

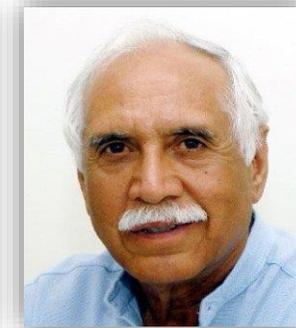
“Ocurrencia de micotoxinas en alimentos comerciales y leche para bebé en el Área Metropolitana, Paraguay”

4ta Presentación de avances

**PINV – 15 – 76 – Ciencia, Tecnología y Sociedad
Adjudicado por Resolución 693/2016**

Equipo Científico Nacional

Andrea Alejandra Arrua
Pablo David Arrua
Man Mohan Kohli
Juliana Moura-Mendes
Cinthia Cazal
Inocencia Peralta
Francisco Ferreira
Danilo Fernández Rios
Mónica Pereira
Pastor Pérez
Gabriela Ulke Mayans



Equipo Científico Internacional

Marta Quezada

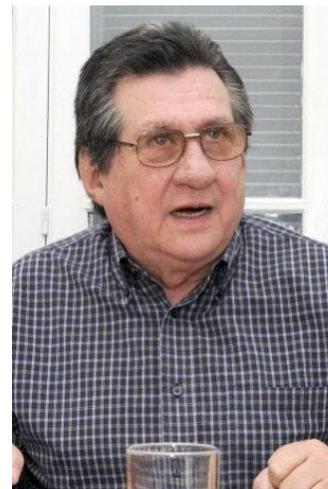
Josefina Moreno Lara



Equipo de Administrativo

Luis Enrique Cubilla –
Director de Proyecto

Maura Genes – Responsable
Administrativo



INTRODUCCIÓN



La inocuidad alimentaria es un tema relevante en la actualidad, puesto que muchas de las enfermedades que se presentan en los seres humanos, sobre todo aquellos que forman parte de las comunidades más vulnerables se relacionan con el consumo de alimentos contaminados.

INTRODUCCIÓN



Los alimentos durante su producción, procesamiento y almacenamiento se ven expuestos al ataque de microorganismos entre ellos los hongos productores de micotoxinas.

- TETÃ REKUÁI
- GOBIERNO NACIONAL



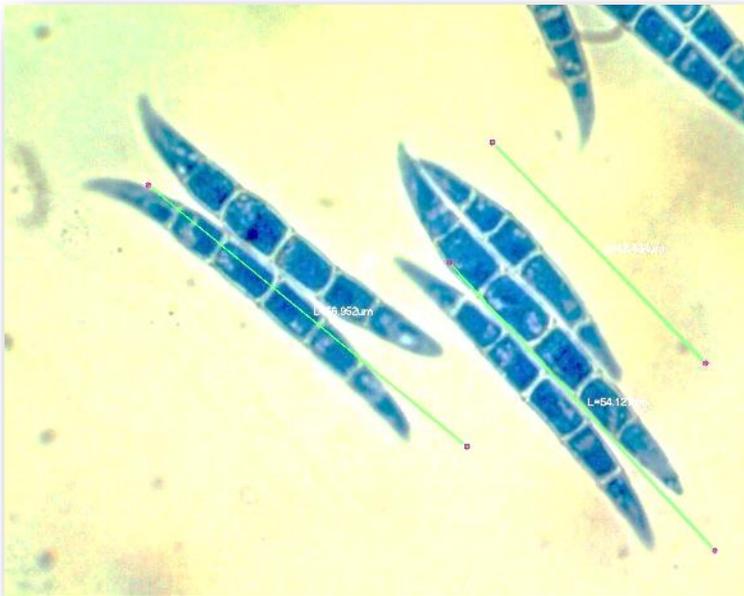


Las micotoxinas, son metabolitos secundarios tóxicos para los seres humanos y animales que producen síndromes llamados micotoxicosis y que en casos extremos pueden llevar a la muerte.



PROGRAMA PARAGUAYO PARA EL DESARROLLO DE LA CIENCIA Y TECNOLOGÍA





Aspergillus – aflatoxinas, aflatoxina M1 ocratoxinas, ácido ciclopiazónico, etc.

Penicillium – ocratoxinas, patulina, etc.

