

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA



Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral, para la obtención del Grado Académico de:

Doctor en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

CONTAMINANTES EN LECHE, PRODUCTOS Y
SUBPRODUCTOS LÁCTEOS: EVALUACIÓN DE FACTORES DE
RIESGO Y ESTRATEGIAS DE INTERVENCIÓN

Ing. Dianela Costamagna

Director: Dr. Marcelo Signorini

Co-Director: MSc. Miguel Taverna

Unidad de Investigación donde se realizó:

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria – INTA

Estación Experimental Agropecuaria Rafaela

2018

INDICE DE CONTENIDOS

Índice de Tablas	1
Índice de Figuras	4
Abreviaturas	5
Agradecimientos	7
Publicaciones	8
Resumen	10
Abstract	15
Introducción general	19
Objetivos	26
Objetivo general.....	26
Objetivos específicos.....	26
CAPITULO I: Estudio observacional: Factores de riesgos asociados a la presencia de contaminantes en leche de tanque proveniente de tambos de la principal cuenca lechera de Argentina	27
1. INTRODUCCIÓN.....	28
OBJETIVO.....	36
2. MATERIALES Y METODOS.....	37
2.1. Selección de tambos.....	37
2.2. Muestreos.....	39
2.3. Determinación de contaminantes.....	41
2.4. Análisis estadísticos.....	46
2.5. Análisis espacial.....	49
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	49
3.1. Ocurrencia natural de aflatoxinas en tambos de la cuenca lechera central de Argentina y factores de riesgo asociados.....	50
3.2. Determinación de plaguicidas en la cuenca lechera central de Argentina y factores de riesgo asociados.....	59

3.3. Evaluación de la concentración de nitratos y nitritos en la cuenca lechera central de Argentina y factores de riesgo asociados.....	70
3.4. Análisis espacial.....	81
4. CONCLUSIONES PARCIALES.....	82

CAPITULO II: Cuantificación de aflatoxina M₁ desde los alimentos del ganado bovino lechero hasta los productos y subproductos lácteos.....84

1. INTRODUCCIÓN.....	85
OBJETIVO.....	87
2. MATERIALES Y METODOS.....	88
2.1. Muestreos.....	88
2.2. Elaboraciones de productos lácteos.....	89
2.3. Detección de AFB ₁ en alimentos de ganado bovino lechero.....	92
2.4. Detección de AFM ₁ en leches, productos y subproductos lácteos.....	93
2.5. Análisis de calidad fisicoquímica e higiénico-sanitaria de la leche y productos lácteos.....	95
2.6. Determinación de la tasa de transferencia de AFB ₁ a AFM ₁	96
2.7. Análisis de aflatoxina M ₁ en sueros procesado por tecnología de membranas, obtenido de Pymes Lácteas de la Cuenca Lechera Central.....	96
2.8. Evaluación del porcentaje de distribución de AFM ₁ en productos y subproductos lácteos.....	98
2.9. Análisis estadístico.....	98
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	99
3.1. Cuantificación de la tasa de transferencia de aflatoxina M ₁ durante la elaboración de quesos blandos y duros a partir de leche cruda contaminada naturalmente.....	99
3.2. Cuantificación de la tasa de transferencia de aflatoxina M ₁ durante la elaboración de leche en polvo a partir de leche cruda contaminada naturalmente.....	108
3.3. Factores de riesgo que impactan sobre las concentraciones de AFM ₁ en leche y en la tasa de transferencia.....	114
3.4. Análisis de aflatoxina M ₁ en sueros procesado por tecnología de membranas, obtenido de Pymes Lácteas de la Cuenca Lechera Central. Destino de AFM ₁ en permeado y concentrado de proteínas de suero.....	118

4. CONCLUSIONES PARCIALES.....	124
--------------------------------	-----

CAPITULO III: Evaluación de riesgos de aflatoxina M₁ asociado al consumo de productos lácteos producidos en Argentina.....126

1. INTRODUCCIÓN.....	127
OBJETIVO.....	128
2. MATERIALES Y METODOS.....	128
2.1. Desarrollo del modelo.....	128
2.2. Entradas del modelo.....	129
2.3. Análisis de sensibilidad.....	135
2.4. Suposiciones del modelo.....	135
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	136
4. CONCLUSIONES PARCIALES.....	147

CAPITULO IV: Efectos de la inclusión de un agente secuestrante en la dieta de vacas lecheras sobre la excreción de aflatoxina M₁ en la leche.....149

1. INTRODUCCIÓN.....	150
OBJETIVO.....	152
2. MATERIALES Y METODOS.....	152
2.1. Animales y dieta.....	152
2.2. Muestras.....	153
2.3. Tasa de transferencia de AFB ₁ a AFM ₁ en leche.....	154
2.4. Indicadores productivos, reproductivos y sanitarios.....	154
2.5. Análisis estadístico.....	155
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	156
3.1. Alimentos.....	156
3.2. Efectos del secuestrante sobre la concentración de AFM ₁ en leche y la tasa de transferencia.....	157
3.3. Efectos del secuestrante sobre la performance productiva y sanitaria de las vacas.....	161
3.4. Efectos del secuestrante sobre indicadores de salud hepática.....	162

3.5. Impacto de la aplicación de secuestrantes sobre la salud publica.....	164
4. CONCLUSIONES PARCIALES.....	166
Conclusiones finales	168
Bibliografía	172
Anexo I: Cuestionario para la evaluación de prácticas de manejo	194

Índice de Tablas

Tabla 1: Niveles medios (M) y desvío estándar (DE) de AFB ₁ en alimentos por estación climática.....	50
Tabla 2: Niveles medios (M) y desvío estándar (DE) de AFM ₁ en leche por estación climática.....	52
Tabla 3: Definiciones de variables explicativas seleccionadas (p <0.15) mediante análisis univariado incluidas en el análisis para la asociación potencial con la presencia de AFM ₁ en la leche cruda en la cuenca central de Argentina (n= 68 muestras de leche).....	56
Tabla 4: Modelo de regresión logística multivariable final (selección hacia atrás) para la contaminación de AFM ₁ en la leche de tanque de tambos de la cuenca central de Argentina (n= 68 muestras de leche).....	57
Tabla 5: Concentración de residuos de plaguicidas (µg/l) en leche por estación climática.....	59
Tabla 6: Concentración de residuos de plaguicidas detectados en los alimentos y muestras de leche de 13 establecimientos lecheros.....	61
Tabla 7: Definiciones de variables explicativas seleccionadas (p <0.15) mediante análisis univariado incluidas en el análisis para la asociación potencial con la presencia de plaguicidas en la leche cruda en la cuenca central de Argentina (n= 68 muestras de leche).....	66
Tabla 8: Modelo de regresión logística multivariable final para la contaminación de plaguicidas en la leche de tanque de tambos de la cuenca central de Argentina (n= 68 muestras de leche).....	69
Tabla 9: Media (M) ± desvío estándar (DE), niveles mínimos (Min.) y máximos (Max.) de nitratos y nitritos (mg/l) en agua por estación climática en tambos de la cuenca lechera central de Argentina.....	71
Tabla 10: Calidad microbiológica del agua, provenientes de tambos de la cuenca lechera central de Argentina y porcentaje de muestras aptas.....	74
Tabla 11: Media (M) ± desvío estándar (DE), niveles mínimos (Min,) y máximos (Max,) de nitratos y nitritos (mg/l) en leche de tanque por estación climática en tambos de la cuenca lechera central de Argentina.....	76
Tabla 12: Definiciones de variables explicativas seleccionadas (p <0.15) mediante análisis univariado incluidas en el análisis para la asociación potencial de la presencia de nitratos en agua de tambos provenientes de la cuenca central de Argentina (n= 90 muestras de agua).....	78
Tabla 13: Modelo de regresión logística multivariable final (selección hacia atrás) para la contaminación de nitratos en leche proveniente de tambos de la cuenca central de Argentina (n= 68 muestras de leche).....	79

Tabla 14: Media (M) \pm desvío estándar (DE), mínimo (Min.) y máximo (Max.) niveles de aflatoxina B ₁ ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en diferentes estaciones y alimentos evaluados durante el año 2016.....	100
Tabla 15: Media (M) \pm desvío estándar (DE), niveles mínimos (Min.) y máximos (Max.) de aflatoxina M ₁ ($\mu\text{g}/\text{l}$) en leche cruda por estación climática, durante el 2016.....	100
Tabla 16: Valores medios \pm desvío estándar de la ingesta de aflatoxinas, producción de leche y tasa de transferencia por período de lactancia.....	101
Tabla 17: Composición de la leche utilizada para elaborar los mini-quesos.....	102
Tabla 18: Distribución de AFM ₁ en leche, suero y queso, para el método de producción de Queso Cremoso Argentino.....	103
Tabla 19: Composición de la leche utilizada para elaborar quesos duros.....	104
Tabla 20: Distribución de AFM ₁ en leche, suero y queso, para el método de producción de Queso Reggianito Argentino.....	105
Tabla 21: Media (M) \pm desvío estándar (DE), mínimo (Min.) y máximo (Max.) niveles de aflatoxina B ₁ ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en diferentes estaciones y alimentos evaluados durante el año 2017.....	109
Tabla 22: Media (M) \pm desvío estándar (DE), niveles mínimos (Min.) y máximos (Max.) de aflatoxina M ₁ ($\mu\text{g}/\text{l}$) en leche cruda por estación climática, durante el 2017.....	110
Tabla 23: Valores medios \pm desvío estándar de la ingesta de aflatoxinas, producción de leche y tasa de transferencia por período de lactancia.....	111
Tabla 24: Contenido total de Aflatoxin M ₁ (AFM ₁) en muestras de leche cruda, leche concentrada y en polvo naturalmente contaminadas.....	111
Tabla 25: Distribución de Aflatoxina M ₁ entre retenido y permeado sometidos a diferentes procesos tecnológicos.....	119
Tabla 26: Resultados promedios y desviación estándar (DE) de la caracterización analítica de los sueros utilizados para los procesos de filtración de las empresas I y II.....	120
Tabla 27: Resultados promedios y desviación estándar (DE) de la caracterización analítica de los permeados obtenidos para los procesos de filtración de la empresa I y II.....	121
Tabla 28: Resultados promedios y desviación estándar (DE) de la caracterización analítica de los permeados obtenidos para los procesos de filtración de la empresa I y II.....	122
Tabla 29: Descripción de las variables de entrada del modelo cuantitativo de riesgo.....	130
Tabla 30: Composición de la dieta promedio de vacas de baja y alta producción de leche en las estaciones de otoño-invierno y primavera-verano para la cuenca lechera central de Argentina.....	131

Tabla 31: Descripción de la media (M) en gramos, desvío estándar (DE), frecuencia de consumo (F) de leche y productos lácteos tradicionales de Argentina, y rango de peso corporal (PC) de diferentes grupos poblacionales.....	134
Tabla 32: Composición promedio de la dieta suministrada a las vacas del grupo control y tratado durante los 18 meses.....	153
Tabla 33: Media (M) \pm desvío estándar (DE), mínimo (Min.) y máximo (Max.) niveles de aflatoxina B ₁ (μ g/kg) en los alimentos evaluados durante 18 meses.....	156
Tabla 34: Concentración de AFM ₁ en leche, tasa de conversión de AFB ₁ a AFM ₁ en la leche y porcentaje de reducción de AFM ₁ (%) en el grupo control y tratado.....	157
Tabla 35: Medias \pm desvío estándar de consumo de materia seca (MS), ingesta de AFB ₁ , producción y composición de leche y recuento de células somáticas (RCS) en el grupo control y tratado.....	161
Tabla 36: Parámetros sanguíneos y condición corporal (CC) medido en vacas lecheras del grupo control y tratado	163
Tabla 37: Prevalencia (%) de patologías relevadas en vacas del grupo control y tratado a lo largo del período de lactancia.....	164

Índice de Figuras

Figura 1: Notificaciones por peligros alimentarios (Annual Report RASFF, 2016).....	20
Figura 2: Distribución de tambos muestreados en la provincia de Santa Fe y Córdoba.....	37
Figura 3: Porcentaje de residuos de plaguicidas detectados en las muestras de alimentos (A) y leche (B).....	63
Figura 4: Coagulación y corte de cuajada en la elaboración de quesos miniatura.....	90
Figura 5: Almacenamiento de quesos miniatura envasados al vacío.....	90
Figura 6: Diagrama de flujo del modelo matemático de evaluación de la exposición de aflatoxinas en leche y productos lácteos en Argentina.....	129
Figura 7: Distribución de probabilidad acumulada de la concentración de aflatoxina B ₁ en alimentos destinados a bovinos lecheros.....	136
Figura 8: Distribución de probabilidad acumulada de la concentración de aflatoxina M ₁ en leche bovina.....	137
Figura 9: Análisis de sensibilidad para la concentración de AFM ₁ en leche bovina..	138
Figura 10: Distribución de probabilidad acumulada para el consumo total de AFM ₁ por peso vivo en niños de 6 a 23 meses de edad.....	142
Figura 11: Distribución de probabilidad acumulada para el consumo de AFM ₁ por peso vivo en niños de 2 a 5 años de edad.....	143
Figura 12: Distribución de probabilidad acumulada para el consumo de AFM ₁ por peso vivo en mujeres de 10 a 49 años de edad.....	143
Figura 13: Análisis de sensibilidad para el consumo de AFM ₁ por peso vivo por grupo poblacional.....	144
Figura 14: Evolución de la excreción de AFM ₁ en leche y la producción de leche durante el período de lactancia de las vacas en el grupo control y tratado.....	159

Abreviaturas

Ab	Absorbancia
AFB₁	Aflatoxina B1
AFM₁	Aflatoxina M1
BD	Bilirrubina Directa
BEN	Balance Energético Negativo
BHBA	Acido Beta HidroxiButírico
BI	Bilirrubina Indirecta
BT	Bilirrubina Total
CAA	Código Alimentario Argentino
CASAFE	Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes
CB	Carbamatos
DNL	Dirección Nacional Láctea
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (European Food Safety Authority)
ELISA	Ensayo por InmunoAbsorción Ligado a Enzimas (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
F	Fungicidas
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (Food and Agriculture Organization of the United Nations)
FC	Forrajes Conservados
FunPEL	Fundación para la Promoción y el Desarrollo de la Cadena Láctea Argentina
FV	Forrajes Verdes
GGT	Gamma Glutamil Transpeptidasa
GLMM	Modelo Mixto Lineal Generalizado
GOT	Transaminasa Oxalacética Glutámica
GPS	Sistema de Posicionamiento Global (Global Positioning System)
H	Herbicidas
IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (International Agency for Research on Cancer)
IDE	Ingesta Diaria Estimada
IDT	Ingesta Diaria Tolerable
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
INTI	Instituto Nacional de Tecnología Industrial
KOW	coeficiente de partición octanol-agua (octanol-water partition coefficient)
LD	Límite de Detección

LMR	Límites Máximos de Residuos
MERCOSUR	Mercado Común del Sur
MS	Materia Seca
NEFA	Ácidos Grasos No Esterificados
NF	Nanofiltración
NMP	Número Más Probable
NO₂	Nitritos
NO₃	Nitratos
OC	Plaguicidas organoclorados
OCLA	Observatorio de la Cadena Láctea Argentina
OMS	Organización Mundial de la Salud
OP	plaguicidas organofosforados
P	Piretroides
PMR	Ración Parcialmente Mezclada
PSPS	Separador de Partículas Penn State (Penn State Particle Separator)
PySub.	Productos y/o Subproductos de la Agroindustria
QuEChERS	Rápido, Fácil, Barato, Efectivo, Robusto y Seguro (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe)
RASFF	Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos (Rapid Alert System for Food and Feed)
RBT	Recuento de Bacterias Totales
RCS	Recuento de Células Somáticas
SENASA	Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria
TMR	Ración Totalmente Mezclada
UE	Unión Europea
UF	Ultrafiltración
WPC	Concentrado de Proteínas de Suero (Whey Protein Concentrate)

Agradecimientos

A mi director, Marcelo Signorini por su apoyo incondicional, paciencia, dedicación, comprensión y confianza. Gracias por tus palabras de aliento y por contribuir enormemente en mi formación profesional, ha sido un privilegio poder contar con su guía.

A Mónica Gaggiotti por su confianza y amistad. Siempre dispuesta a colaborar con total entusiasmo en este trabajo aportando ideas y críticas precisas. Gracias por poner a disposición todos los medios necesarios para llevar adelante este trabajo.

A mi co-director Miguel Taverna por incorporarme a su grupo de trabajo y brindarme los medios y la vinculación para llevar adelante el trabajo de campo.

A INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria) por haberme posibilitado el desarrollo de la Tesis a través de la beca de posgrado que me fue otorgada.

A los distintos profesionales de producción primaria de las industrias lácteas que fueron parte de este trabajo, por la coordinación y dedicación que hicieron posible los muestreos a campo y la interacción con productores lecheros. Gracias a los Ingenieros Juan Pablo Zenklusen, Pablo Terraf, Marilin Finello y Andrés Costamagna.

A Carolina Chiericatti de la Facultad de Ingeniería Química por la paciencia y dedicación en la enseñanza de las técnicas de laboratorio.

