

Cravero Ponso, Carolina Florencia

Estabilidad de la aflatoxina M1 (AFM1) en leche y su reducción en el proceso de elaboración del queso ricotta

**Tesis para la obtención del título de posgrado de
Magíster en Tecnología de los Alimentos**

Director: Olmedo, Rubén Horacio.

Documento disponible para su consulta y descarga en Biblioteca Digital - Producción Académica, repositorio institucional de la Universidad Católica de Córdoba, gestionado por el Sistema de Bibliotecas de la UCC.





UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CÓRDOBA

Facultad de Ciencias Químicas

**"ESTABILIDAD DE LA AFLATOXINA M1 (AFM1) EN LECHE Y SU REDUCCIÓN
EN EL PROCESO DE ELABORACIÓN DEL QUESO RICOTTA"**

**Tesis de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Católica de Córdoba
conforme a los requisitos para obtener el título de MAGISTER EN TECNOLOGÍA DE
LOS ALIMENTOS**

por

Lic. CAROLINA FLORENCIA CRAVERO PONSO

CÓRDOBA

2017

DIRECTOR DEL TRABAJO FINAL

Prof. Dr. Rubén Horacio Olmedo

Licenciado en Bioquímica

Magister en Ciencias Agropecuarias

Doctor en Ciencias de la Ingeniería

Facultad de Ciencias Agropecuarias – Universidad Nacional de Córdoba

CO-DIRECTORA DEL TRABAJO FINAL

Prof. Ing. Agr. Mgter. María Verónica Aimar

Ingeniera Agrónoma

Magister en Ingeniería en Calidad

Facultad de Ciencias Agropecuarias - Universidad Nacional de Córdoba

COMISIÓN DEL TRABAJO FINAL

Dedico este trabajo a mis padres, Ethel y Fermín,

por el permanente apoyo, amor

y contención que me brindan y

por ser fuente de inspiración y

superación en mi vida.

A mis amigos, por el cariño y

aguante de todos estos años.

AGRADECIMIENTOS

A la **Facultad de Ciencias Agropecuarias** y **Facultad de Ciencias Químicas** de la **Universidad Católica de Córdoba**, gracias por haberme dado la oportunidad de formarme en ellas como Licenciada y Magister en Tecnología de los Alimentos.

La presente tesis realizada en la **Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba** es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente participaron distintas personas opinando, corrigiendo, teniéndome paciencia, dándome ánimo, acompañándome en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad. Éste trabajo me ha permitido aprovechar la competencia y la experticia de muchas personas que deseo agradecer.

En primer lugar, a mi director de tesis, **Dr. Rubén Horacio Olmedo**, mi más amplio agradecimiento por haberme confiado éste trabajo, por su paciencia, por su valiosa dirección y apoyo para seguir éste camino de tesis. Su experiencia y dedicación han sido fuente de motivación y curiosidad durante estos años.

A la **Ing. Agr. Mgter. María Verónica Aimar**, co-directora de tesis, un especial agradecimiento por su orientación, guía y corrección del presente trabajo, y por haberme recibido y abierto las puertas del **Laboratorio de Lactología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba**, para poder realizar los ensayos y análisis pertinentes de la tesis.

Mi agradecimiento a la colaboración del **Dr. Nelson Rubén Grosso** por facilitarme la utilización del Laboratorio de Química Biológica de la FCA UNC, bajo su dirección, para la realización de parte de los ensayos del presente trabajo.

Al **Ing. Agr. Fernando Masía**, Director del Tambo Escuela de la FCA UNC, por su colaboración en el suministro de la leche necesaria y aporte de información sobre calidad higiénico-sanitaria de la leche, para los análisis, ensayos y elaboración del queso ricotta.

A todos ellos ¡¡Muchas Gracias!!

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO I:	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 Principales Hongos productores de Toxinas	4
1.2 Toxicidad de las Aflatoxinas	5
1.3 Biotransformación de la Aflatoxina B1 en AFM1 en leche.....	8
1.4 Bioconversión de micotoxinas en el rumen	9
1.5 Acciones posibles para reducir la concentración de Aflatoxina M1 en leche y productos lácteos	10
1.6 Consideraciones sobre la legislación de las micotoxinas	11
1.7 Procedimientos tendientes a detoxificar la Aflatoxina M1 en la leche destinada a la elaboración de quesos.....	13
1.8 Caracterización de la Lechería Argentina.....	14
1.9 Estructura de la Leche.....	16
1.10 Leche de Vaca	18
1.11 Biosíntesis de los principales componentes de la leche.....	19
1.12 Origen de los precursores sanguíneos.....	22
1.13 Composición química de la leche de vaca	22
1.14 Variabilidad de la composición química de la leche	23
1.15 Composición de la leche de la Cuenca de Villa María - Córdoba.....	24
1.16 Propiedades físicas de la leche.....	24
1.17 Grasa Láctea.....	25
1.18 Fracción Nitrogenada	26
1.19 Caseínas	27
1.20 Coagulación por vía enzimática	29

1.21 Efecto del tratamiento térmico sobre la estructura y estabilidad de la leche y sus principales componentes	30
1.22 Queso Ricotta.....	31
1.23 Proceso de elaboración de la ricotta	36
2. ANTECEDENTES	40
2.1 Antecedentes sobre estabilidad y partición de la Aflatoxina M1 en leches y productos lácteos	40
HIPÓTESIS	43
OBJETIVO GENERAL	43
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
CAPÍTULO II:	44
Objetivo Específico 1.....	44
3.1 Introducción.....	45
3.2 Materiales y Métodos	46
3.3 Resultados y Discusión	50
3.4 Conclusión.....	51
CAPÍTULO III:	52
Objetivo Específico 2.....	52
4.1 Introducción.....	53
4.2 Materiales y Métodos	55
4.3 Resultados y Discusión	56
4.4 Conclusión.....	61
CAPÍTULO IV:	63
Objetivo Específico 3.....	63
5.1 Introducción.....	64
5.2 Materiales y Métodos	64
5.3 Resultados y Discusión	67
5.4 Conclusión.....	67

CAPÍTULO V:	68
Objetivo Específico 4.....	68
6.1 Introducción	69
6.2 Materiales y Métodos	70
6.3 Resultados y Discusión	71
6.4 Conclusión.....	76
CAPÍTULO VI:	77
Conclusiones Generales	78
Futuras líneas de investigación	79
BIBLIOGRAFÍA	80
ANEXOS	92
Anexo 1	93
Análisis estadístico utilizado en los tratamientos de la leche	94
Anexo 2	95
Análisis estadístico utilizado en los tratamientos del queso ricotta	96

ABREVIATURAS

A.: Aspergillus

AFs: Aflatoxinas

AFB1: Aflatoxina B1

AFG1: Aflatoxina G1

AFM1: Aflatoxina M1

AGNES: Ácidos Grasos No Esterificados

α : Alfa

AOAC: Association of Official Analytical Chemists

Aw: Actividad de Agua

β : Beta

BPA: Buenas Prácticas Agrícolas

Ca: Calcio

CaCl₂: Cloruro de Calcio

CAA: Código Alimentario Argentino

Cl: Cloro

CMP: Caseino-Macropéptido-Hidrófilo

CN: Caseína Nativa

°C: Grado Celsius

CuSO₄: Sulfato de Cobre

Da: Dalton

D=: Densidad

°D: Grado Dornic

DS: Desvío Estándar

DON: Vomitoxina

EEUU: Estados Unidos

g: Gramo

H₂O₂: Peróxido de Hidrógeno

H₂SO₄: Ácido Sulfúrico

H₃BO₃: Ácido Bórico

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución

HSCAS: Aluminosilicatos Hidratados

IARC: Agencia Internacional de Investigación del Cáncer

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

INTI: Instituto Nacional de Tecnología Industrial

κ: caseína capa

K: Potasio

K₂SO₄: Sulfato de Potasio

Kg: Kilogramo

L: Litro

LMA: Límites Máximos Admisibles

LPO: Lactoperoxidasa

Máx: Máximo

>: Mayor

mg: Miligramo

Mín: Mínimo

mL: Mililitro

mm: Milímetro

mM: Milimoles

N: Normal

Na: Sodio

NaCl: Cloruro de Sodio

ng: Nanogramo

nm: Nanometro

NNP: Nitrógeno No Proteico

NaOH: Hidróxido de Sodio

¹O₂: Oxígeno Atómico

OMS: Organización Mundial de la Salud

OTA: Ocratoxina

P: Fósforo

PCC: Puntos Críticos de Control

ppb: Partes por Billón

%: Porcentaje

RP-HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución de Fase Reversa

rpm: Revoluciones por Minuto

RTM: Ración Totalmente Mezclada

SAG: Unidad de Normas del Servicio Agrícola-Ganadera

Se: Selenio

SENASA: Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria

TD50: dosis de micotoxinas con la cual el 50% de los individuos pueden desarrollar tumores malignos

TDI: Ingesta de Micotoxina Diaria que puede ser Tolerada

TFA: Ácido Trifluoroacético

U: Unidades

µg: Microgramo

µL: Microlitro

µm: Micrómetro

UE: Unión Europea

ZEA: Zearalenona

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: “Fase de crecimiento fúngico y localización de la síntesis de Micotoxinas”	3
Figura 2: “Transformación de la Aflatoxina B1 a Aflatoxina M1 a través del citocromo P450”	8
Figura 3: “Destino de la producción de leche”	14
Figura 4: “Principales cuencas lecheras Argentinas”	15
Figura 5: “Esquema del equilibrio entre las principales sustancias dispersas de la leche”	17
Figura 6: “Tamaño relativo de los principales componentes de la leche”	18
Figura 7: “Macro estructura de la glándula mamaria”	19
Figura 8: “Alvéolo secretor”	20
Figura 9: “Célula secretora mamaria”	20
Figura 10: “Estructura de la micela de caseína”	27
Figura 11: “Diagrama de flujo: Elaboración industrial de ricotta”	38
Figura 12: “Cromatograma obtenido en la detección de Aflatoxina M1 en leche descremada contaminada artificialmente con AFM1 con adición de peróxido de hidrógeno tratada térmicamente a 90 °C por 10 minutos”	59
Figura 13: “Cromatograma obtenido en la detección de Aflatoxina M1 en queso ricotta descremado elaborado a 90 ° sin adición de sal”	76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I: “Principales Hongos productores de Micotoxinas”	4
Tabla II: “Bioconversión de micotoxinas en el rumen”	9
Tabla III: “Componentes de la leche y sus precursores de la sangre”	21
Tabla IV: “Composición promedio de leches de vacas, cabras y ovejas”	23
Tabla V: “Composición química de la leche de la cuenca de Villa María”	24
Tabla VI: “Principales propiedades físico-químicas de la leche”	25
Tabla VII: “Perfil de ácidos grasos”	25
Tabla VIII: “Constituyentes de la fracción proteica”	26
Tabla IX: “Composición del suero de leche”	35
Tabla X: “Composición promedio de la ricotta de suero de queso más leche elaborada industrialmente”	37
Tabla XI: “Características físico-químicas de la leche cruda entera utilizada”	51
Tabla XII: “Porcentajes de inactivación de la Aflatoxina M1 en leche cruda entera”	57
Tabla XIII: “Porcentajes de inactivación de la Aflatoxina M1 el leche cruda descremada”	58
Tabla XIV: “Composición química de los quesos ricotta elaborados a partir de leche entera y descremada contaminados con 0,5 ppb de AFM1 ...	67
Tabla XV: “Niveles de detección de Aflatoxina M1 en queso ricotta entero en distintos tratamientos a partir de leche contaminada artificialmente con 0,5 ppb”	72
Tabla XVI: “Niveles de detección de Aflatoxina M1 en queso ricotta descremado en distintos tratamientos a partir de leche contaminada artificialmente con 0,5 ppb”	73

RESUMEN

La Aflatoxina M1 (AFM1) es un derivado por biotransformación efectuada en los hepatocitos del hígado de la vaca lechera a partir de la Aflatoxina B1 (AFB1) contenida en las raciones alimenticias de los animales. La AFM1, aunque de menor toxicidad que la AFB1, tiene un importante impacto negativo en la salud de los consumidores de leche y sus derivados, siendo categorizada por la IARC (OMS) como toxina 2B por su posible efecto carcinogénico. El objetivo principal del presente trabajo fue: determinar la estabilidad de la AFM1 en leche cruda artificialmente contaminada con 0,5 ppb de dicha toxina con adición de peróxido de hidrógeno a temperaturas y tiempos variables y establecer la eventual detoxificación de AFM1 en el proceso de elaboración del queso ricotta a partir de leche entera y descremada con el agregado de diferentes concentraciones salinas a distintas temperaturas. Para ello, se tomaron alícuotas de una única toma de muestra de leche cruda entera de tanque refrigerado y se mantuvieron a -35°C hasta su procesamiento de laboratorio. A) Se determinó la estabilidad de AFM1 en leches tratadas con y sin peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 0,05% a temperaturas de 25°C , 65°C y 90°C por 60, 30 y 10 minutos; los resultados indicaron un porcentaje máximo de inactivación de la toxina en las muestras con agregado de H_2O_2 de leche entera a 25°C por 60 minutos de 29,29% y en leche descremada a 65°C por 30 minutos de 82,64%. B) Se elaboraron quesos ricottas a partir de leche entera y descremada contaminadas artificialmente con 0,5 ppb de AFM1 con el agregado de dos concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) (0,75% y 1,5%) a temperaturas de 85°C , 90°C y 95°C . Los resultados indicaron una marcada disminución de la AFM1 retenida en los quesos ricottas elaborados, obteniéndose valores que oscilaron entre el 0,44% y 2,90% respecto de la concentración de la leche de origen. Las determinaciones de AFM1 fueron efectuadas mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). Los resultados fueron analizados estadísticamente por Análisis de la Varianza (ANAVA) y Test LSD Fisher.

Palabras claves: Aflatoxina M1, leche, ricotta, HPLC,

SUMMARY

Aflatoxin M1 (AFM1) is a derivative by biotransformation carried out in the liver hepatocytes of the dairy cow from Aflatoxin B1 (AFB1) contained in animal feed. AFM1, although less toxic than AFB1, has a significant negative impact on the health of consumers milk and milk products being categorized by the IARC (OMS) as a toxin 2B for its possible carcinogenic effects. The main objective of this experiment was to determine the stability of AFM1 in raw milk that was artificially contaminated with 0.5 ppb of this toxin. Furthermore, hydrogen peroxide was administered at variable temperatures and times, and to establish the eventual detoxification of AFM1 during the elaboration process of ricotta cheese from whole and skimmed milk, using different salt concentrations at different temperatures. For this purpose, aliquots were taken from a single sample of whole milk from the cooled tank and kept at -35°C until laboratory processing. A) The stability of AFM1 was determined in milks treated with and without 0.05% hydrogen peroxide (H₂O₂) at temperatures of 25°C, 65°C and 90°C for 60, 30 and 10 minutes. The results indicated a maximum percentage of inactivation of the toxin as follows: 29.29% in whole milk treated with H₂O₂ at 25°C for 60 minutes and 82.64% in skimmed milk treated with H₂O₂ at 65°C for 30 minutes. B) Ricotta cheeses were prepared from whole and skimmed milk that was artificially contaminated with 0.5 ppb of AFM1 along with the addition of two concentrations of sodium chloride (NaCl) (0.75% and 1.5%) at temperatures of 85°C, 90°C and 95°C. The results indicated a marked decrease of AFM1 retained in the elaborated ricotta cheeses, obtaining values ranging from 0.44% to 2.90% over the concentration of milk origin. AFM1 determinations were performed using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The results were analyzed statistically by the Analysis of Variance (ANOVA) and Fisher LSD test.

Keywords: Aflatoxin M1, milk, ricotta, HPLC.

CAPÍTULO I
INTRODUCCIÓN

1. Introducción

Según Treviño, J. (2000), la palabra aflatoxina es un neologismo, cuyas primeras cuatro letras (afla) son un acrónimo, formado a partir del nombre latinizado del hongo: *Aspergillus flavus* productor de toxina de donde se tomó la letra A del género (*Aspergillus*) y las primeras letras, fla, de la especie (*flavus*) de la que se aisló la toxina.

El crecimiento de hongos filamentosos con capacidad de producir toxinas, pueden desarrollarse bajo condiciones climáticas de prácticamente todo el mundo, tanto en soportes sólido cuanto líquido. Estos hongos tienen la capacidad de penetrar profundamente en las estructuras de los diferentes sustratos mediante la acción enzimática producida por ellos descomponiendo los productos complejos.

Particularmente los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* poseen la habilidad de crecer, desarrollarse y producir las micotoxinas correspondientes en condiciones de relativa baja actividad de agua (A_w). No obstante ello, la naturaleza y cantidad de micotoxinas producidas se ve influenciada por la interacción de varios factores como: tipo de sustrato, humedad, nutrientes disponibles, temperatura, humedad del ambiente circundante (Marin Sillué, S. y otros. 2000). Los hongos, para su crecimiento, utilizan metabolitos primarios: ácidos nucleicos, proteínas y lípidos, entre otros; éstos metabolitos están asociados con la fase de rápido crecimiento (Soriano del Castillo, 2007).

Por otra parte, los hongos producen una serie de compuestos llamados metabolitos secundarios que no son esenciales para su crecimiento vegetativo, ejemplo de éstos metabolitos lo constituyen los antibióticos y las micotoxinas; estas últimas se sintetizan al final de la fase exponencial y al principio de la fase estacionaria del crecimiento fúngico, tal como se ilustra en la Figura N° 1.

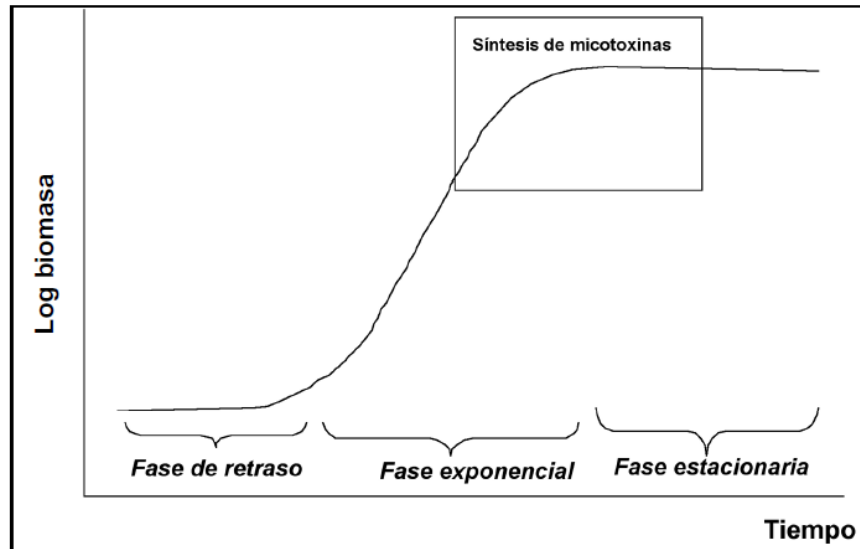


Figura 1: Fase de crecimiento fúngico y localización de la síntesis de micotoxinas
(Soriano del Castillo, 2007)

Desde el punto físico – químico, las micotoxinas son sustancias cristalinas que se disuelven en solventes ligeramente polares como el cloroformo, metanol y agua a razón de 10 – 20 mg / litro; éstas sustancias presentan fluorescencia a la luz ultravioleta (Asociación Española de Fabricantes de Harinas y Sémolas de España. 2015).

Los principales géneros de hongos toxigénicos pueden observarse en la Tabla N° I.

1.1 Tabla N° I. Principales Hongos productores de Micotoxinas

Hongos del campo	Fusarium sp.	DON (Vomitoxina) Zearalenona (ZEA) Toxina T2 Fumonisina DAS
Hongos altamente contaminantes	Aspergillus sp.	Aflatoxinas (B1, B2, G1, G2) Ocratoxina (OTA) Patulina
	Penicillium sp.	Ocratoxina (OTA) Citrina Roquefortina Patulina

(Acosta Yamandú M. y otros. 2016)

Dentro de un amplio grupo de micotoxinas producidas por una gran variedad de hongos filamentosos, se encuentran las Aflatoxinas, que constituyen un grupo de metabolitos secundarios, la mayoría de ellos tóxicos tanto para animales como para el ser humano. Son considerados metabolitos secundarios debido a que son procesos metabólicos primarios que no intervienen en el crecimiento del hongo. Si bien sus funciones no están claramente definidas, se cree que desempeñan la función de eliminar a otros microorganismos que compiten en el mismo entorno, ayudando a hongos-parásitos a invadir los tejidos del huésped (Thomma, 2003).

Las aflatoxinas son producidas principalmente por dos especies de hongos del género *Aspergillus* con sus especies *A. flavus* y *A. parasiticus*; estos hongos poseen la capacidad de desarrollarse en distintos sustratos dentro de una amplia gama de temperaturas (4 a 40 °C); aunque la temperatura óptima de crecimiento y producción de toxina se encuentra alrededor de 20 °C con humedad generalmente muy alta.