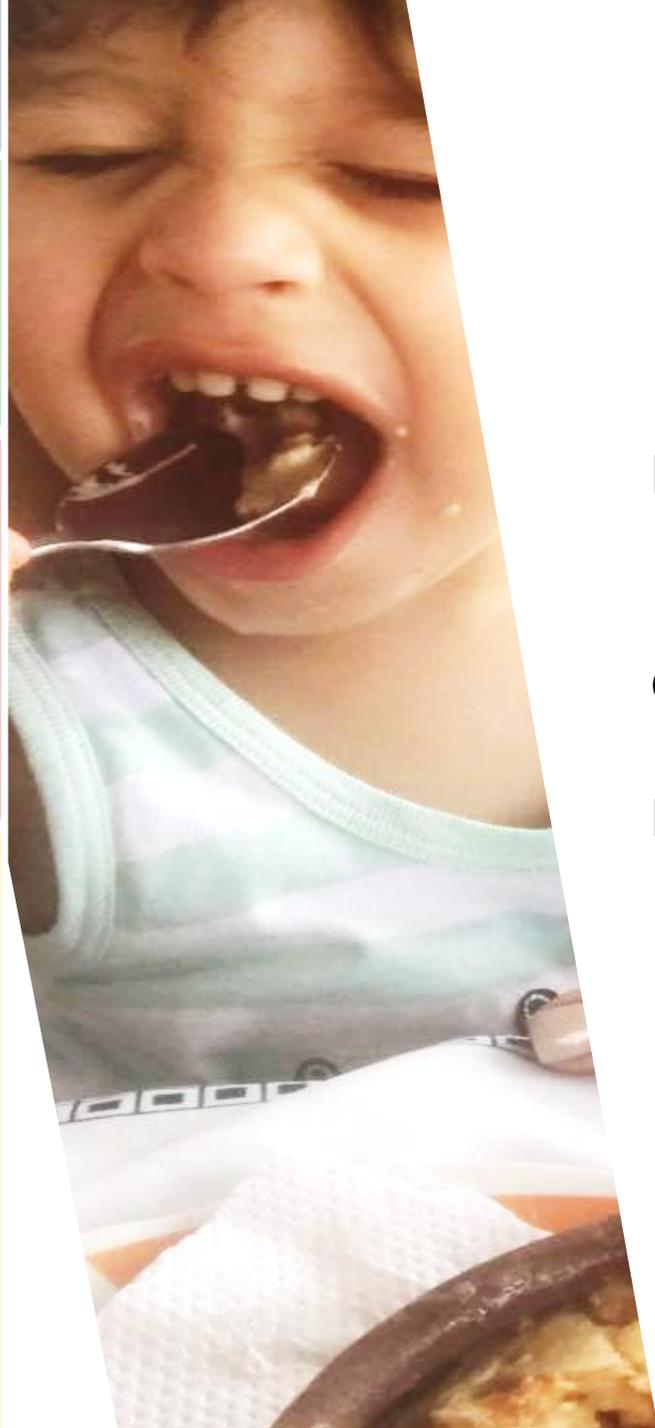
Fusarium – tricotecenos, fumonisinas, etc.



Las micotoxinas poseen efectos diversos en la salud humana.

Pueden afectar al sistema inmune, respiratorio, etc. o bien a órganos específicos como el hígado, riñón, pulmones.

Producen intoxicaciones agudas o crónicas.





Las aflatoxinas, AF, son las micotoxinas de mayor importancia; son derivados de difurano cumarinas, contaminan diversos sustratos entre los que se incluyen oleaginosas, cereales y diversos tipos de granos.

AFB está clasificada por el IARC (1993) en el grupo 1, cancerígena en humanos.

La Aflatoxina M, AFM es un derivado hidroxilado de la AFB, IARC 1993, la clasifica en el grupo 2B, probable carcinógeno en humanos.



Las ocratoxinas, han sido encontradas en diversos sustratos que incluyen cereales, frutas y derivados.

IARC 1993 considera a las OT dentro del grupo 2B, posible cancerígeno en humanos.

La exposición dietética a OTA representa un grave problema de salud y ha sido asociada con varias enfermedades humanas y animales, incluyendo nefropatías endémicas humanas y tumores en el tracto urinario entre otros



Los tricotecenos son un grupo de sesquiterpenoides diverso reportado en cereales principalmente.

Incluyen a los del tipo A, toxina T-2, y al Deoxinivalenol, DON, y el tipo B; son hepatotóxicas y tienen efectos sobre los sistemas inmune y gastrointestinal; además son responsables de problemas dermatológicos.

IARC, 1993, las clasifica dentro del grupo 3, no cancerígena en humanos



Las Fumonisin, FUM son nefrotóxicas, y hepatotóxicas.

Contaminan principalmente cereales y el IARC las clasifica dentro del grupo 2B, posiblemente carcinogénico en humanos.





La ZEA, zearelanona, IARC, 1993, la clasifica dentro del grupo 3, no cancerígena en humanos.

Se ha detectado principalmente en cereales y derivados; afecta al sistema reproductivo y se excreta por la leche.

IARC la clasifica dentro del grupo 2B, posiblemente carcinogénico en humanos.



OBJETIVO

Determinar la presencia de micotoxinas en alimentos y leche para bebe comercializados en el Área Metropolitana, Paraguay.



APORTE PRINCIPAL

Proyección del nivel de riesgo de exposición a micotoxinas en la población de bebés consumidores de estos alimentos en el Área Metropolitana.



METODOLOGIA GENERAL

Colecta de muestras de alimentos y leche para bebé de centros de comercialización del Área Metropolitana

Determinación de micotoxinas presentes por medio del método ELISA

Cálculo del riesgo de exposición de la población de bebés a diferentes toxinas en base al tipo de alimento y contenido de toxina

