

## **Detección de Aflatoxinas en refresco de cola**

Maria Moreno, Itzy Santoyo, Leonor Obeso, Frida Peimbert

### **Resumen:**

Se seleccionó una muestra de refresco de cola enlatado controlándose las variables de iluminación, gasificación, pH, coloración y temperatura. La selección se hizo el día 6 de mayo de 2005. El problema controlado fue sometido a la prueba de ELISA con columnas Aflatest dotadas de anticuerpos monoclonales activos para captar aflatoxinas B. Se encontró que en dicha bebida existe la presencia de aflatoxinas que fueron identificadas y cuantificadas con un fluorómetro digitalizado VICAM.

### **Introducción:**

En México se está empezando a legislar el contenido de sustancias tóxicas inevitables en los alimentos para normativizar su presencia. Este es el caso de las aflatoxinas que en el año 2002 se normativizaron para leche y cereales de consumo humano (3). Mundialmente no existe ningún estudio reportado para identificar la presencia de aflatoxinas en refrescos de cola. Debido a que en México hay un alto consumo de esta bebida (1), consideramos necesario identificar y cuantificar la presencia de aflatoxinas en este tipo de refrescos.

### **Antecedentes:**

La contaminación de alimentos para uso humano o animal por hongos generadores de aflatoxinas, puede ocurrir tanto en el campo como en el almacenaje y puede afectar casi cualquier producto que requiera de secado cuando éste no se realiza adecuadamente. Los principales productos que se han identificado contaminados son: cultivos de cacahuate, árbol de la nuez, maíz, trigo, leche y semillas oleaginosas como el algodón (5).

Las aflatoxinas tienen efectos tóxicos, mutágenos, hepatocarcinógenos y teratógenos (4). Se identifican por el color de la fluorescencia que emiten al someterse a la luz ultravioleta. Las que fluorescen azul (Blue) se denominan aflatoxinas B, las que fluorescen verde (Green) se denominan aflatoxinas G y las que se identifican en la leche (Milk) se llaman aflatoxinas M (8). Los refrescos de cola utilizan como fuente de cafeína extractos de la nuez de kola (11). El árbol de la nuez de kola crece en clima templado y húmedo por lo que es altamente susceptible a la invasión de hongos *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, generadores de aflatoxinas (5). Las aflatoxinas son altamente solubles en agua y alcohol (10), solventes utilizados para producir el extracto característico de este refresco y por lo mismo es posible que estén presentes en el producto final.

### Hipótesis:

El refresco de cola seleccionado tiene aflatoxinas.

### Objetivo:

Desarrollar un método que controle las variables de: luminosidad, gasificación, pH, coloración y temperatura que nos permita detectar la presencia y cuantificación de las aflatoxinas en refrescos de cola.

### Materiales:

- soporte universal
- pinza para bureta
- bureta de 25 ml.
- matraz erlenmeyer de 100ml. (v.g. fig. 1)
- matraz kitasato de 100ml. (v.g. fig. 1)
- vasos de precipitados de diferentes volúmenes
- agitador electromagnético
- mosca magnética
- jeringas capilares de 20 a 50 microlitros
- pipetas (v.g. fig 2)
- embudos de vidrio
- guantes
- cubrebocas
- cubrecabello
- lentes de seguridad
- cables de fibra óptica
- papel filtro Watman #1



Fig. 1 Matraz kitasato y erlenmeyer

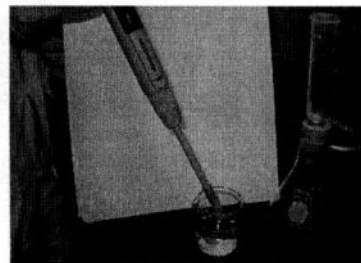


Fig. 2 Pipeta

- filtro de microfibras de vidrio
- cloruro de sodio RA
- solución estándar de NaOH 0.1 M
- soluciones estándar para calibración a pH 4, 7 y 10
- agua tridestilada
- metanol RA y HPLC
- solución de bromuros 0.03%.

### Equipo:

- potenciómetro (pHmetro). (v.g. fig3)
- fuente de luz ultravioleta de 360 nm
- espectrofluorómetro digitalizado VICAM
- campana de extracción
- balanza analítica
- balanza granataria
- bomba pum VICAM (v.g. fig 4)
- licuadora
- columnas para cromatografía por inmunoreactividad monoclonal (Aflatest)
- set de estándares de calibración de micotoxinas para el espectrofluorómetro digitalizado
- blanco para calibración cero de metanol 20% en agua y solución de bromuros
- agitador Vortex.