Existen aproximadamente 20 tipos de toxinas, si bien las más importantes producidas por estas especies de hongos filamentosos contaminantes de los alimentos, son las Aflatoxinas B1, B2, G1 y G2; el *A. parasiticus* es el encargado de producir aflatoxinas B y G, mientras que el *A. flavus* solamente sintetiza las

aflatoxinas B. Las aflatoxinas son producidas, bajo ciertas condiciones de humedad ambiente, temperatura y disponibilidad de nutrientes, en productos agrícolas, pudiéndose desarrollar antes y después de las cosechas de determinados cereales y oleaginosas, como así también, en forrajes conservados como el silaje, cada vez más utilizados en la alimentación del ganado lechero, especialmente en los sistemas intensivos de producción con los animales parcial o totalmente confinados. El género *Aspergillus* es un hongo que necesita temperaturas mínimas de 10 a 12 °C para desarrollar y producir micotoxinas. La Aw mínima para el desarrollo y producción de toxinas es de 0,75 y de 0,83 respectivamente. Las condiciones óptimas para su máxima producción de toxinas son temperaturas de 25 °C y una Aw de 0,95. No obstante, ciertas estirpes de *Aspergillus flavus* en sustrato como por ejemplo el arroz, pueden crecer entre 6 y 45 °C, con una óptima de 37 °C, la máxima producción de micotoxinas se verificó a la temperatura de 30 °C (Hesseltine C. W. 1976).

Las aflatoxinas son derivados de la difuranocumarina sintetizadas siguiendo la vía metabólica de los policétidos, involucrando reacciones de condensación, oxidación, reducción y alquilación. Los pesos moleculares de estas sustancias oscilan entre 312 y 350 Da; en general son pocos solubles en agua, son termoresistentes con punto de fusión superiores a los 250 °C; resisten pH del orden de 3 a 10 y temperaturas cercanas a los 150 °C.

1.2 Toxicidad de las aflatoxinas

1 – Toxicidad en animales rumiantes

En los animales rumiantes las Aflatoxinas, particularmente la Aflatoxina B1 es la más importante por su toxicidad, produce deterioro significativo en la función hepática reduciendo el consumo de alimento; esto a su vez puede explicar la reducción de la producción de leche en las vacas.

La disminución en la capacidad de ingesta de alimentos sería atribuida a la funcionalidad ruminal, debido a la disminución en la digestión de la celulosa, producción de ácidos grasos volátiles (acético, propiónico y butírico) y a la motilidad ruminal (Diekman, M. A. y Green, M. L. 1992; Cook, W. O. y otros, 1986; Helferich, W. G. y otros, 1986).

En los casos de intoxicación aguda por AFB₁, el animal presenta inapetencia, letargia, ataxia, pelo hirsutado y opaco, pudiendo morir en pocas horas o días. (Reyes Velázquez, W. 2011); también se observaron en vacas lecheras mecanismos de inmunosupresión, disminución de la estimulación mitogénica inducida por los linfocitos periféricos (Paul, P. S., y otros. 1977). Además se observó disminución de la eficiencia reproductiva y de producción de leche cuando las vacas consumieron alimentos contaminados con 120 µg/Kg. de AFs; registrándose un incremento del 25% en la producción cuando se retiró el alimento contaminado (Guthrie, L. D. 1976).

Las micotoxicosis generadas por Aflatoxinas se las pueden definir en tres cuadros: clínicos, subclínico y crónico.

El cuadro clínico, en los animales, se caracteriza por el rechazo del alimento, baja en la producción de leche, depresión y agravamiento de cualquier cuadro clínico preexistente. El cuadro subclínico se caracteriza por inmunodepresión; mientras que en el cuadro crónico se destaca el efecto acumulativo de las aflatoxinas sobre los hepatocitos provocando el síndrome de hígado graso, concomitante con inmunodepresión, favoreciendo la invasión al organismo por diferentes agentes infecciosos (Gimeno, A., y Martins, M. L. 2011).

Según Rojo, F. y otros (2014) existe evidencia de que la AFB₁ y AFG₁ ejercen acción sobre los sistemas enzimáticos vinculados a la síntesis de los radicales libres y sobre los antioxidantes enzimáticos: glutatión, peroxidasas, superóxido-dismutasa y también sobre los antioxidantes no enzimáticos como la vitamina E.

2 – Toxicidad en humanos (riesgos para la salud pública)

La toxicidad de las Aflatoxinas en humanos depende de varios factores: a) biodisponibilidad y toxicidad de la micotoxina; b) los sinergismos entre ellas; c) la cantidad de micotoxina ingerida diariamente en función de la concentración de la micotoxina y la cantidad de alimento ingerido; d) la continuidad o intermitencia de ingestión del alimento contaminado; e) peso del individuo y el estado fisiológico y de salud; f) edad del individuo (Gimeno, A. 2005).

Como consecuencia de todo lo mencionado, se desprende la mayor vulnerabilidad de los niños y jóvenes a la acción de las micotoxinas, debido a que pueden no tener suficientes mecanismos bioquímicos de detoxificación (Gimeno, A. 2005).

Si la exposición a la aflatoxina es aguda puede desencadenar en el ser humano una aflatoxicosis severa, afectando a los hepatocitos con una mortalidad que puede alcanzar aproximadamente al 25% de las personas intoxicadas (Cullen y Newberne 1994).

La potencia carcinogénica de la AFB1 es significativamente mayor a las demás aflatoxinas, teniendo una TD50 (dosis de micotoxinas con la cual el 50% de los individuos pueden desarrollar tumores malignos) de 10,38 $\mu\text{g} / \text{Kg}$. de peso corporal / día, mientras que la AFM1, derivado por biotransformación de la AFB1 es sólo de 1,15 $\mu\text{g} / \text{Kg}$. de peso corporal / día (Gimeno, A. 2005).

El TDI (ingesta de micotoxina diaria que puede ser tolerada) de AFM1 es 2 ng/Kg. de peso corporal / día, siendo diez veces mejor tolerada que la AFB1 de la que deriva.

Los niveles de micotoxinas con las que no se han observado efecto adversos fueron de < 2,5 y 0,75 $\mu\text{g} / \text{Kg}$. de peso corporal / día para AFM1 y AFB1 respectivamente (Kuiper-Goodman, T. 1994).

En razón de los estudios y evidencias que se disponen en la actualidad, la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC) de la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha categorizado a la AFM1 como toxina de posible acción carcinogénica en humanos otorgándole la categoría 2B y a la AFB1 como toxina clase 1 (carcinogénica para humanos).

Las aflatoxicosis agudas en humanos suelen resultar por la ingestión de alimentos contaminados con AFB1 como granos de maíz.

Los síntomas tempranos más frecuentes de una hepatotoxicidad por AFs son la anorexia, malestar general y fiebre baja (Chulze, S. y otros. 2011). Cuando la exposición es de tipo aguda puede evolucionar hacia una hepatitis letal con presencia de vómitos, ictericia y fallo hepático fulminante seguido de muerte.

Las aflatoxicosis crónicas suelen asociarse con hepatocarcinoma celular que muchas veces son concomitantes con el virus de la hepatitis B (Henry, S. y otros. 2002).

1.3 Biotransformación de la AFB1 en AFM1 en leche

La absorción de la AFB1 proveniente de los alimentos contaminados, se realiza a través del tracto gastrointestinal que por vía del sistema sanguíneo portal es conducida al hígado para su metabolización, tal como se ilustra en la Figura N° 2. Una parte de la AFB1 es activada y fijada en los tejidos hepáticos (Gimeno, A. 2005); algunos metabolitos conjugados de la AFB1 y solubles en agua se excretan por la bilis eliminándose por las heces; mientras otros metabolitos también solubles en agua son excretadas en leche, huevos, músculo y tejidos comestibles (Hsieh, D. y otros. 1981).

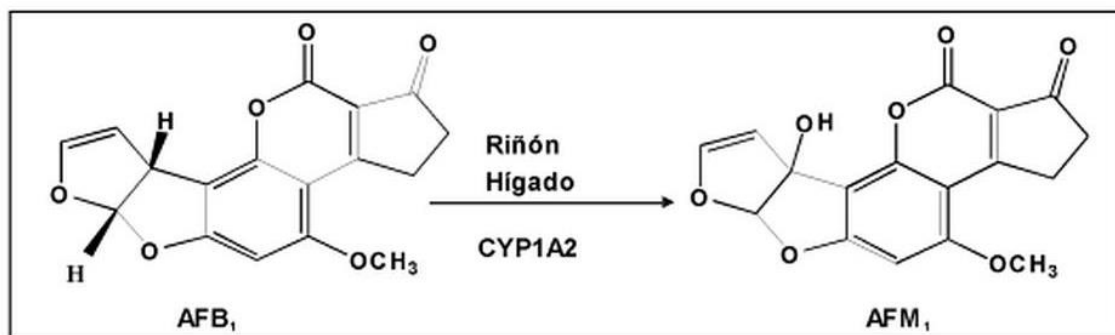


Figura 2: Transformación de la aflatoxina B1 a aflatoxina M1 a través del citocromo P450. (Soriano del Castillo, J. 2007).

La metabolización de AFB1 que ocurre en el hígado es realizado por el citocromo P450 de los hepatocitos.

Resulta de interés consignar que los animales rumiantes son más resistentes a la mayoría de las micotoxinas que los animales monogástricos; fenómeno que puede explicarse debido al rol detoxificante de la población ruminal microbiana (Yiannikouris y otro 2002) y particularmente por los protozoarios, siendo dicha detoxificación ocho veces más rápida en el ganado de carne que en el ganado lechero (Carmona Solano, G. 2009). Éste hecho probablemente sea debido al tipo de dieta de alta digestibilidad con el que son alimentadas las vacas lecheras, ocasionando mayor concentraciones de ácido propiónico y ácido láctico en el líquido ruminal que determinan condiciones adversas para ciertos grupos bacterianos que pueden procesar y desactivar las micotoxinas (Acosta Yamandú M. 2011).

1.4 Tabla Nº II. Bioconversión de micotoxinas en el rumen

Micotoxina	Degradación en rumen	No degradado en rumen
Aflatoxina	0 – 42%	58 – 100%
Zearalenona	90%	% metabolitos estrogénicos
DON	35% pH dependiente	65%
Ocratoxina	100% ???	?

(Acosta Yamandú M. y otros. 2016)

Las aflatoxinas M1 y M2 encontradas en la leche de los rumiantes son metabolitos hidroxilados por biotransformación de la AFB1 ingeridas en la alimentación que posteriormente son excretadas en leche, orina y heces debido a que las hidroxilaciones producidas en la molécula de AFB1 pueden atravesar las barreras fisiológicas (Acosta Yamandú M. y otros. 2016).

La tasa de conversión de AFB1 a AFM1 en la vaca lechera oscila entre 1 y 3% con una media encontrada en distintos estudios del orden del 1,5%. Las tasas de conversión son directamente proporcionales a las cantidades de AFB1 contenidas en las dietas de la vaca lechera.

Para otros autores (Veldman, A. y otros. 1992 y Pettersson, H. y otros. 1989), en función de estudios realizados con vacas de alta producción de leche encontraron tasas de conversión de AFB1 a AFM1 del orden de 2,6% a 6,2%. Para dichas investigaciones la relación aumenta a medida que se incrementa la producción de leche; analizando todos los datos de los distintos estudios, daría un incremento del 0,1% por cada Kg. de leche obtenida. También determinaron que para vacas de más de 25 Kg. de leche / día la tasa de conversión fue de 2,66% \pm 1,24.

La mayor tasa de excreción observada en vacas de alto rendimiento lechero podría estar relacionado con la mayor permeabilidad en las membranas plasmáticas de los alveolos secretores de leche (Veldman, A. y otros. 1992); por otra parte, explicaría también de esta manera el mayor incremento de la excreción de AFM1 en leche de vacas con mastitis.

Las vacas pueden biotransformar AFB1 en AFM1 dentro de las 12 – 24 horas posteriores a la ingestión del alimento contaminado, incluso a las 6 horas ya pueden aparecer residuos de AFM1 en la leche (Gimeno, A. 2005).

La presencia de AFM1 en leche es transitoria, alcanzando un máximo a los dos días del consumo del alimento contaminado y desapareciendo después de 4 a 5 días de retirado el alimento (Dragacci, S. y otros. 2001).

Las tasas de biotransformación de AFB1 en AFM1 pueden variar según la raza de la vaca, la concentración de AFB1 en la ración, la cantidad y duración del consumo del alimento contaminado y el estado de salud del animal (Gimeno, A. 2005).

1.5 Acciones posibles para reducir la concentración de AFM1 en leche y productos lácteos

En la producción primaria de leche, se pueden incorporar prácticas disponibles para la reducción de la concentración de AFM1 en leche, esto es a través de la incorporación de una amplia gama de sustancias, agregadas a la dieta de la vaca lechera, actuando como secuestrantes de las aflatoxinas del grupo B. Éstas sustancias, en combinación con un adecuado manejo de los recursos forrajeros, especialmente granos, y otros concentrados energéticos, como así también de diferentes forrajes conservados (silaje de maíz de planta entera, de grano húmedo de maíz y soja, etc.), demostraron ser capaces de reducir este contaminante químico. Algunos de los métodos disponibles para disminuir la contaminación y los efectos tóxicos de las micotoxinas presentes en las materias primas de las dietas para la alimentación animal son:

- Métodos Químicos: en general son caros y no son totalmente efectivos; además no todos están autorizados por las legislaciones vigentes. Dentro de estos procedimientos tenemos la amonización, nixtamalización, uso de agentes oxidantes como el peróxido de hidrogeno y el ozono.
- Métodos Biológicos: estos procedimientos resultan prometedores; pero aún están en estudio y experimentación. Los agentes biológicos que participan son bacterias lácticas y levaduras.
- Métodos Físicos: están constituidos por altas temperaturas, radiación x, uv e irradiación por microondas.
- Métodos Adsorbentes: los mismos son los más utilizados en la actualidad e incluyen a diferentes sustancias como:
 - Carbón activo

- Polímeros: polivinilpirrolidona, colestiramina, etc.
- Aluminosilicatos: zeolitas, esmectita, aluminosilicatos hidratados (HSCAS).

Para la disminución de las AFs contenidas en las materias primas destinadas a la alimentación animal, las sustancias más efectivas parecen ser la HSCAS, las bentonitas, la colestiramina y polivinilpirrolidona.

En términos generales, la incorporación de los adsorbentes en las premezclas de las dietas de los animales, forman con las toxinas en el tracto gastrointestinal complejos insolubles incapaces de atravesar el epitelio de los intestinos siendo en consecuencia eliminados en las heces (Dalcero, A. y otros. 2011).

Es probable, que la contaminación de los recursos forrajeros con que se alimentan las vacas lecheras, presenten niveles de contaminación muy por encima de los límites aceptados por las legislaciones vigentes de las principales regiones productoras de leche del mundo, particularmente en regiones de alta temperatura y humedad relativa y baja disponibilidad de tecnología, tanto en la pre como en la post cosecha de los principales granos utilizados en la alimentación animal.

1.6 Consideraciones sobre la legislación de las micotoxinas

- En la alimentación animal

En la Unión Europea hasta el 2003 la única micotoxina legislada en la alimentación animal fue la AFB1 con valores que oscilan entre 5 y 20 µg/Kg en función del tipo de alimento y animal al que va dirigido (UE. 2003).

En EEUU y Canadá los niveles máximos admisibles para las AFs en la alimentación animal, oscilan entre 20 y 300 µg/Kg según el alimento y al ganado al que va dirigido; en el caso específico del ganado lechero es de 20 µg/Kg de alimento (NGFA. 2011).

En México las concentraciones máximas permitidas de AFs para consumo animal oscilan entre 45 y 300 µg/Kg de alimento según el animal (NOM. 2002).

En Chile la Unidad de Normas del Servicio Agrícola-Ganadera (SAG), resolución 736/92 establece como contenido máximo de AFs en alimentos para animales valores que van desde 10 a 200 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ según el alimento y animal al que va dirigido.

En nuestro país, por la bibliografía consultada, no se posee información fidedigna publicadas de manera oficial y/o privada, de los niveles de contaminación con AFs del grupo B en los forrajes que generalmente son utilizados en la alimentación del ganado lechero, y es muy poca la información disponible sobre la contaminación con el metabolito AFM1 en leche y productos lácteos.

➤ En la alimentación humana

En la Unión Europea los niveles máximos de Aflatoxinas M1 admisibles son: en leche cruda, leche tratada térmicamente y leche para la fabricación de productos lácteos 0,05 $\mu\text{g}/\text{Kg}$; para preparados para lactantes 0,025 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ y para alimentos dietéticos 0,025 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. (UE. 2010).

En Canadá se ha fijado valores máximos permitidos para AFM1 de 0,5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. (NGFA. 2011).

En México se establece para leche, fórmulas lácteas y productos lácteos combinados un nivel máximo de contaminación con AFM1 de 0,5 $\mu\text{g}/\text{L}$. (NOM. 2002).

En Brasil los niveles máximos admisibles para leche fluida son de 0,5 $\mu\text{g}/\text{L}$ y para leche en polvo 5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, mientras que para quesos el límite establecido es de 2,5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. (RDC. 2011).

En Chile se establece como límites máximos de AFM1 en productos lácteos valores de 0,05 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. (Decreto 353. 2009).

En nuestro país y el MERCOSUR se han fijado como límites máximos admisibles (LMA) de AFM1, para leche fluida de 0,5 $\mu\text{g}/\text{L}$ y para leche en polvo 5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Desconociéndose normativas referidas a quesos y otros productos lácteos (Reglamento Técnico MERCOSUR. 2002).

1.7 Procedimientos tendientes a detoxificar la AFM1 en la leche destinada a la elaboración de quesos:

Debido a que la caseína incrementa notoriamente su hidrofobicidad durante la etapa de proteólisis en la elaboración del queso, y que dicha condición es necesaria para la unión de AFM1 con la caseína, resulta importante en consecuencia, encontrar métodos o procedimientos que puedan eliminar o disminuir la actividad de la toxina en la leche, antes de que esta sea utilizada en la fabricación del queso. En tal sentido se realizaron diversos ensayos calentando la leche a distintas temperaturas y tiempos, lográndose en algunos casos disminuciones de la AFM1 que van desde valores moderados a importantes (Henry y otros. 2001). Mientras que otras experiencias dieron resultados negativos, se sabe que para lograr abrir el anillo de la AFM1, y convertirlo en un ácido carboxílico terminal finalizando con la descarboxilación, es necesario aplicar temperaturas superiores a los 150 °C, con disponibilidad de suficiente contenido de agua: para poder abrir el anillo de la molécula de AFM1, convirtiéndola en ácido carboxílico terminal que se descarboxilará por efecto de la alta temperatura (Gimeno, A. 2005), ésta condición se torna incompatible con la gran mayoría de los procesos empleados en la fabricación de productos lácteos.

En otros ensayos se ha utilizado radiación UV que actúa sobre el enlace del anillo furánico lográndose reducciones en la concentración de AFM1, entre 3,6 y 100 %, dependiendo del tiempo de tratamiento. Métodos químicos también han sido ensayados empleando bisulfito potásico al 0,4 % a 25 °C durante 5 hrs, lográndose disminución de la AFM1 de hasta un 45 % (Henry y otros. 2001).

En otras experiencias, se utilizaron sustancias oxidantes como peróxido de hidrogeno y ozono en el pre tratamiento de la leche destinada a la elaboración de quesos con resultados contradictorios sobre la disminución de la estabilidad de la AFM1. También se han propuesto estrategias de tipo biológica utilizando bacterias lácticas y bifidobacterias a los efectos de disminuir la biodisponibilidad de la AFM1 a nivel gastrointestinal.

1.8 Caracterización de la lechería Argentina

La Argentina es un país con una lechería muy desarrollada, especialmente a partir de la década del 90; está ubicada como el segundo país productor de leche de América Latina y ocupando el puesto 11º de la producción mundial de leche bovina (Sánchez, C. y otros. 2012). La producción de leche nacional para el año 2016 osciló alrededor de 9.600 millones de litros, con una disminución del orden del 10% respecto de los años 2013-2015, debido a problemas meteorológicos (inundaciones en las principales cuencas lecheras) que afectaron significativamente el desarrollo y la evolución habitual del sector. El destino de dicha producción de leche puede observarse en la Figura N° 3.