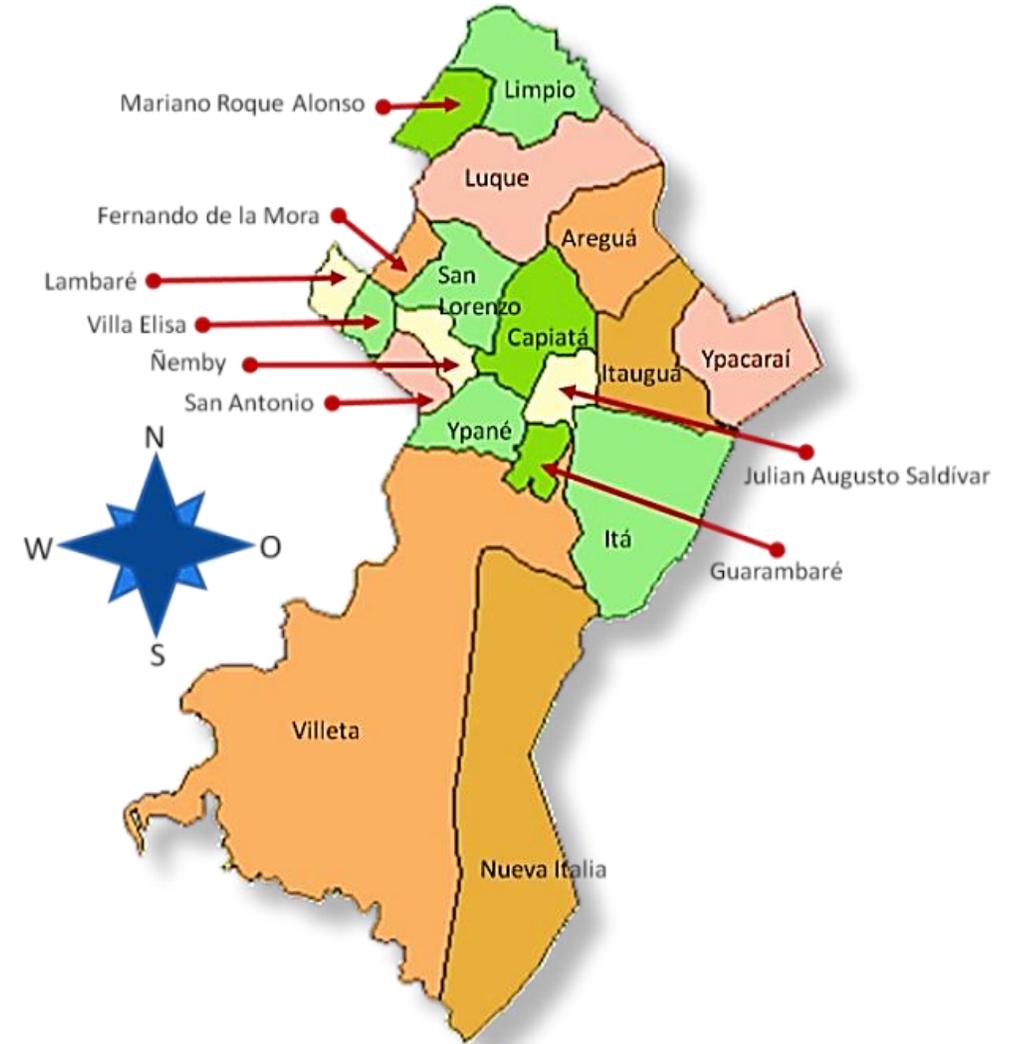
COLECTA DE MUESTRAS

Supermercados y
Farmacias

Asunción
Fernando de la Mora
San Lorenzo
Luque
Mariano Roque Alonso

Pures y colados
Cereales
Fórmulas para bebe
Leches en polvo
Leches Fluidas

COLECTA DE MUESTRAS



Producto	Número de muestras
Pures y colados	69
Cereales	62
Fórmulas para bebe	108
Leches en Polvo	24
Leches Fluidas	116



Se adquirieron productos que se comercializaban en la zona del Área Metropolitana, se utilizaron como criterios de inclusión: rango de consumo por edad de: pures y colados para bebe, cereales para bebe, fórmula en polvo y fluida para bebe, leche fluida nacional y como criterio de exclusión los signos de alteración del paquete, y que no se encuentren vencidos.



Se tomaron datos de marca de producto, componentes principales declarados por el fabricante en la etiqueta, edad a partir de la cual se recomienda su consumo, país del origen del cual fue importado, tipo de producto, fecha de vencimiento, tipo de empaquetado y gramaje del producto, número de lote, comercio y ciudad de la que fueron adquiridos.



PROGRAMA PARAGUAYO PARA EL DESARROLLO DE LA CIENCIA Y TECNOLOGÍA



Pures y Colados

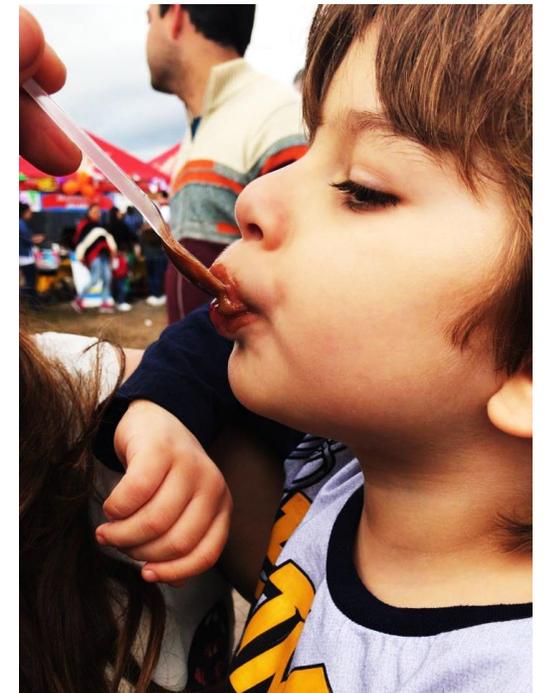
- AF
- OT
- FUM
- ZEA
- T-2
- DON

Cereales

- AF
- OT
- FUM
- ZEA
- T-2
- DON

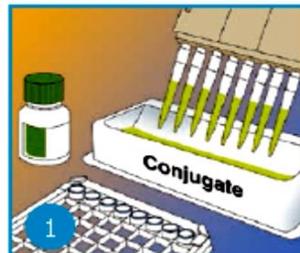
Fórmulas y Leches

- AFM1

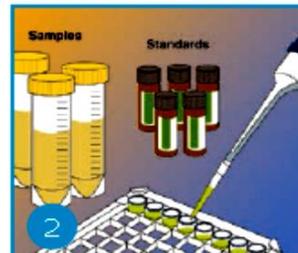




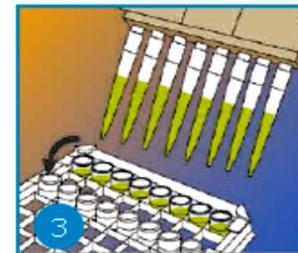
Test de ELISA-AGRAQUANT – ROMER LABS



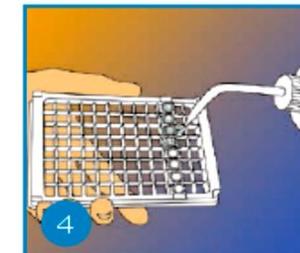
1 Add 200 μ L conjugate into each color-coded dilution well.