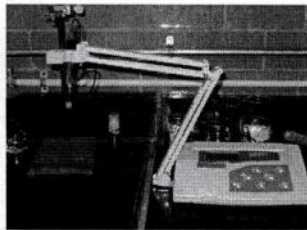


Fig. 3 Potenciómetro (pHmetro)

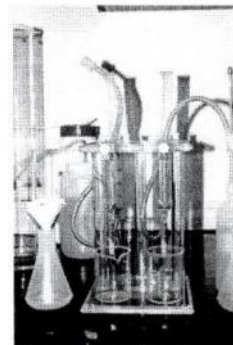


Fig. 4 Bomba pum

### Metodología:

- Selección de muestras: De la variedad de refrescos de cola en México, se eligió la marca de mayor consumo por la población. La elección se hizo al azar, de presentaciones en lata para evitar la posible afectación de las aflatoxinas por efecto de la luz (2), encontradas en expendios de Cuernavaca y Ciudad de México. Se encontraron latas con una sola fecha de caducidad, sin indicación de número de lote, por lo que se procedió a trabajar con ellas. La fecha encontrada fue del 27 de abril 2006.
- Desgasificación y Fijación de temperatura: Colocamos muestras de 100 ml en vasos de precipitados para someterlos a agitación

magnética para desgasificarlos y permitimos la estabilización a temperatura ambiente. Trabajamos a 24° C.

- C. Determinación de Ph: Medimos el pH de las muestras después de calibrar un potenciómetro con soluciones reguladoras de biftalato de potasio a pH 4; fosfatos mono y dibásico de potasio a pH 7 y bicarbonato y carbonato de sodio a pH 10. Encontramos un pH promedio de 2.5 para las muestras seleccionadas.
- D. Neutralización: Las muestras desgasificadas y a temperatura ambiente se llevaron a un pH 7 con una solución de hidróxido de sodio 0.1 M.
- E. Extracción de la muestra: Se colocó en el vaso de la licuadora una alícuota de 50ml de refresco de cola con 5gr de Cloruro de Sodio RA y 100ml de solución de metanol al 20% en agua y se agitó en la licuadora durante un minuto.
- F. Filtrado: En la campana de extracción se preparó un filtro con papel Watman #1 en un embudo y se procedió a filtrar la muestra extraída en donde se separó el color del refresco y se tomaron 10 ml del filtrado ajustándose a 50ml con agua destilada para filtrarse nuevamente ahora con filtro de microfibras de vidrio. Con esto la muestra quedó lista para pasarse por la columna de inmunoafinidad Aflatest. (v.g. fig 5)



Fig. 5 Filtrado

- G. Columna de Inmunoafinidad (técnica ELISA):
- H. Se tomaron 10ml del filtrado y se pasaron por la columna Aflatest (v.g. fig 6) con una velocidad de 2 gotas cada 15 segundos con la ayuda de la bomba pum para garantizar la reacción específica antígeno anticuerpo de los monoclonales con las aflatoxinas.

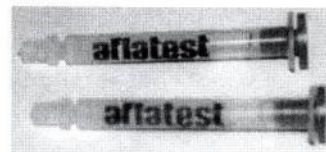


Fig. 6 Columnas Aflatest

- I. Lavado: La columna Aflatest se lavó con 10 ml de agua destilada por duplicado para eliminar residuos ajenos a la reacción inmunológica. Finalmente se pasó aire para garantizar la eliminación del agua destilada.
- J. Recuperación de las aflatoxinas: Se pasó a través de la columna un mililitro de metanol grado HPLC a una velocidad de una gota por segundo y en un tubo de ensayo se recogió la solución con las aflatoxinas.
- K. Revelado: Se agregó al tubo de ensayo un mililitro de revelador Aflatest (solución de bromuros al 0.03%) para resaltar la fluorescencia de las aflatoxinas y se sometió al agitador Vortex durante un minuto.
- L. Medición: Se colocó el tubo de ensayo en el fluorómetro calibrado y se leyó la concentración de aflatoxinas en sesenta segundos.

## Resultados:

Con el método desarrollado obtuvimos muestras de un refresco de cola donde las variables de temperatura, iluminación, acidez (pH), gasificación y coloración fueron controladas. Obtuvimos productos con actividad en el espectro ultravioleta que nos mostró que las aflatoxinas si estan presentes en el refresco de cola analizado con una concentración de 1.0 ppb ó 1000 ppt. (v.g. fig 7)

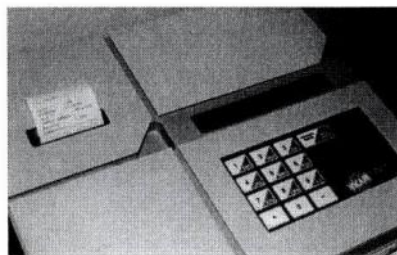


Fig. 7 Espectrofluorometro VICAM

## Discusión:

El resultado de nuestro trabajo muestra que los productos elaborados con materia prima susceptible a contaminarse con hongos pueden tener en su presentación final aflatoxinas. Siendo éstas altamente tóxicas, en cantidades infinitesimales, tanto para el ser humano como para los animales debe tenerse un control dentro de las normas que se establezcan como razón de salud pública y animal.