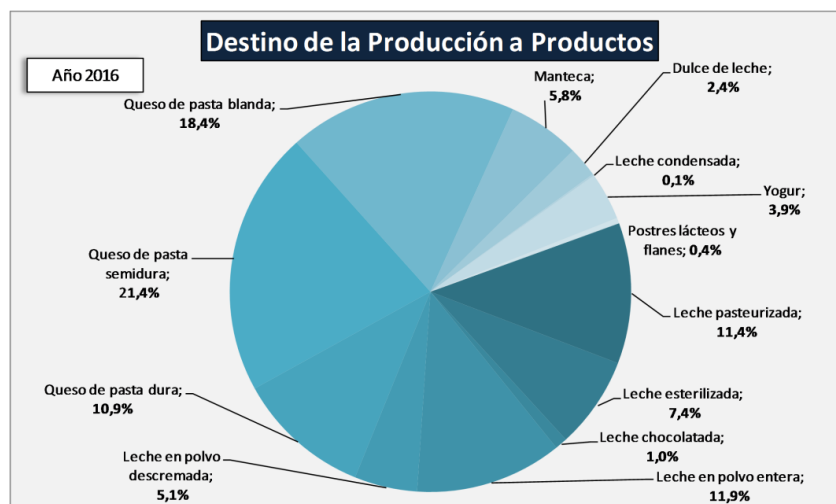


Figura N° 3 Destino de la producción de leche (Observatorio de la Cadena Láctea, 2017).

Cabe consignar que aproximadamente un 7-8% de la producción de leche cruda no es procesada industrialmente, escapándose de ésta forma, de la economía formal de los lácteos.

Las principales zonas productoras de leche están ubicadas en lo que se denomina la región pampeana, siendo las provincias de Córdoba, Santa Fe, Buenos Aires y Entre Ríos las más importantes.

Córdoba y Santa Fe son las provincias que más aportan a la producción nacional, siguiéndole las provincias de Buenos Aires y Entre Ríos; también existe una pequeña producción de leche aportadas por las provincias de Tucumán, Salta y

Santiago del Estero, que si bien tienen poca significación en la producción de leche nacional, en cambio constituyen una actividad importante para la región. Las principales cuencas lecheras del país, pueden observarse en la Figura N° 4.

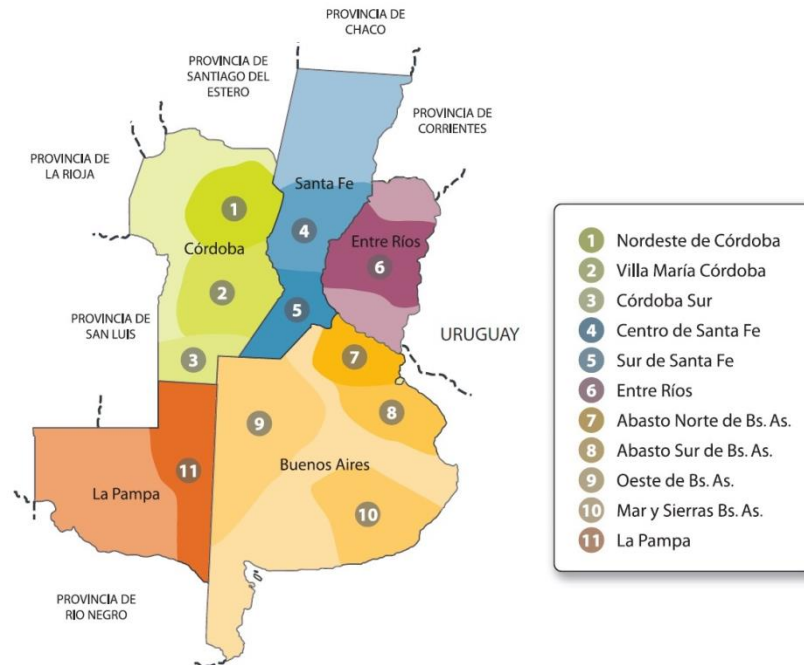


Figura N° 4. Principales Cuencas Lecheras Argentinas. (Bolsa de Comercio de Córdoba. IIE sobre la base del INTA – CFL. 2007.)

La provincia de Córdoba participa con el 36% de la producción nacional de leche. La zona de mayor densidad de producción de leche se encuentra ubicada en los departamentos Castellanos de la provincia de Santa Fe y el departamento San Justo de la provincia de Córdoba, en dicha zona está ubicada la estación experimental, especializada en lechería del INTA Rafaela.

Como rasgo fundamental de la lechería Argentina se puede destacar desde sus comienzos, una constante reducción del número de tambos y de vacas en producción, mientras se observa un importante incremento de la producción nacional, lo que significa un aumento en la concentración de la producción de leche y de animales por tambo; según información del SENASA 2017, las principales provincias productoras de leche reúnen 10.700 tambos, con un total de 11.326

unidades de producción en todo el país con un total de 1.720.067 vacas productoras de leche (SENASA. 2017).

Algo similar ocurre con los establecimientos industriales que han experimentado en las últimas décadas, una disminución de empresas con ampliación de la capacidad de elaboración por planta.

Cabe mencionar, que la tendencia a la mayor concentración en la producción de leche y elaboración de productos lácteos, observados en las últimas décadas de nuestra lechería nacional, copia un similar comportamiento de la lechería de los principales y desarrollados países lecheros del mundo.

1.9 Estructura de la leche

Las propiedades de un líquido biológico no se establecen totalmente sólo con su composición química y la leche no es una excepción; por ello es de suma importancia conocer su estructura física, es decir la disposición espacial de sus componentes (Walstra, P. y Jenness, R. 1987). En tal sentido 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, con una de las principales fracciones de importancia tecnológica como lo son las caseínas, que se encuentran en forma de macromoléculas llamadas micelas, la lactosa y las sales minerales en solución verdadera.

Las vitaminas, moléculas orgánicas esenciales para la vida de las crías, están presentes en la leche de dos maneras: en solución acuosa (hidrosolubles) y dispersa en la fase lipídica (liposolubles). El equilibrio dinámico entre los diferentes sistemas dispersos de la leche, se indican en la Figura N° 5.

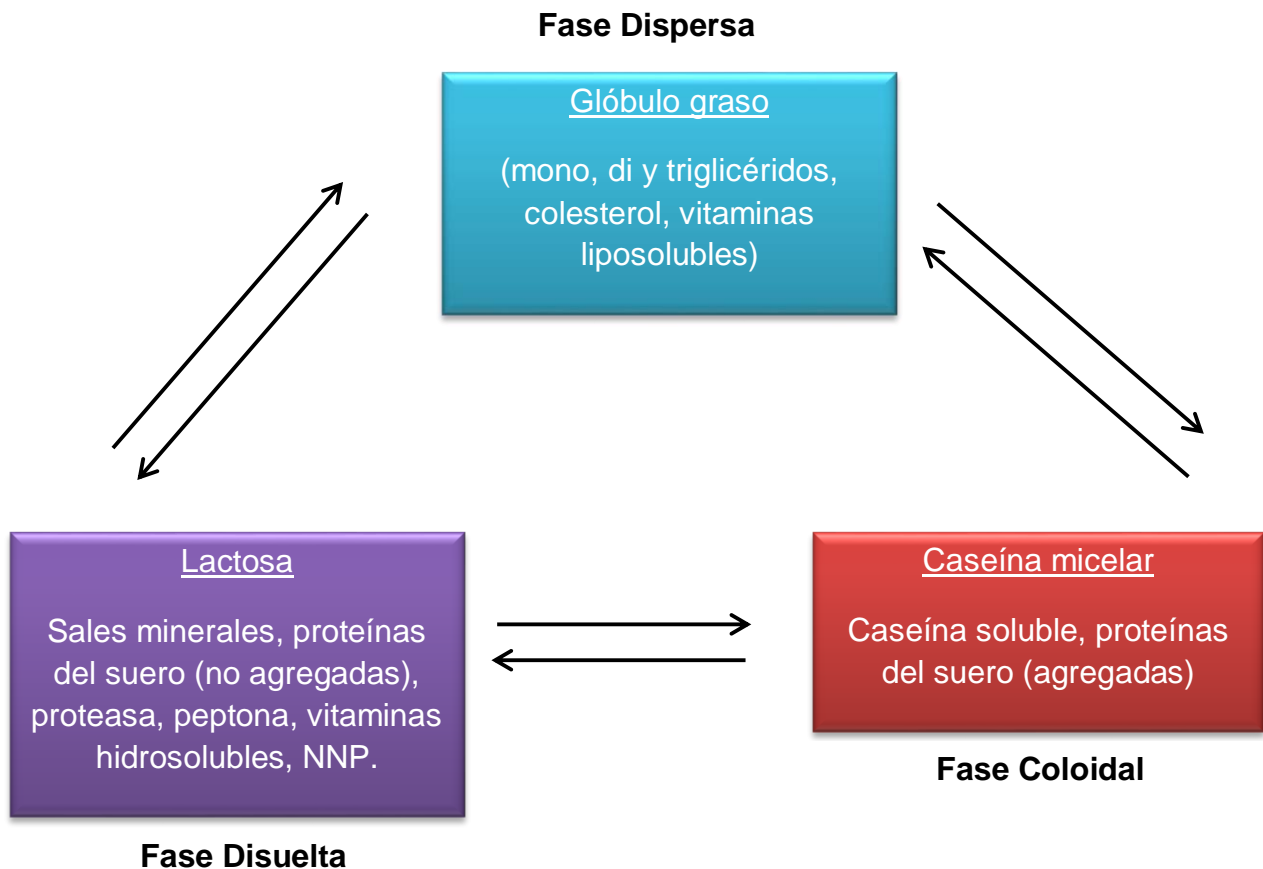


Figura N° 5. Esquema del equilibrio entre las principales sustancias dispersas de la leche. (Schlimme, E. y otro. 2002, modificado)

Los principales componentes de la leche cruda poseen diferentes tamaños, las caseínas, que se encuentran en solución coloidal formando macromoléculas denominadas micelas, son muy pequeñas (0,04 a 0,2 μm) en relación a los glóbulos de grasa (2 a 10 μm) que se hallan en emulsión con la fase acuosa del suero lácteo (Caja, G. 2006), los tamaños relativos se pueden observar en la Figura N° 6.

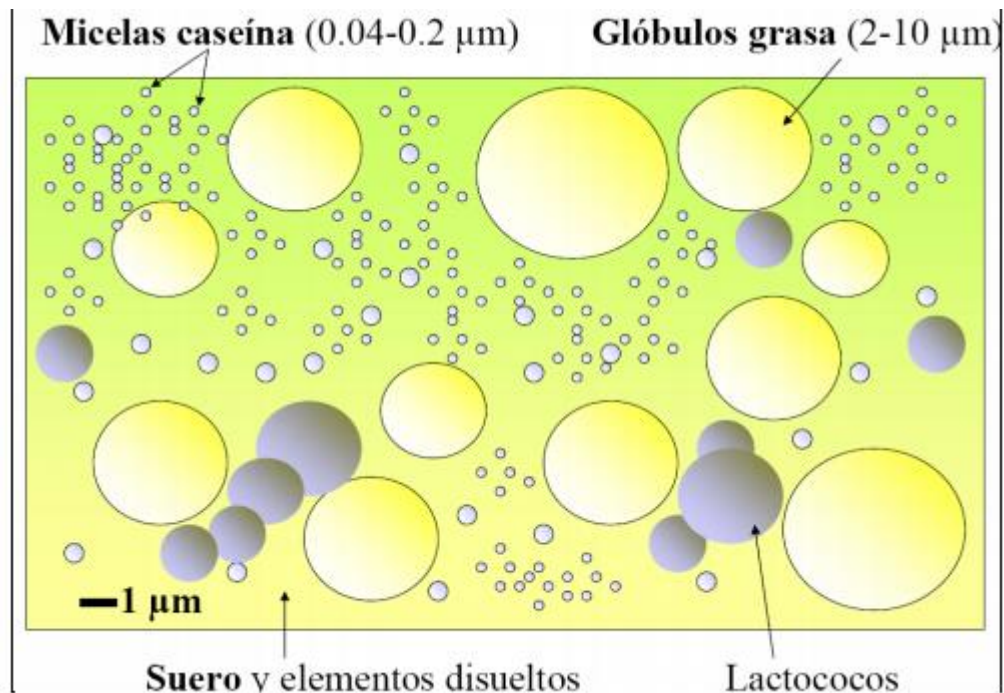


Figura N° 6. Esquema ilustrativo del tamaño relativo de los componentes de la leche. (Caja, G. 2006).

Los componentes salinos se encuentran en distintos estados de solubilización y unión a otros componentes como gotitas de grasa, con micelas caseínicas o en solución verdadera; a una determinada temperatura se encuentran en un equilibrio dinámico llamado equilibrio salino (Schlimme, E. y Buchheim, W. 2002).

1.10 Leche de Vaca

El Código Alimentario Argentino (CAA) en el Artículo 554 - (Res 22, 30.01.95) establece que: "Con la denominación de Leche sin calificativo alguno, se entiende el producto obtenido por el ordeño total e ininterrumpido, en condiciones de higiene, de la vaca lechera en buen estado de salud y alimentación, proveniente de tambos inscriptos y habilitados por la Autoridad Sanitaria Bromatológica Jurisdiccional y sin aditivos de ninguna especie. La leche proveniente de otros animales, deberá denominarse con el nombre de la especie productora".

1.11 Biosíntesis de los principales componentes de la leche

La biosíntesis de los principales componentes de la leche, lactosa, proteínas y grasa, son sintetizados bajo una compleja correlación hormonal, a partir de precursores sanguíneos (ver Tabla N° III), en el epitelio secretor monoestratificado que tapizan el lumen de los alvéolos formadores de leche, que reunido a su vez en lobulillos y éstos en lóbulos, constituyen la glándula mamaria de la vaca. La leche así formada es luego drenada al exterior mediante una gran cantidad de conductos galactóforos, desembocando en la cisterna de la glándula y de ésta luego de pasar por la cisterna del pezón, es removida por la succión del ternero para su alimentación o por medios mecánicos (máquinas de ordeño) a tanques de almacenamiento refrigerados en los tambos. A manera de ilustración, en las Figuras N° 7, 8 y 9, se presentan esquemas simplificados de las más importantes estructuras anatómicas y citológicas de la glándula mamaria.



Figura N° 7. Macro estructura de la glándula mamaria

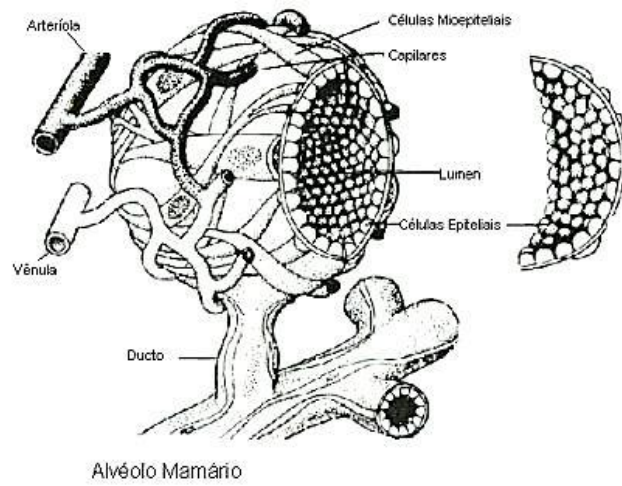


Figura Nº 8. Alvéolo secretor

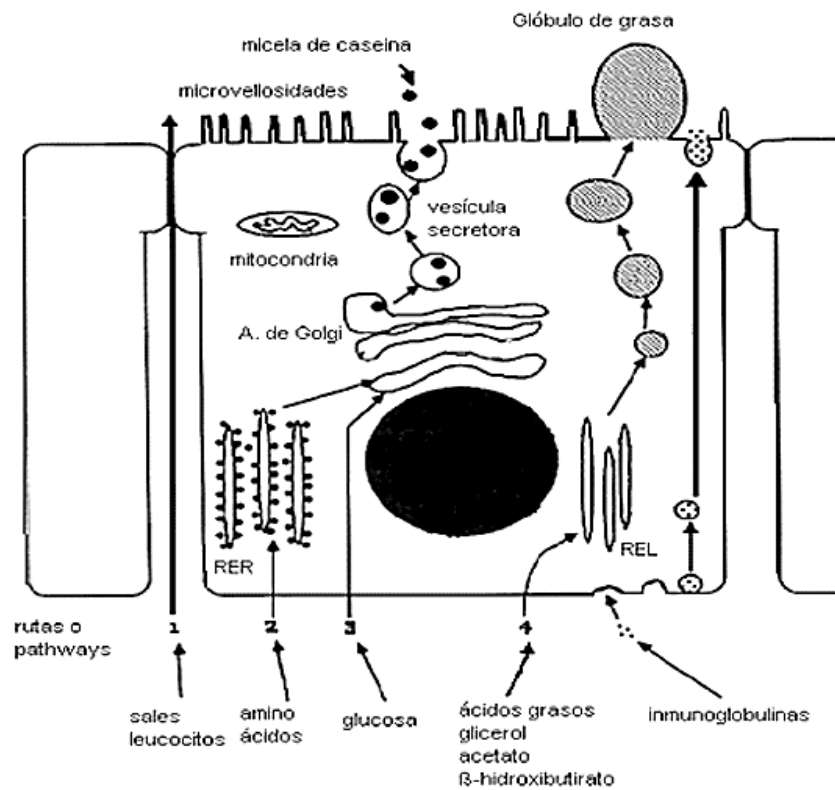


Figura Nº 9. Célula secretora mamaria

Tabla Nº III. Componentes de la leche y sus precursores de la sangre

Componentes de la leche	Contenido (g. / Kg.)	Precusores del plasma sanguíneo	Contenido (g. / Kg.)
Agua	860	Agua	910
Lactosa	46	Glucosa	0,5
Proteínas			
Caseínas	26		
β - Lactoglobulina	3,2	Aminoácidos	0,4
α - Lactoalbúmina	1,2		
Lactoferrina	0,1		
Albúmina	0,4	Albúmina	32,0
Inmunoglobulinas	0,7	La > parte son los mismos 15 aminoácidos, vitaminas (en parte)	
Enzimas	Vestigios		
Grasa			
Triglicéridos	38	Acetato	0,1
Fosfolípidos	0,3	β – Hidroxibutirato	0,06
Citrato	1,6	Lípidos	2,0
		Glucosa	0,5
Minerales			
Ca	1,3	Ca	0,1
P	0,9	P	0,1
Na	0,4	Na	3,4
K	1,5	K	0,3
Cl	1,6	Cl	3,5

(Walstra, P. y Jennes, R. 1987).

1.12 Origen de los precursores sanguíneos

Glucosa: la glucosa sanguínea que se utilizará para la síntesis de la lactosa en las células secretoras mamarias, proviene de la gluconeogénesis hepática a partir del ácido propiónico ruminal, de la hidrólisis enzimática del almidón pasante en el intestino delgado y de la interconversión de la reserva corporal animal.

Aminoácidos: los aminoácidos empleados en la biosíntesis de las proteínas lácteas sintetizados de novo en el sistema endoplásmico rugoso y con terminación de su estructura micelar en vesículas de Golgi y vesículas secretoras de la célula, tienen como origen a la hidrólisis enzimática de la proteína bacteriana, de la proteína dietética pasante en el intestino delgado y de la movilización de la reserva corporal e interconversión de nutrientes.

Ácidos Grasos y Triglicéridos: los ácidos grasos y triglicéridos que serán utilizados por la célula secretora para producir la biosíntesis de la grasa de la leche, provienen del acetato y β hidroxibutirato de la fermentación de los hidratos de carbono estructurales en el rumen, de la hidrólisis de la grasa dietética en el intestino delgado, de las AGNES (ácidos grasos no esterificados) provenientes de la movilización de la reserva corporal y de los β hidroxibutiratos (cuerpos cetónicos) que derivan de la β oxidación de la grasa de reserva corporal.

1.13 Composición Química de la Leche de Vaca

Algunas de las propiedades físicas, limitan la composición química de la leche, por ejemplo, la presión iso-osmótica que tiene con la sangre ya que la suma de las concentraciones de los solutos de ambos líquidos es aproximadamente $0,3 \text{ mol.Kg}^{-1}$ de agua (Walstra, P. y Jenness, R. 1987).

En la sangre, los iones Cl y Na son los principales contribuyentes de la presión osmótica; mientras que en la leche lo son la lactosa, K, Na y Cl; siendo la biosíntesis de la lactosa el principal regulador del contenido de agua de la leche. Otra limitación física a la composición es el punto de fusión de la grasa láctea que no debe superar la temperatura corporal ($37 - 40 \text{ }^\circ\text{C}$) (Walstra, P. y Jenness, R. 1987) para poder drenar de la glándula mamaria y de esa manera cumplir la función fisiológica en la alimentación de la cría.

1.14 Variabilidad de la composición química de la leche

La variación de la composición de la leche depende de varios factores: raza del animal lechero, potencialidad genética, nutrición, salud general y mamaria, edad, estadio de la lactación, tecnología del ordeño y circunstancias medio ambientales, entre otros.

El componente de la leche que más varía es el contenido de grasa; éste es el que posee mayor dependencia de la dieta del animal, quizás por tener como función biológica, suministrar principalmente energía en la crianza del ternero lactante.

Los componentes más estables de la composición química de la leche y menos dependientes de la dieta, en orden decreciente de variabilidad son: las proteínas, la lactosa y el contenido de minerales; esto es debido a sus funciones fundamentales de constituir la estructura ósea y plástica de los procesos vitales de la cría, que aún frente a severas restricciones alimenticias de la vaca, la leche deberá procurar mantener la integridad nutricional esencial para el crecimiento y desarrollo de la cría en la etapa lactante. En la Tabla N° IV se presenta la composición química promedio de las principales especies de rumiante productoras de leche.