A cada persona del Laboratorio de Calidad de Leche y Agroindustria por siempre tener una palabra de aliento y por la voluntad para colaborar en cada actividad. Por incorporarme a su grupo y al trabajo en equipo. Gracias Sonia Campos, Belén Adorni, Gabriela Audero, Luciana Costabel y Luisina Lavari por ser incondicionales en el trabajo y en la vida. Un placer compartir cada día con ustedes.

A Alejandro Smulovitz, Rodrigo Destefani, Gonzalo Galeano y Maximiliano Zenklusen, por su dedicación y apoyo en todos los ensayos de campo llevados adelante. Gracias por hacer sentir siempre la tarea a meno con su buen humor y predisposición.

A mi familia por ser el pilar de mi vida y por entender y apoyar en cada momento mis decisiones y crecimiento profesional.

Publicaciones

El desarrollo de este trabajo dio lugar a las siguientes publicaciones:

Costamagna D., Gaggiotti M., Chiericatti C.A., Costabel L., Audero G.M.L., Taverna M., Signorini, M.L. 2019. Quantification of aflatoxin M₁ carry-over rate from milk to soft cheese. *Toxicology Reports* 6, 782-787.

Costamagna D., Gaggiotti M., Audero G.M.L., Signorini, M.L. 2018. Changes in concentration of Aflatoxin M₁ during manufacture of milk powder from naturally contaminated raw milk. *Toxicology Reports*. Enviado.

Costamagna D., Gaggiotti M., Signorini, M.L. 2018. Estimation of aflatoxin M₁ exposure in milk and traditional dairy products of Argentina. *Food Control*. Enviado.

Costamagna, D., Gaggiotti, M., Signorini, M. Ocurrencia natural de aflatoxina M₁ en leche de tanque proveniente de tambos de la cuenca lechera central de Argentina y factores de riesgo asociados. VII Congreso Internacional de Tecnología de los Alimentos – (CICYTAC) del 1 al 3 de octubre de 2018, Córdoba.

Costamagna, D., Gaggiotti, M., Signorini, M. Ocurrencia natural de aflatoxina M₁ en leche de tanque proveniente de tambos de la cuenca lechera central de Argentina y factores de riesgo asociados. INTA – Estación Experimental Agropecuaria Rafaela Información Técnica de Producción Animal 2018 Publicación Miscelánea Año VI - Nº 4 ISSN en línea 2314-3126

El presente trabajo de Tesis fue realizado en el INTA EEA Rafaela y se desarrolló en el marco de los proyectos de investigación y convenios de vinculación tecnológica con empresas e instituciones del sector:

- Programa Nacional de Producción Animal: PNPA – 1126044 “Inocuidad, Calidad, Herramientas de Innovación y Bienestar en leches”. Módulo 1: Inocuidad y Seguridad Alimentaria en leche y productos lácteos. Período 2013 – 2017.
- Programa Nacional de Producción Animal: PNPA-1126042 "Estrategias de alimentación y valor agregado en origen en sistemas de producción de leche base pastoril". Módulo 3: Uso de subproductos industriales como insumos para la producción de leche. Período 2013 – 2017.

- Programa Nacional de Agroindustria y Agregado de Valor: PNAyAV-1130041- "Herramientas y sistemas para la gestión de la calidad integral". Período 2013 – 2017.
- CONVENIO MARCO INTA-COOPERATIVA GUILLERMO LEHMANN (2017-2018): "Evaluación de la eficiencia de un secuestrante comercial de micotoxinas sobre la reducción de AFM₁ en leche y parámetros productivos-reproductivos de las vacas lecheras"
- CONVENIO MARCO INTA – INTI (2015-2017): "Evaluación de la concentración de nitratos y nitritos en leche cruda y agua en tambos de la cuenca lechera central argentina".

RESUMEN

La leche es un alimento altamente nutritivo y una fuente de macro y micronutrientes necesarios para el crecimiento, desarrollo y mantenimiento de la salud humana en todos los grupos etarios. Sin embargo, también puede ser una fuente de contaminantes naturales de los alimentos que pueden causar enfermedades. Sumado a esto, el mercado actual de productos lácteos está cada vez más influenciado por exigencias de mercados internacionales y de los consumidores en materia de inocuidad y seguridad alimentaria, constituyendo barreras para la comercialización interna y externa. La intensificación de los sistemas productivos lecheros se incrementó en los últimos años en Argentina, asociada a una serie de impactos negativos sobre la inocuidad de la leche y los productos lácteos. La concentración de animales en menores superficies (mayor acumulación de excretas), el mayor uso de insumos (plaguicidas, fertilizantes) y alimentos cosechados y almacenados en condiciones muy diferentes, son algunos de los factores que aumentaron los riesgos de contaminación en el tambo por la presencia en la leche de xenobióticos. El objetivo general de la presente Tesis Doctoral fue evaluar el impacto de las prácticas de manejo en los diferentes sistemas de producción de leche de Argentina sobre la presencia de contaminantes en leche y productos lácteos.

En una primera etapa (Capítulo I) se investigó la presencia y niveles de tres contaminantes (aflatoxina M1, nitratos/nitritos y plaguicidas) en la leche cruda de 34 tambos ubicados en la cuenca lechera central de Argentina representada por las provincias de Santa Fe y Córdoba, en diferentes sistemas de producción y períodos climáticos. Otras matrices, como el agua y los alimentos consumidos por el ganado bovino lechero, también fueron muestreadas como posibles vías de ingreso de contaminantes a la leche. Al mismo tiempo se relevaron todas las prácticas de manejo realizadas en los sistemas productivos y a partir de ello, se identificaron los factores de riesgo asociados a la presencia de cada contaminante en la leche cruda. Los resultados indicaron que la leche producida en la cuenca lechera central no estuvo

mayormente fuera de los límites internacionales máximos permitidos para los distintos contaminantes. El 19,5% y el 12% de las muestras de leche presentaron más de 0,025 µg/l y 0,05 µg/l, límites establecidos por la Unión Europea para aflatoxina M₁ (AFM₁) en leche infantil y leche fluida, respectivamente. En ningún caso, los valores excedieron el límite máximo establecido para leche fluida por el Mercado Común del Sur (MERCOSUR). El 50% de las muestras superó el límite máximo establecido sólo para uno de los plaguicidas evaluados, el clorpirifós-metil en leche (10 µg/l). Respecto a nitratos y nitritos, el 12% de las muestras superaron el límite establecido por China para leche infantil (2 mg/l). Dado que los requisitos de calidad son cada vez más estrictos, cualquier reducción en los límites regulatorios internacionales tendrá un impacto grave en la producción nacional.

Los factores de riesgo identificados en los establecimientos, que explican la presencia de los contaminantes evaluados en la leche, estuvieron asociados a la implementación de prácticas de manejo inadecuadas. La semilla de algodón fue el ingrediente de mayor riesgo en las dietas de ganado lechero y las condiciones de almacenamiento de los subproductos en los establecimientos se asociaron a la presencia de AFM₁ en leche. Por otra parte, la presencia de insecticidas organofosforados en la leche estuvo asociada a la falta de registro de las aplicaciones y del cumplimiento de los tiempos de carencia establecidos para los plaguicidas. Finalmente, se detectaron altos contenidos de nitratos en las muestras de agua de la región bajo estudio y los factores de riesgo estuvieron ligados a características constructivas de los pozos de abastecimiento de agua y la distancia y ubicación de los mismos respecto a posibles fuentes de contaminación como corrales de encierre de los animales o pozos ciegos. Si bien no se halló una correlación entre el contenido de nitratos en leche y en agua, y entre esta última y aspectos microbiológicos, la mayoría de las muestras estuvieron contaminadas con bacterias del grupo coliformes, representando un alto riesgo sanitario, asociado a los factores enumerados.

En el Capítulo II se cuantificó la tasa de transferencia de la aflatoxina desde los alimentos del ganado bovino a la leche y de ésta a los principales productos y subproductos lácteos que exporta nuestro país, como leche en polvo, quesos y concentrado de proteínas de suero de queso. También se identificaron los factores asociados a dicha tasa y a la concentración de AFM₁ en la leche. La tasa de transferencia promedio varió entre 0,84%-0,90% y se vio afectada por el nivel productivo de las vacas y el tamaño de partícula de la ración ofrecida a las mismas. Vacas de alta producción (>30 litros/día) presentaron mayor tasa de transferencia que vacas de baja producción (<30 litros/día). En dietas en las que el tamaño de partícula no fue adecuado, presentaron una mayor concentración de AFM₁ (0,0164 µg/l) y tasa de transferencia (0,61%) que en aquellas donde el tamaño de partícula de la ración fue ideal (0,0075 µg/l y 0,34%, respectivamente). Se comprobó que la tasa de transferencia se redujo a la mitad cuando se aplicaron mejoras en la calidad de la dieta ofrecida a las vacas lecheras.

Se ha demostrado que debido a la solubilidad en agua de la AFM₁ y a procesos térmicos que cambian las interacciones hidrofílicas entre la AFM₁ y la caseína, se lograron reducciones de la toxina en leche en polvo mediante secado spray de 96% en el contenido de AFM₁ de la leche naturalmente contaminada. Por otro lado, en el caso de los quesos, AFM₁ incrementa su concentración respecto a la leche original debido a su afinidad con la fracción de caseína de la leche. El nivel de AFM₁ resultó ser en promedio 4,8 y 11,8 veces mayor en quesos blandos y duros, respectivamente, en comparación con la leche utilizada para su fabricación. Sin embargo, una gran proporción de AFM₁ (60-70%) migra hacia el suero. Los resultados obtenidos indicaron que la aflatoxina está disponible en productos lácteos elaborados a partir de leche naturalmente contaminada ya que la toxina puede tener diferentes comportamientos de acuerdo con el proceso al que se la somete.

En el Capítulo III se elaboró un modelo cuantitativo del riesgo de exposición a aflatoxinas en diferentes grupos de población mediante la estimación de la ingesta

diaria de leche y productos lácteos por los consumidores argentinos. De acuerdo con los riesgos potenciales para la seguridad humana derivados del consumo de aflatoxina en la leche y los productos lácteos, la ingesta diaria estimada mostró que la cantidad de aflatoxina es más alta que la ingesta diaria tolerable recomendada (0,0002 µg/l), en las categorías de población infantil evaluada (46,2% y 45,2% en niños de 6 a 23 meses y 2 a 5 años, respectivamente), siendo más baja para la población adulta (9,6% en mujeres de 10 a 49 años). Aun así, los niños, considerados la población más susceptible, no estarían expuestos a un riesgo significativo por los efectos de aflatoxinas a través del consumo de leche, aunque esta situación debería evaluarse a lo largo del tiempo. El análisis de sensibilidad indicó que ciertos alimentos que forman parte de la dieta del ganado lechero presentan niveles de aflatoxinas considerables, como los silajes, pasturas, balanceados comerciales y semilla de algodón. Los resultados de este capítulo, indicaron la necesidad de implementar buenas prácticas de manejo para prevenir y/o inhibir el crecimiento de hongos o agregar secuestrantes en las dietas que permitan bloquear la acción de las aflatoxinas.

En el Capítulo IV se propuso la implementación de una buena práctica de manejo tendiente a evitar o minimizar los riesgos para la salud humana y animal por el efecto de las aflatoxinas. Se evaluó la adición de un secuestrante comercial a la dieta de vacas lecheras contaminadas naturalmente con aflatoxinas sobre la concentración de aflatoxinas en la leche y la tasa de transferencia. La incorporación de secuestrante en la dieta permitió reducir la tasa de transferencia de aflatoxinas desde los alimentos a la leche en un 65%, con un comportamiento independiente del nivel productivo de las vacas. Debido a los niveles de exposición a los que se encuentran expuestas las vacas lecheras, no se apreciaron efectos metabólicos ni sanitarios sobre las mismas. Mediante un análisis de escenarios, se demostró que la incorporación de esta medida de manejo, permitiría reducir los porcentajes de exposición de la población más susceptible al efecto de las aflatoxinas por el consumo de leche y productos lácteos. Por otra parte, la reducción de los límites de aflatoxinas debajo de los establecidos por

las regulaciones internacionales permitiría a nuestro país mejorar la performance externa y acceder a mercados para productos y subproductos lácteos como por ejemplo, el concentrado de proteínas de suero, con mercados importadores exigentes debido a su destino en la alimentación infantil.

Los resultados de este trabajo de tesis permitieron avanzar en el conocimiento de los factores de riesgo que impactan en la probabilidad de aparición de contaminantes en la leche y productos lácteos, permitiendo direccionar las medidas de manejo a través de buenas prácticas a aplicar en los sistemas de producción de leche con sustento científico.

ABSTRACT

Milk is a highly nutritious food, and it is a source of necessary macro- and micronutrients for the growth, development and maintenance of human health in all age groups. However, it may also be a source of natural food contaminants that may cause disease. Added to this, the current market of dairy products is increasingly influenced by demands of international markets and consumers in matters of food safety and security, constituting barriers for internal and external marketing. The intensification of dairy production systems has increased in recent years in Argentina, associated with a series of negative impacts on the safety of products. The concentration of animals in smaller areas (greater accumulation of excreta), the greater use of inputs (pesticides, fertilizers) and feed harvested and stored in different conditions, are some of the factors that increased the risks of contamination in the dairy due to the presence in the milk of xenobiotics. The general objective of this Doctoral Thesis was to evaluate the impact of management practices in the different systems of milk production in Argentina on the presence of contaminants in milk and milk products.

In a first stage (Chapter I) the presence and levels of three contaminants (aflatoxin M1, nitrates / nitrites and pesticides) in raw milk were investigated in 34 dairy farms located in the Argentina's central dairy region represented by the provinces of Santa Fe and Córdoba, in different production systems and climatic periods. Other matrices, such as water and feed consumed by dairy cattle, were also sampled as possible ways of contaminants entering the milk. At the same time, all the management practices carried out in the production systems were surveyed and, as a result, the risk factors associated with the presence of each pollutant in raw milk were identified. The results indicated that the milk produced in the central dairy basin was not mostly outside the maximum international limits allowed for the different contaminants. 24.5% of milk samples presented more than 0.025 µg/l and 0.05 µg/l, limits established by the European Union for aflatoxins in infant milk and fluid milk, respectively. In no case, the values exceeded the maximum limit established for fluid milk by the Common Market of

the South (MERCOSUR). 50% of the samples exceeded the maximum limit established only for one of the evaluated pesticides, chlorpyrifos-methyl in milk (10 µg/l). Regarding nitrates and nitrites, 12% of the samples exceeded the limit established by China for infant milk (2 mg/l). As quality requirements are increasingly stringent, any reduction in international regulatory limits will have a serious impact on national production.

The risk factors identified in the farms, which explain the presence of the contaminants evaluated in the milk, were associated with the implementation of inadequate management practices. Cottonseed was the highest risk ingredient in dairy cattle diets and the storage conditions of by-products in establishments were associated with the presence of aflatoxin M1 (AFM₁) in milk. On the other hand, the presence of organophosphorus insecticides in milk was associated with the lack of registration of the applications and compliance with the deficiency times established for pesticides. Finally, high nitrate contents were detected in the water samples of the region under study and the risk factors were linked to the construction characteristics of the water supply wells and the distance and location of them with respect to possible sources of contamination such as corrals enclosing animals or blind wells. Although no correlation was found between the content of nitrates in milk and water, and between the latter and microbiological aspects, most of the samples were contaminated with bacteria of the coliform group, representing a high health risk, associated with the factors listed.

In Chapter II, the carry over rate of aflatoxin from cattle feeds to milk and the main dairy products and byproducts exported by our country, such as milk powder, cheese and whey protein concentrate, was quantified. The factors associated with this rate and the concentration of aflatoxins in milk were also identified. The average carry over rate varied between 0.84% -0.90% and was affected by the productive level of the cows and the particle size of the ration offered to them. High production cows (> 30 liters/day) had a higher carry over rate than low production cows (<30 liters/day). In

diets in which the particle size was not adequate, they presented a higher concentration of AFM₁ (0.0164 µg/l) and carry over rate (0.61%) than in those where the particle size of the ration was ideal (0.0075 µg/l and 0.34%, respectively). It was found that the carry over rate was reduced by half when improvements were made in the quality of the diet offered to dairy cows.

It has been shown that due to the water solubility of the AFM₁ and thermal processes that change the hydrophilic interactions between AFM₁ and casein, reductions of the toxin in milk powder were achieved by spray drying of 96.1% in the content of AFM₁ of naturally contaminated milk. On the other hand, in the case of cheeses, AFM₁ increases its concentration with respect to the original milk due to its affinity with the casein fraction of the milk. The level of AFM₁ was found to be on average 4.8 and 11.8 times higher in soft and hard cheeses, respectively, compared to the milk used for its manufacture. However, a large proportion of AFM₁ (60-70%) migrates to the whey. The results obtained indicated that aflatoxin is available in dairy products made from naturally contaminated milk since the toxin can have different behaviors according to the process to which it is subjected.