2 Add 100 μ L standards or samples to the conjugate.



3 Mix well. Transfer 100 μ L content to antibody-coated wells. Incubate for 5 - 60 minutes.



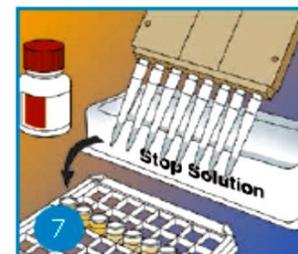
4 Discard contents from the wells and wash wells with deionized water or buffer solution (5x).



5 Tap dry the wells on absorbent paper towel.



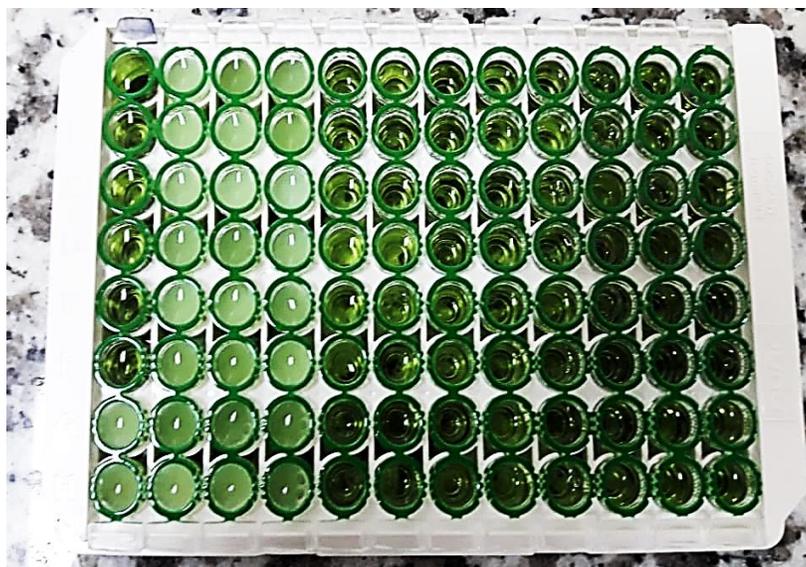
6 Add 100 μ L substrate into each well. Incubate for 5 - 20 minutes.



7 Add 100 μ L stop solution into each well.



8 Analyze results using an ELISA reader with 450 nm filter.



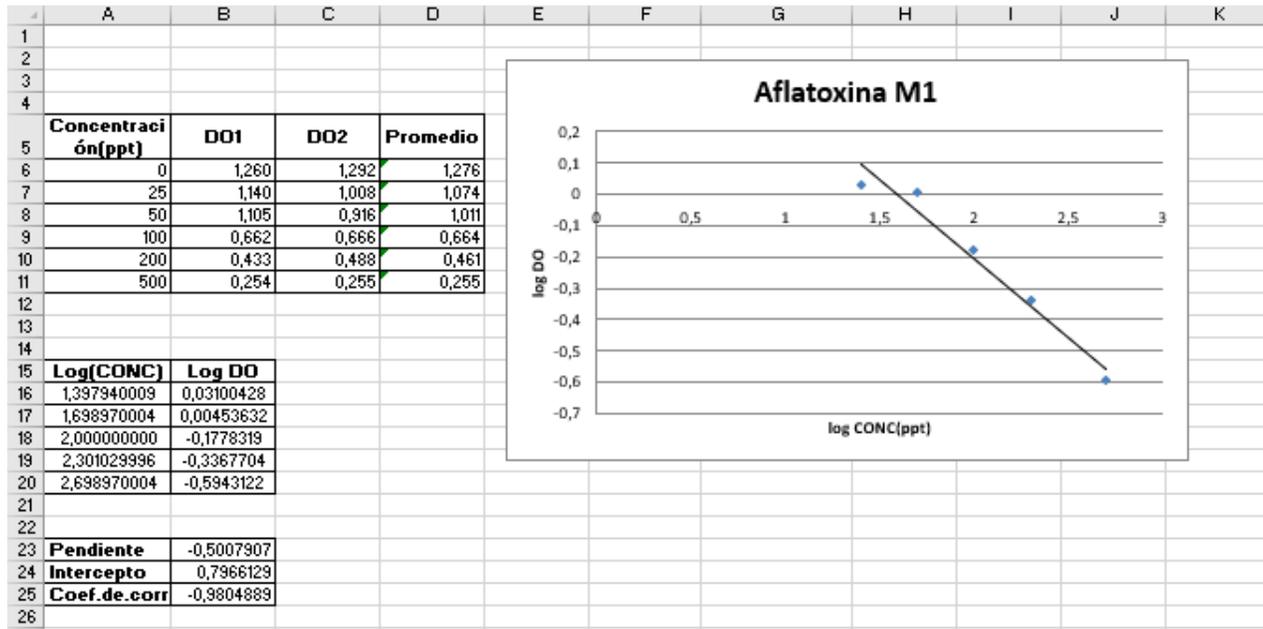
**Selección de
muestras
positivas**

**Análisis
estadístico**

**Cálculo de
riesgo**



SELECCIÓN DE MUESTRAS POSITIVAS



**AgraQuant® Aflatoxin M₁
Sensitive 25/500**

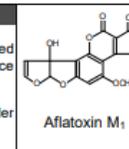


Order #: COKAQ7100

Intended Use

The AgraQuant® Aflatoxin M₁ Sensitive is a direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) that determines a quantitative level for the presence of aflatoxin M₁ and is intended for use in milk and milk products.