Tabla N° IV Composición promedio de leches de vacas, cabras y ovejas (según Jarrige et.al., 1978).

Elementos constitutivos de la leche	Vaca	Cabra	Oveja
Agua (g. / Kg.)	871	886	816
Materia Seca (g. / Kg.)	129	114	184
Lactosa (g. / Kg.)	48,0	43,0	44,0
Materia Grasa (g. / Kg.)	40,0	32,0	73,0
Proteínas Totales (g. / Kg.)	33,5	30,0	58,0
Cenizas (g. / Kg.)	7,5	8,0	9,0
Calcio (g. / L.)	1,25	1,30	1,90
Fósforo (g. / L.)	0,95	0,90	1,50
Magnesio (g. / L.)	0,12	0,12	0,16
Potasio (g. / L.)	1,50	2,00	1,25
Sodio (g. / L.)	0,50	0,40	0,45
Cloro (g. / L.)	1,10	1,30	1,20

(tomado de Taverna, M. y Coulon, J. 2000).

1.15 Composición de la leche de la Cuenca de Villa María, Córdoba

En Argentina, el contenido de los principales componentes de la leche de importancia lactocasearia (grasa y proteínas) varían según las cuencas lecheras, pero las diferencias observadas en promedio, no resultan de mucha significación, dependiendo del manejo nutricional de los animales en los distintos sistemas de producción primaria: sistemas de base pastoril con variados niveles de suplementación de forrajes conservados más concentrados energéticos (granos de maíz, sorgo y balanceados comerciales) y sistemas intensivos con alimentación RTM (Ración Totalmente Mezclados) con confinamiento de las vacas en corrales a cielo abierto o en galpones. La caracterización de la composición química promedio de la leche producida en la cuenca de Villa María se presenta la Tabla N° V.

Tabla N° V. Composición química de la leche en la Cuenca de Villa María

Componente	Promedio (%) ± DS	% Mín	% Máx
Materia Grasa	3,6 ± 0,2	2,9	4,1
Proteínas Totales	3,3 ± 0,2	2,6	3,7
Lactosa	4,8 ± 0,2	4,0	5,1
Sólidos Totales	12,5 ± 0,3	9,3	13,3
Sólidos Totales No grasos	9,0 ± 0,2	7,9	11,0

(Pécora, R. 2008, tomado de Dalla Costa, C. 2012)

1.16 Propiedades físicas de la leche

Los valores principales de las propiedades físico – químicas de la leche de vaca, obtenida de animales sanos y bien alimentados se muestran en la Tabla N° VI.

Tabla N° VI. Principales propiedades físico – químicas de la leche

Densidad	1.028 - 1.035
pH	6,5 - 6,8
Punto de Congelación	-0,52 - 0,54
Punto de Ebullición	100,17 °C
Conductibilidad Eléctrica	0.05 Ohm
Potencial Redox	+20 +30
Acidez Natural Titulable	15 – 17°D
Índice de Refracción	1,3419 a 1,3427

(Alais, C. 1971 y Mahaut, M. y otros. 2003)

1.17 Grasa Láctea

El contenido de materia grasa de la leche, se presenta en forma de pequeños glóbulos rodeados por una delgada capa lipoproteica derivada de la membrana apical de las células secretoras de la glándula mamaria. Dicha membrana es arrancada durante el proceso de exportación de la grasa hacia el lumen del alvéolo.

El diámetro de los glóbulos oscilan entre 1 y 10 μm con una concentración aproximada de 10^{10} por mililitro de leche cruda (Schlimme, E. y Buchheim, W. 2002).

El perfil de los ácidos grasos que constituyen la grasa de la leche, varía con la estación del año, la alimentación, estadio fisiológico de la lactancia etc., no obstante, se pueden establecer valores promedio en la leche cruda producida en la cuenca lechera central de la Argentina, como se indican en la Tabla N° VII.

Tabla N° VII. Perfil de Ácidos Grasos

Perfil de Ácidos Grasos	Concentración (g. / 100 g. de Ácidos grasos Totales)
Cadena corta saturados (C4 – C12)	9,41
Cadena media y larga saturados (C14 – C18)	51,75
Insaturados (un doble enlace)	28,08
Poliinsaturados (más de un doble enlace)	4,17

(Taverna, M. 2001, tomado de Dalla Costa, C. 2012)

1.18 Fracción nitrogenada

La fracción nitrogenada de la leche está representada por dos grandes grupos: las proteínas totales y el nitrógeno no proteico. Éstos constituyentes pueden observarse en la Tabla N° VIII.

Tabla N° VIII. Constituyentes de la Fracción Proteica

	Valores promedios	
	g. por litro	Relativos
Fracción nitrogenada	32,0	100
I. Proteínas		
A – Caseínas	25	78 100
a- Caseína alfa s1		9 36
b- Caseína alfa s2		2,5 10
c- Caseína beta		8,5 34
d- Caseína kapa		3,2 13
e- Caseína gamma 1, 2, 3		1,75 7
B – Proteínas de lactosuero	5,4	100
B-1- Albúminas		
a- Beta lactoglobulina		2,70 50
b- Alfa-lactoalbúmina		1,20 22
c- Suero-albúmina		0,25 5
B-2- Globulinas inmunes		0,65 12
B-3- Proteasas peptonas		0,60 10
II. Sustancias nitrogenadas no proteicas	1,6	5

(Alais, C. 1984, tomado de Taverna, M. y Coulon, J. 2000).

El contenido de nitrógeno en la leche de vaca es de 5,3 g. por Kg.; de éste, alrededor del 95% forman el total de las proteínas, siendo la principal fracción las diferentes variantes de las caseínas, que representan aproximadamente el 80% del nitrógeno total.

1.19 Caseínas

En función del rol fundamental que cumplen las caseínas de la leche en los diferentes procesos tecnológicos lactocasearios, resulta de interés describir, aún de manera somera, las características estructurales y sus modificaciones sufridas durante la elaboración de los diferentes tipos de quesos obtenidos por precipitación enzimática y/o ácida.

Si bien no existe acuerdo sobre el tamaño y peso molecular de las micelas, se sostiene que las mismas podrían oscilar entre 30-300 nm de diámetro y 250.000 g./mol⁻¹ de peso molecular (Holt, C. 1985; Schmidt, D. 1982; Schmidt, D. y Payens, T. 1976). Las micelas de caseína podrían estar formadas por 20 a 300.000 moléculas de caseína y el número contenidas en un mililitro de leche, alcanzaría a 10¹⁴.

La organización de las moléculas de caseína en micelas aún no se conoce adecuadamente y se han sugerido varios modelos, de los cuales, los más conocidos son:

- Modelo de submicelas (Schmidt, D. 1982).
- Modelo de la capa pilosa (Holt, C. 1992)
- Modelo de doble enlace (Walstra, P. 1999)
- Modelo de interacciones duales (Horne, D. 1998)

En la figura N° 10. se puede observar la estructura micelar de la caseína según Schmidt.

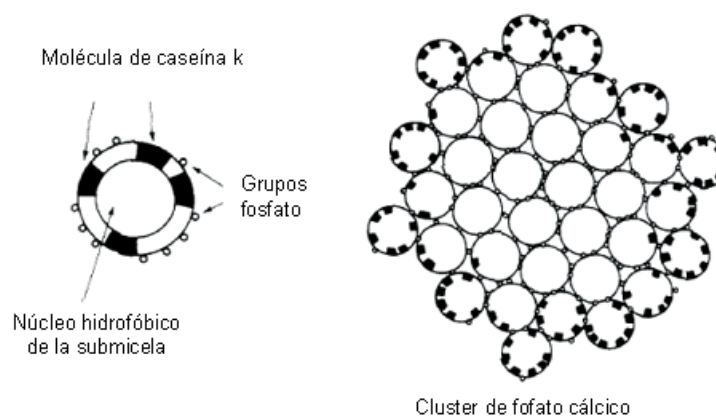


Figura N° 10. Estructura de la micela de caseína según Schmidt, D. (1982).

La agregación entre las submicelas está favorecida por la presencia de sitios fosfoserilos que poseen afinidad con el calcio (Mahaut, M. y otros 2003).

Las micelas de caseína tienen carácter ácido y a pH normal de la leche poseen exceso de cargas negativas; en consecuencia, las repulsiones electrostáticas se oponen a su acercamiento y agregación contribuyendo de esa manera a la estabilidad de su dispersión coloidal.

Las caseínas pueden ser precipitadas de su suspensión coloidal de dos formas diferentes: coagulación ácida y coagulación por vía enzimática; los productos obtenidos son totalmente diferentes tanto desde el punto de vista químico como nutricional.

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.

Éste tipo de precipitación es la que se obtiene mediante el proceso de elaboración de la ricotta a partir suero de queso más el agregado de leche entera o descremada, como habitualmente se produce en las industrias lácteas en Argentina. En la elaboración de la ricotta del presente trabajo experimental, se utilizó un procedimiento similar de precipitación a partir de leche entera y descremada contaminada artificialmente con AFM1.

1.20 Coagulación por vía enzimática

La coagulación enzimática de las caseínas de la leche es el procedimiento habitual y generalizado en la elaboración de casi todos los tipos de quesos madurados o no madurados del mercado. El precipitado logrado es el **para-caseinato fosfocálcico**.

La transformación de la leche del estado líquido al estado de gel por medio de la acción de enzimas proteolíticas de origen animal y/o vegetal, ocurre en tres etapas: fase primaria o enzimática, fase secundaria o agregación de micelas desestabilizadoras y fase terciaria o fase de reticulación (Mahaut, M. y otros 2003).

La fase primaria enzimática, desencadena la coagulación mediante la acción de la enzima proteolítica hidrolizando la caseína κ (capa) entre la unión de la fenilalanina (105) y la metionina (106) con liberación del caseino-macropéptido- hidrófilo (CMP).

En la fase secundaria ocurre la coagulación propiamente dicha cuando el pH llega a 6,6, en ese momento alrededor del 90% de la κ (capa) caseína es hidrolizada; en éste punto las micelas pierden el carácter hidrofílico; las uniones hidrófobas y electrostáticas se estabilizan entre las micelas modificadas preparando la formación del gel (Mahaut, M. y otros 2003).

En la fase terciaria, se observan profundas reorganizaciones de las micelas caseínicas por medio de las uniones fosfocálcicas y puentes disulfuro entre las paracaseínas. El coágulo formado está constituido por una red tridimensional estable e irreversible, (diferencia con la precipitación ácida que bajo ciertas condiciones puede ser reversible) que retiene los glóbulos de la grasa y el resto de los componentes de la leche no solubles en el suero.

1.21 Efecto del tratamiento térmico sobre la estructura y estabilidad de la leche y sus principales componentes

Los tratamientos térmicos aplicados a la leche han estado originalmente y aún en la actualidad, destinados a proveer a la alimentación humana de un producto inocuo para la salud, destruyendo los microorganismos patógenos e incrementando la vida útil del producto por disminución del contenido total de gérmenes que constituyen la flora láctica normal de la leche.

La estabilidad térmica de la leche, depende de varios factores como lo son la carga bacteriana, enzimas proteolíticas, contenido de sólidos totales, concentraciones de sales, albúminas, globulinas, pH y acidez titulable entre otros.

Con el aumento de la intensidad del tratamiento térmico de la leche se producen varias modificaciones y transformaciones de sus componentes. Los más sensibles son las enzimas libres y las proteínas del lactosuero (un 20% y 50% se desnaturalizan con temperaturas de la pasteurización y ultrapasteurización respectivamente) le siguen en orden decreciente las enzimas ligadas a las micelas y glóbulos grasos; las caseínas, lactosa y los lípidos (Badui Dergal, S. 1999).

Las caseínas a pH normal de leche son sumamente estables y es necesario someterlas a temperaturas drásticas y a tiempos prolongados para desnaturalizarlas, temperaturas que no son aplicables en los procesos tecnológicos de la industria láctea. Ésta condición de estabilidad térmica va variando a medida que desciende el pH hasta llegar al punto isoeléctrico (pH=4,6) donde precipita totalmente.

1.22 Queso Ricotta

La ricotta es un producto lácteo elaborado originalmente 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 elaborado 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; que en un principio fue la mozzarella, pecorino y provolone, y que luego se generalizó con otros tipos de quesos. Este producto también se lo denominó “requesón”, producto lácteo similar al queso, obtenido como consecuencia de un segundo procesamiento de la leche, es decir del suero resultante de la elaboración del queso; su nombre deriva del Italiano Ricotta y este a su vez del Latin Recocta, “recocida” que significa doble cocción o recocado.

En nuestro país, al igual que en EEUU, el queso ricotta se elabora de manera diferente que en Italia, es decir, 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, mediante el calentamiento de la leche a 90 °C con el agregado de un ácido orgánico, generalmente ácido acético, hasta llegar al punto isoelectrico 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 (Dianda, M. A. 2002). 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 y uniforme. (INTI. 2011).

El Código Alimentario Argentino (CAA) en su Artículo 614 - (Resolución Conjunta SPReI y SAGyP N° 98/2010 y N° 800/2010), define que: “Con la denominación de Ricotta o Ricota, se entiende el producto obtenido por precipitación mediante el calor en medio ácido producido por acidificación, debida al cultivo de bacterias lácticas apropiadas o por ácidos orgánicos permitidos a ese fin, de las sustancias proteicas de la leche (entera, parcial o totalmente descremada) o del suero de quesos.

Deberá cumplir con las siguientes exigencias:

a. Masa: compacta, finamente granulosa, desmenuzable; sabor y aroma poco perceptibles; color blanco-amarillento uniforme.

- b. Estabilización mínimo 24 hs.
- c. Forma: de acuerdo con el envase. El envase será bromatológicamente apto de conformidad con el presente Código con materiales adecuados para las condiciones previstas de almacenamiento y que confieran una protección apropiada contra la contaminación.
- d. Se mantendrá en fábrica y hasta su expendio a una temperatura inferior a 10° C.
- e. Queda prohibido su fraccionamiento en los lugares de expendio.
- f. Rotulado: Deberá efectuarse en conformidad con las exigencias establecidas en el presente Código.

Se reconocerán tres variedades, las que deberán responder en su rotulado y composición a las siguientes:

- Ricotta o Ricota de Leche Entera:

agua, máx.: 75,0%

grasas: 11,1-13,0%

- Ricotta o Ricota de Leche Semidescremada:

agua, máx.: 77,0%

grasas: 5,0-11,0%

- Ricotta o Ricota de Leche Descremada:

agua, máx.: 80,0%

grasas: menos de 5,0%

- g. La ricotta o ricota elaborada con suero de quesos podrá ser adicionada de leche y/o crema.

Se reconocen tres variedades, las que deberán responder en su rotulado y composición a las siguientes:

- Ricotta o Ricota con Crema:

agua, máx.: 75,0%

grasas: más de 11,0%

- Ricotta o Ricota Semigrasa:

agua, máx.: 77,0%

grasas: 5,0-11,0%

- Ricotta o Ricota Magra:

agua máx.: 80,0%

grasas: menos de 5,0%

Es conveniente resaltar, la gran diferencia tanto desde el punto de vista tecnológico como nutricional, entre el queso propiamente dicho y la ricotta o queso símil o queso ricotta según se define en el Código Alimentario Argentino en sus Art. 605 y 614 (CAA. 2006).

El queso es un producto lácteo obtenido a partir de la leche estandarizada, según el tipo de queso a elaborar, fermentada con cultivos lácticos seleccionados y coagulada mediante la enzima quimosina o renina, contenida en el cuajo de origen animal, pudiéndose utilizar también otras enzimas de origen bacteriano y fúngico. El precipitado (cuajada o coagulo) proteico obtenido en este caso, es totalmente diferente al de la ricotta; mientras que en el queso el precipitado obtenido es un complejo llamado paracaseinato fosfocalcico, muy rico en calcio y fósforo, el precipitado proteico en medio ácido como ocurre en el caso de la ricotta es fuertemente desmineralizado.

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.

Con respecto a la utilización del suero proveniente de la elaboración de quesos en Argentina, se considera de interés, hacer algunas consideraciones y/o reflexiones sobre la problemática del suero de queserías, especialmente, sobre la evolución histórica de su aprovechamiento. En principio se debe señalar que existen dos tipos de suero, según su procedencia:

- Suero Dulce: con pH entre 6 y 6,8
- Suero Ácido: con pH entre 3,57 a 4,34 (INTI. 2013).

En ambos casos, el suero constituye aproximadamente entre el 83 y 85 % del volumen de la leche utilizada para la elaboración de quesos. El lactosuero significó durante muchos años un desecho o efluente que era vertido sin control alguno, en zanjas y lagunas, produciendo graves daños al medio ambiente y a las poblaciones

vecinas a las plantas elaboradoras de quesos. Posteriormente y a raíz de este problema y debido a razones económicas, el suero fue aprovechado en parte para la alimentación de porcinos; esto a su vez, generó serios problemas de higiene e inocuidad de los productos lácteos; porque las industrias queseras asociaron a las plantas elaboradoras, el negocio de la cría de cerdos, que por razones de comodidad, se instalaron muy próximos a las fábricas.

A lo largo de las últimas décadas, esta situación fue revirtiéndose paulatinamente, debido a la aparición de nuevas tecnologías para el procesamiento del suero lácteo (microfiltración, nanofiltración y ultrafiltración) que permitieron obtener derivados del suero, como lactosa, concentrados proteicos de alto valor biológico, entre otros subproductos, para ser utilizados en la industria farmacéutica y como ingredientes en diversos productos alimenticios, en razón a su importante valor nutricional.

No obstante la evolución mencionada, aun hoy hay importantes volúmenes de suero provenientes de las industrias lactocasearias, generalmente de pequeña y mediana capacidad de procesamiento, son vertidos al medio ambiente, pese a que este “desecho” contenga aproximadamente el 50 % de los nutrientes de la leche (INTI, 2013).

En la industria quesera Argentina, se utiliza abundantemente el suero de queso más el agregado de leche y/o crema con la finalidad de aumentar el rendimiento de la ricotta. El suero de la elaboración de múltiples tipos de quesos, está claramente definido en el Código Alimentario Argentino (CAA) en su Artículo 582 - (Res 879, 5.6.85): "Con la denominación de Sueros de Lechería, se entienden los líquidos formados por parte de los componentes de la leche, que resultan de diversos procesos de elaboración de productos lácteos, a saber:

1. Suero de queso: es el subproducto líquido proveniente de la elaboración de quesos.
2. Suero de manteca: es el subproducto líquido proveniente del batido de la crema en la obtención de manteca.
3. Suero de caseína: es el subproducto líquido proveniente de la elaboración de caseínas.

4. Suero de ricotta: es el líquido resultante de precipitar por el calor, en medio ácido, la α lactoalbúmina y la β lactoglobulina del suero de queso.

Cuando estos productos se utilicen como materias primas para la elaboración de productos alimenticios, deberán ser pasteurizados o esterilizados antes o durante el proceso de elaboración de dichos productos, no debiendo presentar un recuento mayor de 100 bacterias coliformes/g después del tratamiento térmico.

Queda prohibido alimentar animales con sueros de lechería que no hayan sido pasteurizados o esterilizados. Se exceptúa de esta exigencia los sueros provenientes de procesos de elaboración en los que se aplicaron dichos tratamientos."

Según estudios realizados por el Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI 2013), la composición del lactosuero, promedio, de las industrias queseras Argentinas, es como se muestra en la Tabla N° IX.

Tabla N° IX. Composición del suero de leche

	Materia Seca (%)	Proteína (%)	Cenizas (%)	Lactosa (%)	pH
Suero de leche dulce	6,70	0,61	0,52	4,99	6,10
Suero de leche ácido	6,42	0,54	0,60	4,39	4,70

(INTI, 2013)

1.23 Proceso de elaboración de la Ricotta

El proceso de elaboración de la ricotta, comienza con la mezcla del suero de queso con cantidades variables de leche entera o descremada, en los equipos floculadores. Luego se incrementa paulatinamente la temperatura, con suave agitación hasta los 65°C, se corrige la acidez a 7° D a pH 6,6 con hidróxido de sodio (Na OH 1.0N) con el fin de evitar la precipitación anticipada de las caseínas de la leche (Finten, F. 2015).

Se continúa el calentamiento hasta llegar a los 90°C, momento en que se le agrega una solución de un ácido orgánico (ácido acético, cítrico, láctico y tartárico, entre otros) hasta lograr la disminución del pH a 4,6 – 4,7 momento en que precipitan las proteínas de la leche y del suero del queso; resulta conveniente que el descenso de pH no sea muy drástico (menos de 4,5) debido a que podrían degradarse totalmente las estructuras de las proteínas, impidiendo la formación de gránulos de proteína coagulada lo suficientemente grandes para poder ser filtradas y recolectadas adecuadamente (Monsalve, J. y otro 2005). También puede agregarse solución de cloruro de calcio (CaCl_2) para facilitar la precipitación y formación de los gránulos de ricotta.