In Chapter III, a quantitative model of the risk of exposure to aflatoxins in different population groups was elaborated by estimating the daily intake of milk and milk products by Argentine consumers. In accordance with the potential risks to human safety derived from the consumption of aflatoxin in milk and milk products, the estimated daily intake showed that the amount of aflatoxin is higher than the recommended tolerable daily intake (0.0002 µg/l), in the categories of child population evaluated (46.2% and 45.2% in children from 6 to 23 months and 2 to 5 years, respectively), being lower for the adult population (9.6% in women of 10 to 49 years old). Even so, children, considered the most susceptible population, would not be exposed to a significant risk due to the effects of aflatoxins through milk consumption, although this situation should be evaluated over time. The sensitivity analysis indicated that certain foods that are part of the diet of dairy cattle show considerable levels of

aflatoxins, such as silages, pastures, commercial balances and cottonseed. The results of this chapter indicated the need to implement good management practices to prevent and/or inhibit the growth of fungi or add sequestrants in diets to block the action of aflatoxins.

In Chapter IV, the implementation of a good management practice was proposed to avoid or minimize risks to human and animal health due to the effect of aflatoxins. The addition of a commercial sequestrant to the diet of dairy cows naturally contaminated with aflatoxins was evaluated on the aflatoxin concentration in the milk and the carry over rate. The incorporation of sequestrant in the diet allowed to reduce the carry over rate of aflatoxin from feed to milk by 65%, with a behavior independent of the productive level of the cows. Due to the exposure levels to which the dairy cows are exposed, no metabolic or health effects were observed on them. Through an analysis of scenarios, it was demonstrated that the incorporation of this management measure would allow reducing the percentage of exposure of the population most susceptible to the effect of aflatoxins by the consumption of milk and milk products. On the other hand, reducing aflatoxin limits below those established by international regulations would allow our country to improve external performance and access markets for dairy products and byproducts such as whey protein concentrate, with import markets demanding because of their destiny in infant feeding.

The results of this thesis work made it possible to advance in the knowledge of the risk factors that impact on the probability of the appearance of contaminants in milk and dairy products, making it possible to direct the management measures through good practices to be applied in the systems of production of milk with scientific sustenance.

INTRODUCCIÓN GENERAL

La seguridad alimentaria es una de las grandes preocupaciones de la sociedad actual. El concepto seguridad alimentaria ha adquirido diferentes significados y ha ido evolucionando con el paso de los años. Según la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), existe seguridad alimentaria cuando “todas las personas tienen en todo momento acceso físico, social y económico a alimentos seguros, nutritivos y en cantidad suficiente para satisfacer sus requerimientos nutricionales y preferencias alimentarias, a fin de llevar una vida activa y saludable” (FAO, 2009).

El componente de mayor repercusión en los países desarrollados es la utilización de los alimentos, asociado habitualmente a la inocuidad, garantía de que un alimento no cause daño en la salud del consumidor cuando sea preparado y/o ingerido de acuerdo al uso que se destine (FAO, 2011). Es por ello que en las últimas décadas se han adoptado diferentes medidas para prevenir, controlar, y reducir los riesgos de origen alimentario para velar por la salud del consumidor. Los controles y el seguimiento del alimento se efectúan a lo largo de toda la cadena alimentaria y en todos los sectores de la alimentación bajo el concepto “de la granja a la mesa” (European Commission, 2015).

A nivel europeo, el sistema RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed) cataloga los peligros de seguridad alimentaria sobre una base de datos semanal y anual. Este sistema representa la herramienta de intercambio de información más importante, proporcionando una elevada protección del consumidor ante los peligros para la salud que se ocasionan en el sector alimentario.

De acuerdo con el informe más reciente, un total de 2962 notificaciones relativas a productos alimenticios fueron transmitidas a través del RASFF en el año 2016, de las cuales, 495 correspondieron a notificaciones relacionadas con la presencia de micotoxinas en alimentos (RASFF, 2016). Como se puede observar en la *Figura 1*, las micotoxinas ocuparon el segundo lugar de los peligros alimentarios,

ocupando el primer y tercer puesto las notificaciones relacionadas con la presencia de microorganismos patógenos y plaguicidas, respectivamente.

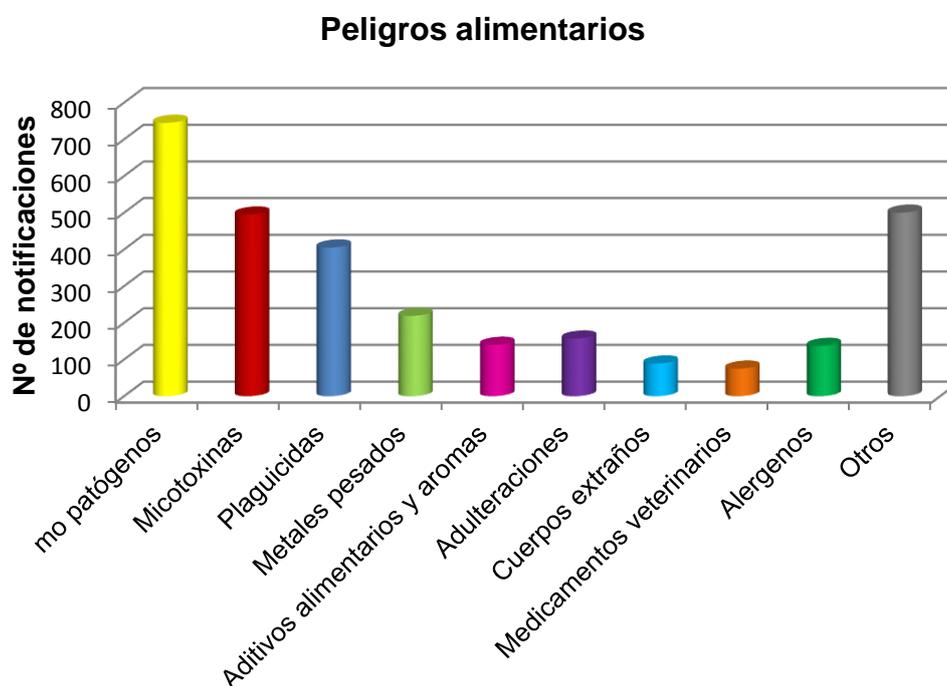


Figura 1: Notificaciones por peligros alimentarios (RASFF, 2016)

Dentro de los productos alimenticios, la leche es un alimento altamente nutritivo y es una fuente de macro y micronutrientes necesarios para el crecimiento, desarrollo y mantenimiento de la salud humana. Sin embargo, también puede ser una fuente de contaminantes naturales de los alimentos que pueden causar enfermedades (Iqbal *et al.*, 2013).

Argentina se encuentra dentro de los 17 principales países productores de leche del mundo, ocupando el segundo puesto a nivel de Sudamérica después de Brasil, con un consumo *per capita* que se ubica dentro del rango de los países desarrollados (209 litros/habitante año) y muy por encima de lo recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OCLA, 2016). La elevada disponibilidad de leche por habitante (295 litros/habitante) define al país como exportador neto, ocupando el 5° lugar después de Nueva Zelanda, la Unión Europea, Estados Unidos y Australia. Dentro de este contexto, cualquier escenario de crecimiento cuantitativo de la

producción nacional debe orientarse mayoritariamente hacia mercados externos (Taverna, 2012).

Existen en el país aproximadamente 11.300 tambos, ubicados en la región agroecológica denominada “Pampa Húmeda”, con una región tradicionalmente productora conformada por los departamentos del centro-oeste de la provincia de Santa Fe y centro-este de la provincia de Córdoba, aportando el 69% de la producción nacional (OCLA, 2016).

En los últimos años, la lechería argentina experimentó cambios profundos caracterizados por la intensificación de los sistemas productivos con liberación de tierras para la producción agrícola y mayor concentración de animales en menores superficies, obligados a integrarse a modelos mixtos agrícola-ganaderos (Taverna *et al.*, 2004). Este fenómeno aumentó los riesgos de contaminación en el tambo por la presencia en la leche de xenobióticos como los antimicrobianos, plaguicidas, toxinas provenientes de la contaminación de los alimentos con hongos (micotoxinas), microorganismos patógenos, detergentes, desinfectantes y otros contaminantes como nitratos y nitritos, melanina, diacianodiamida, metales pesados, entre otros.

La intensificación de los sistemas agropecuarios incrementa los flujos de energía y nutrientes, y los expone a procesos de contaminación (Viglizzo y Roberto, 1997). La misma, se asocia a una serie de impactos negativos: 1) incremento de la carga animal, con mayor cantidad de animales concentrados en menores superficies lo que trae aparejado una importante producción de estiércol, cuya disposición final requiere de especial cuidado por el efecto que tal concentración pueda ejercer sobre el ambiente con graves impactos en el agua superficial y subterránea (Herrero y Gil, 2008) y 2) esta intensificación está acompañada generalmente por una mayor producción y uso de alimentos cosechados y almacenados en diversas condiciones, con un mayor uso de plaguicidas y fertilizantes que pueden por un lado, ingresar a la leche y por el otro, provocar un deterioro de la calidad superficial y subterránea del

agua por exceso de nutrientes químicos, en especial de eutrofización por altas concentraciones de nitrógeno (Alfaro y Salazar, 2005; Carbó *et al.*, 2014).

Este fenómeno provocó también el desarrollo de actividades conjuntas en una misma explotación como respuesta a la mayor exigencia del sistema y a la competencia por el recurso tierra. La mayoría de los establecimientos existentes a nivel provincial se caracterizan por presentar actividades mixtas, es decir, la producción lechera convive con la agrícola (Arregui *et al.*, 2013). Parte de los granos producidos y sus subproductos, generalmente tratados con agroquímicos y/o fertilizantes orgánicos e inorgánicos, son utilizados como alimento del ganado lechero y se presentan como un factor de riesgo importante de contaminación de la leche.

Por lo planteado, el sector productivo primario presenta varios puntos dentro del proceso de producción donde la inocuidad puede verse comprometida y afectar a la salud pública. Sumado a esto, el mercado actual de productos lácteos está cada vez más influenciado por exigencias de mercados internacionales y de los consumidores en materia de inocuidad y seguridad alimentaria, constituyendo barreras para la comercialización interna y externa (Boland *et al.*, 2001).

Sumado a este contexto, en los últimos 25 años Argentina ha evolucionado desde una lechería de mercado interno a una creciente inserción internacional con una alta diversificación en el destino de sus exportaciones. Los productos de exportación más importantes para Argentina son las leches en polvo, ciertos quesos, suero de queso y sus derivados (concentrado de proteínas de suero). Así, de los 650 millones de litros exportados en los primeros cinco meses del 2018, un 50,8% salió como leches en polvo enteras, descremadas y modificadas, un 20,9% en quesos y 20,1% de suero en polvo (OCLA, 2018).

El 50% de la leche en polvo exportada es destinada a la elaboración de fórmulas infantiles o leche maternizada como alternativa ante la necesidad de suministrar a recién nacidos (de 0 a 6 meses) un alimento que supla la leche materna y a niños en la primera infancia (hasta los 3 años). Respecto al suero, el mismo es

utilizado para consumo humano como parte de formulados infantiles, chocolates, panificados, lácteos, bebidas, productos cárnicos, consumo animal e industria farmacéutica.

Debido a la susceptibilidad de la población de destino, los estándares de calidad se han redoblado y se muestra una constante evolución en términos de nuevos metabolitos a analizar y umbrales exigidos. El control de estas sustancias involucra a toda la cadena (desde el tambo hasta la góndola) y requiere del desarrollo e implementación de estrategias de intervención. Esto permitiría dar garantías de inocuidad y seguridad alimentaria, aspectos importantes para la protección de la salud humana, logro de credibilidad y posibilidad de mayor participación en el comercio mundial.

En esta tesis se evaluaron tres tipos de contaminantes a lo largo de la cadena láctea: aflatoxinas, residuos de plaguicidas, y nitratos y nitritos. La aflatoxina M₁ (AFM₁) es un metabolito hidroxilado de aflatoxina B₁ (AFB₁) presente en los alimentos del ganado (Asi *et al.*, 2012), que se excreta en la leche de animales lactantes (Fallah *et al.*, 2009). La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) ha clasificado a AFB₁ como carcinógeno del Grupo 1 (IARC, 2002). Los estudios han demostrado que la presencia de AFM₁ en la leche y los productos lácteos es un problema de salud porque en muchos países, todos los grupos etarios consumen regularmente estos productos en su dieta diaria (Fallah *et al.*, 2009). Además, posteriormente puede contaminar otros productos lácteos, como el queso, el yogur y puede generar problemas de salud para los consumidores.

Los plaguicidas son compuestos lipofílicos que ingresan en el cuerpo humano a través de los alimentos, que tienen un origen animal especialmente rico en lípidos, como la leche (Tecles, 2013). La presencia de pesticidas en la leche fue reportada por varios autores en diferentes países durante las últimas décadas, y el uso de la mayoría de estos productos químicos ha sido prohibido en muchos países (Nag *et al.*, 2007). Sin embargo, las aplicaciones de plaguicidas constituyen un serio riesgo para: 1) la

salud específicamente en los bebés, que tienen sistemas metabólicos y enzimáticos menos desarrollados (Shaker y Elsharkawy, 2015), 2) el medio ambiente y 3) el comercio exterior, si no se aplican adecuadamente a fin de no dejar residuos en los alimentos del ganado bovino lechero comprometiendo la inocuidad de la leche y los productos lácteos (Giorda y Baigorri, 1997; Pengue, 2001; Novo *et al.*, 2011).

La presencia de residuos de plaguicidas en productos de consumo es uno de los aspectos de peligrosidad de los agroquímicos que más preocupa actualmente, tanto por la sensibilidad de la opinión pública respecto a la calidad de los alimentos, como por su incidencia en el comercio a nivel nacional e internacional y su importancia en la salud pública (Coscollá, 1993).

Los nitratos y nitritos son compuestos iónicos que se encuentran presentes de forma natural en el suelo, agua y alimentos en bajas concentraciones, pudiéndose incrementar como consecuencia de las actividades humanas. Además de las fuentes naturales, son utilizados en fertilizantes y plaguicidas en las actividades agrícolas (Albert, 1997).

El nitrato es uno de los contaminantes más frecuentes de las aguas subterráneas y su presencia puede asociarse a problemas de salud humana, especialmente en grupos sensibles como los lactantes. El significado toxicológico del ión nitrato para la población humana es derivado del hecho de que los nitratos pueden ser convertidos a nitritos y estos pueden reaccionar con la hemoglobina afectando el transporte de oxígeno en sangre, originando la condición patológica denominada metahemoglobinemia o síndrome del bebé azul (Winter *et al.*, 2007). Por otro lado, los iones nitritos pueden también reaccionar con aminas secundarias y terciarias para formar compuestos N-nitrosos (nitrosaminas), inductores del cáncer (Avery, 1999).

Si bien la información existente sobre la prevalencia de los contaminantes enumerados es conocida a nivel internacional, en general, en nuestro país no se ha abordado de manera conjunta el estudio de la prevalencia de contaminantes, las rutas de contaminación de la leche y los factores de riesgos asociados a su presentación.

Conocer cuáles son los factores que impactan en la probabilidad de presentación de estos xenobióticos de gran relevancia para la salud pública como para el comercio internacional de leche y productos lácteos, será de fundamental importancia para sustentar científicamente las medidas de gestión que se decidan adoptar.

Por lo expuesto, en esta tesis se planteó evaluar no sólo la presencia de contaminantes en el producto final, sino de comprender la relación con el medio bajo el cual la leche se produce, identificando mediante la evaluación de factores de riesgo, aquellas prácticas dentro del proceso de producción que suponen un riesgo para la inocuidad de la leche y los productos derivados de la misma. La información generada permitió evaluar el riesgo de exposición de la población Argentina a la presencia de algunos contaminantes debido al consumo de leche y productos lácteos, así como considerar pautas de manejo ante las situaciones detectadas.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral fue evaluar el impacto de las prácticas de manejo en los diferentes sistemas de producción de leche de Argentina sobre la presencia de contaminantes en leche, productos y subproductos lácteos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Investigar la presencia y los niveles de contaminantes en la leche cruda en tambos de la cuenca lechera central Argentina en diferentes sistemas de producción y períodos climáticos.
2. Identificar los factores de riesgo asociados a la presencia de contaminantes en la leche cruda.
3. Cuantificar la tasa de transferencia de los contaminantes a la leche, productos y subproductos lácteos y evaluar los factores que la influyen.
4. Realizar una evaluación de riesgo de contaminantes en diferentes grupos de población mediante la estimación de la ingesta diaria de leche y productos lácteos por los consumidores argentinos.
5. Proponer la implementación de buenas prácticas de manejo tendientes a evitar o minimizar los riesgos para la salud humana y animal debido a la presencia de contaminantes en la leche.

CAPITULO I: Estudio observacional: Factores de riesgo asociados a la presencia de contaminantes en leche de tanque proveniente de tambos de la principal cuenca lechera de Argentina

1. INTRODUCCION

En Argentina, la producción láctea conforma uno de los complejos agroalimentarios más importantes y dinámicos dentro de la economía nacional. Solo respondiendo a las nuevas y crecientes demandas sobre inocuidad del mercado internacional, la producción lechera logrará alcanzar la competitividad necesaria para aumentar las exportaciones del sector (DNL, 2017).