Debido a que este trabajo no tiene antecedentes, lo dimensionaremos comparando nuestro resultado con estudios previos hechos en cerveza y con las normas establecidas para la leche. Existen en la literatura tres estudios en la cerveza (Estados Unidos, Japón y Sud África) (6,7,9) que analizaron, entre otras, cervezas mexicanas encontrando una marca contaminada con 49 ppt y otras cuatro con menos de 10 ppt. Comparando con los 1000 ppt que nosotras encontramos en el refresco de cola vemos que éste se encuentra 20 veces por encima del valor de la cerveza más contaminada y 100 veces más alto que el de la menos contaminada. Comparando con la norma para la leche tenemos que en Estados Unidos se aceptan 0.5 ppb, en la Unión Europea 0.05 ppb y en México se estableció una norma de 0.25 ppb. (3) Aquí vemos que el refresco se encuentra también con una concentración de aflatoxinas 4 veces mayor que el límite establecido en México, el doble del límite mayor de tolerancia de la norma estadounidense y 20 veces por encima de la norma europea que es más exigente.

Dado que la distribución de aflatoxinas en las muestras problema es irregular ya que depende de diferentes factores vinculados a la humedad, temperatura, ciclos de sequia y ataque de insectos así como factores genéticos vinculados a la materia prima, es necesario hacer un muestreo minucioso por lo menos durante un ciclo anual para determinar una estadística del contenido de aflatoxinas en el refresco de cola

seleccionado completándolo con un muestreo de otras marcas de bebidas similares.

### **Conclusiones:**

El muestreo para identificar aflatoxinas es particularmente difícil dado que la distribución de esta toxina en los diferentes productos depende de muchas variables vinculadas a la genética de la materia prima, clima, manipulación y almacenamiento por el hombre así como la presencia de conservadores y otras sustancias adicionales para desarrollar un producto final.

Por motivo de recursos y tiempo nuestro estudio es un análisis de caso, sin embargo, sus resultados abren la posibilidad de continuar con esta línea de investigación para obtener resultados concluyentes apoyados en una estadística válida para todo el universo de estudio con un muestreo significativo.

Creemos que la validación de nuestro trabajo con estudios futuros podría contribuir para establecer una norma para este tipo de bebidas.

### **Agradecimientos:**

Agradecemos profundamente a nuestro asesor Dr. Ricardo Moreno, al Dr. Francisco Rojo jefe del laboratorio de Química Analítica de la UNAM y al Dr. Ernesto Moreno jefe de la Unidad de Investigación en Granos y Semillas (UNIGRAS) de la UNAM-Cuautitlán por darnos las facilidades para el desarrollo experimental de este proyecto. Finalmente, gracias al Dr. Enrique Galindo, por su apoyo y orientación.

### **Bibliografía:**

(11) Autor desconocido. (2005). *Coca-Cola perspectives*. [www.coca-cola.com](http://www.coca-cola.com) (27 feb 2005)

(1) Castro, G. (2005). *La Coca Cola en México*. CIEPAC <http://www.ciepac.org/bulletins/BOLETIN%202005/bolec445.htm> (27 feb. 2005)

(2) Cossette, B., Smoragiewicz, W., Boutard, A., et Bouchard, G. (1992). *La Detection des Mycotxines Trichothecenes*. *Travail et Sante* 8(1): 2-6. Citado en Martí, M., Alonso, R., y Constans, A. NTP 351: Micotoxinas (aflatoxinas y tricotecenos) en ambientes laborales. [www.mtas.es/insht/ntp/ntp/\\_351.htm](http://www.mtas.es/insht/ntp/ntp/_351.htm) (7 feb. 2005)

(3) Diario Oficial de la Federación (2002). *Normas mexicanas para control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal*. 1ª. Sección. 15 de octubre.

- Diario Oficial de la Federación (2002). Secretaria de Salud. *Normas mexicanas para control de aflatoxinas en leche, fórmulas lácteas y productos lácteos combinados*. 2ª sección. 23 de octubre.
- (4)** Edlefsen, M. & Brewer M. S. (2000). *Aflatoxin*. The National Food Safety Database. [www.foodsafety.ufl.edu/consumer/i1/i1099.htm](http://www.foodsafety.ufl.edu/consumer/i1/i1099.htm) (7 feb. 2005)
- (5)** Klaassen, C.D. y Watkins III, J.B. (2001). *Manual de toxicología*, 5ª. Edición. McGraw Hill. México. p. 888
- (6)** Nakajima, M., Tsubouchi, H., Miyabe, M. (Jul-Aug 1999) *A survey of ochratoxin A and aflatoxins in domestic and imported beers in Japan by immunoaffinity and liquid chromatography*. Journal of AOAC International, 82 (4): 897-902
- (7)** Odhav, B., Naicker, V. (Jan 2002). *Mycotoxins in South Africa traditionally brewed beers*. Food additives and contaminants, 19 (1): 55-61
- (8)** Sánchez, E. (2003). *Optimización de técnicas de análisis de aflatoxinas*. Tesis en proceso para obtener el grado de M. en C. UNAM
- (9)** Scott, PM, Lawrence, GA. (Nov-Dec1997). *Determination of aflatoxin in beer*. Journal of AOAC International, 80 (6): 1229-1234
- (10)** Windholz, M. (Editor) *The Merck Index*. (1983) 10th. Edition. USA. p. 27-28