Luego de la coagulación, se deja reposar por un intervalo de 10-15 minutos y se procede a su recolección mediante el filtrado, quedando como residuo el suero de dicha elaboración; finalmente la cuajada se deja enfriar y desuerar. Éste producto puede ser salado para otorgarle mejor perfil sávido-aromático, a la vez que contribuye a regular la humedad y a controlar el desarrollo de ciertos microorganismos indeseables como las bacterias proteolíticas.

El último paso del proceso es el empaque para su posterior distribución al mercado, siempre en condiciones de refrigeración, habida cuenta de su alto porcentaje de humedad, que la convierte en un producto lácteo sumamente perecedero. La composición química promedio puede verse en la Tabla N° X.

Tabla N° X. Composición promedio de la ricotta de suero de queso más leche elaborada industrialmente

Ricotta con leche entera + crema		Ricotta Magra	
Proteínas	10%	Proteínas	12%
Grasas Totales	17%	Grasas Totales	4%
Carbohidratos	4%	Carbohidratos	6%
Sodio	116 mg.	Sodio	120 mg.
Calcio	300 mg.	Calcio	530 mg.

La composición observada en la Tabla N° X puede variar de acuerdo al porcentaje de leche entera y/o descremada, agregadas al suero de queso; modificándose en consecuencia el rendimiento quesero de éste producto.

A los efectos de esquematizar el proceso de elaboración, se presenta el siguiente diagrama de flujo Figura N° 11.

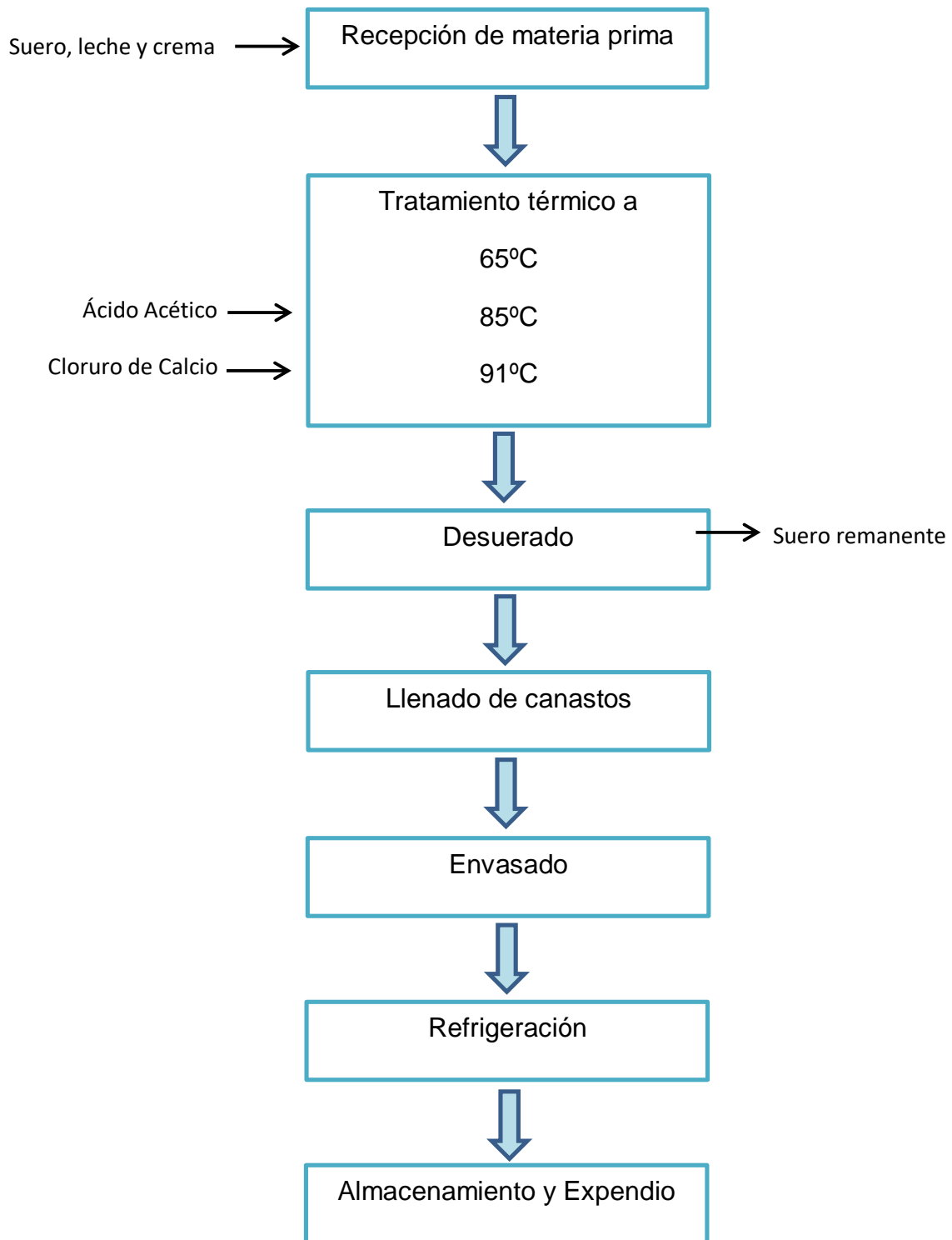


Figura N° 11: Diagrama de flujo: Elaboración industrial de ricotta (Finten, F. 2015).

Cabe consignar que la originalidad pretendida en el presente trabajo, radica en la investigación de la estabilidad de la AFM1 y su reducción en la elaboración del queso ricotta; habida cuenta que la mayoría de los trabajos realizados fueron hechos en quesos con precipitación enzimática y a valores ligeramente ácidos de pH y temperaturas moderadas, observándose en la mayoría de ellos una marcada afinidad de la AFM1 por las macromoléculas de las caseínas con enriquecimiento de la concentración de AFM1 en el precipitado proteico, respecto a la leche de origen. En cambio en el proceso convencional de la elaboración de ricotta a partir de suero de queso más el agregado de leche entera y/o descremada, la acción conjunta de las altas temperaturas (entre 85° y 95°C) y los bajos pH (entre 4,6 y 3,8) observados en la elaboración del queso ricotta modificarían la afinidad de la AFM1 con las proteínas de la leche.

En razón de ello, es que se plantea en el presente trabajo de investigación, realizar ensayos sobre el proceso de elaboración del queso ricotta con el objetivo de determinar el grado de estabilidad de la AFM1 y posible reducción de la actividad tóxica y procurar establecer un punto crítico de control en el proceso de elaboración de queso ricotta, minimizando el impacto negativo que la misma tiene sobre la salud del consumidor.

Por razones de factibilidad operativa y mayor ajuste a los objetivos planteados en la presente investigación, se prefirió elaborar la ricotta a partir de leche entera y descremada.

2. Antecedentes

2.1 Antecedentes sobre estabilidad y partición de la AFM1 en leches y productos lácteos

Respecto a la estabilidad y partición de la AFM1 en leche y derivados lácteos existen una gran cantidad de trabajos y ensayos realizados con distintas especies de rumiantes lecheros: bovinos, ovinos y caprinos. Iha, M. H. y otros (2013) no encontraron efectos sobre la estabilidad de la AFM1 en el proceso de fermentación durante la elaboración de yogur.

Por otra parte en la elaboración de quesos, se observó que la concentración de AFM1 fue 1,9 veces mayor que en la leche de origen. Cavallarin, L. y otros (2014) en un ensayo sobre transferencia de AFM1 desde la leche contaminada natural y artificialmente con 10, 50 y 200 ng/L a tres tipos diferentes 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. En todos los casos la concentración de AFM1 en los quesos estuvieron positivamente correlacionados con las concentraciones en las leches utilizadas.

En la elaboración del queso fresco Minas de Brasil, a partir de leche contaminada con 0,250 0,500 $\mu\text{g AFM1 mL}^{-1}$, se midieron niveles en el queso 2,5 veces superior a la leche empleada (Fernandes, A. M. y otros 2012). Estos mismos autores no encontraron influencia sobre las concentraciones y estabilidad de AFM1 en los quesos cuando se les agregó cultivos iniciadores y se los estacionó por más de 30 días.

Manetta, A. C. y otros (2009) estudiaron la distribución de la AFM1 durante el proceso de elaboración del queso italiano Grana – Padano a partir de leche naturalmente contaminada, con niveles de 30 – 98 ng de AFM1/Kg.; los resultados experimentales mostraron que en comparación a la leche utilizada en la elaboración, las concentraciones de AFM1 en la cuajada y en el queso madurado fue de 3 y 4,5 veces superiores; mientras que en el suero del queso los niveles de AFM1 decrecieron en un 40%; señalando que la concentración de AFM1 en leche podría ser un buen predictor del destino de los productos lácteos.

Battaccone, G. y otros (2005) en un estudio realizado en ovejas para estimar la transferencia de AFB1 de los alimentos ingeridos por el animal a la leche y de ésta a la cuajada y suero, encontraron una lineal correlación entre la concentración de AFM1 en leche y la AFB1 en los alimentos ingeridos por el animal como así también entre la AFM1 contenida en la leche, la cuajada y el suero. Otros estudios tendientes a demostrar la minimización del contenido de AFM1 en el queso salado blanco iraní (Mohammadi, H. y otros 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, O. (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% respectivamente de la contaminación inicial.

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 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 y aunque trabajos de relevamientos sobre niveles de contaminación de AFM1 en leche cruda producida en tambos de la principal cuenca lechera de Argentina, han demostrado que no constituyen un serio problema para la salud pública (Michlig, N. y otros. 2016); 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, P. y otros (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 y otros (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.

No obstante los resultados obtenidos por los autores mencionados, otra importante cantidad de estudios, difirieron de estos resultados sobre la partición de la AFM1, mencionando que durante la elaboración del queso, el 86%, 61%, 66% de la AFM1 contenida en la leche pasaron al suero.

López, C. y otros (2001); Blanco, J. y otros (1998); Wiseman, D. y otro (1983) Stoloff, L. y otros (1975) sostuvieron que los conflictos sobre los resultados publicados, podrían deberse a los distintos procedimientos de elaboración de quesos empleados, las técnicas analíticas utilizadas y a los niveles de contaminación de la leche (Device, O. 2007).

Se considera de mucha importancia consignar que la mayoría de los ensayos realizados, citados en el presente trabajo, lo 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. Éstas diferencias, podrían modificar la estabilidad y partición de AFM1 verificadas en la elaboración de los quesos. En tal sentido el presente trabajo intenta aportar información experimental sobre el tema abordado.

Hipótesis

- 1) La acción combinada de temperaturas y tiempos sobre la leche contaminada con Aflatoxina M1 (AFM1) con presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), disminuyen la estabilidad de la toxina.
- 2) En el proceso de elaboración del queso ricotta a partir de leche cruda entera y descremada contaminada con Aflatoxina M1 (AFM1) la acción conjunta de temperatura, bajo pH (4,6) y agregado de Cloruro de Sodio (NaCl), reducen la concentración de la toxina en la cuajada.

Objetivo general

Establecer la estabilidad de la Aflatoxina M1 (AFM1) en leche con adición de peróxido de hidrógeno a temperaturas y tiempos variables, y determinar el porcentaje de detoxificación de la Aflatoxina M1 (AFM1) en la elaboración del queso ricotta a partir de leche entera y descremada con el agregado de diferentes concentraciones salinas a distintas temperaturas.

Objetivos específicos

- 1) Preparar muestras de leche cruda entera y descremada contaminándolas con una concentración de 0,5 ppb de Aflatoxina M1 (AFM1) y con el agregado de 0,05% de peróxido de hidrógeno (H_2O_2).
- 2) Determinar las concentraciones de Aflatoxina M1 (AFM1) en leche con el agregado de 0,05% de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) sometida a tratamientos con diferentes temperaturas y tiempos, mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).
- 3) Preparar y elaborar quesos ricottas en pequeña escala (proceso de laboratorio) a partir de leche entera y descremada contaminadas artificialmente con una concentración de 0,5 ppb de Aflatoxina M1 (AFM1).
- 4) Determinar las concentraciones relativas de Aflatoxina M1 (AFM1) en ricotta entera y descremada, mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

CAPÍTULO II

OBJETIVO ESPECÍFICO 1

“ACONDICIONAMIENTO Y PREPARACIÓN DE LA LECHE”

3.1 Introducción

En los trabajos publicados y citados en el presente estudio, las muestras motivo de ensayo fueron hechas con leches crudas y enteras, con diversas concentraciones de AFM1 y en dos formas diferentes de contaminación: natural y artificialmente. En la preparación de las muestras de leche cruda entera y descremada del presente trabajo se optó por efectuar una contaminación artificial de 0,5 ppb de AFM1 por ser ésta la concentración máxima permitida en el Código Alimentario Argentino (CAA). La utilización de 0,05% de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) agregada a la leche cruda entera y descremada fue una concentración tomada en base a otros ensayos similares, citados en éste trabajo, con el objeto de establecer las posibles pérdidas de actividad de la AFM1 por desnaturalización de las fracciones proteicas de la leche debido al tratamiento.

El objetivo de éste capítulo fue determinar la composición físico-química de la leche utilizada para poder caracterizarla.

3.2 Materiales y Métodos

Recolección de la leche: Para la preparación de las muestras a analizar, se utilizó leche cruda de mezcla de tanque refrigerado producida por la raza Holando Argentino proveniente del tambo escuela de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba. Del volumen total de leche obtenido, se fraccionaron alícuotas de 250 mL que fueron conservadas para su posterior análisis a temperatura de -36°C .

Se tomaron 2 alícuotas de 250 mL de leche cruda y se procedió a descongelarlas; a una fracción se la sometió a un proceso de centrifugación con centrifuga convencional a 3000 rpm durante 20 minutos, para obtener leche descremada la cual se mantuvo a temperatura de refrigeración de 4°C .

Determinación de Grasa (Norma ISO 2446:2008): Se utilizó el butirómetro de Gerber, con calibración de acuerdo a la estandarización DIN 12836 A6 introduciendo en el mismo 10 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) $D= 1,82$, luego 11 mL de leche y finalmente 1 mL de alcohol iso-amílico. El método se basa en la digestión parcial de los componentes de la leche, excepto la grasa; la utilización del alcohol iso-amílico ayuda a separar la interfase con la grasa; luego de someterse a una centrifugación a 1500 rpm. El contenido de grasa es leído directamente en la escala del butirómetro expresándose el valor por ciento en volumen.

Determinación de Proteínas (AOAC 920.105): El método Kjeldahl, método de referencia, es el más usado en la actualidad para el análisis de proteínas, mediante la determinación del nitrógeno total de la muestra. Se procedió a pesar 5 g de leche que se introdujeron en el tubo de digestión con un catalizador, compuesto por sulfato de potasio (K_2SO_4), sulfato de cobre (CuSO_4) y selenio (Se) en una relación 10:1:0,1. A continuación se agregaron 10 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado ($D=1,84$) y se procedió a la digestión a temperaturas progresivas de 100, 200, 300°C hasta alcanzar una temperatura final de 450°C , con un tiempo total de 80 minutos, hasta lograr un color verde esmeralda característico. A continuación se agregaron 90 mL de agua destilada más 50 mL de hidróxido de sodio (NaOH) al 32%, procediéndose luego a su destilación. El destilado fue recibido en 25 mL de una

solución de ácido bórico (H_3BO_3) con indicador Mortimer. Luego se tituló con ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,1N.

Para la conversión de nitrógeno total a proteínas totales se utilizó el factor 6,38.

Determinación de Cenizas (AOAC 923.03): El método se basa en la destrucción de la materia orgánica presente en la muestra por calcinación en mufla regulada a $550 \pm 2^\circ\text{C}$ y determinación gravimétrica del residuo mediante pesaje constante en balanza analítica de sensibilidad 0,1 mg.

Determinación de pH (método potenciométrico): El pH representa la acidez actual (concentración de H^+ libres) de la leche.

La leche de vaca recién ordeñada y sana, es ligeramente ácida, con un pH comprendido entre 6,5 y 6,8 como consecuencia de la presencia de caseínas, aniones fosfórico y cítrico, principalmente (Alais, C. 1971). Estos valores se aplican solamente a temperaturas cercanas a 25°C .

La medición potenciométrica del pH se realizó con un pH-metro digital Checker Hi 98103 de Hanna.

La acidez de la leche está conformada por cuatro factores:

- 1) Acidez debido al contenido de caseínas.
- 2) Acidez debido a ácidos orgánicos y sustancias minerales.
- 3) Reacciones secundarias debidas a fosfatos (reacciones “over-run”).

Estos tres factores representan la acidez “natural” de la leche (Alais, C. 1971).

- 4) Éste factor lo constituye “la acidez desarrollada” debida, principalmente, al ácido láctico y otros ácidos orgánicos derivados de la degradación de la lactosa por acción microbiana.

Determinación de Acidez Titulable (titulación ácido-base expresado en °Dornic; IRAM 14005-1): La acidez se mide por titulación y corresponde a la cantidad de hidróxido de sodio (NaOH) utilizado para neutralizar los grupos ácidos.

El valor obtenido en ésta determinación se expresó en “grados Dornic” (°D), correspondiente al volumen de solución de NaOH 0,9N utilizado para titular 10 mL de leche en presencia de fenolftaleína. Este resultado expresó el contenido en ácido láctico. Como el peso molecular del ácido láctico es 90 g/mol, un °D equivale a 1mg de ácido láctico en 10mL de leche o a 0,01 % de ácido láctico.

Determinación de Densidad (AOAC 925.22): para ésta determinación se utilizó lactodensímetro Quevenne; se vertió la leche en un recipiente cilíndrico colocando el lactodensímetro de modo que ocupase la parte central del líquido hasta que alcanzó el nivel correspondiente, posteriormente se procedió a leer la densidad.

Determinación de Extracto Seco Total (AOAC 925.23): se encuentra constituido por el residuo remanente de la evaporación de las materias volátiles de la leche a la temperatura de ebullición del agua.

A un cristizador de diámetro no menor de 5 cm se le agregó arena de manera que quede una capa delgada en el fondo del mismo. El conjunto se secó en estufa a 102 °C durante 1 hora, se enfrió y taró, luego se agregaron al cristizador 5 mL de leche, exactamente medidos, y se pesó nuevamente. Se evaporó en baño de agua hirviente durante 10-15 minutos; se colocó posteriormente en estufa a 102°C secándose hasta pesada constante.

Determinación de Lactosa: para obtener dicho valor, se realizó el cálculo por diferencia de los valores obtenidos anteriormente de proteínas, grasa, cenizas y extracto seco total.

Determinación de Extracto Seco No Graso: se determinó por diferencia de los valores porcentuales de extracto seco total y grasa, obtenidos anteriormente.

Preparación del estándar (AOAC 970.44 y 971.22) y contaminación de la leche con Aflatoxina M1 (AFM1): A partir de un estándar liofilizado de Aflatoxina M1 Sigma Aldrich de una concentración de 52,3 ppb, se preparó por dilución la solución a emplear de 0,5 ppb de Aflatoxina M1. A partir de dicho estándar, se tomaron las alícuotas correspondientes para contaminar las muestras de leche para los respectivos ensayos, quedando de ésta manera una concentración final en las muestras de leche de 0,5 ppb de Aflatoxina M1.

De la leche contaminada con AFM1 de 0,5 ppb, se dividieron en dos fracciones, agregándole a una de ellas una solución de peróxido de hidrogeno para lograr una concentración final en leche de 0,05% v/v.

3.3 Resultados y Discusión

Los resultados sobre la composición química de los principales componentes de la leche utilizada en el presente trabajo, arrojaron resultados ligeramente inferiores a los publicados por Pécora, R. y otros (2008) en la cuenca lechera de Villa María (Tabla N° V) y muy similar a los valores promedios obtenidos por Taverna M. y otros (2001) en un estudio realizado en la cuenca Central de la Argentina, donde se registraron niveles de 3,15% de materia grasa, 3,17% de proteínas, 4,61% de lactosa, 11,26% de extracto seco total y 0,65% de cenizas. Según los últimos estudios realizados por la Subsecretaría de Lechería, perteneciente a la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca del Ministerio de Agroindustria de la Nación, del año 2016, arrojaron valores de los componentes lactocasearios (proteína y grasa) promedio de las cuencas de Córdoba y Santa Fe de 3,32% de proteínas y 3,5% de grasa; las diferencias analíticas que se observaron con respecto a la leche utilizada en el presente trabajo, pueden deberse a variaciones estacionales de la alimentación del ganado lechero.

Los valores de las determinaciones realizadas a la leche pueden observarse en la Tabla N° XI.