La producción lechera de la Argentina ha transitado en la última década un camino de transformaciones y procesos de intensificación de los sistemas de producción. Entre otros, la alimentación intensiva de vacas lecheras en corrales es una práctica que ha crecido instalándose en varias regiones del país, particularmente en la región pampeana. Este sistema de producción ha encontrado espacios en planteos más complejos, agrícola-ganadero en el mismo campo como estrategia de diversificación (Pordomingo, 2009).

Por lo planteado, el sector productivo primario presenta varios puntos dentro del proceso de producción donde la inocuidad de la leche puede verse comprometida debido a la presencia de xenobióticos como los antimicrobianos, plaguicidas, toxinas provenientes de la contaminación de los alimentos con hongos (micotoxinas) y de microorganismos patógenos, detergentes, desinfectantes y otros contaminantes como nitratos y nitritos, melanina, diacianodiamida, metales pesados, entre otros (Boland *et al.*, 2001). Debido a la susceptibilidad de la principal población (niños) a la cual la leche va destinada, los estándares de calidad se han redoblado.

El monitoreo y control de estas sustancias involucra a toda la cadena (desde el tambo hasta la góndola) y requiere del desarrollo e implementación de estrategias de intervención. Esto permitiría dar garantías de inocuidad y seguridad alimentaria, aspectos importantes para la protección de la salud humana, logro de credibilidad y posibilidad de mayor participación en el comercio mundial.

Contaminantes explorados y su relevancia en leche y productos lácteos

Aflatoxinas

Las aflatoxinas son un grupo de micotoxinas importantes y pueden ser producidas por diferentes especies del género *Aspergillus*, principalmente *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* (Elsanhoty *et al.*, 2014), influenciado (entre otros factores) por las condiciones ambientales que favorecen el crecimiento del moho y la producción de toxinas en cualquier etapa de la cosecha o el almacenamiento de los alimentos (Van Egmond, 1989).

Entre las aflatoxinas existentes (B₁, B₂, G₁ y G₂), la B₁ es el carcinógeno natural conocido más prevalente y potente (Gournama y Bullerman, 1995). En los rumiantes, tras la ingestión de alimentos contaminados, la aflatoxina B₁ (AFB₁) es parcialmente degradada en el rumen, mientras que la AFB₁ absorbida sufre rápidamente procesos metabólicos en el hígado a varios metabolitos secundarios, entre ellos, AFM₁ que se excreta en la leche (Kuilman *et al.*, 2000; Kensler *et al.*, 2011). Por lo tanto, una de las principales formas en que los humanos están expuestos a las aflatoxinas es a través del consumo de leche y productos lácteos (Campagnollo *et al.*, 2016).

Tanto la AFB₁ como la AFM₁ tienen potencial carcinogénico, teratogénico y mutagénico, causando un gran daño a la salud humana (Hernández-Mendoza *et al.*, 2009). En el ganado bovino, el consumo de estas micotoxinas se asocia con una disminución en el consumo de alimento, pérdida de peso, reducción en la producción de leche, entre otras consecuencias (Driehuis *et al.*, 2008).

En general, se considera que aproximadamente el 0,3-6,2% de AFB₁ presente en la alimentación animal se excreta como AFM₁ en la leche, dependiendo del animal, la estación del año y la producción de leche, así como muchos otros factores (Creppy, 2002; EFSA, 2004). En nuestro país, el proceso de intensificación de la producción lechera llevó a un mayor uso de alimentos cosechados y almacenados en condiciones muy variables por lo que la presencia de estas toxinas es más frecuente y casi inevitable (Gaggiotti *et al.*, 2004).

La posible presencia de AFM₁ en la leche y sus subproductos representa una preocupación mundial porque estos productos son consumidos principalmente por niños, que son más susceptibles a los efectos adversos de las micotoxinas (Boudra *et al.*, 2007). Este hecho es muy importante ya que AFM₁ es muy estable a los tratamientos térmicos como la pasteurización (Galvano *et al.*, 1996; Prandini *et al.*, 2009). Por lo tanto, varios países han establecido límites máximos permitidos de aflatoxinas tanto en alimentos de ganado bovino como en leche y productos lácteos para proteger la salud pública (Galvano *et al.*, 1996).

Debido a que las micotoxinas son un contaminante natural de los alimentos, el mejor control es la prevención de su formación en el campo (Binder *et al.*, 2007). El conocimiento de los factores de riesgo que impactan en su presencia en leche, son indispensables para elaborar medidas de gestión con base científica y recomendar buenas prácticas a nivel de los tambos, que ayuden a prevenir y minimizar los riesgos de contaminación de los alimentos y la leche con aflatoxinas como así también a preservar la salud del rodeo lechero.

Plaguicidas

Según la definición de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), un plaguicida o pesticida, es cualquier sustancia destinada a prevenir, destruir, atraer, repeler o combatir cualquier plaga, incluidas las especies indeseadas de plantas o animales, durante la producción, almacenamiento, transporte, distribución y elaboración de alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales, o que pueda administrarse a los animales para combatir ectoparásitos (FAO, 2002).

El uso de plaguicidas es indispensable para mejorar la producción agrícola y controlar las enfermedades humanas y animales transmitidas por vectores. Sin embargo, el uso inadecuado de estas sustancias puede dejar residuos en los alimentos suministrados al ganado y estos, cuando se metabolizan, se depositan en la

grasa y los músculos, pudiéndose también encontrar en la leche. Del mismo modo, el uso directo de estas sustancias para controlar los parásitos en el ganado puede generar residuos en la leche cuando no se respeta el período de espera (Rothwell *et al.*, 2001).

La exposición a plaguicidas, tanto en humanos como en animales, se da por tres vías: respiratoria, absorción dérmica y consumo de alimentos contaminados, siendo esta última la de mayor impacto (Tsiplakou *et al.*, 2010). La mayoría de las veces, la presencia de residuos de plaguicidas en alimentos para animales es la principal fuente de contaminación de productos lácteos con los mismos, ya que pequeñas cantidades entran en el cuerpo de los rumiantes, se concentran en el tejido graso y se transportan a través de las grasas y lipoproteínas circulantes del organismo para posteriormente ser excretados por orina y leche (Kampire *et al.*, 2011; Díaz *et al.*, 2012; Luzardo *et al.*, 2012). Otras vías de entrada a la leche pueden ser la contaminación del agua con plaguicidas, la aplicación de éstos en animales para la eliminación de ectoparásitos y derrames accidentales (Tsiplakou *et al.*, 2010)

La contaminación de la leche y los productos lácteos con residuos de pesticidas es un problema grave de salud pública, ya que los mismos son ampliamente consumidos por bebés, niños y adultos de todo el mundo (Goulart *et al.*, 2008). Este punto es de particular interés ya que los niños pequeños pueden estar altamente expuestos a los residuos de pesticidas y tener un mayor riesgo de efectos adversos para la salud debido a sus características fisiológicas.

La exposición crónica de plaguicidas presentes en la leche tiene efectos adversos en la salud pública y causa enfermedades graves como cáncer, afecciones neurológicas, daños al sistema reproductivo y malformación congénita (Alavanja *et al.*, 1996; Damalas y Eleftherohorinos, 2011).

Un estudio previo realizado en la cuenca lechera de Santa Fe-Córdoba reveló la presencia de insecticidas organoclorados, organofosforados y piretroides en leche (Rojas *et al.*, 2012). Los plaguicidas organoclorados (OC) son sustancias químicas

tóxicas de alto impacto debido a su persistencia en el medio ambiente y la bioacumulación en humanos (Sachin *et al.*, 2013; Velasco *et al.*, 2014).

Los pesticidas organofosforados (OP) se utilizan ampliamente en la agricultura, principalmente como insecticidas, debido a su amplio espectro de acción y menor persistencia en el medio ambiente que los pesticidas organoclorados (Gazzotti *et al.*, 2009). Sin embargo, los OP pueden concentrarse a lo largo de la cadena alimentaria. Las vacas lecheras pueden absorber estos compuestos por múltiples vías (inhalación, ingestión y absorción dérmica) y, por lo tanto, pueden ser excretados en la leche. Esto se ve favorecido por las posibles interacciones de los OP con los lípidos y las proteínas y puede verse influido por la estación climática (Pagliuca *et al.*, 2006).

Los piretroides (P) son ampliamente utilizados en agricultura, áreas residenciales (interiores y exteriores), salud pública, desinsectización de productos almacenados y medicina veterinaria (Lestremau *et al.*, 2014). Como los piretroides son compuestos lipofílicos, con altos valores de coeficiente de partición octanol-agua (log KOW), tienden a acumularse fácilmente en los tejidos grasos. Dado que la leche contiene una cantidad considerable de grasa, la presencia de estos compuestos en ella está fuera de toda sospecha (Akhtar y Ahad, 2017).

Los piretroides son efectivos en dosis bajas, muestran una baja toxicidad para los mamíferos, una rápida biotransformación en el cuerpo humano y altas tasas de degradación ambiental. Por lo tanto, esta clase de insecticidas generalmente se usan más que los OP y carbamatos (Wu *et al.*, 2013). Ciflutrina, bifentrin y deltametrina son los piretroides más tóxicos, pero también tienen la toxicidad oral aguda más baja en los mamíferos (ratas). Estos datos solo tienen en cuenta la toxicidad individual. Sin embargo, cuando están asociados, los piretroides pueden tener efectos aditivos (Cao *et al.*, 2011).

Los alimentos de origen animal son ampliamente consumidos por los humanos para satisfacer las demandas diarias de energía. La posible presencia de residuos de pesticidas en este tipo de alimentos es un problema de seguridad alimentaria. Para

controlar el uso de pesticidas y proteger a los consumidores, las autoridades reguladoras, como el *Codex Alimentarius*, establecieron límites máximos de residuos (LMR) para pesticidas en estos alimentos.

El análisis de los alimentos para animales y la leche en busca de residuos de plaguicidas es indispensable para monitorear los niveles e identificar las principales fuentes de contaminación de la leche y productos lácteos. En nuestro país no existen estudios de trazabilidad de plaguicidas a lo largo de la cadena láctea, sino sólo en matrices evaluadas de manera independiente, como en leche (Lorenzatti *et al.*, 2003; Rojas *et al.*, 2012) o en agua (Alonso *et al.*, 2018; Demonte *et al.*, 2018).

Nitratos y nitritos

Los nitratos (NO_3) y nitritos (NO_2) son compuestos iónicos producidos principalmente por fuentes naturales, encontrándose presentes en el suelo, agua y alimentos, en bajas concentraciones. El aumento en su concentración observado en los últimos años, es producido por fuentes antropogénicas derivado principalmente, de la agricultura y ganadería intensiva (Vitousek *et al.*, 1997).

En áreas rurales, los nitratos NO_3 y NO_2 , se introducen principalmente a través de fertilizantes, acumulación y aplicación de estiércol animal y la proximidad a sistemas sépticos dañados o mal mantenidos (Spears *et al.*, 2003). La cantidad de nitrógeno orgánico proporcionada por los animales está relacionada con la cantidad de heces y orina, que a su vez depende directamente de la nutrición y el tipo de sistema de producción (Gelberg *et al.*, 1999). No es raro encontrar varias fuentes de contaminación alrededor del área donde se ubica el pozo de abastecimiento de agua, tales como salas de ordeño, corrales de alimentación, lagunas de tratamiento de efluentes y sistemas sépticos, todas ellas importantes fuentes de nitrógeno.

La contaminación por NO_3 es una preocupación tanto para la salud como para el medio ambiente, ya que es uno de los contaminantes más frecuentes de las aguas

subterráneas y su presencia puede asociarse a problemas de salud humana, especialmente en grupos sensibles como los lactantes (Hubbard y Sheridan, 1989).

Los niveles altos de NO_3 en el agua son potencialmente capaces de reducir la capacidad de transporte de oxígeno de la sangre al producir metahemoglobina, que induce síntomas de cianosis (Winter *et al.*, 2007). Los bebés menores de 6 meses de edad tienen más probabilidades de sufrir estos efectos adversos que los adultos, lo que causa el llamado "síndrome del bebé azul", una condición potencialmente mortal (Burden 1961; NRC 1974; Deeb y Sloan, 1975; Knobeloch *et al.*, 2000).

La exposición crónica a NO_3 en aguas subterráneas también se ha asociado con enfermedad tiroidea (van Maanen *et al.*, 1994), diabetes (Parslow *et al.*, 1997), linfoma no Hodgkin (Weisenberger, 1990) y aumento del riesgo de cáncer de colon (De Roos *et al.*, 2003). Asimismo, algún tipo de cáncer del tracto gastrointestinal ha sido atribuido a la acción de compuestos nitrosos, formados en el interior del organismo a partir de los NO_2 , los que a su vez proceden de la reducción de los NO_3 consumidos con el agua (Avery, 1999).

En los Estados Unidos el límite máximo permitido de NO_3 en agua para consumo humano es de 44 mg/l (USEPA, 1983). En nuestro país, el Código Alimentario Argentino establece un límite de 45 mg/l de agua (CAA, 2007).

Los nitratos son un tema de mucho interés, por su asociación a prácticas de manejo productivo, como es la intensificación de los sistemas productivos y el aumento de la carga animal en determinados sectores (Goss *et al.*, 1998; Rudolph *et al.*, 1998; Herrero *et al.*, 2000b).

En las zonas donde se practica una agricultura y ganadería intensiva se utilizan enormes cantidades de abonos químicos, a los que se suman los abonos naturales que provienen de las excretas animales (Davis *et al.*, 2006). Estos abonos suelen contener una cantidad importante de compuestos nitrogenados, como los nitratos, que en proporciones adecuadas mejoran el crecimiento de los cultivos y aumentan su rendimiento. Sin embargo, cuando estos compuestos se encuentran en cantidades

demasiado altas para que sean absorbidos por las plantas, se infiltran a través del suelo y alcanzan las aguas subterráneas, contaminando pozos y acuíferos. Análogamente, los excrementos procedentes de animales de granjas también aumentan la concentración de nitratos en el suelo, de donde pueden pasar a los acuíferos que hay bajo ellos (Carbó *et al.*, 2009).

Los fertilizantes, abonos y residuos orgánicos de base nitrogenada aplicados al suelo, son degradados por los microorganismos hasta nitratos, entre otros compuestos inorgánicos, que son esenciales para la nutrición vegetal, pero a su vez pueden ser contaminantes del medio ambiente (Echeverría y Bergonzi, 1995). Los nitratos son altamente solubles y no son retenidos por las cargas negativas de los coloides del suelo, de modo que se mueven libremente con el agua de drenaje, a través del perfil, hacia los acuíferos (Ceplecha *et al.*, 2004).

Por último, numerosos autores asociaron a las características constructivas y condiciones de sitio alrededor de los pozos de captación de agua como posibles fuentes de contaminación puntual de los mismos (Hallberg *et al.*, 1989, 1992; Glanville *et al.*, 1997; Goss *et al.*, 1998; Ceplecha *et al.*, 2004).

Altos niveles de nitratos en el suelo pueden conducir a niveles relativamente altos de nitratos en el agua de consumo, lo cual afecta adversamente la salud humana. De aquí, la importancia de monitorear los niveles de nitratos en los pozos o en cualquier otra fuente de suministro de agua para consumo humano, animal e higiene de las instalaciones. El conocimiento de los factores de riesgos asociados permitirá proteger las fuentes de agua minimizando los riesgos para la salud humana y animal derivados de la contaminación por nitratos.

Si bien la información existente sobre la prevalencia de los contaminantes citados es conocida a nivel nacional, en general, no se ha abordado de manera conjunta el estudio de la prevalencia de estos contaminantes, las rutas de contaminación y los factores de riesgos asociados a su presencia en la leche.

En la presente tesis no sólo se realizó un monitoreo de presencia/ausencia de contaminantes, sino que también se buscó comprender la relación con el medio bajo el cual la leche se produce. La generación de esta información a nivel de cuenca lechera central de Argentina, es de gran relevancia tanto para la salud pública como para el comercio nacional e internacional de leche y productos lácteos.

Para ello, en este estudio, se aplicaron modelos estadísticos que permitieron identificar los factores de riesgo dentro del proceso de producción, que impactan en el aumento de la concentración de contaminantes en la leche. Los mismos, se utilizaron para intentar explicar la relación entre aspectos físicos y ciertas prácticas de manejo productivas y ambientales de los establecimientos, sobre la inocuidad de la leche y los productos lácteos.

Identificar cuáles son los factores de riesgo que impactan en la probabilidad de aparición de estos contaminantes en leche sirve como base para enfocar y sustentar científicamente las medidas de manejo que se decidan adoptar.

OBJETIVO

Las industrias lácteas de la región tienen como objetivo generar alimentos seguros, sanos y nutritivos para la población. La mayoría de ellas, además, destinan parte de su producción a la elaboración de fórmulas infantiles debiéndose enfrentar a las demandas impuestas por los países importadores en materia de calidad e inocuidad de dichos productos lácteos.

