

Niveles traza de OTC inducen carbonilación y reducen digestibilidad de proteínas de leche bovina

Marrugo Padilla A.¹, Méndez Cuadro D.¹, Rodríguez Cavallo E.¹.

¹Grupo de Investigación en Química Analítica y Biomedicina – Universidad de Cartagena, Sede Zaragocilla, Antiguo Edificio CREAD – Laboratorio 103. Cartagena de Indias - Colombia

Correo: erodriguezc1@unicartagena.edu.co

Palabras Clave: Oxitetraciclina, Límite Máximo de Residuos, Dot-blot, gástrico, duodenal

Introducción

La presencia de residuos de antibióticos y pesticidas en alimentos de origen animal, representa en la actualidad una de las problemáticas ampliamente reportadas por la comunidad científica a nivel mundial, que afecta tanto a países en vía de desarrollo como Colombia, hasta potencias económicas como la Unión Europea y los Estados Unidos [1]. Esta problemática es considerada como de injerencia en salud pública, al alterar la inocuidad alimentaria y repercutir negativamente la salud del consumidor frecuente.

Investigaciones previas, realizadas por el Grupo de Investigación, demostraron que algunos medicamentos de uso veterinario promueven la oxidación irreversible de proteínas constitutivas de alimentos como el músculo bovino, evidenciado con el aumento del grado de carbonilación proteica [2,3].

La carbonilación de proteínas induce la formación de agregados, asociándose a pérdida de la solubilidad, cambio en la composición de aminoácidos y aumento de la susceptibilidad proteolítica. Considerando la importancia nutricional de los alimenticios de origen animal, cifrados en su alto contenido proteico [4]; y el elevado empleo de antibióticos en medicina veterinaria para la cría intensiva de animales, resulta de interés investigar la capacidad de la oxitetraciclina para promover la oxidación de proteínas de la leche bovina y su efecto sobre la digestibilidad de las mismas.

Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de residuos de oxitetraciclina sobre la carbonilación de las fracciones proteicas de leche bovina y su efecto sobre digestibilidad *in vitro* de las fracciones mediante ensayos bioquímicos.

Metodología

Asépticamente se seleccionó una muestra de leche cruda, proveniente de una vaca de ordeño libre de la administración de oxitetraciclina. La muestra obtenida se separó en tubos falcon, y se identificó como control de los experimentos (blancos). A partir de muestras blanco se preparó muestras enriquecidas individualmente con oxitetraciclina a 100 y 150 µg.L⁻¹. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Posterior a la contaminación, las muestras se incubaron a temperatura ambiente por espacio de una hora, se extrajeron las fracciones de proteínas del lactosuero y caseínas, y se cuantificó el contenido proteico por fracción, empleando el método de Bradford. Para verificar su integridad y el perfil electroforético obtenido por fracción, se realizaron electroforesis en SDS PAGE al 15%. El daño oxidativo proteico causado por la presencia de oxitetraciclina se midió en términos de índice de carbonilos, empleando en su determinación el método alcalino del 2,4 dinitrofenilhidrazina (DNPH) [5].

Paralelamente, fracciones de proteína aisladas a partir de muestras contaminadas, se sometieron a un ensayo de digestibilidad gastrointestinal simulada *in-vitro*, de acuerdo con las metodologías descritas por Feng y col. y Scheidegger y col. [6, 7].

La digestibilidad gástrica *in-vitro* se determinó mediante la reacción de la enzima pepsina bovina. Para ello, inicialmente se prepararon disoluciones de las fracciones proteicas carboniladas por los contaminantes y de las muestras control negativo; de estas se tomó una alícuota y se depositó en tubos Eppendorf cargados previamente con una solución de simulación gástrica (NaCl 0.15 M pH: 2.5, ajustada con HCl 1 M) y de una disolución de pepsina bovina. La mezcla resultante se incubó a 37°C, recogiendo alícuotas a tiempo 1 y 5 minutos, para su posterior análisis por SDS-PAGE.