Tabla Nº XI. Características físico-químicas de la leche cruda entera utilizada

Parámetro	Valor (%)
Grasa	3,45
Proteínas	3,13
Lactosa	4,70
Cenizas	0,65
Extracto Seco Total	11,93
Extracto Seco No Grasos	8,48
Densidad	1,032
pH	6,66
Acidez Titulable	16,5°D
UFC/MI	21950
Recuento de Células Somáticas/mL	275350

3.4 Conclusión

Las características físico-químicas y calidad higiénico sanitaria no se diferencian de los estándares de la leche producida en las cuencas de la región pampeana Argentina y en particular de la cuenca lechera de Villa María Córdoba.

CAPÍTULO III

OBJETIVO ESPECÍFICO 2

**“DETECCIÓN DE AFLATOXINA M1 MEDIANTE HPLC EN
LECHE SOMETIDA A DISTINTOS TRATAMIENTOS”**

4.1 Introducción

Desde el descubrimiento de las aflatoxinas y de sus propiedades tóxicas se han realizado muchas investigaciones sobre el desarrollo de métodos para el análisis de estas sustancias. Estos métodos son necesarios para el establecimiento de programas adecuados de control de alimentos, así como para la investigación sobre aspectos relacionados con las aflatoxinas tales como su producción por los hongos aflatoxigénicos o el metabolismo de estas sustancias en los animales (Duarte, S. 2004).

La estructura cumarínica de la aflatoxina y la presencia de grupos cetónicos en la molécula, le confieren dos propiedades importantes para la detección cromatográfica: la polaridad y la fluorescencia bajo luz UV (Céspedes, A. 1997).

Los métodos analíticos para la determinación de Aflatoxinas M1 se pueden dividir en dos grupos principales: métodos de screening y métodos analíticos cuantitativos. El screening utiliza principalmente ELISA (enzimo-inmuno análisis) o el radioinmunoanálisis, raramente utilizado. En la cuantificación se utiliza generalmente la cromatografía de capa fina o la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Maragos, C. y otro, 2010).

La cromatografía líquida es una técnica de separación física en la cual los componentes de una muestra se separan en función de su distinta afinidad entre dos fases, una fase estacionaria contenida en una columna y una fase móvil líquida, normalmente constituida por una mezcla de disolventes de distinta fuerza eluotrópica, que fluye a través de la columna. El proceso cromatográfico ocurre como resultado de una repetición de etapas de absorción/desorción durante el movimiento de los analitos a través de la fase estacionaria. Finalmente, la separación es consecuencia de los diferentes coeficientes de distribución entre los componentes de una muestra, jugando un papel fundamental la elección de la columna y de la fase móvil. El tipo de cromatografía líquida llevada a cabo en este estudio se denomina Cromatografía líquida de alta resolución o *High performance liquid chromatography* (HPLC) (Cavaliere, C., y otros, 2006).

Una mejora introducida a la técnica de HPLC es la variación en la composición de la fase móvil durante el análisis, conocida como elución en gradiente. El gradiente utilizado varía en función de la hidrofobicidad del compuesto y separa los

componentes de la muestra como una función de la afinidad del compuesto por la fase móvil utilizada respecto a la afinidad por la fase estacionaria.

Uno de los tipos de HPLC es la cromatografía en fase reversa, utilizada en este estudio. El HPLC de fase reversa (RP-HPLC) consiste en una fase estacionaria apolar y una fase móvil de polaridad moderada. El tiempo de retención aumenta con la adición de disolvente polar a la fase móvil y disminuye con la introducción de disolventes más hidrofóbico. La cromatografía de fase reversa es tan utilizada que a menudo se le denomina HPLC sin ninguna especificación adicional. Este tipo de cromatografía se basa en el principio de las interacciones hidrofóbicas que resultan de las fuerzas de repulsión entre un disolvente relativamente polar, un compuesto relativamente apolar, y una fase estacionaria apolar. La fuerza conductora en la unión del compuesto a la fase estacionaria es la disminución del área del segmento apolar del analito expuesto al disolvente. Este efecto hidrofóbico está dominado por la disminución de la energía libre de la entropía asociada con la minimización de la interfase compuesto-disolvente polar. El efecto hidrofóbico disminuye con la adición de disolvente apolar a la fase móvil. Esto modifica el coeficiente de partición de forma que el compuesto se mueve por la columna y eluye (Amersham Pharmacia Biotech, 1999).

Aparte de la hidrofobicidad, otras modificaciones de la fase móvil pueden afectar la retención del compuesto; por ejemplo, la adición de sales inorgánicas provoca un aumento lineal en la tensión superficial, y como la entropía de la interfase compuesto-disolvente está controlada precisamente por la tensión superficial, la adición de sales tiende a aumentar el tiempo de retención (GE Healthcare, 2006).

4.2 Materiales y Métodos

Determinación de la Aflatoxina M1: A las muestras preparadas en el Objetivo Específico 1 se las trató de acuerdo a lo establecido por el Método Oficial propuesto por la AOAC 980.21.

Las leches crudas enteras y descremadas contaminadas con 0,5 ppb de AFM1 se dividieron en partes iguales. A tres porciones de leche cruda entera se las trató a tres temperaturas y tiempos distintos (25°C por 1 hora, 65°C por 30 minutos y 90°C por 10 minutos), a las otras tres porciones restantes de la misma leche se le agregó peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 0,05% y se las sometió a los mismos tratamientos de temperatura y tiempo; de igual manera se procedió con las porciones de leche cruda descremada aplicándole los mismos procedimientos anteriormente mencionados.

Una vez concluidos los tratamientos térmicos, a cada muestra se le agregó 1 mL de solución salina al 40% y se agitó para que se homogenizara, posteriormente se adicionaron 12 mL de cloroformo para favorecer la extracción de AFM1, se dejó reposar hasta generarse una separación de fases; de ésta se tomó 250 µL que se colocó en tubo de ensayo y se le agregó 750 µL de solución derivatizadora (Trifluoracético - TFA) y se llevó a baño a 65°C por 8,5 minutos.

Cada una de las muestras anteriormente preparadas fueron inyectadas por duplicado en el HPLC para determinar el contenido de AFM1.

Para este estudio se utilizó un cromatógrafo de alta resolución marca Shimadzu, el cual consta de los siguientes elementos:

- Bomba Shimadzu LC 10AD, adecuada para el volumen de flujo constante de aproximadamente 1 mL/min.
- Sistema inyector, con volumen de inyección de circuito adecuado para la inyección de 0.1 µL a 900 µL.
- Detector de fluorescencia: longitud de onda de emisión y excitación de 335 nm y 440 nm respectivamente.
- Columna Cromatográfica Shim-pack VP-ODS C18 de fase reversa de 250 x 4,6 mm I.D. de 5 µm de tamaño de partícula y 12 nm de tamaño de poro con envase de octadecyl- silica gel.

- Unidad de control del equipo Shimadzu CBM-20A y tratamiento de los datos con el programa software Shimadzu LabSolutions.

Condiciones Cromatográficas en HPLC para el Análisis de AFM1

- Columna: Shim-pack VP-ODS C18 (250 x 4,6 mm I.D).
- Flujo: 1 mL/ min.
- Detector de fluorescencia: Excitación 360 nm. Emisión 440 nm.
- Temperatura de la columna: 40°C.
- Volumen de inyección de la muestra: 25 µL.
- Fase Móvil: Agua milipore : Metanol : Acetonitrilo (65:25:10 v/v).
- Tiempo total de corrida cromatográfica: 7 minutos (Figura N° 12).

4.3 Resultados y Discusión

Los resultados sobre la inactivación de la AFM1 en leche contaminada artificialmente con una concentración de 0,5 ppb más el agregado de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 0,05 % a distintas temperaturas y tiempos de tratamiento, se muestran en las Tablas N° XII, N° XIII y Anexo 1.

Tabla N° XII. Porcentajes de inactivación de la AFM1 en leche cruda entera

MUESTRA	% DE INACTIVACIÓN DE AFM1	% DE AFM1 REMANENTE
Leche Entera Contaminada Artificialmente sin adición de H₂O₂ a 25°C por 1 hora	3,40	96,60
Leche Entera Contaminada Artificialmente sin adición de H₂O₂ a 65°C por 30 minutos	31,23	68,97
Leche Entera Contaminada Artificialmente sin adición de H₂O₂ a 90°C por 10 minutos	28,14	71,86
Leche Entera Contaminada Artificialmente con adición de H₂O₂ a 25°C por 1 hora	29,29	70,71
Leche Entera Contaminada Artificialmente con adición de H₂O₂ a 65°C por 30 minutos	17,90	82,10
Leche Entera Contaminada Artificialmente con adición de H₂O₂ a 90°C por 10 minutos	23,19	76,81

Tabla N° XIII. Porcentajes de Inactivación de la AFM1 en leche cruda descremada

MUESTRA	% DE INACTIVACIÓN DE AFM1	% DE AFM1 REMANENTE
Leche Descremada Contaminada Artificialmente sin adición de H ₂ O ₂ a 25°C por 1 hora	1,20	98,80
Leche Descremada Contaminada Artificialmente sin adición de H ₂ O ₂ a 65°C por 30 minutos	5,30	94,70
Leche Descremada Contaminada Artificialmente sin adición de H ₂ O ₂ a 90°C por 10 minutos	5,93	94,07
Leche Descremada Contaminada Artificialmente con adición de H ₂ O ₂ a 25°C por 1 hora	6,57	93,43
Leche Descremada Contaminada Artificialmente con adición de H ₂ O ₂ a 65°C por 30 minutos	82,64	17,36
Leche Descremada Contaminada Artificialmente con adición de H ₂ O ₂ a 90°C por 10 minutos	75,83	24,17

<Chromatogram>

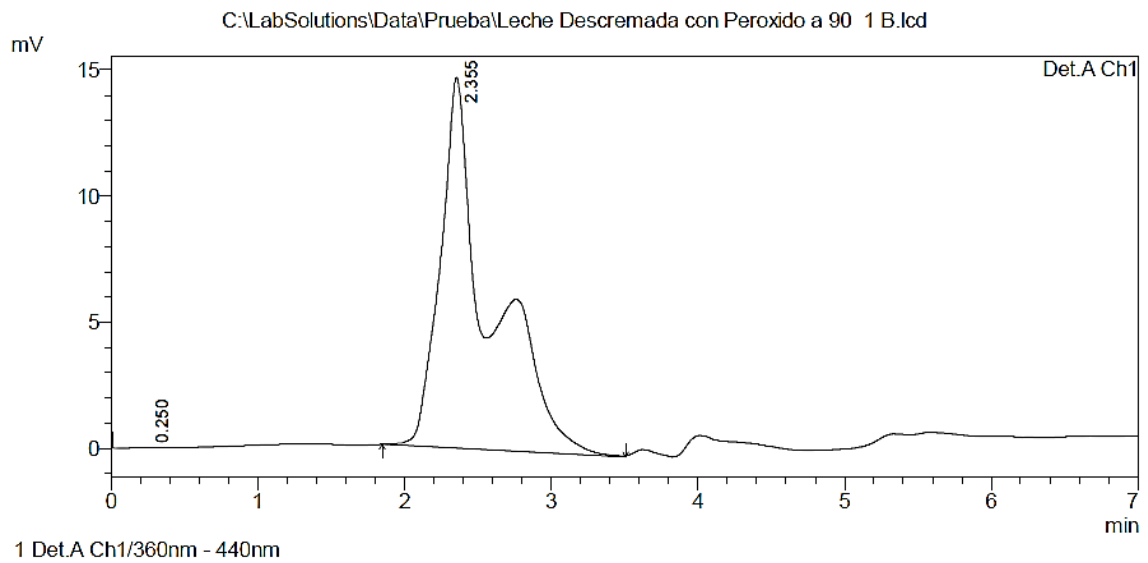


Figura N° 12. Cromatograma obtenido en la detección de AFM1 en leche descremada contaminada artificialmente con AFM1 con adición de peróxido de hidrógeno tratada térmicamente a 90° por 10 minutos.

Si se comparan los distintos tratamientos de tiempo y temperaturas con y sin agregado de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en leches descremada se puede observar que en todas las muestras sin agregado de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el porcentaje de inactivación de AFM1 fue sensiblemente inferior a los valores logrados en las muestras que contuvieron peróxido de hidrógeno (H_2O_2), siendo particularmente relevantes los niveles de inactividad en los tratamientos a $65^\circ C$ durante 30 minutos y a $90^\circ C$ durante 10 minutos con valores de 82,64% y 75,83% respectivamente (Tabla N° XIII). En los tratamientos efectuados en leches crudas enteras, los resultados obtenidos indican que los porcentajes de inactivación de AFM1 entre las leches contaminadas sin y con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) son similares (Tabla N° XII), a excepción del tratamiento a temperatura ambiente ($25^\circ C$) dando el porcentaje de inactivación mayor se observó en la leche con agregado de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), 3,4 % y 29,9% respectivamente.

Applebaum, R. y Marth, E. (1982) aunque con temperatura y tiempos distintos de tratamiento ($30^\circ C$ durante 30 minutos) el porcentaje de inactivación informado fue de 0%; éstos mismos autores realizando tratamientos similares en leche cruda entera contaminada naturalmente con AFM1 pero con una concentración de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 1% a temperatura de $63^\circ C$ durante 30 minutos obtuvieron una inactivación de AFM1 del orden del 11% y utilizando una concentración de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 6% a $30^\circ C$ por 30 minutos de retención, lograron inactivar el 60% de la AFM1 en leche cruda entera y el 83% en leche descremada pasteurizada. Cuando asociaron 5 U (unidades) de lactoperoxidasa (LPO) con 0,05% de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (concentración utilizada en el presente trabajo) el porcentaje de inactivación de AFM1 fue del 47,2%.

Motawee, M. y otros (2006), estudiaron el efecto de distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) con diferentes tratamientos térmicos sobre leche contaminada con AFM1; en los resultados arrojados en esos ensayos se determinó que cuando la leche contaminada con $1,85 \mu g/L$ de AFM1, tratada con 0,06% de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a $90^\circ C$ durante 10 minutos (condiciones similares empleadas en el presente estudio) el porcentaje de degradación de AFM1 fue de 29,7%, lográndose una completa degradación de AFM1 (100%) con la esterilización de la leche a $121^\circ C$ con una retención de 5 minutos y una concentración de 0,1% de peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

Yousef, A. y Marth, E. (1989) explicaron que el mecanismo por el cual el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) reduce la actividad de la AFM1, estaría dado por la habilidad que ésta molécula tiene para generar oxígeno atómico (1O_2), el cual es altamente electrofílico, reaccionando fácilmente con el doble enlace del anillo hidrofurano de la AFM1. También Aman, I. (1992) informó que utilizando peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en distintas concentraciones y temperaturas logró disminuir la actividad de la AFM1 en leche artificialmente contaminada.

El Deeb, S. A. y otros (1992) hallaron que con sólo el tratamiento térmico del orden de $121^\circ C$ durante 15 minutos causó una reducción del 26% de la AFM1 contenida en la leche artificialmente contaminada; mientras que la pasteurización a $90^\circ C$ con una retención de 10 minutos sólo logró degradar el 16% de la toxina.

Resultados aún más significativos en la reducción de la actividad de la AFM1 en la leche se obtuvieron cuando se asoció a una concentración de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 1% con 0,5 mM de riboflavina durante 30 minutos a $30^\circ C$, obteniendo una detoxificación alrededor del 98% (Applebaum, R. y Marth, E. 1982).

4.4 Conclusión

Concluyendo sobre el presente objetivo específico, podría afirmarse que aún con resultados dispares y contradictorios, la mayoría de los trabajos de investigación (incluyendo el presente) realizados sobre éste tema, concuerdan que es factible disminuir el efecto tóxico de la AFM1 en leche destinada a la elaboración de productos lácteos mediante el uso adecuado de bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) asociado a otras sustancias químicas como la lactoperoxidasa (LPO) y riboflavina. Los distintos resultados entre los ensayos realizados, quizás puedan deberse a los diferentes métodos utilizados en el tratamiento de la leche, la forma de contaminación artificial o natural con variadas concentraciones de AFM1 y el sistema de detección empleado.

No obstante ello, se considera de sumo interés continuar con éste tipo de estudio, ampliando la gama de ensayos con diferentes niveles de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) solamente o con el agregado de otras moléculas químicas de uso permitido, con la finalidad de encontrar métodos económicamente viables y

bromatológicamente aceptables, tendientes a establecer un punto crítico de control (PCC) en los diagramas de flujo en la elaboración de los diferentes productos lácteos; todo ello en el entendimiento de que la presencia de AFM1 en leche, aun cuando se apliquen Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) en la producción primaria, seguirá constituyendo un riesgo para la salud pública.

CAPÍTULO IV

OBJETIVO ESPECÍFICO 3

**“ELABORACIÓN DE QUESOS RICOTTAS A PEQUEÑA ESCALA
A PARTIR DE LECHE ENTERA Y DESCREMADA”**

5.1 Introducción

Si bien el proceso de obtención del queso ricotta tradicionalmente es efectuado industrialmente a partir del suero de la elaboración del queso, sin y con el agregado de leche entera, a efecto de aumentar el rendimiento del producto final y bajar los costos por unidad de producción, en el presente estudio se optó por elaborar el queso ricotta a partir directamente de leche entera y descremada productos tipificados por el Código Alimentario Argentino (CAA) y por ser operativamente viables a escala utilizada en éste trabajo.

Para la preparación de las ricottas enteras y descremadas se tomaron 2 alícuotas de 250 mL de leche cruda y se procedió a descongelarlas; a una fracción se la sometió a un proceso de centrifugación con centrífuga convencional a 3000 rpm durante 20 minutos, para obtener leche descremada la cual se mantuvo a temperatura de refrigeración de 4°C hasta su elaboración.

5.2 Materiales y Métodos

Preparación del estándar (AOAC 970.44 y 971.22) y contaminación de la leche con Aflatoxina M1 (AFM1): A partir del estándar de AFM1 preparado en el Objetivo Específico 1, se tomaron las alícuotas correspondientes para contaminar las muestras de leche para los respectivos ensayos, quedando de ésta manera una concentración final en las muestras de leche para la elaboración de ricottas de 0,5 ppb de AFM1.

Preparación del Queso Ricotta: Para la elaboración de las ricottas se utilizaron las leches crudas enteras y descremadas contaminadas con 0,5 ppb de AFM1, las cuales se dividieron en partes iguales. Las ricottas se elaboraron a tres temperaturas diferentes (85°C, 90°C y 95°C) y con diferentes concentraciones salinas de Cloruro de Sodio (NaCl) (0%, 0,75% y 1,5%).

Las leches se llevaron a las diferentes temperaturas deseadas, con su correspondiente concentración salina y se les agregó Ácido Acético glacial al 20% gota a gota con agitación leve hasta lograr la precipitación de las caseínas y

proteínas del suero (pH 4,6). Elaboradas las ricottas fueron sometidas a su caracterización química.

Determinación de Materia Grasa (Norma ISO 2446:2008): El contenido en materia grasa de las ricottas se determinó volumétricamente mediante el método ácido-butírométrico según Van-Gulik (adaptación del Método Gerber). Se pesó y colocó 2,5 g de ricotta (según calibración del butirómetro) en la copa de vidrio en el cuello del butirómetro. Se añadió por la abertura pequeña del butirómetro 15 mL de H_2SO_4 (D= 1,530) hasta que recubrió completamente la copa de vidrio que contiene al queso. Se llevó el butirómetro a baño María a 65-70 °C hasta obtener una completa disolución del queso, agitando suavemente. Una vez disuelto el queso, se retiró el butirómetro del baño María y se añadió 1 mL de alcohol iso-amílico; posteriormente se agregó cantidad necesaria de H_2SO_4 para que el nivel del líquido coincida aproximadamente con el 30-35% de la escala del butirómetro, procediéndose a continuación a una centrifugación durante 5-7 minutos a 1200 rpm. Una vez concluida la centrifugación se realizó la lectura directamente en la escala del butirómetro.

Determinación de proteínas (AOAC 920.105): Para su determinación se utilizó el método de referencia Kjeldahl. Se procedió a pesar 2 g de queso ricotta que se introdujeron en el tubo de digestión con un catalizador, compuesto por sulfato de potasio (K_2SO_4), sulfato de cobre ($CuSO_4$) y selenio (Se) en una relación 10:1:0,1. A continuación se agregaron 10 mL de H_2SO_4 concentrado (D= 1,84) y se procedió a la digestión a temperaturas progresivas de 100, 200, 300°C hasta alcanzar una temperatura final de 450°C, con un tiempo total de 80 minutos, hasta lograr un color verde esmeralda característico. A continuación se agregaron 90 mL de agua destilada más 50 mL de hidróxido de sodio (NaOH) al 32%, procediéndose luego a su destilación. El destilado fue recibido en 25 mL de una solución de ácido bórico (H_3BO_3) con indicador Mortimer. Luego se tituló con H_2SO_4 0,1N.

Para la conversión de nitrógeno total a proteínas totales se utilizó el factor 6,38.

Determinación de pH (método potenciométrico): Se tomó 1 g de la muestra, se trituró y se colocó en un vaso de precipitado con agregado de 10 mL de agua destilada hasta su completa dispersión. La lectura se efectuó con el pH-metro digital Checker Hi 98103 de Hanna, provisto de un electrodo de membrana de vidrio que se introdujo en el queso ricotta dispersa.