Los objetivos de este capítulo fueron:

1. Evaluar la contaminación natural por aflatoxina M₁, plaguicidas, nitratos y nitritos en leche de tanque, de establecimientos provenientes de la principal Cuenca Lechera de Argentina.
2. Identificar los factores de riesgo asociados con la presencia de estos contaminantes en la leche.

La identificación de los factores de riesgo dentro de la cadena láctea permite enfocar las medidas de manejo a aplicar mediante buenas prácticas en pos de minimizar los riesgos para la salud humana e incrementar su valor en el comercio mundial de alimentos.

Los datos de contaminación de la leche proporcionados por este trabajo podrían ser una referencia científica útil para el análisis y manejo de riesgos futuros para la producción regional de leche cruda.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Selección de tambos

Las muestras fueron tomadas en establecimientos lecheros ubicados en la principal cuenca lechera de nuestro país. El área de estudio involucró varios departamentos del centro-oeste de la provincia de Santa Fe y noreste de la provincia de Córdoba (*Figura 2*).

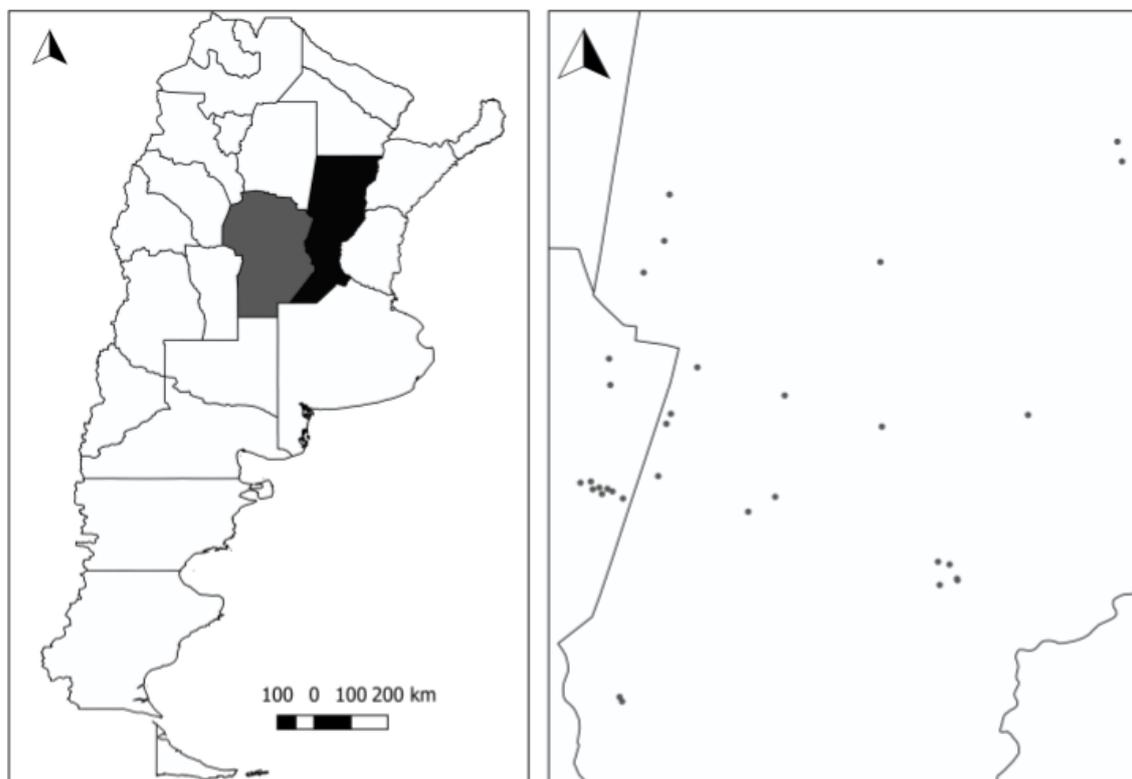


Figura 2: Distribución de tambos muestreados en la provincia de Santa Fe y Córdoba

Córdoba es la principal provincia productora de leche del país, representando el 31% del total nacional. La cuenca noreste de la provincia de Córdoba presenta 1.705 establecimientos productores de leche con alrededor de 296 mil vacas, representando el 44% de la producción total provincial (SENASA, 2014).

Santa Fe es la segunda provincia productora de leche del país, representando el 28% del total nacional. La cuenca lechera santafesina -ubicada en el centro oeste- constituye la región productora más importante de América Latina, con alrededor de 4.300 tambos y 577 mil vacas que producen más de 2.600 millones de litros de leche (FUNPEL, 2014).

El número total de establecimientos muestreados fue de 35, para su cálculo se consideró que existían en la zona bajo estudio 6.000 tambos, una prevalencia estimada de los principales contaminantes inferior al 10% (Signorini *et al.*, 2012), un error en la estimación del 10% y una confianza del 95%.

Para la selección de estos tambos se consideraron tres tipos de sistemas productivos representativos de los sistemas de producción predominantes en la zona bajo estudio, con la siguiente categorización:

Pastoriles con suplementación: son aquellos sistemas donde la dieta anual del ganado lechero bovino está basada principalmente en pasturas a través del pastoreo directo y realizan una suplementación basada en alimentos balanceado y una PMR (Ración Parcialmente Mezclada) durante todo el año, pero con mayor participación en los meses de otoño e invierno cuando existe un déficit de pasto.

Estabulados (tipo Dry Lot): son aquellos sistemas en los cuales las vacas permanecen encerradas en corrales de tierra al aire libre, con una dieta TMR (Ración Totalmente Mezclada) equilibrada y estable durante todo el año.

Pastoriles con encierre estratégico: es un sistema híbrido de los dos anteriores, donde las vacas permanecen encerradas durante los meses de otoño e invierno debido al déficit de pasturas y/o a eventos climáticos.

El número de establecimientos muestreados dentro de cada estrato (tipo de sistema productivo) fue calculado de manera proporcional al número de establecimientos que practicaban cada uno de los sistemas dentro de la totalidad de tambos radicados en la zona bajo estudio. Esta elección permitió inferir sobre el impacto de las distintas prácticas de manejo y el nivel de tecnología aplicado, sobre la concentración de contaminantes hallados en leche. Todos los establecimientos fueron georeferenciados mediante GPS (*Global Positioning System*).

Cabe aclarar que el número final de tambos muestreados fue de 34 debido al cese de actividad de uno de los establecimientos que formaba parte del estudio por haber sufrido un fenómeno climático adverso (inundaciones) durante el período de muestreo, por lo que se desestimó para el análisis.

2.2. Muestras

En cada establecimiento se tomaron muestras durante dos estaciones contrastantes desde el punto de vista climático y del tipo de alimentación recibida por el rodeo lechero (otoño-invierno 2016 y primavera 2016-verano 2017), de las siguientes matrices alimentarias:

2.2.1. Alimentos de ganado bovino lechero

Se tomó una muestra de cada alimento que compuso la dieta suministrada a las vacas en lactancia. Cada muestra de alimento estuvo compuesta por un mínimo de 10 a 20 submuestras tomadas de diferentes puntos del lugar de almacenamiento del alimento o en los lotes de pasturas. Las submuestras fueron luego mezcladas de manera homogénea hasta formar una muestra compuesta de aproximadamente 1 o 2 Kg. Todas las muestras se colocaron en bolsas de plástico con cierre hermético perfectamente identificadas y se transportaron en conservadoras al laboratorio donde se almacenaron a -20 °C hasta su procesamiento.

En total, 284 alimentos fueron muestreados. Los mismos estuvieron compuestos por: forrajes verdes (FV) como pasturas de alfalfa, avena, trigo y cebada;

forrajes conservados (FC) como silajes y henos; y productos y/o subproductos de la agroindustria (PySub.) como expeller, harinas, cáscara de soja, semilla de algodón, balanceados, burlanda y granos.

2.2.2. Leche de tanque

Un total de 68 muestras de leche cruda fueron recolectadas directamente del tanque de frío de los tambos después de la homogenización del contenido, bajo un protocolo de procedimiento de muestreo de leche en tanque de frío establecido por INTA-INTI (Taverna *et al.*, 2005). Las mismas se colocaron en envases de plástico estériles perfectamente identificados y se transportaron en conservadoras refrigeradas al laboratorio donde se mantuvieron almacenadas (-20°C) hasta el análisis.

2.2.3. Agua

El muestreo se realizó sobre las fuentes de agua de mayor utilización en el establecimiento y las más representativas de la calidad del agua del predio. En casi la totalidad de los casos, la fuente de agua más muestreada fue la perforación de las instalaciones de ordeño, considerando su importancia en la producción de leche (bebida animal e higiene de instalaciones) y además porque es la que se utiliza para bebida del personal (Pedraza, 1998; Herrero *et al.*, 2000b). Además, se tomaron muestras provenientes del bombeo de agua de molinos de viento y bombas sumergibles que generalmente abastecían tanques de almacenamiento y piletas para abrevado animal.

Un total de 90 muestras de agua fueron recolectadas teniendo en cuenta los períodos húmedos y secos de la región en estudio. Para ello se aplicó un protocolo de muestreo, transporte y conservación de muestras de agua con fines múltiples (INTA, 2011).

2.3. Determinación de contaminantes

2.3.1. Aflatoxinas

2.3.1.1. Detección de aflatoxina B₁ en alimentos de ganado bovino lechero

El análisis cuantitativo de AFB₁ en muestras de alimentos se basó en un inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) utilizando el kit de prueba RIDASCREEN®FAST (R-Biopharm, Alemania, artículo N° Z9999), con las siguientes características: límite de detección <1,7 µg/kg, tasa de recuperación del 95% y soluciones estándar 0, 5, 10, 20, 50 µg/kg.

Para la extracción, se pesaron cinco gramos de cada muestra de alimento previamente molido y se añadieron 25 ml de metanol/agua destilada (70/30) y se mezclaron vigorosamente usando un agitador mecánico durante 3 minutos a temperatura ambiente. El extracto se filtró a través de un papel de filtro Whatman N° 1 y se diluyó 1 ml del filtrado en 1 ml de agua destilada. Se utilizaron 50 µl del filtrado diluido por pocillo en el test.

Se añadieron 50 µl de las soluciones estándar y de las muestras preparadas a los pocillos para ocupar los sitios de unión. Luego se adicionaron, a cada pocillo, 50 µl de conjugado enzimático seguidamente de 50 µl de solución de anticuerpo. Se mezcló suavemente agitando la placa manualmente y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente (20-25°C). A continuación, el líquido se vertió fuera de los pocillos y los mismos se llenaron con 250 µl de solución tampón de lavado y se desechó nuevamente el líquido. Este paso de lavado se repitió dos veces.

En el siguiente paso, se añadieron 100 µl de solución de sustrato/cromógeno al pocillo y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente (20-25°C) en la oscuridad. Trascurrido ese lapso de tiempo, se añadieron 100 µl de solución *stop* a cada pocillo, mezclando el contenido de la micro placa suavemente, lo que condujo a una decoloración amarilla del cromógeno. En el transcurso de los siguientes 10 min se midió la Absorbancia (Ab).

2.3.1.2. Detección de aflatoxina M_1 en leche de tanque

El análisis cuantitativo de AFM₁ en leche se realizó usando el kit de prueba RIDASCREEN® (R-Biopharm, Alemania, artículo N° R1121). Los límites de detección fueron de 5 ng/l con tasas de recuperación del 100% y soluciones estándar 0, 5, 10, 20, 40, 80 ng/l.

Para la preparación de la muestra, se utilizaron 20 ml de leche a la cual se la calentó a 50 °C en un baño de agua durante 30 min para homogeneizar sus componentes. Luego, las muestras se centrifugaron durante 10 min a 3500 g/10 °C. Como las aflatoxinas son compuestos solubles en agua (Deshpande, 2002), la capa de crema superior se descartó por completo utilizando una pipeta Pasteur y la fase inferior descremada se usó para la prueba cuantitativa (100 µl por pocillo).

Se añadió 100 µl de solución de anticuerpo al fondo de cada pocillo, agitando manualmente el contenido de la microplaca y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente (20-25°C). A continuación, se vació el líquido de los pocillos golpeando energicamente (tres veces consecutivas) la microplaca sobre un papel absorbente limpio para asegurar la eliminación completa de restos líquidos. Luego, los pocillos se llenaron con solución tampón de lavado (250 µl por pocillo) y se volvió a verter el líquido. Este paso se repitió dos veces más.

En la siguiente etapa, se añadieron en cada pocillo 100 µl de las soluciones estándar y las muestras preparadas, agitando la placa manualmente y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Concluido ese período de tiempo, se repitió la etapa de lavado tres veces.

A continuación, se añadieron 100 µl de solución conjugada, agitando la placa manualmente y se incubó nuevamente durante 15 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Concluido ese período de tiempo, se repitió la etapa de lavado tres veces. Posteriormente, se añadieron 100 µl de solución de sustrato/cromógeno a los pocillos y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente (20-25 °C) en la oscuridad. Finalmente, se añadieron 100 µl de solución *stop*, mezclando el contenido de la

microplaca suavemente lo que condujo a una decoloración amarilla del cromógeno. En el transcurso de los siguientes 15 min se midió la absorbancia.

2.3.1.3. Lectura de las absorbancias

La Absorbancia (Ab) de todas las muestras se midió a 450 nm en un lector de placas ELISA (MULTISKAN EX, Thermo Electron). La intensidad de absorción fue inversamente proporcional a la concentración de aflatoxinas en la muestra. Se usó un software especial (RIDA®SOFT Win.net; R-Biopharm AG) para la cuantificación de los resultados de Ab de los inmuno-ensayos enzimáticos RIDASCREEN®.

2.3.1.4. Determinación de la tasa de transferencia de AFB₁ a AFM₁

La tasa de transferencia de AFB₁ a AFM₁ en la leche se calculó como el porcentaje de AFB₁ consumida que se excretó como AFM₁ en la leche. Las concentraciones de AFB₁ en los alimentos fueron la suma de la concentración de AFB₁ en cada ingrediente (µg/kg) dividido por la cantidad (en kg de materia seca) de alimento consumido. La cantidad total de AFM₁ excretada en la leche se calculó considerando la concentración de AFM₁ en la leche (µg/l) multiplicada por la cantidad total (l) de leche producida por las vacas.

2.3.2. Plaguicidas

2.3.2.1. Plaguicidas analizados

Todas las muestras de leche cruda (n=68) fueron analizadas para detectar plaguicidas, pero solo 54 muestras de alimentos de los establecimientos donde se detectaron residuos en la leche, fueron analizadas para realizar un seguimiento de las posibles fuentes de contaminación con plaguicidas en la leche.

Se analizaron residuos de 18 plaguicidas en leche y alimentos: *Insecticidas órganofosforados (OP)*: Diazinon, Dimetoato, Clorpirifos-metil, Pirimifos-metil, Clorpirifos. *Insecticidas órganoclorados (OC)*: Endosulfan. *Piretroides (P)*: Permetrina,

Cipermetrina, Deltametrina, Cialotrina, Bifentrin. Carbamatos (CB): Carbofuran. *Herbicidas (H)*: Atrazina. *Fungicidas (F)*: Pyraclostrobin, Metalaxil, Azoxistrobin, Cyproconazol, Tebuconazole.

Además de estos plaguicidas enunciados, sólo en leche fueron analizados los siguientes: *Insecticidas órganofosforados (OP)*: Diclorvos, Fenitrothion, Malation y Malaoxon. *Fungicidas (F)*: Picoxistrobin, Carboxine, Prothioconazol, Epoxiconazol, Fludioxonil, Kresoxim-Metil y Captan. *Herbicidas (H)*: Acetoclor. *Piretroides (P)*: Fenvalerato y Ciflutrina. *Insecticidas órganoclorados (OC)*: Lindano, Heptacloro, Aldrine, Clordano, Metoxiclor, Dieldrin, Endrin, para, para, dichlorodiphenyltrichloroethane (pp-DDT) y sus metabolitos: pp-DDD y pp-DDE.

El listado de estos compuestos investigados surgió de estadísticas del mercado argentino de fitosanitarios realizada anualmente por la Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (CASAFE, 2016).

2.3.2.2. *Detección de plaguicidas en alimentos de ganado bovino lechero*

Las muestras se retiraron del *freezer* y colocaron en heladera 24 horas y el día del procesamiento fueron llevadas a temperatura ambiente. Los análisis fueron realizados en el Departamento de Análisis de Alimentos y Nutrición de la Facultad de Alimentos y Tecnología Bioquímica, Universidad de Química y Tecnología, Praga.

La metodología empleada para la evaluación de plaguicidas en alimentos de ganado bovino lechero fue multi-clase multi-residuo de extracción-partición con acetonitrilo y *clean-up* de extracción en fase sólida dispersiva (QuEChERS). Se pesaron 2 g de muestra molida y se hidrataron durante 30 min con 10 ml de H₂O y 0,2% de ácido fórmico. Una vez hidratada la muestra se realizó la “fase de extracción” mediante la adición de 10 ml de acetonitrilo y 2% de ácido fórmico seguido por el agregado de 4 g de MgSO₄ y 1 g de NaCl (“tubo de extracción”), sin *clean up*.

