es la que provoca una mayor afinidad para la unión de AFM1 con la caseína, resultando en un aumento de la concentración de la toxina en los quesos elaborados por esta metodología, particularmente en los quesos de larga maduración (pasta dura).

Los niveles de AFM1 en queso son influenciados por muchos factores a tener en cuenta: tipo de leche utilizada, queso a elaborar, tiempo de prensado, concentración de sal, pH final y cantidad de agua eliminada durante el procesamiento. Según un ensayo sobre transferencia de AFM1 desde la leche contaminada natural y artificialmente con 10, 50 y 200 ng/L a tres tipos de quesos italianos con distintos grados de maduración, encontraron siempre una mayor concentración de AFM1 en quesos que en la leche de origen, con factores de concentración de 1,43 a 2,20 en quesos frescos y de 6,71 en el queso de mayor maduración (Cavallarin et al., 2014). Por lo tanto, la elaboración de quesos a partir de leche contaminada con aflatoxina aumenta el riesgo en la salud, ya que por su procesamiento habitual aumenta la concentración y afinidad de dicha toxina en el alimento. Esto constituye un problema serio de inocuidad que la industria láctea tiene vigente, lo que ha provocado una mayor regulación en los límites máximo permisible de ésta toxina en leche y productos lácteos (0,5 ppb ó µg/L, CAA).