Determinación de pH del suero: La medición potenciométrica del pH del suero se realizó directamente sumergiéndolo al pH-metro digital Checker Hi 98103 de Hanna.

Determinación de Extracto Seco Total (AOAC 925.23): A un cristalizador de diámetro de 5 cm se le agregó arena hasta lograr una capa delgada en el fondo del mismo. El conjunto se secó en estufa a 102 °C durante 1 hora, se enfrió en desecador y taró, luego se agregaron al cristalizador 3 g de queso ricotta y se pesó nuevamente. Se evaporó en baño de agua hirviente durante 10-15 minutos; se colocó posteriormente en estufa a 102°C secándose hasta pesada constante.

Determinación de Extracto Seco No Graso: se determinó por diferencia de los valores porcentuales de extracto seco total menos el contenido de materia grasa, obtenidos anteriormente.

Los valores de las determinaciones realizadas a los quesos ricottas pueden observarse en la Tabla N° XIV.

5.3 Resultados y Discusión

Tabla N° XIV. Composición química de los quesos ricotta elaborados a partir de leche entera y descremada contaminados con 0,5 ppb de AFM1

Parámetro	Ricotta Entera Valor (%)	Ricotta Descremada Valor (%)
Grasa	20	3
Proteínas	14,63	21,41
Extracto Seco Total	42,42	38,89
Extracto Seco No Grasos	22,42	35,89
pH	5,10	5,08
pH del Suero	4,6	4,6

5.4 Conclusión

Los resultados analíticos obtenidos de los quesos ricottas elaborados en el presente trabajo fueron, en relación a los quesos ricotta comercializados en los supermercados, similares a excepción del extracto seco total que fue mayor; cabe destacar que la mayoría de los quesos ricottas elaborados industrialmente provienen de suero de queso con el agregado de leche entera o descremada.

CAPÍTULO V

OBJETIVO ESPECÍFICO 4

**“DETECCIÓN DE AFLATOXINA M1 MEDIANTE HPLC EN
QUESO RICOTTA ELABORADO A PEQUEÑA ESCALA”**

6.1 Introducción

La presencia de Aflatoxina M1 (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 (Michlig, N. y otros 2016; López, C. y otros 2001) en minimizar el impacto negativo que dicha toxina posee sobre la salud pública.

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.

Con el objetivo específico de estudiar la estabilidad de la AFM1 y su posible reducción en la cuajada lograda por precipitación ácida (pH: 4,6) de leche entera y descremada contaminada artificialmente con una concentración de 0,5 ppb, se llevó a cabo el presente ensayo.

6.2 Materiales y Métodos

Determinación de la Aflatoxina M1: A las muestras preparadas en el Objetivo Específico 3 se las trató de acuerdo a lo establecido por el Método Oficial propuesto por la AOAC 980.21.

A cada muestra de queso ricotta entera y descremada elaborada a partir de leche contaminada artificialmente con 0,5 ppb de AFM1 se procedió a colocarla en vasos de precipitado, se desmenuzó y posteriormente a cada muestra se le agregó 1 mL de solución salina al 40% y 12 mL de cloroformo para favorecer la extracción de AFM1; se dejó reposar hasta generarse una separación de fases, de ésta se tomó 250 μ L que se colocó en tubos de ensayos agregando 750 μ L de solución derivatizadora (Trifluoracético - TFA) y se llevó a baño a 60°C por 8,5 minutos.

Cada una de las muestras anteriormente preparadas fueron inyectadas por duplicado en el HPLC para determinar el contenido de AFM1 remanente en el precipitado proteico (caseínas + proteínas del suero).

Para este estudio se utilizó un cromatógrafo de alta resolución marca Shimadzu el cual consta de los siguientes elementos:

- Bomba Shimadzu LC 10AD, adecuada para el volumen de flujo constante de aproximadamente 1 mL/min.
- Sistema inyector, con volumen de inyección de circuito adecuado para la inyección de 0.1 μ L a 900 μ L.
- Detector de fluorescencia: longitud de onda de emisión y excitación de 335 nm y 440 nm respectivamente.
- Columna Cromatográfica Shim-pack VP-ODS C18 de fase reversa de 250 x 4,6 mm I.D. de 5 μ m de tamaño de partícula y 12 nm de tamaño de poro con envase de octadecyl- silica gel.
- Unidad de control del equipo Shimadzu CBM-20A y tratamiento de los datos con el programa software Shimadzu LabSolutions.

Condiciones Cromatográficas del HPLC para el Análisis de AFM1

- Columna: Shim-pack VP-ODS C18 (250 x 4,6 mm I.D).
- Flujo 1 mL/ min.
- Detector de fluorescencia: Excitación 360 nm. Emisión 440 nm.
- Temperatura de la columna: 40°C.
- Volumen de inyección de la muestra: 25 µL.
- Fase Móvil: Agua milipore : Metanol : Acetonitrilo (65:25:10 v/v).
- Tiempo total de corrida cromatográfica: 5 minutos (Figura N° 13).

6.3 Resultados y Discusión

Resulta de utilidad considerar que la mayoría de los trabajos de investigación sobre la estabilidad y partición de la AFM1 en productos lácteos, fueron realizados en quesos precipitados enzimáticamente con diferentes niveles de maduración; mientras que en los ensayos llevados a cabo en el presente trabajo lo fueron sobre precipitación ácida (pH: 4,6) de la totalidad de las proteínas de la leche entera y descremada. Este tipo de precipitación conlleva una diferencia fundamental en la estructura de la macromolécula resultante; de tal manera que en la precipitación enzimática el coágulo formado mantiene las uniones de calcio y fosfatos con las caseínas; en cambio en la preparación de la presente ricotta a partir de leche entera y descremada, el precipitado obtenido es totalmente desmineralizado. Este hecho puede relativizar la confrontación de los presentes resultados con los informados por la mayoría de los ensayos realizados por otros autores.

Los resultados obtenidos en los distintos tratamientos a que fueron sometidas las leches crudas enteras y descremadas contaminadas artificialmente con una concentración de 0,5 ppb de AFM1 en la elaboración del queso ricotta pueden observarse en las Tablas N° XV, N° XVI y Anexo 2.

Tabla Nº XV. Niveles de detección de AFM1 en queso ricotta entero en distintos tratamientos a partir de leche contaminada artificialmente con 0,5 ppb

MUESTRAS	DETECCIÓN DE AFM1 EN QUESO RICOTTA (ppb)	REDUCCIÓN DE AFM1 (%)
Ricotta Entera elaborada a 85°C	0,008	98,29
Ricotta Entera elaborada a 85°C con adición de 0,75% de solución de NaCl	0,014	97,18
Ricotta Entera elaborada a 85°C con adición de 1,5% de solución de NaCl	0,012	97,5
Ricotta Entera elaborada a 90°C	0,145	97,1
Ricotta Entera elaborada a 90°C con adición de 0,75% de solución de NaCl	0,005	98,99
Ricotta Entera elaborada a 90°C con adición de 1,5% de solución de NaCl	0,007	98,5
Ricotta Entera elaborada a 95°C	0,006	98,7
Ricotta Entera elaborada a 95°C con adición de 0,75% de solución de NaCl	0,006	98,66
Ricotta Entera elaborada a 95°C con adición de 1,5% de solución de NaCl	0,005	98,9

Tabla N° XVI. Niveles de detección de AFM1 en queso ricotta descremado en distintos tratamientos a partir de leche contaminada artificialmente con 0,5 ppb

MUESTRAS	DETECCIÓN DE AFM1 EN QUESO RICOTTA (ppb)	REDUCCIÓN DE AFM1 (%)
Ricotta Descremada elaborada a 85°C	0,010	97,96
Ricotta Descremada elaborada a 85°C con adición de 0,75% de solución de NaCl	0,003	99,31
Ricotta Descremada elaborada a 85°C con adición de 1,5% de solución de NaCl	0,007	98,44
Ricotta Descremada elaborada a 90°C	0,008	98,3
Ricotta Descremada elaborada a 90°C con adición de 0,75% de solución de NaCl	0,002	99,56
Ricotta Descremada elaborada a 90°C con adición de 1,5% de solución de NaCl	0,002	99,51
Ricotta Descremada elaborada a 95°C	0,009	98,14
Ricotta Descremada elaborada a 95°C con adición de 0,75% de solución de NaCl	0,004	99,03
Ricotta Descremada elaborada a 95°C con adición de 1,5% de solución de NaCl	0,007	98,44

Agrupando los tratamientos por temperaturas, tiempos y concentración salina (NaCl), se desprende que la acción conjunta de la temperatura y bajo pH, serían los responsables de la alta reducción de la concentración de la Aflatoxina M1 (AFM1) en el queso ricotta obtenido en relación a la contaminación de la leche de origen, mientras que el agregado de diferentes concentraciones de sal no demuestran tener efecto coadyuvante sobre la disminución de la AFM1 en la cuajada.

En términos promedios de todos los tratamientos, la reducción de la toxina retenida en la cuajada, a partir de una concentración de 0,5 ppb en la leche de origen, fue del orden del 98,47%. De otro modo se puede afirmar que sólo en promedio el 1,53% de la AFM1 permaneció retenida en las distintas ricottas elaboradas. Por el diseño y objetivos del presente trabajo no se pudo dilucidar si la toxina no detectada en la

cuajada, haya permeado al suero de la ricotta con actividad tóxica, lo que significaría una alta estabilidad de la misma o si bien podría haber sufrido una desnaturalización de la molécula con pérdida del efecto tóxico. Estos interrogantes más la partición de la AFM1 entre el precipitado proteico y el suero remanente se tratarán de elucidar en futuros trabajos de investigación previstos.

Resulta difícil contrastar los resultados obtenidos en el presente trabajo, con los informados por otros autores, en razón de que la mayoría de los ensayos fueron realizados en ricottas elaboradas a partir del suero de queso, donde la caseína remanente resulta en ínfima concentración. Es de utilidad aclarar que en nuestro medio el Código Alimentario Argentino (CAA), establece que la ricotta puede obtenerse a partir de suero de queso más el agregado de leche entera o descremada y también a partir sólo de la leche por precipitación ácida mediante el agregado de ácidos orgánicos. Estas circunstancias hacen que los presentes ensayos sean difíciles de contrastar; en cambio pueden aportar información nueva sobre dicha temática.

En la elaboración de queso por precipitación enzimática de la caseína, la AFM1 muestra una clara afinidad por la unión a la caseína nativa (CN) de la cuajada, reteniendo en la misma entre 1,7 a 5 veces más concentración que en la leche contaminada de origen (Chavarría, G. y otros 2017; Pietri, A. y otros 2016; Cavallarin, L. y otros 2014; Moosavy, M. y otros 2013; Iha, M. y otros 2013; Fernandes, A. y otros 2012; Rubio, R. y otros 2011; Fallah, A. y otros 2009; Manetta, A. y otros 2009; Mohammadi, H. y otros 2008; Deveci, O. 2007; Battacone, A. y otros 2005); además se encontró una correlación positiva entre la contaminación de la leche con AFM1 y la retenida en la cuajada (Barbiroli, A. y otros 2007); 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 (CN) 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.

Resultados distintos a los citados fueron publicados por López, C. y otros (2001) en un trabajo realizado sobre elaboración de queso a pequeña escala, a partir de leche contaminada artificialmente con siete niveles de concentración de AFM1, con la finalidad de conocer la reducción y distribución de la toxina en la cuajada y el suero.

Dichos ensayos establecieron que el 60% de la contaminación inicial de la leche migró al suero y el 40% restante quedó retenida en el queso. En el presente trabajo el porcentaje (%) de AFM1 retenido en el queso ricotta osciló entre el 0,44% y 2,90%. Las diferencias observadas podrían deberse a las distintas características de los precipitados de las caseínas nativa (CN) de la leche, ya que en la elaboración del queso ricotta, el precipitado proteico a pH: 4,6 y alta temperatura (85°C – 95°C) es totalmente diferente a la coagulación enzimática a bajas temperaturas (35°C – 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. Tal como se mencionara anteriormente (Barbiroli, A. y otros 2007) 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.

A igual consideraciones realizadas en el objetivo específico nº 2 del presente trabajo, la disparidad de resultados entre los ensayos efectuados podrían deberse a las distintas maneras de contaminación de la leche artificialmente o naturalmente con variadas concentraciones de AFM1 y especialmente a los sistemas de detección utilizados.

<Chromatogram>

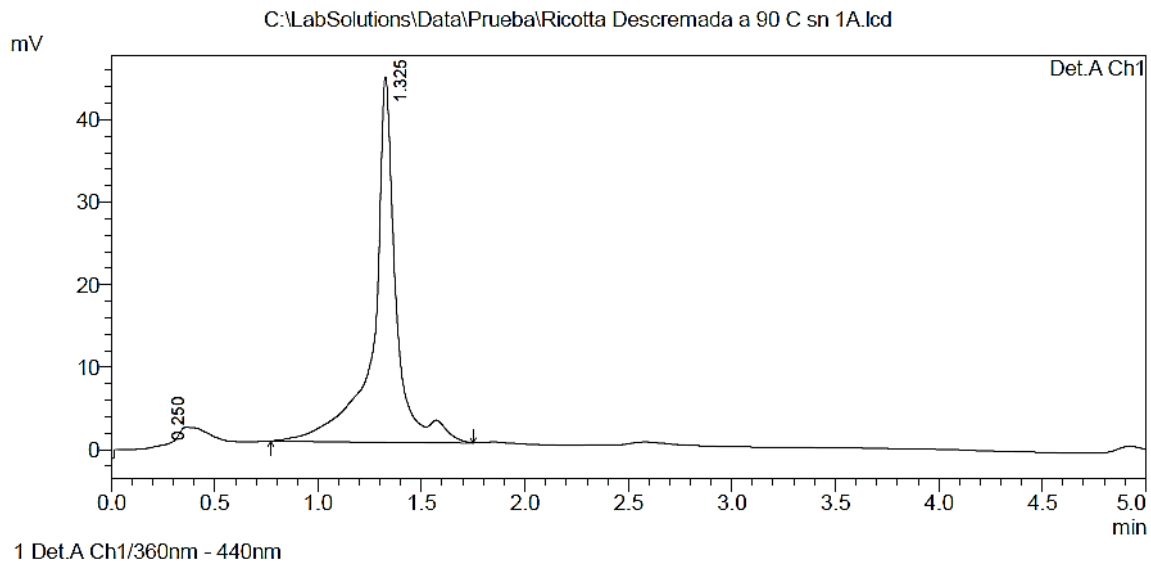


Figura N° 13. Cromatograma obtenido en la detección de AFM1 en queso ricotta descremado elaborado a 90 ° sin adición de sal.

6.4 Conclusión

Los resultados obtenidos en el presente trabajo contrariamente a lo que ocurre en la elaboración de quesos donde la mayor retención de AFM1 se vincula a la cuajada, en el proceso de elaboración del queso ricotta, realizado en este estudio, sólo un pequeño porcentaje de AFM1 quedó retenido en el precipitado proteico. Aunque se hace necesario profundizar el estudio sobre la forma en que se liga la molécula de AFM1 con los distintos componentes lactocasearios de la leche, podría afirmarse que el proceso de elaboración del queso ricotta a partir de leche entera y descremada, resulta una eficaz manera de detoxificar la AFM1 contenida en la leche de origen, convirtiendo a éste producto en un alimento seguro desde el punto de vista bromatológico.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES GENERALES

Conclusiones generales

- A) Los resultados obtenidos sobre inactivación de la AFM1 en leche entera contaminada artificialmente con una concentración de 0,5 ppb, más el agregado de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 0,05% v/v a distintas temperaturas y tiempos de tratamiento, fueron dispares y de baja detoxificación respecto a la leche sin agregado de H_2O_2 ; en cambio en los tratamientos en iguales condiciones en leche descremada, mostraron altos porcentajes de inactivación de AFM1 (82,64% y 75,83%) a temperaturas y tiempos distintos (65° y 90°C durante 30 y 10 minutos respectivamente). En conclusión, podría afirmarse que aún con resultados dispares y a veces contradictorios entre los trabajos de distintos autores, el tratamiento térmico con bajas concentraciones de H_2O_2 con asociación de sustancias como lactoperoxidasa y riboflavina y otras moléculas químicas de uso permitido, podrían disminuir la actividad de la AFM1 durante el pre-tratamiento industrial de la leche.
- B) Los resultados obtenidos indican que en todas las muestras de queso ricotta elaborados a partir de leche entera cruda artificialmente contaminada con 0,5 ppb de AFM1, mediante precipitación ácida (pH: 4,6) a temperaturas entre 85° y 95°C, arrojaron reducciones de contaminación de AFM1 en las cuajadas del orden de 97,46 a 99,51% respecto de la leche de origen. El agregado de 0,75 y 1,5% de cloruro de sodio (NaCl) en los mismos tratamientos de acidez y temperaturas no modificaron los niveles de retención de AFM1 en las ricottas obtenidas. Contrariamente a lo que ocurre en la elaboración de la mayoría de los tipos de quesos de precipitación enzimática, en donde la cuajada retiene entre 1,7 y 5 veces más de la AFM1 que en la leche de origen. En el queso ricotta la acción conjunta del bajo pH y altas temperaturas podrían determinar una desnaturalización importante en las proteínas lácteas, particularmente de las caseínas, que disminuirían la afinidad de unión con las moléculas de la AFM1.

Futuras líneas de Investigación

Se considera de interés continuar en la profundización del presente estudio ampliando la gama de ensayos utilizando otras moléculas bromatológicamente permitidas y económicamente viables, con el objetivo de determinar la estabilidad y partición de la AFM1 en los procesos de elaboración de productos lácteos, tendientes a establecer Puntos Críticos de Control (PCC) en los diagramas de flujo correspondientes.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- Acosta Yamandú M. 2011. “Buenas Prácticas de Alimentación para el Ganado Lechero”. Programa Nacional de Lechería INIA La Estanzuela. [En línea].<http://infolactea.com/wp-content/uploads/2017/05/Micotoxinas-Yamand%C3%BA-Acosta.pdf>
- Acosta Yamandú M. y otros. 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”. [En línea].http://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_micotoxinas_alimento_ganado_y_algunos_criterios_utilizacion_alimentos_contaminados.pdf
- Alais, C. 1971. “Ciencia de la leche. Principios de técnica lechera”. Ed. CECSA. España.
- Aman, I. 1992. “Reduction of Aflatoxin M1 in milk using hydrogen peroxide plus heat treatment”. Journal Veterinary Medicine, 9: 692-694.
- Amersham Pharmacia Biotech. 1999. “Reversed Phase Chromatography. Principles and Methods”. Amersham Biotech. Uppsala, Sweden. ISBN: 18-1134-16.
- AOAC 920.105. 1990. “Determinación de proteínas totales en leche”. Official Methods of Analysis, 15th Edition. Association of Official Analytical Chemists. Washington DC, USA.
- AOAC 980.21. 1990. “Determinación de Aflatoxina M1 en leche y queso”. Official Methods of Analysis, 15th Edition. Association of Official Analytical Chemists. Washington DC, USA.
- AOAC 925.23. 1995. “Determinación de extracto seco total”. Official Methods of Analysis, 16th Edition. Association of Official Analytical Chemists. Washington DC, USA.
- AOAC 970.44 y 971.22. 2000. “Preparación de los estándares de micotoxinas” Official Methods of Analysis, 17th Edition. Association of Official Analytical Chemists. Washington DC, USA.

- AOAC 923.03 Cap. 32:2. 2005. "Determinación de cenizas totales". Official Methods of Analysis, 18th Edition. Association of Official Analytical Chemists. Washington DC, USA.
- AOAC 925.22. 2005. "Determinación de densidad". Official Methods of Analysis, 18th Edition. Association of Official Analytical Chemists. Washington DC, USA.
- Applebaum, R. S., y Marth, E. H. 1982. "Inactivation of Aflatoxin M1 in milk using hydrogen peroxide and hydrogen peroxide plus riboflavin or lactoperoxidase". Journal of Food Protection, 45: 557-560.
- Applebaum, R. S., y Marth, E. H. 1982. "Fate of Aflatoxin M1 in Cottage Cheese". Journal of Food Protection, 45: 903-904.
- Asociación Española de Fabricantes de Harinas y Sémolas de España. 2015. "Recomendaciones para la prevención, el control y la vigilancia de las micotoxinas en las fábricas de harinas y sémolas". Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente Secretaría General Técnica. [En línea]. <http://publicacionesoficiales.boe.es/>
- Badui Dergal, S. 1999. "Química de los Alimentos". Ed. Longman de México S. A. de C. V. ISBN: 968-444-152-5.
- Barbiroli, A., Bonomi, F., Benedetti, S., Mannino, S. Monti, L., Cattaneo, T., y Iametti, S. 2007. "Binding of Aflatoxin M1 to different protein fractions in ovine and caprine milk". Journal Dairy Science, 90: 532-540.
- Battaccone, G., Nudda, A., Palomba, M., Pascale, M., Nicolussi, P., y Pulina, G. 2005. "Transfer of Aflatoxin B1 from feed to milk and from milk to curd and whey in dairy sheep fed artificially contaminated concentrates". Journal of Dairy Science, 88: 3063-3069.
- Blanco, J. L., Domingues, L., Gomez-Lucía, E., Garayzabal, J. F. F., Goyache, J., Suarez, G. 1998. "Behavior of Aflatoxin during the manufacture, ripening and storage of Manchego - type cheese". Journal Food Science, 53: 1373-1376.