La determinación de residuos de plaguicidas se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de masa de triple cuadrupolo UHPLC-

MS/MS (Michlig *et al.*, 2017). Los resultados de los análisis se expresaron en microgramo de plaguicidas por kilo de material vegetal ($\mu\text{g}/\text{kg}$).

2.3.2.3. Detección de plaguicidas en leche de tanque

A continuación, se describe el método empleado, basado en el procedimiento QuEChERS con las modificaciones realizadas para leche cruda (AOAC, 2007).

Las muestras se retiraron del *freezer* y colocaron en heladera 24 horas y el día del procesamiento fueron llevadas a temperatura ambiente. Los análisis fueron realizados conjuntamente con el equipo de trabajo del Laboratorio de Contaminantes Químicos del Instituto de Tecnología de Alimentos del Centro de Investigaciones Agropecuarias (CNIA) de INTA Castelar, Provincia de Buenos Aires.

Se midieron 10 ml de leche y se colocaron en un tubo falcon de 50 ml para su posterior procesamiento y extracción de plaguicidas mediante la técnica de QuEChERS. Para la fase de extracción se adicionó a la muestra 10 ml de acetonitrilo seguido por el agregado de 4 g de MgSO_4 , 1 g de AcNa y 1 g de NaCl. El tubo se agitó y sonicó durante 10 y 15 min, respectivamente, para homogeneizar el contenido, seguido por una etapa de centrifugado a 3.500 g durante 10 min a 5°C.

Se tomaron 6 ml de sobrenadante y se colocaron en un “tubo de limpieza” con 0,3 g de MgSO_4 , 0,1 g de Amina Primaria secundaria (PSA) y 0,1 g de Octadecano unido químicamente a sílica porosa (C18). Nuevamente se agitó por 10 min y se sonicó cada tubo por 15 min. Seguidamente, los tubos se centrifugaron a 5.000 g durante 5 minutos a 5 °C y se tomaron 2 ml de sobrenadante que se colocaron en un tubo eppendorf para finalmente centrifugar las muestras a 10.000 g durante 10 min a 4°C. Por último, se transfirió una alícuota de 1 ml a un vial de cromatografía. Los viales fueron conservados en *freezer* a temperatura de -30 °C al abrigo de la luz y la humedad, hasta su posterior análisis.

Las muestras fueron analizadas inyectando 2 μl de extractos preparados en un Cromatógrafo Gaseoso (Perkin Elmer, modelo Clarus 600). Se realizó el ensayo de

recuperación para el cual se contaminaron muestras blanco artificialmente a distintos niveles: 0,01 mg/l; 0,02 mg/l; 0,03 mg/l. Una muestra blanco sin contaminación fue incluida como “cero”. Se realizó el ensayo por triplicado, con al menos 2 inyecciones para cada nivel. Los resultados de los análisis se expresaron en microgramo de plaguicidas por litro de leche cruda ($\mu\text{g/l}$).

2.3.3. Nitratos y nitritos

2.3.3.1. Detección de nitratos y nitritos en agua

La cuantificación de nitratos (NO_3) y nitritos (NO_2) en agua se realizó por cromatografía iónica (IRAM 29039-1, 2016). Los límites de detección (LD) fueron de 0,87 y 0,25 mg/l para NO_3 y NO_2 en agua, respectivamente y de cuantificación (LC) fueron de 0,11 y 0,10 mg/l para NO_3 y NO_2 en agua, respectivamente.

Adicionalmente, se determinaron parámetros físico-químicos como pH por el método potenciómetro y salinidad total por conductividad eléctrica *in situ* (mS/cm). La calidad microbiológica del agua fue determinada mediante el recuento de bacterias aerobias mesófilas viables (UFC/ml), determinación del número de coliformes totales por 100 ml de muestra y presencia de *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Pseudomonas aeruginosa* en 100 ml de muestra (APHA, 2005).

2.3.3.2. Detección de nitratos y nitritos en leche de tanque

Para cuantificar NO_3 y NO_2 en leche cruda se utilizó la Norma ISO 14673-1 IDF 189-1. Los límites de detección fueron 0,5 y 0,2 mg/l y de cuantificación 1 y 0,5 mg/l de nitratos y nitritos en leche, respectivamente.

2.4. Análisis estadístico

En el momento de la toma de muestras, se recogieron datos sobre varios factores de los establecimientos lecheros, a través de un cuestionario estructurado dividido en dos secciones: PARTE A) características generales del establecimiento

productivo y PARTE B) potenciales factores de riesgo asociados con la presencia de contaminantes en la leche (ANEXO I).

La PARTE A del cuestionario involucraba aspectos generales y productivos del establecimiento, tales como tipo de sistema productivo, actividades productivas desarrolladas, producción de leche (litros/día y litros/vaca/día), ubicación geográfica, cantidad de hectáreas productivas y número de vacas en ordeño.

La PARTE B del cuestionario examinó diferentes variables relacionadas con cada contaminante:

Aflatoxinas: cantidad e ingredientes de la dieta suministrada a las vacas en ordeño, tipos de forrajes disponibles, forma de almacenamiento y suministro, datos sobre la confección de silajes, uso de inoculantes para silo, uso de secuestrantes de micotoxinas, realización de análisis a los alimentos, almacenamiento de productos y subproductos de la agroindustria, formas de extracción y distribución de silajes y conocimiento de las micotoxinas.

Plaguicidas: porcentaje de la tierra disponible en el establecimiento utilizada para pasturas y agricultura, características de los campos colindantes, quién realiza el diagnóstico, la receta y especifica el tiempo de carencia, disposición final de los envases vacíos, registro de los tratamientos aplicados y características de los equipos utilizados para la aplicación.

Nitratos y nitritos: con el propósito de evaluar las condiciones de riesgo de contaminación en las perforaciones para extracción de agua, se incluyeron los siguientes parámetros de relevamiento: tipo de dispositivo de extracción de agua (molino de viento o bomba), profundidad del nivel freático, profundidad y edad de los pozos, y características de la construcción del pozo: presencia de revestimiento protector, pendiente a su alrededor, posibles fuentes de contaminación dentro de los 100 m y su distancia a la boca del pozo, y ubicación en relación con el pozo (aguas arriba, a nivel o aguas abajo). Entre las posibles fuentes de contaminación tomadas en

consideración en esta encuesta se encuentran los sistemas sépticos domésticos, corrales permanentes o temporarios para animales y lagunas de efluentes.

El tipo de suelo presente en el establecimiento también fue relevado. El mismo se verificó posteriormente mediante el uso de mapas de suelos (Visor GeoINTA). También se realizaron preguntas referidas al manejo y reutilización de los efluentes dentro del predio y al uso de fertilizantes, sobretodo de base nitrogenada.

Se realizó un análisis univariado con tambo como efecto aleatorio para seleccionar las variables explicativas potencialmente asociadas con la concentración de contaminantes en la leche. Las variables con un valor de $P \leq 0,15$ se seleccionaron para un análisis multivariable posterior. Exclusivamente, la variable explicativa con el valor P más alto se seleccionó para el modelo multivariado cuando dos de ellos pudieron haber explicado resultados similares y se asociaron estadísticamente (evaluación de colinealidad).

Los análisis de regresión logística multivariable con tambo como efecto aleatorio se realizó utilizando un modelo mixto lineal generalizado (GLMM) para evaluar el efecto de las variables explicativas seleccionadas. Cuando la variable respuesta fue considerada como continua (Ej. concentración de AFM₁ en leche) se asumió que sigue una distribución Gamma o Binomial cuando la variable respuesta fue categorizada como presencia o ausencia según los límites de detección de las técnicas analíticas y/o límites establecidos por organismos de seguridad alimentaria. Se siguió una estrategia de eliminación hacia atrás conducida manualmente, eliminando una variable a la vez con el valor P más alto. Con cada variable eliminada del modelo, se verificó el coeficiente de las variables significativas y, si resultó en un cambio de más del 20% en las estimaciones, la variable se mantuvo en el modelo para tener en cuenta su efecto de confusión (Chowdhury *et al.*, 2012). Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software InfoStat (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

2.5. Análisis espacial

El método de detección de conglomerados espaciales (Kulldorff y Nagarwalla, 1995) se utilizó para identificar y probar la importancia de grupos específicos para una distribución de población heterogénea. El conjunto de datos fue escaneado para detectar áreas donde la concentración de contaminantes en las distintas matrices evaluadas era significativamente menor o mayor de lo esperado por casualidad (*cluster* de baja y alta tasa, respectivamente). El límite superior de escaneo se estableció en el 50% de la población en riesgo (Kulldorff y Nagarwalla, 1995).

Se seleccionó el tipo de distribución de acuerdo a los datos. Para evaluar la concentración de AFB₁ en los alimentos y de AFM₁ en la leche se utilizó una distribución normal. En cambio, para evaluar la concentración de plaguicidas y nitratos en la leche (categorizados como presencia o ausencia de acuerdo a los límites de detección de la técnica) se utilizó la distribución de Bernoulli. Todos los análisis se realizaron con el software SaTScan versión 9.2 (www.satscan.org).

3. RESULTADOS Y DISCUSION

La PARTE A del cuestionario proporcionó una descripción detallada de las características generales de los establecimientos lecheros bajo estudio. Los principales tipos de actividades llevadas a cabo en los establecimientos se distribuyeron entre sólo producción de leche (3%), producción de leche y carne (12%), producción de leche y agricultura (32%) y una combinación de las tres (53%).

El tamaño promedio del rodeo de los establecimientos lecheros analizados fue de 175 vacas lecheras (rango= 52 - 600 vacas) y una producción diaria de leche de 4008 litros (rango= 1000 – 17000 l). La producción diaria de leche por vaca fue, en promedio, de 22 litros (rango= 15 – 31 l). El tamaño promedio de los establecimientos fue de 150 hectáreas (rango= 26 – 400 ha).

3.1. Ocurrencia natural de aflatoxinas en tambos de la cuenca lechera central de Argentina y factores de riesgo asociados

3.1.1. Aflatoxina B₁ en alimentos de vacas lecheras

La prevalencia de AFB₁ en los diferentes alimentos suministrados a las vacas lecheras fue del 47%, con una concentración media de 3,8 ± 7,9 µg/kg (Tabla 1). Teniendo en cuenta las reglamentaciones de la Unión Europea (UE) (European Community, 2002) y MERCOSUR (MERCOSUR, 2002) que regulan los niveles máximos permitidos de AFB₁ en los alimentos del ganado lechero (5 y 20 µg/kg, respectivamente) el 20% de los alimentos ofrecidos a las vacas en lactancia excedió el valor establecido por la UE y el 3% excedió el valor establecido por el MERCOSUR.

Tabla 1: Niveles de AFB₁ en alimentos por estación climática y muestras que exceden los límites de detección y los establecidos en la regulación.

Estación	Alimentos	^a Muestras positivas (n) %	AFB ₁ contaminación (µg/kg)		Excede regulación (%)	
			^b Rango	^c M±DE	^d UE	^e MERCOSUR
O-I	FV (n=26)	(26) 100	16-2,1	6,7±3,5	73	0
	FC (n=58)	(32) 55	76-nd	6,0±12,6	29	5
	PySub (n=70)	(24) 34	48-nd	3,7±8,4	16	7
P-V	FV (n=16)	(12) 75	4,3-0,4	2,7±1,2	0	0
	FC (n=54)	(26) 48	9-nd	2,1±2,1	9	0
	PySub (n=60)	(15) 25	46-nd	2,1±6,0	7	1
MEDIA (n=284)		(135) 47	76 - nd	3,8±7,9	20	3

Referencias: ^aMuestras>Limite de detección; ^bMax-Min.; ^cMedia (M) ± desvío estándar (DE); ^dNivel máximo establecido por Unión Europea (UE) 5 µg/kgMS; ^eNivel máximo establecido por MERCOSUR 20 µg/kgMS. O-I: otoño-invierno; P-V: primavera-verano; FV: Forrajes verdes; FC: Forrajes conservados; PySub: Productos y/o subproductos de la agroindustria; nd<limite de detección (LD).

En este estudio, la prevalencia total de AFB₁ en los alimentos fue menor a la informada por Signorini *et al.* (2012) sobre un total de 597 muestras de alimentos de establecimientos ubicados en una región similar de producción lechera, con una prevalencia general del 78,9%.

De todos los alimentos analizados, la prevalencia y niveles promedios de aflatoxinas fue particularmente alta en forrajes verdes especialmente en la estación otoño-invierno. Estos resultados podrían deberse a la presencia de *Aspergillus* en las pasturas que ante condiciones de estrés hídrico que generalmente se producen en

otoño-invierno respecto a primavera-verano, el hongo se desarrolla y genera la micotoxina. Esto coincide con resultados informados por el estudio mencionado antes donde la prevalencia de AFB₁ en pasturas fue del 91% (Signorini *et al.*, 2012).

Si bien el nivel promedio de AFB₁ en las dietas de ganado lechero fue levemente inferior al encontrado por Signorini *et al.* (2012), los porcentajes de muestras que excedieron los límites establecidos por las regulaciones internacionales fueron similares. La concentración de AFB₁ en los alimentos estuvo influenciada por las estaciones climáticas ($P=0,001$). Las mayores concentraciones se obtuvieron en los meses de otoño-invierno (6,32 µg/kg) respecto a los meses de primavera-verano (2,27 µg/kg).

Durante la temporada de invierno se reduce la disponibilidad de forrajes verdes para las vacas, es decir que se ofrece a las vacas menor cantidad de pasturas, pero con altas concentraciones de AFB₁. Debido a esta escasez, los productores cambian las prácticas de alimentación y apelan a un mayor uso de alimentos concentrados y forrajes conservados que, según las características de almacenamiento de los mismos, pueden contribuir con niveles considerables de AFB₁ en la dieta (Signorini *et al.*, 2012).

En promedio, en otoño-invierno los alimentos concentrados y forrajes conservados estuvieron presentes entre un 65% a 70% de la dieta total, mientras que durante el período primavera-verano representaron un 26% al 48% de la dieta. Dada la composición diferencial de la dieta según la estación del año, se estimó que el consumo de AFB₁ de forrajes conservados y productos y subproductos de la agroindustria representó el 67% de AFB₁ en la dieta durante el otoño-invierno, mientras que durante la primavera-verano esta proporción se redujo al 42%. Este tipo de alimento generalmente está compuesto por granos, expellers y semillas de algodón que podrían almacenarse en condiciones inadecuadas y contener hongos toxigénicos pertenecientes al género *Aspergillus* y, en consecuencia, estar contaminados con altos niveles de aflatoxinas. Además, estos ingredientes han sido positivamente

correlacionados con el nivel de AFM₁ en la leche en estudios previos llevados a cabo en un área más reducida de la cuenca lechera santafesina (Signorini *et al.*, 2012; Michlig *et al.*, 2016).

3.1.2. Aflatoxina M₁ en leche

En el estudio de la presencia de AFM₁ en leche de tanque, se observó que un 78% de las muestras presentaba contaminación con la micotoxina. La Tabla 2 muestra los valores medios del nivel de AFM₁ encontrado por estación climática.

Tabla 2: Niveles de AFM₁ en leche por estación climática y muestras que exceden los límites de detección y los establecidos en la regulación.

Estación	AFM ₁ (ug/l) M ± DE	% nd (<0,005 ug/l)	% d (≥0,005 ug/l)	AFM ₁ : distribución de muestras (%)			
				^a Entre n.d y 0,025 ug/l	^b Mayor a 0,025 ug/l	^c Mayor a 0,05 ug/l	^d Mayor a 0,5 ug/l
O-I	0,013±0,018	20	80	79	21	12	0
P-V	0,015±0,015	24	76	82	18	12	0
Prom.	0,014±0,016	22	78	80,5	19,5	12	0

^aValores que no representan riesgo. ^bLímite máximo establecido por la Unión Europea (UE) para productos lácteos para lactantes. ^cLímite máximo establecido la UE para la leche. ^dLímite máximo establecido por el MERCOSUR para leche. O-I: Otoño-Invierno; P-V: Primavera-Verano; Media (M) ± desvío estándar (DE); nd:<límite de detección; d:>límite de detección.

El nivel promedio de AFM₁ detectado fue 0,014 ± 0,016 µg/l. El 80,5% de las muestras estuvieron dentro de valores que no representan riesgo para la salud humana. Por otro lado, el 19,5% y el 12% de las muestras presentaron niveles superiores a 0,025 µg/l y 0,05 µg/l, límites establecidos por la UE para leche destinada a fórmulas infantiles (European Community, 2004) y leche fluida (European Community, 2006, 2010) respectivamente. En ningún caso, los valores excedieron el límite máximo aceptable de AFM₁ establecido para leche fluida por el MERCOSUR (MERCOSUR, 2002).