The AgraQuant® Aflatoxin M₁ Sensitive has been validated for milk, milk powder and cheese.



Aflatoxin M₁

Aflatoxins are toxic and carcinogenic. They are metabolites of the fungi *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. There are four principle types of aflatoxin: B₁, B₂, G₁ and G₂, which are named for their respective innate fluorescent properties. Aflatoxin B₁ is the most frequently encountered of the group and the most toxic.

Aflatoxin M₁ is a hydroxylated metabolite of aflatoxin B₁, which was first found present in milk and can be detected in urine as well. It is the most potent hepatocarcinogen known in the rat and rainbow trout. Because the young of any species is more susceptible to aflatoxin than adults, aflatoxin M₁ becomes of concern through the young children consuming milk. Processing of milk and dairy products do not lead to a significant degradation of aflatoxin M₁, and therefore can occur in such products as milk powder and cheese.

The commission of European communities set the maximum admissible level of aflatoxin M₁ in milk as 50pg/ml (ppt) in 1998. The US Food and Drug Administration action level of aflatoxin M₁ is 500pg/ml (ppt) for milk.

Assay Principles

The AgraQuant® Aflatoxin M₁ Sensitive is a direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Anti-aflatoxin M₁ antibody is coated on the surface of a microtiter wells. Aflatoxin M₁ standards or samples are mixed with enzyme-conjugated aflatoxin M₁ in the dilution wells, and then transferred to the antibody-coated microwells. Aflatoxin M₁ in standards or samples are allowed to compete with enzyme-conjugated aflatoxin for the antibody binding sites. After a washing step, an enzyme substrate is added and blue color develops. The intensity of the color is inversely proportional to the concentration of aflatoxin M₁ in the sample or standard. A stop solution is then added which changes the color from blue to yellow. The microwells are measured optically using a microwell reader with an absorbance filter of 450nm and a differential filter of 630nm. The optical densities of the samples are compared to the OD's of the standards and an interpretative result is determined.

ANALISIS ESTADISTICO

ANAVA

InfoStat

Versión: 2013
Actualización: 3/6/2013

InfoStat/Libre

1613-2013
400 AÑOS
UNC | Universidad Nacional de Córdoba

www.infostat.com.ar

ANÁLISIS DE RIESGO

$$PDI_m = (\mu \times C \times C_c) / B_w$$

PDI_m: Probable ingesta diaria de micotoxina (microgramos por kilogramo por peso corporal por día)

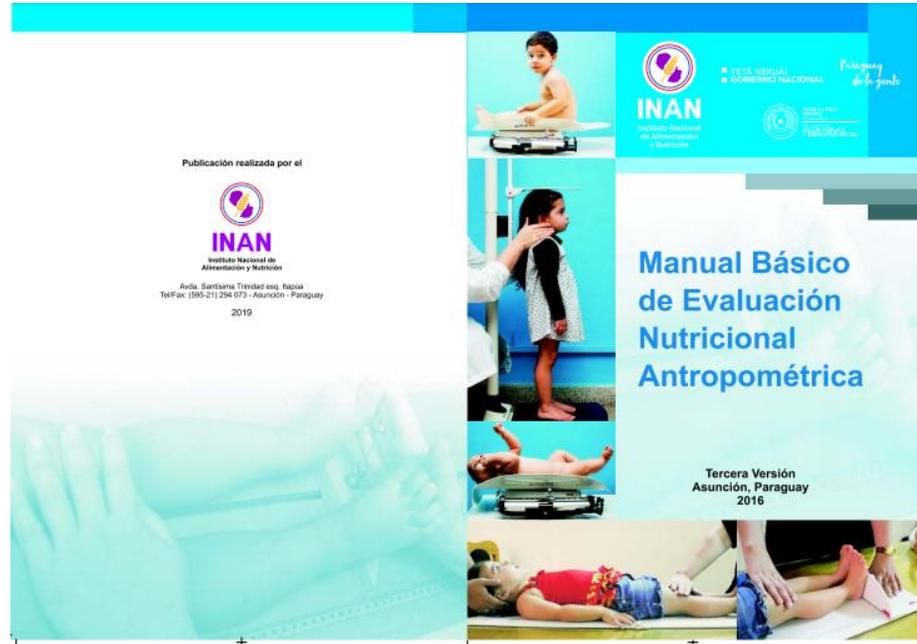
$\mu \times C$: media de la concentración de micotoxina