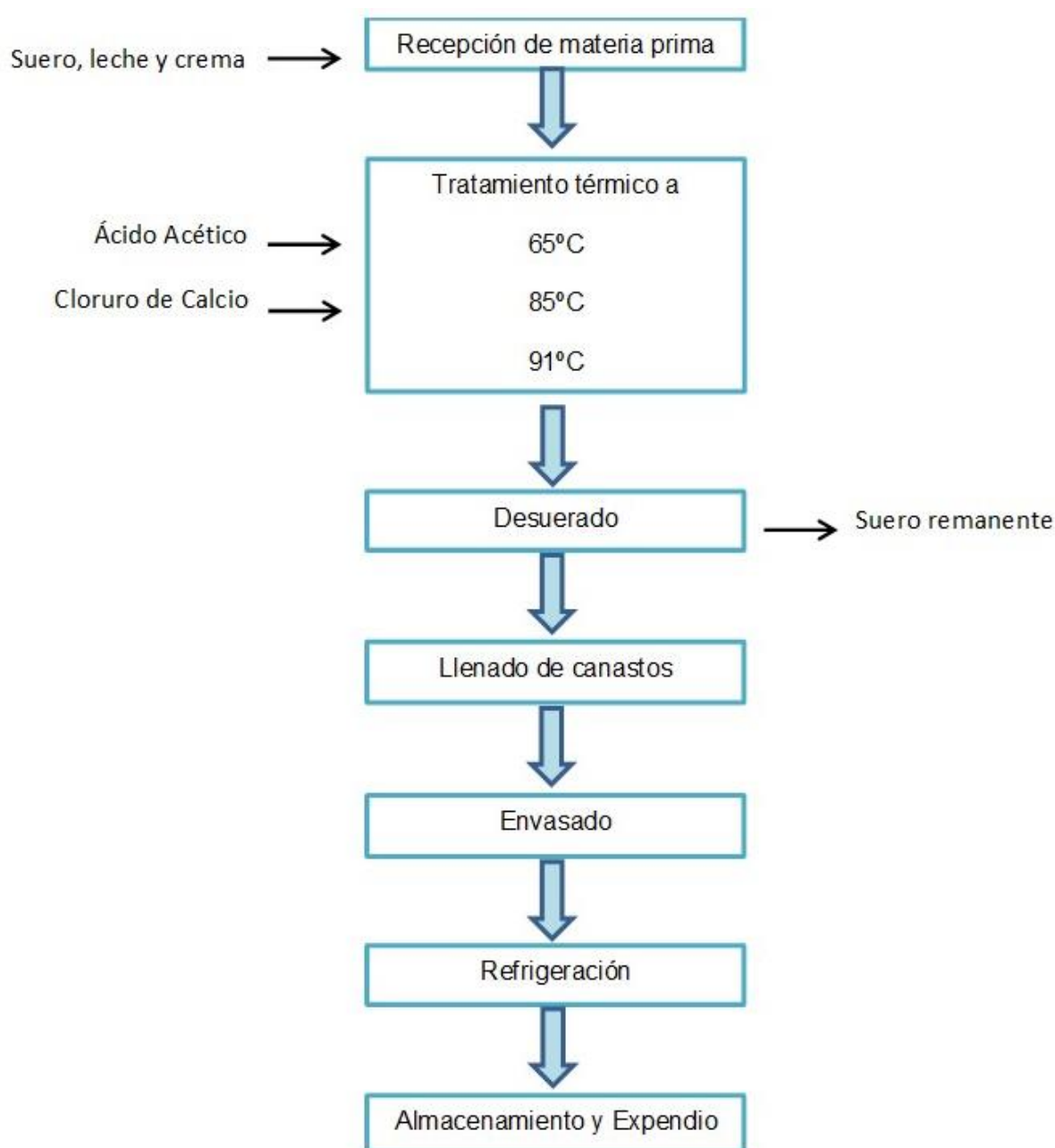


**Figura 1.** Fases de la coagulación enzimática de las caseínas de la leche

## PROCESO DE OBTENCIÓN DE RICOTTA

La ricotta, cuya obtención se basa, en la precipitación ácida a altas temperaturas de las caseínas y proteínas del suero, originalmente elaborada con el suero de la leche de vaca, oveja y de búfala, proveniente de las Comarcas Italianas de Lacio, Sicilia, Cerdeña, Calabria, Piemonte, Venecia y Lombardía. Este tipo de “queso” es preparado como forma de utilizar la totalidad de las proteínas del suero y de las precipitaciones residuales de la caseína luego de la fabricación del queso. En nuestro país, al igual que en EEUU, el queso ricotta puede ser

elaborado a partir de leche entera, parcialmente descremada, descremada o de suero de queso con el agregado de diferentes porcentajes de leche entera, descremada o crema, o leche en polvo mediante el calentamiento de la leche aproximadamente a 90 °C con el agregado de un ácido orgánico, generalmente ácido acético, hasta llegar al punto isoeléctrico de las caseínas (pH 4,6) momento en que las mismas precipitan, incorporando la grasa láctea, si la hubiere, más la floculación de las proteínas del suero (alfa lactoalbúmina y beta lactoglobulina) debido a la acción de la temperatura aplicada (**Figura 2**).



**Figura 2.** Diagrama de flujo: Elaboración industrial de ricotta

La ricotta así obtenida puede ser, de acuerdo a su textura: compacta, finamente granulosa, desmenuzable, con sabor y aroma poco perceptible, de color blanco – amarillento, según el contenido de grasa, y uniforme.

En Argentina, con el objeto de aumentar el rendimiento de éste producto y bajar los costos por unidad de producción, se utiliza el suero de queso con el agregado de leche entera o descremada líquida o en polvo.

El consumo del queso ricotta en nuestro país, deviene de las costumbres de los inmigrantes Italianos y aun hoy estos hábitos tradicionales alimentarios se conservan intactos; no obstante este consumo familiar, el destino más importante de la ricotta es el de las fábricas de pastas frescas en donde es utilizado para el relleno de ravioles, torteletis, lasañas, etc.

### **ESTABILIDAD DE LAS AFM1 Y PRECIPITACIÓN ÁCIDA**

La coagulación ácida consiste en la precipitación de las caseínas en su punto isoeléctrico (pH = 4,6) mediante la acidificación biológica logrado por medio de fermentos lácticos que transforman la lactosa en ácido láctico, o mediante el agregado de ácidos orgánicos, como los ácidos acético, láctico, tartárico y cítrico entre otros. El precipitado caseínico así obtenido es totalmente desmineralizado.

Durante la acidificación se produce una disminución de las cargas negativas de las micelas con una reducción de la capa de hidratación y de las repulsiones electrostáticas, con solubilización del calcio y fósforo mineral que determina la pérdida de la estructura de la micela de caseína y una reorganización de las proteínas, dando como resultado la formación de un gel con elevada friabilidad de nula elasticidad y plasticidad.

Estudios tendientes a demostrar la minimización del contenido de AFM1 en el queso salado blanco iraní (Mohammadi et. al., 2008), concluyeron en que las variables (temperatura de cuajado, tiempo de prensado y el pH de la solución salina saturada) fueron los factores más significantes que afectaron el contenido de AFM1 en el queso; en efecto, el contenido de AFM1 decreció cuando se incrementaron la temperatura del cuajado y el tiempo de prensado a 39,91 °C y 19,48 minutos, respectivamente. En otro trabajo de investigación llevado a cabo por Devici, (2007) referido a los cambios de concentración de la AFM1 durante la elaboración y el almacenamiento del queso blanco encurtido de leche entera de vaca, artificialmente contaminada con dos niveles diferentes de AFM1 (1,5 y 3,5 µg/Kg.), comprobaron que la pasteurización a 72 °C durante 2 minutos causaron disminución del contenido de AFM1 alrededor del 12% y 9% de la contaminación inicial, respectivamente.