En este estudio, la prevalencia de AFM₁ en la leche no estuvo influenciada por las estaciones del año ($P=0,541$). En Argentina generalmente el período seco se ubica en los meses de otoño-invierno, con precipitaciones abundantes en primavera-verano,

por lo que es más probable encontrar altas concentraciones de aflatoxinas en invierno. Si bien las concentraciones de AFB₁ fueron mayores en los meses de otoño-invierno, las concentraciones de AFM₁ en la leche fueron ligeramente superiores en primavera-verano. Esto puede explicarse debido a que las dietas de las vacas presentan una mayor proporción de pasturas en dicho período, ingrediente con mayor concentración de AFB₁ y por las abundantes precipitaciones ocurridas en ese período que podrían haber afectado las condiciones de almacenamiento de los alimentos.

Los niveles de AFM₁ detectados en este estudio fueron ligeramente más bajos que los observados en otros estudios realizados en nuestro país. Algunos autores informaron que el 64% de las muestras de leche de tanque estaban contaminadas con AFM₁ con niveles promedio de 0,028 µg/l en establecimientos lecheros de Villa María (Alonso *et al.*, 2010). Otros autores, en la misma zona productiva, informaron prevalencias del 10,8% en leche de tanque con niveles promedios de 0,016 µg/l (López *et al.*, 2003). Michlig *et al.* (2016) informaron una prevalencia de AFM₁ del 38,8% y un nivel promedio de 0,037 µg/l en un área reducida de la Cuenca Lechera Central de Santa Fe.

En Argentina, el Plan Nacional de Gestión de Residuos y Seguridad Alimentaria (CREHA) monitorea la concentración de AFM₁ en leche cruda de silo de industria. En 2016, se analizaron 158 muestras de leche cruda en las industrias lácteas, de las cuales 27 (17,1%) tenían valores de AFM₁ superiores a 0,025 µg/l, pero inferiores a 0,5 µg/l y en las 131 muestras restantes la toxina no fue detectada (CREHA, 2017).

La diferencia hallada en los resultados de los estudios mencionados, puede deberse a la técnica analítica empleada para la detección de AFM₁ (ELISA vs. LC-MS / MS) siendo la cromatografía más sensible, a las diversas regiones lácteas caracterizadas por el uso de diferentes fuentes de alimentos y el manejo productivo y finalmente, la fuente de muestreo (leche de tanque en el establecimiento vs. leche de silo de industria) donde en estos últimos, las concentraciones de AFM₁ pueden ser más bajas debido al efecto de dilución de las aflatoxinas en la leche. Sin embargo, en

estos estudios, todas las concentraciones de AFM₁ estuvieron por debajo de los niveles máximos establecidos por el MERCOSUR.

Como AFM₁ es un problema global, se han realizado muchos estudios en todo el mundo para determinar la ocurrencia y los niveles de AFM₁ en leche cruda usando diferentes técnicas. En el estado de Minas Gerais, Brasil, se evaluó la ocurrencia de AFM₁ en 129 muestras de leche de granjas lecheras en tres períodos distintos (período seco, período de transición y período lluvioso) mediante ELISA (Picinin *et al.*, 2013). Los niveles promedios fueron ligeramente más altos (0,019 µg/l) que los obtenidos en este estudio y la contaminación de leche con AFM₁ se vio significativamente afectada por las condiciones climáticas, con valores superiores en el período seco. Bilandzic *et al.* (2014) analizaron el contenido de AFM₁ de 3716 muestras de leche cruda y 706 muestras de leche UHT comercializadas en Croacia y la incidencia de contaminación por AFM₁ fue menor en el verano. Los autores sugirieron que esto ocurre porque los productores usan alimento fresco como pasturas en lugar de alimentos concentrados. En Sudáfrica, Dutton *et al.* (2012) analizaron 45 muestras de leche y observaron que los niveles de AFM₁ variaron de 0,01 a 3,1 µg/l. Los datos obtenidos confirmaron que el nivel promedio de AFM₁ (0,278 µg/l) en muestras de leche recolectadas en el invierno fue mayor que las muestras de leche producidas en el verano (0,022 µg/l).

Como puede observarse en los estudios analizados, muchos autores han demostrado la influencia del efecto estacional en los niveles de AFM₁. En promedio, las muestras de leche de invierno mostraron concentraciones de AFM₁ más altas que las muestras de verano. De acuerdo con Galvano *et al.* (1996), es completamente imposible comparar los resultados extraídos de las literaturas debido a las grandes diferencias entre y también dentro de los países. Algunos de los factores responsables de tales diferencias son: las diferentes formas de producción de alimento, tipo de animales, factores ambientales, tales como sequías, variación estacional,

procedimientos de extracción, análisis aplicados y límites normativos establecidos para aflatoxinas en alimentos y leche.

Estos resultados indicarían que los niveles de AFM₁ en la leche producida en la cuenca central de Argentina no serían un problema de relevancia para la salud pública. Sin embargo, se debería seguir monitoreando los niveles de AFB₁ en los alimentos, identificando las prácticas que podrían aumentar los niveles de contaminación. Dado que los requisitos de calidad son cada vez más estrictos, cualquier reducción de los límites normativos internacionales establecidos tendría un grave impacto en la producción nacional.

3.1.3. Evaluación de la concentración de aflatoxina M₁ en leche y su relación con prácticas de manejo en los establecimientos

Las variables incluidas en el modelo de regresión logística y los resultados estadísticos de las mismas se muestran en la Tabla 3. Las características de los establecimientos lecheros como el número de vacas por tambo ($P=0,836$), los litros de leche producidos por tambo ($P=0,846$), la producción de leche por vaca ($P=0,960$) y el tipo de sistema ($P=0,820$) no se asociaron con la presencia de AFM₁ en la leche.

Respecto a la alimentación utilizada en cada tambo, el consumo de silo ($P=0,976$), autoconsumo de silo ($P=0,649$), avena ($P=0,392$), alfalfa ($P=0,508$), heno ($P=0,553$), granos ($P=0,231$), balanceado ($P=0,538$), burlanda ($P=0,684$) y expeller de soja ($P=0,252$), no se asociaron con la presencia de AFM₁ en la leche. No obstante, el consumo de semilla de algodón ($P=0,013$) se asoció con la presencia de esta micotoxina en la leche (Tabla 4). Los tambos que no incorporaban semilla de algodón en la dieta animal presentaron una concentración promedio de aflatoxinas en leche menor ($0,011 \mu\text{g/l}$) que aquellos que sí lo hacían ($0,021 \mu\text{g/l}$). Esto coincide con estudios realizados previamente (Alonso *et al.*, 2010; Signorini *et al.*, 2012; Michlig *et al.*, 2016), donde identificaron a la semilla de algodón como un ingrediente altamente correlacionado con el nivel de esta toxina en la leche.

Tabla 3: Definiciones de variables explicativas seleccionadas ($P < 0,15$) mediante análisis univariado incluidas en el análisis para la asociación potencial con la presencia de AFM₁ en la leche cruda en la cuenca central de Argentina (n= 68 muestras de leche).

Variable	Nivel	Media	DE	P-valor
Estación climática	Otoño-Invierno	0,010	0,002	0,541
	Primavera-Verano	0,012	0,002	
Tipo de sistema	Pastoril con suplementación	0,010	0,007	0,820
	Pastoril con encierre estratégico	0,009	0,005	
	Estabulado	0,012	0,006	
Producción de leche por vaca	<25 l/vaca	0,011	0,002	0,960
	>25 l/vaca	0,009	0,003	
Número de vacas	-	-	-	0,836
Producción de leche por tambo	-	-	-	0,846
Consumo de silo	Si	0,011	0,004	0,976
	No	0,011	0,002	
Extracción de silaje	Buena	0,006	0,002	0,467
	Regular	0,012	0,002	
	Mala	0,009	0,005	
Distribución del silaje	Buena	0,010	0,002	0,532
	Regular	0,012	0,003	
Autoconsumo de silo	Si	0,011	0,002	0,649
	No	0,009	0,004	
Uso de inoculantes	Si	0,010	0,003	0,758
	No	0,011	0,002	
Uso de secuestrantes	Si	0,011	0,002	0,255
	No	0,007	0,003	
Consumo de avena	Si	0,015	0,005	0,392
	No	0,011	0,002	
Consumo de alfalfa	Si	0,012	0,002	0,508
	No	0,010	0,002	
Consumo de heno	Si	0,010	0,002	0,553
	No	0,011	0,002	
Conservación del heno	Intemperie	0,019	0,008	0,371
	Bajo techo	0,010	0,002	
Consumo de granos	Si	0,013	0,002	0,231
	No	0,010	0,003	
Consumo de balanceado	Si	0,011	0,003	0,538
	No	0,010	0,002	
Consumo de burlanda	Si	0,012	0,005	0,684
	No	0,010	0,002	
Consumo de expeller de soja	Si	0,010	0,002	0,252
	No	0,012	0,002	
Consumo de semillas de algodón	Si	0,018	0,005	0,019
	No	0,009	0,001	
Conoce las micotoxinas	Si	0,008	0,002	0,159
	No	0,012	0,002	
Analiza los alimentos	Si	0,009	0,003	0,602
	No	0,011	0,002	
Almacenamiento de los subproductos	Buena	0,009	0,002	0,027
	Mala	0,014	0,003	

Referencias: DE= desvío estándar

Además, se evaluaron variables de manejo como: forma de conservación del heno ($P=0,371$), prácticas de extracción ($P=0,467$) y distribución del silaje ($P=0,532$),

uso de inoculantes para silos ($P=0,758$), uso de secuestrantes de micotoxinas ($P=0,255$), realización de análisis a los alimentos ($P=0,602$) y el conocimiento sobre las micotoxinas por parte del productor ($P=0,159$) no estuvieron asociadas a la presencia de AFM₁ en leche.

Respecto a la última variable, el 73,5% de los productores encuestados no sabe que son las micotoxinas, cómo afectan a la producción o a la salud de los animales y la importancia que tiene su control para ofrecer alimentos seguros para el consumidor. Bajo este diagnóstico, se deberían establecer estrategias de capacitación a los productores con el fin de que puedan implementar prácticas que tiendan a prevenir y minimizar la contaminación de la leche.

Finalmente, las condiciones de almacenamiento de los subproductos en los establecimientos ($P=0,008$) se asoció con la prevalencia de la aflatoxina en la leche (Tabla 4). Aquellos establecimientos que tenían una forma de almacenamiento “adecuada” (subproductos comprados con certificación fiable y condiciones edilicias apropiadas para el almacenamiento) presentaron una concentración de aflatoxinas en leche menor (0,011µg/l) que los establecimientos que tenían formas de almacenamiento “no adecuadas” (0,018 µg/l).

Tabla 4: Modelo de regresión logística multivariable final (selección hacia atrás) para la contaminación de AFM₁ en la leche de tanque de tambos de la cuenca central de Argentina (n= 68 muestras de leche).

Variables predictivas	Nivel	Media	DE	P
Consumo de semilla de algodón	Si	0,021	0,004	0,013
	No	0,011	0,001	
Almacenamiento de subproductos	Buena	0,011	0,002	0,008
	Mala	0,018	0,004	

Referencias: DE= desvío estándar

Como la AFB₁ está presente en los alimentos y es consumida por las vacas lecheras, puede transformarse en AFM₁. La tasa de transferencia de AFB₁ de los alimentos a AFM₁ en la leche en este estudio fue en promedio de 0,70% con un rango de 0,02 a 7,3%.

Los estudios han demostrado una considerable variabilidad con respecto al porcentaje de AFB₁ transformadas en AFM₁ y la cantidad de esta micotoxina presente en la leche. De acuerdo con Prado *et al.* (1999) la relación entre la ingesta de aflatoxinas y la excreción en la leche es muy variable, con un promedio de 1,5%. Creppy *et al.* (2002) informaron que aproximadamente del 0,3% a 6,2% de la AFB₁ total ingerida por los animales se transforman generalmente en AFM₁ en la leche.

Bakirci (2001) afirmó que existe una relación lineal entre la cantidad de AFM₁ en la leche y la cantidad de AFB₁ presente en los alimentos que consumen las vacas. Hussein y Brasel (2001) indicaron que la biotransformación de AFB₁ en AFM₁ estaba comprendida en el rango de 0,5-5%. Lindner (1995) informó que al menos el 2,2% de AFB₁ se excreta como AFM₁ en la leche de vaca. Estos resultados son coincidentes con los encontrados en este estudio.

En este estudio, la tasa de transferencia estuvo asociada al consumo de AFB₁ por las vacas lecheras ($P=0,001$) y al tamaño del tambo ($P=0,032$). Los tambos chicos (<2000 l/día), medianos (entre 2000 y 4000 l/día) y grandes (>4000 l/día) tuvieron tasas de transferencia promedio de 0,34%, 0,55% y 1,13%, respectivamente.

La capacidad del ganado para transformar AFB₁ presente en el alimento a AFM₁ en la leche se ha examinado en muchos estudios los cuales afirman que está directamente relacionada con la producción de leche y con los días de lactancia, donde las vacas en lactancia temprana muestran una tasa de transferencia más alta que las vacas a finales lactancia (Britzi *et al.*, 2013; Díaz *et al.*, 2004; Masoero *et al.*, 2007). Los factores adicionales que han demostrado afectar la tasa de transferencia (a menudo en vacas individuales) han sido la diferencia de razas, la salud general del animal, la capacidad de biotransformación hepática, la tasa de ingestión y la integridad de las membranas de las células alveolares mamarias (Battacone *et al.*, 2003; Fink-Gremmels, 2008). Es necesario seguir indagando en estos aspectos que pueden llegar a influir en la tasa de transferencia de AFM₁ a leche y ser un riesgo para la salud de los consumidores.

3.2. Determinación de plaguicidas en la cuenca lechera central de Argentina y factores de riesgo asociados

3.2.1. Detección de plaguicidas en leche

De las 68 muestras de leche analizadas, 17 (25%) fueron positivas a plaguicidas, con 15 (88,2%) muestras positivas para insecticidas organofosforados (OP) y 6 (35,3%) para insecticidas piretroides (P). El principal plaguicida detectado fue clorpirifós-metil, hallado en doce muestras de 17 (70,6%), seguido de permetrina (29,4%), pirimifós-metil (17,6%) y cialotrina (5,9%). En algunas muestras, se detectaron dos o más principios activos, lo que explica porcentajes superiores al 100%. El resto de los plaguicidas analizados no fueron detectados en ninguna muestra.

Los niveles promedios de plaguicidas en µg/l fueron 14,75 para clorpirifós-metil, 0,4 para pirimifós-metil, 0,3 para permetrina y 0,03 para cialotrina. La mayor frecuencia de plaguicidas encontrados en este estudio fue hallada en la estación de primavera-verano (Tabla 5).

Tabla 5: Concentración de residuos de plaguicidas (µg/l) en leche por estación climática.

Estación	Clorpirifós Metil	Pirimifós Metil	Permetrina	Cialotrina
O-I (n=8)	15,8±18,5 (1,7 - 55,5) 8	0,3±1 (¹ nd-2,8) 1	0,1±0,2 (nd - 0,5) 1	nd
P-V (n=9)	13,8±32 (nd - 97,4) 4	0,5±1 (nd - 2,6) 2	0,5 ±0,6 (nd - 1,6) 4	0,1±0,2 (nd - 0,5) 1
Media (n=17)	14,75 ±25,71	0,41±0,94	0,28±0,5	0,03±0,12
² LMR (µg/l)	10	10	50	200

Referencias: Los resultados se presentan como media ± desviación estándar, rango de valores entre paréntesis y número de muestras positivas.

¹nd:<límite de detección. ²Límites Máximos de Residuos (FAO/WHO, 2012).

Lo encontrado en el presente estudio coincide con evaluaciones previas realizadas en la misma zona, aunque más acotada, donde se buscaron 45 residuos de pesticidas en 253 muestras de leche cruda y se observó un mayor número de muestras detectadas en primavera-verano. Entre ellas, los principios activos revelados fueron pirimifós-metil en 2 muestras a niveles superiores a los reportados en este

estudio (130 a 190 µg/l) y fenvalerato en una muestra a niveles de 140 µg/l, plaguicida no detectado en leche en este estudio (Rojas *et al.*, 2012).

Los niveles medios de residuos de plaguicidas en leche fueron inferiores a los límites máximos de residuos (LMR) establecidos por FAO/WHO, Codex Alimentarius (FAO/WHO, 2012) para pirimifós-metil, permetrina y cialotrina. Sin embargo, para el caso de clorpirifós-metil, los valores promedios excedieron el LMR (10 µg/l). Analizando la concentración individual de las 12 muestras de leche positivas a clorpirifós-metil, el 50% de ellas se encontró dentro de los LMR, resultando el porcentaje restante por encima de dicho límite. Estos resultados podrían ser debidos a deficiencias en la aplicación de los plaguicidas bajo buenas prácticas agrícolas.

Entre los principales grupos de pesticidas, los organoclorados (OC) son más potentes debido a su persistencia y estabilidad. Los plaguicidas OC de importancia universal son pp-DDT, clordano, heptacloro, aldrine, dieldrin y endrin. Debido a la naturaleza lipofílica de estos pesticidas, la leche y otras sustancias ricas en grasa son los elementos clave para su acumulación (Agnihotri, 1999). En nuestro estudio, no se detectaron residuos de plaguicidas organoclorados en la leche, lo cual indica que su prohibición de uso fue efectivizada. Estas sustancias tóxicas se caracterizan por su bioacumulación en el medio ambiente, especialmente en la cadena alimentaria, donde encuentran su camino hacia el cuerpo humano y causan serios peligros para la salud (FAO, 2000). Por esta razón, estos residuos se siguen monitoreando, aunque en Argentina se encuentre prohibido el uso y comercialización. Los resultados obtenidos en este estudio demuestran su erradicación.