C_c : media de consumo del alimento

B_w : peso

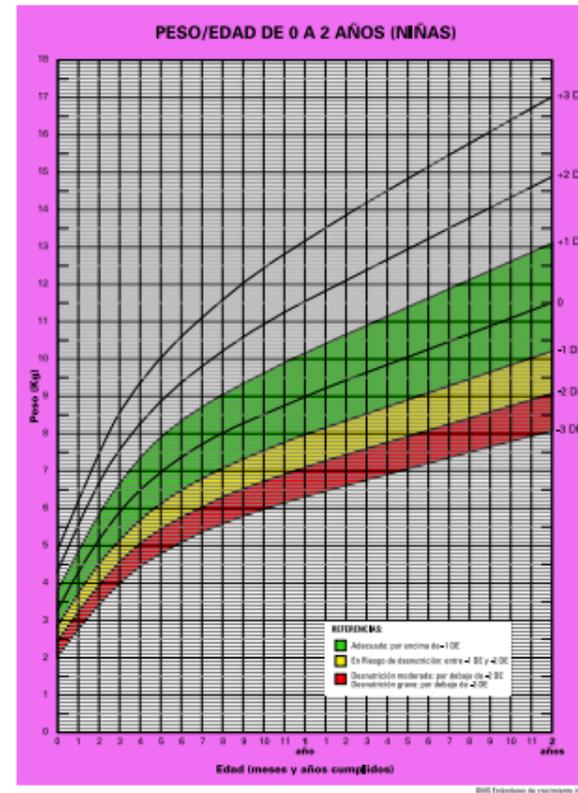


VALORES DE CONSUMO DE ALIMENTOS RECOMENDADOS POR LOS FABRICANTES



48

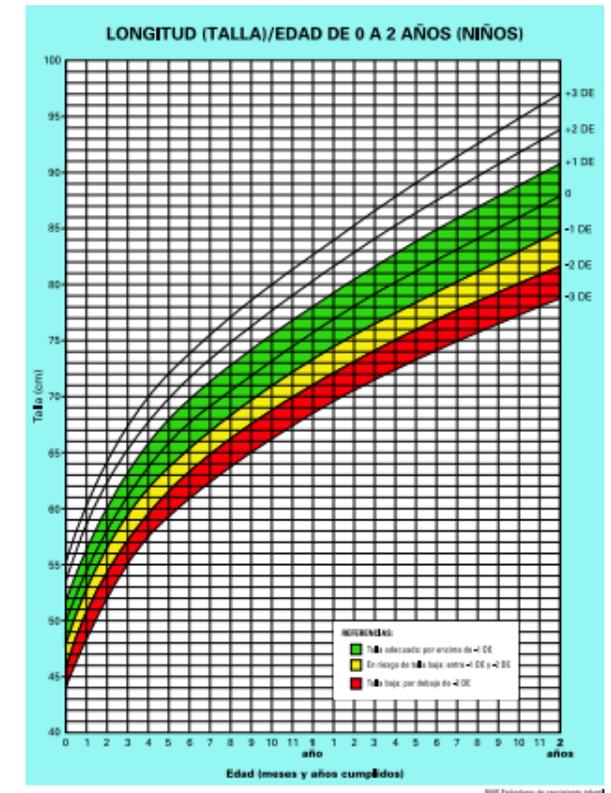
Anexo 4



BIOS Estándares de crecimiento infantil

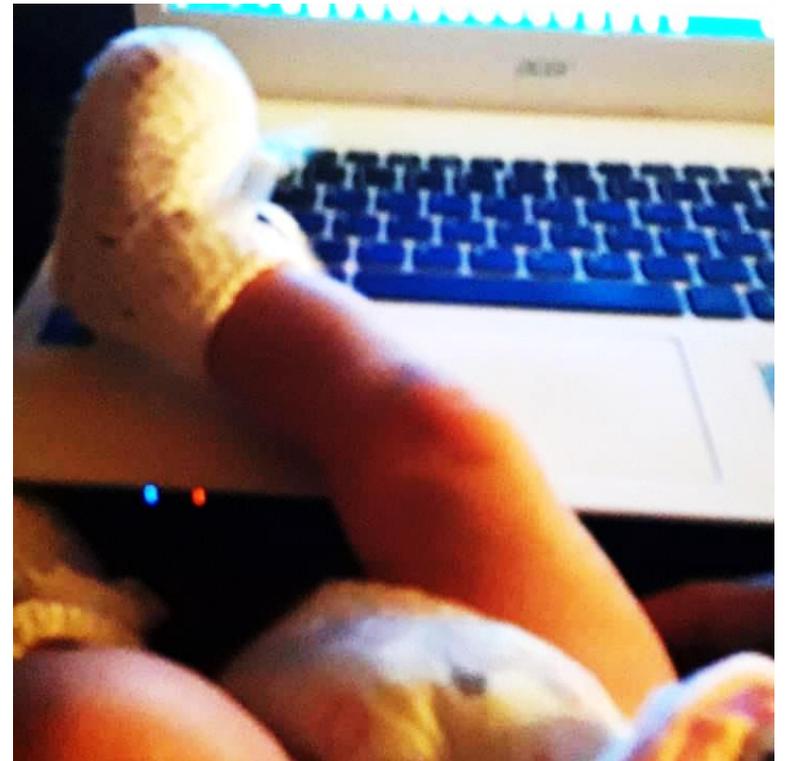
49

Anexo 5

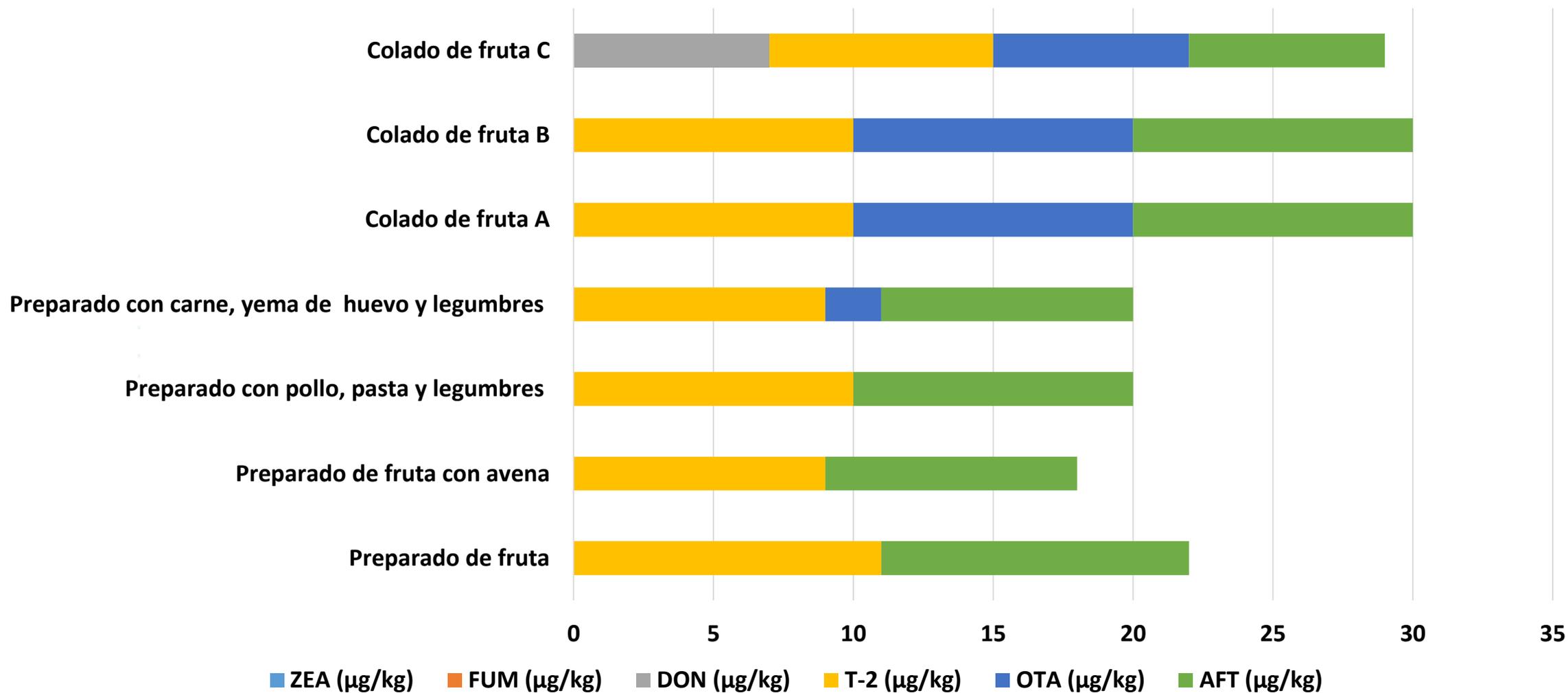


BIOS Estándares de crecimiento infantil

RESULTADOS



PRESENCIA DE MICOTOXINAS EN MUESTRAS DE PURES Y COLADOS COMERCIALES PARA LACTANTES



MEDIA DE MICOTOXINAS PRESENTES EN ALIMENTOS COMERCIALES PARA LACTANTES

Producto	Contenido medio de micotoxina (µg/kg)			
	DON	T-2	OT	AF
Preparado de fruta	DLD ^a	13.01±0.30 ^a	DLD ^a	1.17±0.04 ^a
Preparado de fruta con avena	DLD ^a	13.52±0.17 ^b	DLD ^a	1.26±0.02 ^{ab}