De acuerdo a las evidencias tecnológicas, parece quedar

claro, que la mejor manera de reducir la contaminación de AFM1 en la leche en el futuro, pasará por los métodos de reducción de AFB1 en los forrajes y granos utilizados en la alimentación del ganado lechero, mediante el uso de sustancias adsorbentes y la aplicación de BPA (Buenas Practicas Agropecuarias). Sin embargo, estas herramientas son aún poco usadas en el mundo y en lo que respecta a nuestra lechería, dichos procedimientos no son empleados, por lo menos, de manera significativa, no obstante ello, la presencia de AFM1 en leche sigue siendo una preocupación para la salud de los consumidores de leche y productos lácteos. Choudhary et. al., (1998) estudiaron el efecto de varios tratamientos térmicos sobre la AFM1 contenida en leche de vaca, reportando que la temperatura de esterilización a 121 °C por 15 minutos causó una degradación de la AFM1 en el orden de 12,21%; mientras que el hervido de la leche la redujo en un 14,5%; concluyendo que la destrucción de la AFM1 depende de la combinación del tiempo y temperatura de los tratamientos aplicados a la leche. Según Applebaum et. al., (1982) el hecho de encontrar valores de AFM1 mayor en el queso que en suero, podría ser atribuido a las características semipolares y de alta afinidad de la AFM1 por la caseína de la leche.

Se considera de mucha importancia consignar que la mayoría de los ensayos realizados, fueron sobre quesos elaborados por precipitación enzimática de las micelas caseínicas; en cambio no se han encontrado trabajos referidos a la precipitación ácida mediante altas temperaturas como se observan en la elaboración de la ricotta de leche entera o descremada o de suero de queso con agregado de leche entera, como ocurre habitualmente en la industria láctea Argentina. En tal sentido, resulta de utilidad recordar la gran diferencia composicional, estructural y nutricional entre el paracaseinatofosfo-cálcico producto de la precipitación enzimática (quimosina) y el precipitado ácido desmineralizado que constituye la ricotta. Estas diferencias podrían modificar la estabilidad y partición de AFM1 verificadas en la elaboración de los quesos.

### **COMPARACIÓN ENTRE LOS PROCESOS DE PRECIPITACIÓN ÁCIDA Y ENZIMÁTICA DE LA LECHE**

En la elaboración de queso por precipitación enzimática de la caseína, la AFM1 muestra una clara afinidad por la unión a la caseína nativa de la cuajada, reteniendo en la misma entre 1,7 a 5 veces más concentración que en la leche contaminada de origen (Manetta et al., 2009; Mohammadi et al., 2008; Devici, 2007); además, se encontró una correlación positiva entre la contaminación de la leche con AFM1 y la retenida en la cuajada. Estos mismos autores concluyen que ningún

tratamiento físico aislado puede remover la AFM1 de la leche, ni tampoco evitar la fuerte afinidad de ésta con la caseína nativa y las proteínas del suero, afirmando que solamente la combinación de la acción de la temperatura y el bajo pH (como las usadas en la elaboración de la ricotta) pueden desnaturalizar las proteínas al punto de perder la capacidad de unión con la AFM1.

Las diferencias observadas podrían deberse a las distintas características de los precipitados de las caseínas nativa de la leche, ya que en la elaboración del queso ricotta, el precipitado proteico a pH: 4,6 y alta temperatura (85 – 95 °C) es totalmente diferente a la coagulación enzimática a bajas temperaturas (35 – 37 °C) utilizada en la elaboración de los distintos tipos de quesos; en éste último caso, las micelas caseínicas mantienen las uniones de calcio y fosfato constituyendo el complejo paracaseinato fosfocálcico mientras que en la elaboración del queso ricotta se obtiene un precipitado proteico desmineralizado, razón por la cual el mayor grado de desnaturalización de las proteínas verificadas en la elaboración del queso ricotta modificaría la afinidad de unión de éstas con la molécula de AFM1.