- Bolsa de Comercio de Córdoba. 2007. IIE sobre la base del INTA – CFL. <http://bolsacba.com.ar/>
- Caja, G. 2006. “Naturaleza y composición de la leche”. Producción de leche, Universidad Autónoma de Barcelona, Facultad de Veterinaria, Licenciatura de Veterinaria. Producción Animal II.
- Carmona Solano, G. 2009. “Las micotoxinas en el ganado lechero. El enemigo insidioso... sobre la producción y reproducción: II entrega”. Revista ECAG Informa, 50: 40-45.
- Cavaliere, C., Foglia, P., Pastorini, E., Samperi, R., y Laganan, A. 2006. “Liquid chromatography/tándem mass spectrometric confirmatory method for determining Aflatoxin M1 in cow milk. Comparison between electrospray and atmospheric pressure photoionization sources”. Journal of Chromatography 1101: 69-78.
- 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.
- Céspedes, A. 1997. “Desarrollo y estandarización de tres técnicas analíticas por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y determinación de los niveles de contaminación con aflatoxinas, zearalenona y ocratoxina A en materias primas y alimento terminado empleado para la nutrición de aves y cerdos en Colombia”. Trabajo de grado en Salud y Producción Animal. Universidad Nacional de Colombia.
- Chavarría, G., Molina, A., Leiva, A., Méndez, G., Wong González, E., Cortés Muñoz, M., Rodríguez, C., y Granados Chinchilla, F. 2017. “Distribution, stability and protein interactions of Aflatoxin M1 in fresh cheese”. Food Control 73: 581-586.
- 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.

- Chulze, S. N., Ramirez, M. L., Torres, A. M. 2011. "Micotoxinas y el ser humano". Micotoxinas y Micotoxicosis Ed. AMV. Editor: Ramos Girona, A. J. ISBN: 978-84-96709-70-6. España.
- Código Alimentario Argentino CAA. 2006. Capítulo VIII. Artículo 554 - (Res 22, 30.01.95).
- Código Alimentario Argentino CAA. 2006. Capítulo VIII. Artículo 582 - (Res 879, 5.6.85).
- Código Alimentario Argentino CAA. 2006. Capítulo VIII. Artículo 605 - (Resolución Conjunta SPRyRS y SAGPyA N° 33/2006 y N° 563/2006).
- Código Alimentario Argentino CAA. 2010. Capítulo VIII. Artículo 614 (Resolución Conjunta SPReI y SAGyP N° 98/2010 y N° 800/2010).
- Cook, W. O., Richard, J. L., Osweiler, G. D. y Tramel, D. W. 1986. "Clinical and pathologic changes in acute bovine aflatoxicosis: rumen motility and tissue and fluid concentrations of Aflatoxins B1 and M1". Am. J Vet. Res. 47: 1817-1825.
- Cullen, J. M y Newberne, P. N. 1994. "Acute hepatotoxicity of aflatoxins". En: Eaton, D. L y Groopman, J. D. (Eds), The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary and agricultural significance, Academic Press, San Diego (C.A). pp. 3-26.
- Dalcero, A., Barberis, L., Chiacchiera, S. M., Pascual, L. 2011. "Prevención y control de las micotoxicosis". Micotoxinas y Micotoxicosis Ed. AMV. Editor: Ramos Girona, A. J. ISBN: 978-84-96709-70-6. España.
- Decreto 353, de 26 de Junio de 2009, por el que se declaran Normas Oficiales de la República de Chile. Diario Oficial N 39.405, de 7 de Julio de 2009. Pp. 28.
- Deveci, O. 2007. "Changes in the concentration of Aflatoxin M1 during manufacture and storage of White Pickled cheese". Food Control, 18: 1103-1107.

- Dianda, M. A. 2002. "Elaboración de Quesos Artesanales". 1 Edición. Buenos Aires: Editorial Hemisferio Sur.
- Diekman, M. A. y Green, M. L. 1992. "Mycotoxins and reproduction in domestic livestock". *Journal Animal Science* 70: 1615-1627.
- Dragacci, S., Grosso, F., y Gilbert, J. 2001. "Immunoaffinity column clean-up with liquid chromatography for determination of Aflatoxin M1 in liquid milk: Collaborative study". *Journal of AOAC International*, Vol.84 No.2, pp. 437-443.
- Duarte, S. 2004. "Las micotoxinas, conceptos básicos y su perspectiva desde la salud pública veterinaria". Trabajo de grado. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. Colombia.
- El-Deeb, S. A., Zaki, N., Shoukry, Y. M. R., y Kheadr, E. E. 1992. "Effect of some technological processes on stability and distribution of Aflatoxin M1 in milk". *Egypt Journal Food Science*, 20: 29-42.
- Fallah, A. A., Jafari, T., Rahnama, M. 2009. "Determination of Aflatoxin M1 levels in Iranian White and cream cheese". *Food and Chemical Toxicology* 47: 1872-1875.
- Fernandes, A. M., Corrêa, B., Rosim, R. E., Kobashigawa, E., y Oliveira, C. A. F. 2012. "Distribution and stability of Aflatoxin M1 during processing and storage of Minas Frescal cheese". *Food Control*, 24: 104–108.
- Finten, F. 2015. "Evaluación del proceso de elaboración de Ricotta". Tesis de grado. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNICEN), Tandil.
- GE Healthcare Bio-Sciences AB. 2006. "Hydrophobic Interaction and Reversed Phase Chromatography, Principles and Methods". ISBN: 18-1115-69.
- Gimeno, A. 2005. "Aflatoxina M1 en la Leche. Riesgos para la Salud Pública, Prevención y Control". [En línea].
http://www.engormix.com/aflatoxina_m1_leche_riesgos_s_articulos_372_MYC.htm
- Gimeno, A., y Martins, M. L. 2011. "Micotoxinas y micotoxicosis en animales y humanos". Special Nutrients Inc. 3º Edición.

- Guthrie, L. D. 1979. "Effects of aflatoxins in corn on production and reproduction of dairy cattle". *Journal Dairy Science* 62 (suppl. 1): 134-142.
- Helferich, W. G., Garret, W. N., Hsieh, D. P. H. y Baldwin, R. L. 1986. "Feedlot performance and tissue residues of cattle consuming diets containing aflatoxins". *Journal Animal Science*, 62: 691-696.
- Henry, S. H., Whitaker, T., Rabbani, I., Bowers, J., Park, D., Price, W., Bosch, F. X., Pennington, J., Verger, P., Yoshizawa, T., van Egmond, H., Jonker, M.A, Coker, R. 2001. "Aflatoxin M1". *Join Expert Comité on food additives. JECFA 47*. [En línea].

<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je02.htm>

- Henry, S. H., Bosh, F. X. y Bowers, J. C. 2002. "Aflatoxin, hepatitis and worldwide liver cáncer risks". *Adv. Exp. Med. Biol.* 504:229-33.
- Hesseltine, C. W. 1976. "Conditions leading to mycotoxin contamination of foods feeds". In *mycotoxins other fungal related food problems*. Joseph V. Rodricks (Ed), American Chemical Society, Washington DC, pp. 1-22.
- Holt, C. 1985. "The size distribution of bovine casein micelles". *Food Microstructure*, 4: 1-10.
- Holt, C. 1992. "Structure and stability of bovine casein micelles". *Advances Protein Chemistry*, 43: 63-151.
- Horne, D. S. 1998. "Casein interactions: Casting light on the black boxes, the structure in dairy products". *International Dairy Journal*, 8: 171-177.
- Hsieh, D. P. H., Loury, D. N. 1981. "Effects of chronic exposure to Aflatoxin B1 and Aflatoxin M1 on the in vivo covalent binding of aflatoxin B1 to hepatic macromolecules". *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 13: 4-6.
- Iha, M. H, Barbosa Baltazar, C., Okada, I. A., Trucksess, M. W. 2013. "Aflatoxin M1 in milk and distribution and stability of aflatoxin M1 during production and storage of yogurt and cheese". *Food Control*, 29: 1-6.

- INTI, Instituto Nacional de Tecnología Industrial. 2011. "Lácteos: queso artesanal y ricotta". 2a. Ed. - San Martín: ISBN 978-950-532-159-9.
- INTI, Instituto Nacional de Tecnología Industrial. 2013. "Calidad del suero: tendencias y metodologías analíticas que aplican en su control". I Jornadas de Actualización Analítica. [En línea].
<https://www.inti.gob.ar/lacteos/jaa2013/pdf/P8.pdf>
- IRAM. Norma 14005-1, 2006. "Determinación de acidez titulable".
- Kuiper-Goodman, T. 1994. "Prevention of human mycotoxicoses through risk assesment risk management". In: J. D. Miller H. L. Trenholm (Eds). Mycotoxins in grain, compouns other aflatoxin. Eagam press, St. Paul, Minnesota, pp. 439-469.
- López, C. E., Ramos, L., Ramadán, S., Bulacio, L. C. y Pérez, J. 2001. "Distribution of Aflatoxin M1 in cheese obtained from milk artificially contaminated". International Journal of Food Microbiology, 64: 211-215.
- Mahaut, M., Jeantet, R., y Brulé, G. 2003. "Introducción a la tecnología quesera". Ed. Acribia S. A. ISBN: 84-200-1013-8.
- 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.
- Maragos, C. M. y Busman, M. 2010. "Rapid and advanced tools for mycotoxin analysis: a review". Food Additives and Contaminants, 27: 688-700.
- Marin Sillué, S. y otros. 2000. "Control de micotoxinas emergentes. Situación legislativa actual". Unidad de Microbiología, Departamento de Tecnología de Alimentos, CeRTA. Universidad de Lleida, Lleida, España.
- Michlig, N., Signorini, M., Gaggiotti, M., Chiericatti, C., Basílico, J. C., Repetti, M. R., Beldomenico, H. R. 2016. "Risk factors associated with the presence of Aflatoxin M1 in raw bulk milk from Argentina". Food Control, 64: 151-156.

- 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.
- Monsalve, J., González, D. 2005. "Elaboración de un queso tipo ricotta a partir de suero lácteo y leche fluida". *Red de revistas científicas de América Latina y El Caribe, España y Portugal*. Año/Vol. XV, número 006.
- Moosavy, M. H., Roostaei, N., Katiraei, F., Habibi Asl, B., Mostafavi, H., y Dehghan, P. 2013. "Aflatoxin M1 occurrence in pasteurized milk from various dairy factories in Iran". *International Food Research Journal* 20: 3351-3355.
- Motawee, M. M., Ibrahim, M. K. y Nassib, T. A. 2006. "Effect of hydrogen peroxide (H₂O₂) and different heat treatments on Aflatoxin M1 content in milk". *The third conference of role of biochemistry environment and agricultura*.
- NGFA, National Grain and Feed Association. FDA Regulatory Guidance for Mycotoxins. 2011. [En línea].
http://www.ngfa.org/files/misc/Guidance_for_Toxins.pdf
- NOM - Norma Oficial Mexicana 184-SSA1-2002. Productos y servicios. Leche, formula láctea y producto lácteo combinado. Especificaciones sanitarias. *Diario Oficial de la Federación* de 18/10/2002. México.
- NOM - Norma Oficial Mexicana 188-SSA1-2002. Productos y servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones sanitarias. *Diario Oficial de la Federación* de 15/10/2002. México.
- Normas del Servicio Agrícola Ganadero (SAG). Resolución 736 del 4 de Mayo de 1992 por la que se establecen los niveles máximos de aflatoxinas en ingredientes y en alimentos para animales [En línea]
<https://www.leychile.cl/Navegar?idNorma=86570>
- Norma ISO 2446:2008 (E) IDF 226:2008 (E), "Determinación de materia grasa en leche".
- Observatorio de la Cadena Láctea Argentina (OCLA). 2017. [En línea]
<http://www.ocla.org.ar/>

- Paul, P. S., Johnson, D. W., Mirocha, C. J., Soper, F. F., Thoen, C. C., Muscoplat, C. C. y Weber, A. F. 1977. "In vitro stimulation of bovine peripheral blood lymphocytes: suppression of phyto mitogen and specific antigen lymphocyte responses by aflatoxin. *Am. J. Vet. Res.* 38: 2033-2035.
- Pécora, R. P., Gon, G., Dalla Costa, C. A., Hantís D. y Kivatínitz, S. C. 2008. "Variación anual de la composición química de la leche de vaca de la cuenca lechera de Córdoba, Argentina", en CESIA-CIBSA, M. R. y J. Zalazar, Ed. CIMNE.
- Pettersson, H., Bertilsson, J., Wennberg, O. 1989 "Carry-over of aflatoxin from dairy cattle feed to milk". *Proc World Assoc Vet Food Hygienists Symp.* Stockholm.
- Pietri, A., Mulazzi, A., Piva, G., y Bertuzzi, T. 2016. "Fate of Aflatoxin M1 during production and storage of parmesan cheese". *Food Control* 60: 478-483.
- RDC - Resolução Nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. *Diário Oficial da União, Seção 1, N 46, de 9 de março de 2011, pp. 66 – 67.*
- Reglamento Técnico MERCOSUR sobre límites máximos de aflatoxinas admisibles en leche, maní y maíz. MERCOSUR/GMC/RES N 25/02
- Reyes Velázquez, W. P. 2011. "Micotoxicosis en rumiantes". *Micotoxinas y Micotoxicosis* Ed. AMV. Editor: Ramos Girona, A. J. ISBN: 978-84-96709-70-6. España.
- Rojo, F., Martínez, S. P., Espinoza, V. H. I, Nathal Vera, M. A., De Lucas Palacios, E., Reyes Velázquez, W. P. 2014. "Evaluación de adsorbentes para la reducción de Aflatoxina M1 en leche de vacas alimentadas con dietas contaminadas artificialmente con AFB1". *Rev. Mex. Cs. Pecuarias* Vol. 5. Núm. 1: (1-15).
- Rubio, R., Moya, V. J., Berruga, M. I., Molina, M. P., y Molina, A. 2011. "Aflatoxin M1 in the intermediate dairy products from Manchego cheese production: distribution and stability". *Mljekarstvo* 61: 283-290.

- Sánchez, C., Castignani, H., Marino, M., Suero, M. y Terán, J.C. 2012. “La Lechería Argentina: Estado Actual y su Evolución (2008 a 2011)”. Trabajo en el marco del Proyecto Específico “Gestión de la Información y Modelización en Lechería Bovina”. INTA.
- Schlimme, E., Buchheim, W. 2002. “La leche y sus componentes. Propiedades químicas y físicas”. Ed. Acribia S. A. ISBN: 84-200-0992-X.
- Schmidt, D. G., y Payens, T. A. J. 1976. “Micellar aspects of casein”. *Surface and Colloid Science*, 9: 165-227.
- Schmidt, D. G. 1982. “Association of caseins and casein micelle structure”. *Development in Dairy Chemistry*, 1: 61-86.
- SENASA Dirección Nacional de Sanidad Animal. 2017. “Distribución de tambos y rodeo lechero por provincia”.
- Soriano del Castillo J. M. 2007. “Micotoxinas en Alimentos”. Ed. Díaz de Santos. ISBN: 978-84-7978-808-7. España.
- Stoloff, L., Trucksess, M., Hardin, N., Francis, O., Hayes, J. R., Polan, C. E., Campbell, T. C. 1975. “Stability of Aflatoxin M1 in milk”. *Journal Dairy Science*, 58: 1789-1793.
- Subsecretaría de Lechería, Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca del Ministerio de Agroindustria de la Nación. 2016. [En línea] http://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/ss_lecheria/estadisticas/01_prima_ria/index.php
- Taverna, M. A. y Coulon, J. B. 2000. “La calidad de la leche y de los quesos”. Documento técnico orientado a profesionales que trabajan en el sector lácteo. INTA.
- Taverna M. A., Cuatrín A., Gaggiotti, M., Páez R. y Chávez, M. 2001. “Composición química de la leche producida en la Cuenca Lechera Central de la Argentina”. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 21 (supl.1): 271, 2001.
- Thomma, B.P.H.J. 2003. “*Alternaria* spp. from general saprophyte to specific parasite”. *Mol. Plant Path.* 4:225-236.

- Treviño, J. 2000. "Aflatoxina". Recuperado el 21 de Febrero de 2016, de <http://etimologias.dechile.net/?aflatoxina>
- U. E. Directiva 2003/100 de la Comisión de 31 de octubre de 2003 por la que se modifica el anexo I de la Directiva 2002/327CE del Parlamento Europeo y del Consejo sobre sustancias indeseables en la alimentación animal. Diario Oficial de la Unión Europea L285 de 01/11/2003, pp. 33 - 37.
- U. E. Reglamento (UE) N 165/2010 de la Comisión de 26 de Febrero de 2010 que modifica, en lo que respecta a las aflatoxinas, el Reglamento (CE) N 1881/2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea L50 de 27/02/2010, pp. 8 – 12.
- Veldman, A., Meijs, J. A. C., Borggreve, G. J., Heeres-van der Tol, J. J. 1992. "Carry-over of aflatoxin from cows' food to milk". *Anim. Product.* 55, 163–168.
- Walstra, P. y Jennes, R. "Química y Física Lactológica". 1987. Ed. Acribia S. A. ISBN: 84-200-0594-0.
- Walstra, P. 1999. "Casein sub-micelles: do they exist?". *International Dairy Journal* 9: 189-192.
- Wiseman, D. W. y Marth, E. H. 1983. "Heat and acid stability of Aflatoxin M1 in naturally and artificially contaminated milk". *Milchwissenschaft*, 38: 464-466.
- Yiannikouris, A. y Jouany, J. P. 2002. "Les mycotoxines dans les aliments des ruminants, leur devenir et leurs effets chez l'animal". *INRA Producción Animal* 15: 3-16.
- Yousef, A. E. y Marth, E. H. 1989. "Stability and degradation of Aflatoxin M1". *Mycotoxins in Dairy Products* (H. P. Van Egmond, ed.), 127-161. Elsevier Applied Science.

ANEXOS

ANEXO 1

ANÁLISIS ESTADÍSTICO MUESTRAS DE LECHE

Análisis estadístico utilizado en los tratamientos de la leche

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Área		48	0,9	0,85	14,99

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	Gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1,265E+13	14	9,0357E+11	20,45	<0,0001
Asignación	1,265E+13	14	9,0357E+11	20,45	<0,0001
Error	1,4581E+12	33	4,4184E+10		
Total	1,4108E+13	47			

Test: LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=352077,36542

Error: 44184203741,2803 gl: 33

Asignación	Medias	n	E.E.			
14	273192,25	4	105100,19	A		
15	380419,5	4	105100,19	A		
4	1464488,33	3	121359,25		B	
12	1480500,75	4	105100,19		B	
11	1490350	4	105100,19		B	
6	1501446,75	4	105100,19		B	
5	1525859,33	3	121359,25		B	
1	1538393,5	2	148634,12		B	
10	1554907,25	4	105100,19		B	
9	1573731,25	4	105100,19		B	
8	1630958	2	148634,12		B	C
13	1644201,5	2	148634,12		B	C
7	1743268,67	3	121359,25		B	C
3	2051850,5	2	148634,12		C	D
2	2123249	3	121359,25			D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

ANEXO 2

ANÁLISIS ESTADÍSTICO MUESTRAS DE QUESO RICOTTA

Análisis estadístico utilizado en los tratamientos del queso ricotta

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Área		53	0,98	0,97	27,44

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	9,206E+11	17	5,4153E+10	96,08	<0,0001
Asignación	9,206E+11	17	5,4153E+10	96,08	<0,0001
Error	1,9727E+10	35	563621154		
Total	9,4033E+11	52			

Test: LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=41995,97810

Error: 563621153,8143 gl: 35

Asignación	Medias	n	E.E.			
14	6988,5	4	11870,35	A		
15	7758,33	3	13706,7	A		
11	10880,67	3	13706,7	A	B	
17	15292,75	4	11870,35	A	B	
5	21474	2	16787,21	A	B	C
18	24520,67	3	13706,7	A	B	C
7	27635	3	13706,7	A	B	C
8	28487	1	23740,71	A	B	C
16	29313,33	3	13706,7	A	B	C
6	31940,67	3	13706,7	A	B	C
10	32155,67	3	13706,7	A	B	C
1	36203	4	11870,35	A	B	C
3	53052,5	2	16787,21		B	C
4	61503,75	4	11870,35			C
9	233743,67	3	13706,7			D
12	244708,33	3	13706,7			D
13	267804,33	3	13706,7			D
2	598522,5	2	16787,21			E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