Preparado con pollo, pasta y legumbres	DLD ^a	13.86±0.07 ^{bc}	DLD ^a	1.32±0.02 ^{ab}
Preparado con carne, yema de huevo y legumbres	DLD ^a	14.17±0.12 ^{cd}	2.05±0.02 ^a	1.39±0.01 ^{abc}
Colado de fruta A	DLD ^a	14.51±0.11 ^d	2.20±0.08 ^b	1.51±0.05 ^{bc}
Colado de fruta B	DLD ^a	14.97±0.18 ^e	2.46±0.09 ^b	1.64±0.07 ^c
Colado de fruta C	183.13±6.85 ^b	12.76±0.90 ^f	2.57±0.37 ^c	1.67±0.06 ^d

DLD: Valores por debajo del límite de detección.

CONTENIDOS DE MICOTOXINAS EN MEDIA EN CEREALES PARA BEBE

Micotoxina	% de Muestras contaminadas	Màx.	Mìn.	Med.
$\mu\text{g}/\text{Kg}$				
AF	1.44 (nc=1)	1.33		1.33±0
OT	0	DLD	DLD	DLD
FUM	53.62 (nc=37)	467.69	257.18	279.61±59.50
DON	56.45 (nc=36)	447.80	250.66	306.07±33.65
T-2	100 (nc=62)	18.19	10.46	14.68±1.62
ZEA	0	DLD	DLD	DLD

DLD: Valores por debajo del límite de detección.