#### **UNA POTENCIAL SOLUCIÓN PARA EL USO DE LECHE CONTAMINADA CON AFM1**

La utilización de leche con una cantidad mayor de 0,5 ppb de AFM1 se encuentra prohibida por el Código Alimentario Argentino. Leche, contaminada proveniente de un tambo puede ser diluida, hasta obtener valores aceptables, con leches provenientes de otros tambos de menor concentración de Aflatoxina. Éste tipo de práctica desleal y fraudulenta, se la puede considerar como un “fraude alimentario por dilución”, que tiene por objetivo ocultar la falta de calidad e inocuidad de esta leche mezclándolas con otras. Como alternativa tendiente a minimizar las consecuencias negativas de AFM1 que pudiera contener la leche cruda proveniente de los tambos, se realizó una investigación de manera conjunta entre el Laboratorio de Tecnología de Alimento (LabTA - FCA-UNC) y el Laboratorio de Lactología (FCA-UNC) con el objetivo de desarrollar un procedimiento para éste insumo alimenticio, que por medio de un proceso, genere un alimento inocuo. El proceso consistió en la elaboración de queso ricotta a partir de leche contaminada artificialmente con AFM1 con valores superiores a los permitidos por el Código Alimentario Argentino. Para el procedimiento, se partió de leche entera y descremada contaminadas intencionalmente aplicando diferentes tratamientos (temperaturas, fuerzas iónica, agente oxidativo) lográndose una ricotta con una disminución del 99,5% en el contenido de

AFM1, convirtiéndose en consecuencia en un alimento inocuo para los consumidores.

El proceso optimizado permitió que sea inscripto bajo la ley de propiedad intelectual obteniéndose una solicitud de patente admitida y en vía de resolución definitiva bajo el título “PROCEDIMIENTO PARA REDUCIR LA PRESENCIA DE AFLATOXINA M1 EN LECHE EN EL PROCESO DE ELABORACIÓN DE QUESO RICOTA” (Titulares: UNC – CONICET. Inventores: Rubén Horacio Olmedo, Carolina Florencia Cravero Ponso, Nelson Rubén Grosso y María Verónica Aimar –. Aprobado por Oficina de Propiedad Intelectual SECYT-UNC/CONICET. Expediente del Instituto Nacional de Propiedad Intelectual N° 20180102527).

#### **CONCLUSIÓN**

La presencia de AFM1 en leche y productos lácteos ha sido motivo de preocupación en los países desarrollados del mundo desde hace aproximadamente treinta años y hoy continúa el interés de muchas investigaciones a nivel global y local en minimizar el impacto negativo que dicha toxina posee sobre la salud pública; en tal sentido, cabe destacar las acciones realizadas en la FCA-UNC para lograr la inscripción de la patente generada.

Evidentemente, uno de los productos lácteos más consumidos por la población son los distintos tipos de quesos; por lo tanto, la presencia de AFM1, su estabilidad y posibilidad de desarrollar estrategias de su reducción en dicho producto sigue siendo un motivo relevante de investigación. Si bien el queso ricotta no resulta en nuestro país un derivado lácteo de consumo masivo, no es menos cierto que es un ingrediente importante en la industria elaboradora de pastas y en la actividad de catering brindado una posible solución a la utilización de leche contaminada en origen.

#### **BIBLIOGRAFÍA**

- Acosta, Y. M., Mieres, J. M., La Manna, A. A., INTA. 2016. Micotoxinas en alimentos para el ganado: alternativas para la mitigación de efectos adversos y criterios para la utilización más segura de alimentos contaminados. [http://inta.gob.ar/sites/default/files/inta\\_micotoxina\\_s\\_alimento\\_ganado\\_y\\_algunos\\_criterios\\_utilizacion\\_alimentos\\_contaminados.pdf](http://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_micotoxina_s_alimento_ganado_y_algunos_criterios_utilizacion_alimentos_contaminados.pdf)
- Applebaum, R. S. y Marth, E. H. 1982. Fate of Aflatoxin M1 in Cottage Cheese. *Journal of Food Protection*, 45: 903-904.
- Cavallarin, L., Antoniazzi, S., Giaccone, D., Tabacco, E., y Borreani, G. 2014. Transfer of Aflatoxin M1 from milk to ripened cheese in three Italian traditional production methods. *Food Control*, 38: 174–177.

- Choudhary, P. L., Sharma, R. S., y Borkartria, V. N. 1998. Effect of chilling and heating on Aflatoxin M1 content of contaminated Indian cow's milk. *Egyptian Journal of Dairy Science*, 26: 223-229.
- Deveci, O. 2007. Changes in the concentration of Aflatoxin M1 during manufacture and storage of White Pickled cheese. *Food Control*, 18: 1103-1107.
- Fung, F. and Clark, R. F. 2004. Health effects of mycotoxins: a toxicological overview. *J Toxicol Clin Toxicol*. 42(2):217-34.
- Manetta, A. C., Giammarco, M., Di Giuseppe, L., Fusaro, I., Gramenzi, A., Formigoni, A., Vignola, G., Lambertini, L. 2009. Distribution of Aflatoxin M1 during Grana Padano cheese production from naturally contaminated milk. *Food Chemistry*, 113: 595-599.
- Mohammadi, H., Alizadeh, M., Bari, M. R., Khosrowshahi, A., y Tajik, H. 2008. Minimization of Aflatoxin M1 content in Iranian white brine cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 2: 141-145.