Una vez culminado el tiempo de reacción se detuvo la digestión gástrica para comenzar la digestión duodenal, ajustando el pH de la mezcla a 6.5. A la mezcla resultante se le adicionó una disolución de tripsina porcina y α -quimotripsina bovina (0.05 y 0.1%, p/v respectivamente). Finalmente, las muestras se incubaron a 37°C, recogiendo alicuotas a tiempo 1 y 5 min para su posterior análisis por SDS-PAGE [6,7]. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Resultados y discusión

La evaluación del efecto inducido por la presencia de oxitetraciclina a concentraciones de 100 y 150 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (1 y 1.5LMR) permitieron establecer que las mismas promueven carbonilación en ambas fracciones proteicas: caseínas y proteínas del lactosuero. La carbonilación observada en ambos casos fue significativamente superior en todos los niveles ensayados, con respecto a la observada en los blancos. La única excepción la constituyó la fracción del lactosuero expuesta a 1.5LMR, cuya carbonilación sólo llegó a ser 1.17 veces la observada en las muestras blanco.

De acuerdo con la Tabla 1, también se establece que las proteínas del lactosuero son más sensibles a la presencia del contaminante, que las caseínas, aunque estas últimas alcanzaron carbonilaciones 1,36 y 2,11 veces superiores al blanco. Estos resultados sugieren que la presencia de oxitetraciclina al LMR tiene el potencial para inducir daño oxidativo irreversible sobre las principales fracciones proteicas de la leche, comprometiendo su inocuidad y la calidad funcional de las mismas.

Tabla 1. Valores de carbonilación y relación IC/IC Basal (blanco) en las diferentes fracciones de proteínas de leche bovina contaminada con oxitetraciclina

Nivel de Contaminación*	Caseínas		Lactosuero	
	IC/IC Basal	nmol/mg de proteína media(RSD)	(IC/IC Basal)	nmol/mg de proteína Media(RSD)
LMR (100)	1.36	5.81 (1.37)	1.37	14.52 (\pm 5.43)
1.5 LMR (150)	2.11	8.98 (1.25)	1.17	12.39 (\pm 2.69)
BASAL		4.26 (3.70)		10.58 (2.51)

*En paréntesis se indican concentraciones en $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Estos hallazgos se confirmaron con los ensayos de digestibilidad proteica, cuyos resultados revelaron pérdidas de digestibilidad de las principales bandas proteicas del lactosuero: β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina, tanto en fase gástrica como duodenal. En el primer caso, tras 5 minutos de exposición a la acción enzimática, el 84% de la banda de β -lactoglobulina y el 72% de α -lactoalbúmina, permaneció sin digerir. En la fase duodenal estos porcentajes pasaron a 83 y 70%, respectivamente.

Estos resultados evidencian la capacidad de la concentración equivalente al LMR para inducir cambios tecno-funcionales en las proteínas expuestas, cuestionando la inocuidad de dicha concentración.

Conclusiones

Niveles de oxitetraciclina al 1,0 y 1,5 veces su LMR en leche bovina, inducen daño oxidativo sobre fracciones proteicas tipo caseínas y lactosuero.

Las caseínas son más sensibles al efecto de exposición al contaminante.

La oxidación inducida por oxitetraciclina al LMR sobre el lactosuero, afectó la digestión de β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina presentes en dicha fracción.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Colciencias y la Universidad de Cartagena por el apoyo financiero a los proyectos 1107-711-50102 y Actas de Compromiso 088-2018, 120-2018. Albeiro Marrugo-Padilla agradece a Colciencias por la Becas Doctoral 706-2015.

Referencias

1. Toro, F. (2011). Uso de antibióticos en la nutrición animal. *Rev Sist Prod Agroecol*, 2(2): 51–64.
2. Gasparovic, A. C., Zarkovic, N., & Bottari, S. P. (2018). Biomarkers of nitro-oxidation and oxidative stress. *Current Opinion in Toxicology*, 7: 73–80.
3. Schieber, M., & Chandel, N. S. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology*, 24(10): 1–25.
4. Pereira, P. C. (2014). Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition*, 30(6): 619–627.
5. Mesquita CS1, Oliveira R1, Bento F1, Geraldo D1, Rodrigues JV1, Marcos JC2 (2014). Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. *Anal Biochem*. 1:458:69-71.
6. Feng, X., Li, C., Ullah, N., Cao, J., Lan, Y., Ge, W., ... Chen, L. (2015). Susceptibility of whey protein isolate to oxidation and changes in physicochemical, structural, and digestibility characteristics. *Journal of Dairy Science*, 98(11): 7602–7613.
7. Scheidegger, D., Pecora, R. P., Radici, P. M., & Kivatinitz, S. C. (2010). Protein oxidative changes in whole and skim milk after ultraviolet or fluorescent light exposure. *Journal of Dairy Science*, 93(11): 5101–9.