Componentes	AF	FUM	DON	T-2
Harina de arroz, sales minerales, emulsionante, maltodextrina de maíz, vitaminas, aromatizante, probióticos	1.33	304.57±17.52 ^a nc= 1	279.45±20.30 ^a nc= 3	14.66±0.44 ^{ab} nc= 11
Harina de trigo, azúcar, miel, sales minerales maltodextrina de maíz, vitaminas, aromatizante, probióticos	DLD	316.69±25.35 ^a nc= 5	373.69±20.30 ^b nc=3	15.41±0.46 ^{ab} nc= 10
Harina de trigo, azúcar, plátano, maltodextrina de maíz, manzana, sales minerales, vitaminas, aromatizante, probióticos	DLD	366.39±20.04 ^a nc= 8	336.12±13.29 ^{ab} nc=7	14.66±0.46 ^{ab} nc= 10
Harina de trigo, leche en polvo, sales minerales, emulsionante, maltodextrina de maíz, vitaminas, aromatizante, probióticos	DLD	353.84±21.42 ^a nc= 7	309.89±12.29 ^{ab} nc=7	16.10±0.46 ^b nc= 10
Harina de avena Integral, azúcar, almidón de maíz, ciruela en polvo, prebióticos sales minerales maltodextrina de maíz, emulsionante Aromatizante, probióticos	DLD	374.90±23.14 ^a nc= 6	290.80±11.72 ^a nc=9	14.17±0.46 ^a nc= 0.46
Harina de trigo, cebada, avena, arroz, maíz, harina hidrolizada de trigo, sales minerales, maltodextrina de maíz, vitaminas, aromatizante probióticos	DLD	295.94±56.68 ^a nc=1	281.36±13.29 ^a nc=7	13.42±0.44 ^a nc= 11

CONTENIDOS DE AFM1 EN FÓRMULAS PARA BEBE

Producto	Tipo		Min.	Med.	Max.
Fluida*	Fórmula	0-6 meses nc=9	22.80	32.76±2.27^a	38.98
	Fórmula	6-12 meses nc=9	25.62	30.24±2.64^a	45.59
Polvo**	Fórmula	0-6 meses nc=4	609.78	1601.28±348.43^b	2161.
		6-12 meses nc=1	509.26	DLD	DLD
					10

DLD: Valores por debajo del límite de detección.



PDI FÓRMULA PARA BEBE

Producto			PDI $\mu\text{g}/\text{kg Wd}$						
			AFM1 $\mu\text{g}/\text{Kg}$	Al nacer		6 m		12 m	
				F	M	F	M	F	M
Fórmula	Líquida	0 a 6 m	0,032	9E-04	9E-04	7E-04	6E-04		
		6 a 12 m	0,025					4E-04	4E-04
Polvo		0 a 6 m	1,6	0,043	0,041	0,034	0,032		
		6 a 12 m	0,5					0,008	0,007



CONCLUSION

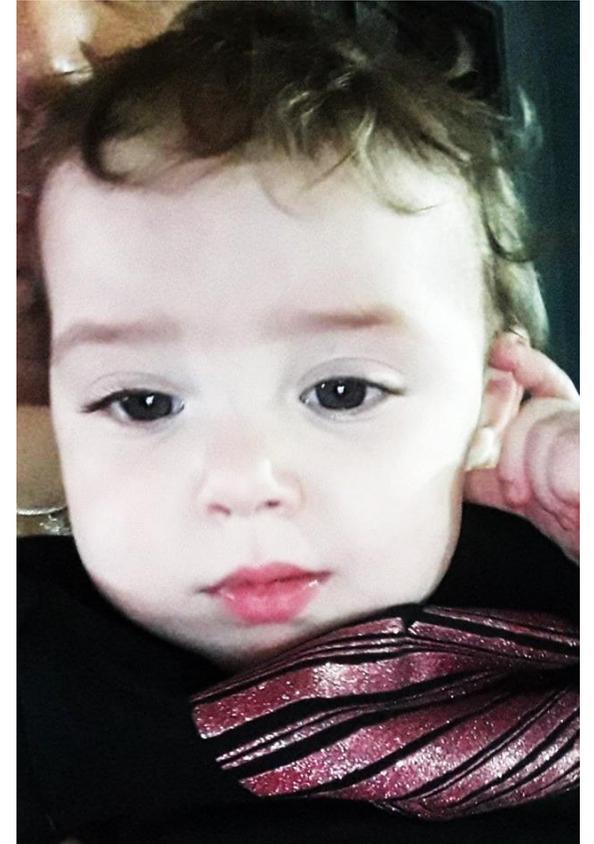
Se reporta la presencia de niveles variables de AF, OT, DON y T-2, siendo las AF y T-2 las toxinas prevalentes en preparados y colados para bebe.

Los resultados obtenidos en este estudio han determinado la presencia de AF, OTA, FUM, DON en alimentos para bebe tipo cereal en niveles variables y dependientes del tipo de alimento analizado. La micotoxina prevalente fue T-2.



CONCLUSION

AFM1 fue detectada en 5 fórmulas para bebe de 2 marcas diferentes en niveles que superaron lo establecido por las normativas internacionales.



CONCLUSION

El riesgo es mayor para las niñas que para los niños; para los bebés de 6 meses de edad al compararlos con los de 12 meses.



CONCLUSION

La identificación de este peligro potencial sentará las bases para el desarrollo de futuros programas de monitoreo de riesgo y elaboración de legislaciones que permitan la protección de los consumidores, sobre todo en poblaciones vulnerables como los niños, sin embargo, el riesgo al que actualmente se encuentran expuestos es bajo.



CONCLUSION

Los resultados obtenidos en este estudio respaldan la necesidad de implementar sistema de vigilancia para minimizar la ingesta de micotoxinas.



AGRADECIMIENTOS





PR  CIENCIA

PROGRAMA PARAGUAYO PARA EL DESARROLLO DE LA CIENCIA Y TECNOLOGÍA

 **CONSEJO NACIONAL
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA**
CONACYT

■ **TETÃ REKUÁI**
■ **GOBIERNO NACIONAL**