3.2.2. Detección de plaguicidas en alimentos de ganado bovino lechero

De los 34 tambos evaluados, en 13 de ellos se detectaron residuos de plaguicidas en leche pertenecientes a la familia de los OP y P. Para realizar un seguimiento de las posibles fuentes de contaminación de la leche, se analizaron las muestras de alimentos que consumían las vacas de los establecimientos que

resultaron positivos en leche (Tabla 6).

Tabla 6: Concentración de residuos de plaguicidas detectados en los alimentos y muestras de leche de 13 establecimientos lecheros

Plaguicidas	Concentración ug/kg o ug/l			
	FV (n=5)	FC (n=18)	PySubp. (n=31)	Leche (n=17)
Atrazina	12,4 ± 12 (nd - 26) 3	2,7 ± 6,5 (nd -24) 2	1,8 ± 5,1 (nd - 23) 2	nd
Bifentrin	nd	0,6 ± 1 (nd - 3,1) 0	0,1 ± 0,4 (nd - 2,6) 0	nd
Diazinon	0,1 ± 0,3 (nd - 0,7) 0	0,4 ± 1,3 (nd - 4,2) 0	0,5 ± 0,1 (nd - 0,5) 0	nd
Dimetoato	6,3 ± 11,8 (nd - 27,3) 0	nd	0,1 ± 0,4 (nd - 2) 0	nd
Metalaxil	6,3 ± 11,8 (nd - 27,3) 1	0,2 ± 0,4 (nd - 1,2) 0	0,4 ± 0,7 (nd - 3) 0	nd
Pirimifós-metil	11,7 ± 23 (nd -52,7) 1	16 ± 58,7 (nd -250,8) 3	39,3 ± 77,8 (nd -324,1) 14	0,4 ± 0,9 (nd -2,8) 3
Clorpirifós	8,5 ± 9,7 (1,3 -25,4) 1	17,3 ± 37,5 (0,9 -122,6) 3	20,7 ± 37,3 (nd -167,3) 13	nd
Clorpirifós-metil	nd	1,5 ± 6,2 (nd -26,4) 1	11,4 ± 30,4 (nd -128,5) 4	14,7 ± 25,7 (nd -97,4) 12
Permetrina	nd	nd	nd	0,3 ± 0,5 (nd -1,6) 5
Cipermetrina	nd	nd	1,5 ± 8,1 (nd -45,4) 1	nd
Deltametrina	nd	3,7 ± 15,6 (nd -66,1) 1	68 ± 137,5 (nd -532,4) 12	nd
Cialotrina	nd	nd	nd	0,03 ± 0,1 (nd -0,5) 1
Endosulfán	nd	nd	nd	nd
Carbofuran	nd	nd	nd	nd
Azoxistrobin	nd	nd	nd	nd
Piraclostrobin	nd	0,05 ± 0,15 (nd - 0,5) 0	0,02 ± 0,09 (nd - 0,5) 0	nd
Tebuconazole	1,6 ± 3,6 (nd - 8,1) 0	0,2 ± 0,9 (nd - 3,8) 0	nd	nd
Ciproconazole	nd	nd	nd	nd

Referencias: nd:<límite de detección; los datos de concentración de plaguicidas se presentan como: media ± desviación estándar, rango de valores y número de muestras positivas. FV: forrajes verdes; FC: forrajes conservados; PySubp.: productos y subproductos de la agroindustria.

Como se puede observar, existen residuos de plaguicidas que solo se detectaron en alimentos y no en leche y también se observó lo contrario, aunque la

proporción de grupos de residuos de plaguicidas detectados en ambas matrices indicó la contribución más alta de OP, principalmente del grupo clorpirifós y pirimifós-metil (Figura 3A - B). La alta incidencia puede estar relacionada con el uso ampliamente extendido de estos insecticidas, debido a su amplio espectro de acción y una menor persistencia en el medio ambiente que los plaguicidas OC (Gazzotti *et al.*, 2009). Por ejemplo, algunos insecticidas como la cipermetrina, deltametrina, diazinón, entre otros, pueden estar presentes en los alimentos del ganado bovino lechero, ya que se utilizan en el almacenamiento de granos, en el control de plagas en cultivos y pasturas, así como en productos para su aplicación directa sobre animales. Además, por su uso prolongado en la agricultura, los insecticidas también pueden contaminar los cuerpos de agua utilizados tanto para la limpieza y desinfección de equipos de ordeño como para bebida animal (Dallegrave *et al.*, 2018). En este estudio no fue posible analizar los residuos de plaguicidas presentes en las fuentes de agua utilizadas en los establecimientos, siendo una posible causa de aparición de los mismos en leche.

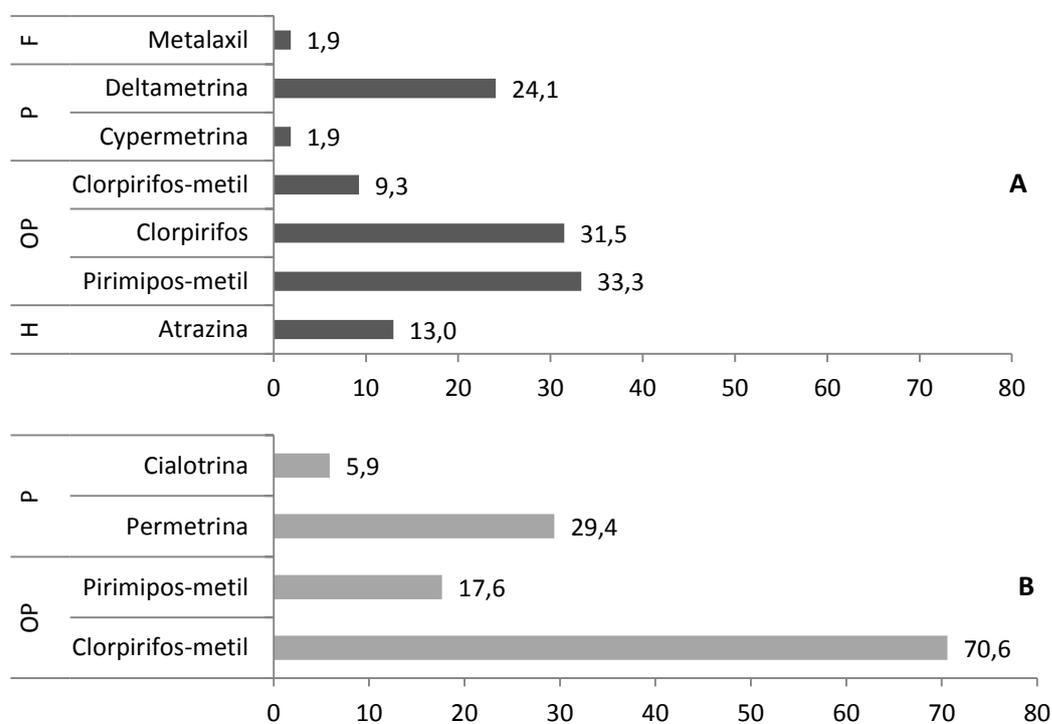


Figura 3: Porcentaje de muestras de alimentos (A) y leche (B) en las que se detectaron plaguicidas.

La presencia de residuos de plaguicidas en alimentos para animales es la principal fuente de contaminación de productos lácteos por pesticidas (Tsiplakou *et al.*, 2010). Los residuos de plaguicidas detectados durante el presente estudio en alimentos fueron: atrazina en 7 muestras de pastura de alfalfa, silo de maíz, balanceado comercial y semilla de algodón a niveles promedio de $20,14 \mu\text{g}/\text{kg} \pm 6,15 \mu\text{g}/\text{kg}$, metalaxil en una muestra de pastura de cebada a niveles de $27,3 \mu\text{g}/\text{kg}$, pirimifós-metil en 18 muestras de pastura de alfalfa, balanceado comercial, grano de maíz, burlanda de maíz, gluten de maíz y semilla de algodón a niveles de $84,19 \mu\text{g}/\text{kg} \pm 99,33 \mu\text{g}/\text{kg}$, clorpirifós en 17 muestras pastura de alfalfa, balanceado comercial, grano de maíz y semilla de algodón a niveles de $52,05 \mu\text{g}/\text{kg} \pm 49,06 \mu\text{g}/\text{kg}$, clorpirifós-metil en 5 muestras de grano de maíz, trigo y balanceado comercial a niveles de $65,74 \mu\text{g}/\text{kg} \pm 50,15 \mu\text{g}/\text{kg}$, cipermetrina en una muestra de balanceado comercial a niveles de $45,4 \mu\text{g}/\text{kg}$, y deltametrina en 13 muestras pastura de alfalfa, balanceado comercial, burlanda de maíz, expeller de soja, grano de maíz y semilla de algodón a niveles de $166,58 \mu\text{g}/\text{kg} \pm 171,76 \mu\text{g}/\text{kg}$ (Tabla 6).

La mayor cantidad de muestras positivas fueron detectadas en los productos y subproductos de la agroindustria, lo cual coincide con los usos de los principios activos hallados en ambas matrices, destinados al control de plagas en granos almacenados. El clorpirifós-metil solo o combinado con deltametrina, son productos autorizados por SENASA, de acción insecticida y gorgojicida para el control de plagas en granos almacenados y para tratamientos complementarios de instalaciones de almacenaje y transporte (CASAFE, 2017).

El clorpirifós no está recomendado ni autorizado para su uso en granos almacenados, solo en cultivos extensivos como alfalfa, algodón, cereales de invierno, girasol, maíz, soja y sorgo. El pirimifós-metil es un producto de amplio espectro (insecticida, acaricida, gorgojicida) y persistencia de control para el tratamiento de granos y semillas de trigo y maíz almacenados en bolsas o a granel, transportes (camiones) e instalaciones (silos) (CASAFE, 2017).

Los plaguicidas detectados durante el presente estudio en la leche fueron compatibles con el principio activo detectado en la alimentación ofrecida a los animales, sugiriendo una posible fuente de contaminación, pero no la única, debido a que los piretroides hallados en alimentos de ganado bovino lechero no fueron transferidos a leche, pero sí se encontraron otros residuos de piretroides en leche que pertenecen a principios activos o drogas de uso veterinario.

Los principios activos cialotrina y permetrina se utilizan para el control de parásitos externos en bovinos (mosca doméstica, mosca de los cuernos, garrapata, ácaros de la sarna) administrados exclusivamente por vía tópica mediante baño o *pour-on* y también es empleado en curabicheras a menudo mezclado con otros compuestos (ej.: organofosforados) de forma líquida (*spray*, aerosol) o en pomadas, cremas, etc. (Vademécum Veterinario, 2017).

Haematobia irritans, vulgarmente conocida como mosca de los cuernos, es hoy un ectoparásito endémico y problemático en las áreas ganaderas de la Argentina, sobre todo en las estaciones de primavera-verano. La eficacia de los piretroides para su control, el bajo costo y la facilidad de las aplicaciones tópicas (*pour-on*) dio lugar a su uso masivo, especialmente en vacas lecheras (Guglielmone *et al.*, 2001).

Una encuesta realizada por Suarez *et al.* (2006) en establecimientos destinados a la producción de leche de la provincia de Santa Fe y Córdoba, revela que los piretroides, como droga única o en combinación con otros tipos de insecticidas, constituyen el principal grupo químico utilizado. Estos piretroides son aplicados principalmente (69,4%) por vía tópica, seguida por la utilización de caravanas (28,5%) que emplea el uso de insecticidas organofosforados, principalmente diazinon, debido a que no presenta restricciones para su uso en animales en lactancia, hecho que se vio reflejado en este estudio al no ser detectado en muestras de leche.

La presencia de estos insecticidas en la leche proviene de la excreción a través de las glándulas mamarias, ya que la leche es rica en lípidos, lo que facilita la excreción de compuestos lipofílicos por esta vía (Suarez *et al.*, 2006). Esto demuestra

que la leche podría constituirse en alimento de alto riesgo para la salud de los consumidores.

3.2.3. Evaluación de la concentración de plaguicidas en leche y su relación con prácticas de manejo en los establecimientos

Las variables incluidas en el modelo de regresión logística y los resultados estadísticos de las mismas se muestran en la Tabla 7.

En este estudio, la presencia de residuos de plaguicidas en leche no estuvo influenciada por las estaciones del año ($P=0,754$) ni por las características productivas de los establecimientos, como el tamaño del tambo ($P=0,723$), número de vacas en ordeño ($P=0,777$), producción diaria ($P=0,636$), producción individual de leche ($P=0,468$) y el tipo de sistema productivo ($P=0,390$).

Las actividades productivas desarrolladas en los establecimientos encuestados ($P=0,401$) no estuvieron asociadas a la presencia de plaguicidas en la leche. La mayor cantidad de muestras positivas de plaguicidas provenían de los establecimientos que realizan producción de leche, carne y agricultura en conjunto (53,3%), seguida por aquellos que combinaban la producción de leche con la actividad agrícola (20%) y en la misma proporción las actividades producción de leche (13,3%) y la combinación de ésta con carne (13,3%).

Un relevamiento de la utilización de agroquímicos en la provincia de Buenos Aires mostró que existen variaciones en el uso de plaguicidas asociadas al modelo productivo predominante (Gonzalez *et al.*, 2013). En este estudio observaron que las zonas con mayores valores de peligrosidad coincidían con actividades predominantemente agrícolas, en contraste con zonas de menores índices de peligrosidad donde predominaba la ganadería.

Con base en estos antecedentes, en el presente estudio se relevaron variables que pudieran estar potencialmente asociadas a la presencia de plaguicidas en la leche como: 1) las actividades productivas practicadas en los campos colindantes a los

establecimientos lecheros, 2) qué porcentaje de la superficie total del establecimiento estudiado estaba destinado a pasturas y a cultivos agrícolas, ya sea para la elaboración de forrajes conservados y/o granos para venta o consumo propio del establecimiento.

Tabla 7: Definiciones de variables explicativas seleccionadas ($P < 0,15$) mediante análisis univariado incluidas en el análisis para la asociación potencial con la presencia de plaguicidas en la leche cruda en la cuenca central de Argentina ($n = 68$ muestras de leche).

Variable	Nivel	Media	DE	P-valor
Estación climática	Otoño-Invierno	0,766	0,074	0,754
	Primavera-Verano	0,795	0,071	
Tamaño del tambo	Chico: <2000 l/día	0,821	0,087	0,723
	Mediano: entre 2000-4000 l/día	0,710	0,101	
	Grande: >4000 l/día	0,821	0,087	
Número de vacas	-	-	-	0,777
Producción diaria	-	-	-	0,636
Producción individual de leche	-	-	-	0,468
Tipo de sistema	Pastoril con suplementación	0,812	0,067	0,390
	Pastoril con encierre estratégico	0,669	0,120	
	Estabulado	0,847	0,104	
Litros de leche por vaca	<25 l/día	0,790	0,060	0,779
	>25 l/día	0,752	0,115	
Actividades productivas	Tambo	0,341	0,290	0,401
	Tambo-Carne	0,800	0,131	
	Tambo-Carne-Agricultura	0,758	0,078	
	Tambo-Agricultura	0,864	0,075	
Campo colindante: agricultura	Si	0,795	0,056	0,612
	No	0,701	0,156	
Campo colindante: ganadería	Si	0,752	0,103	0,744
	No	0,793	0,062	
Campo colindante: mixto	Si	0,999	0,001	0,789
	No	0,732	0,060	
Campo colindante: tambo	Si	0,798	0,128	0,588
	No	0,716	0,058	
Uso del suelo: % agricultura	<60 %	0,500	0,165	0,035
	>60%	0,828	0,050	
Asesoramiento técnico	Ingeniero Agrónomo contratado	0,774	0,067	0,874
	Ingeniero Agrónomo empresas	0,794	0,087	
Diagnóstico agronómico	Ingeniero Agrónomo	0,500	0,107	0,001
	Productor	0,768	0,042	
Receta agronómica	Si	0,762	0,128	0,877
	No	0,785	0,058	
Equipo de pulverización	Propio	0,682	0,118	0,364
	Contratado	0,834	0,058	
Registro de los equipos	Si	0,775	0,072	0,713
	No	0,805	0,082	
Registro de tratamientos	Si	0,651	0,056	0,014
	No	0,834	0,113	
Respeto tiempo de carencia	Si	0,500	0,098	0,023
	No	0,942	0,036	
Disposición de envases vacíos	Ningún manejo	0,921	0,035	0,916
	Triple Lavado y venta	0,788	0,068	
	Se lo lleva el contratista	0,753	0,117	
	Sólo venta	0,802	0,135	

Referencias: DE= desvío estándar

Las características de los campos colindantes con agricultura ($P=0,612$), ganadería ($P=0,744$), tambo ($P=0,585$) y mixtos ($P=0,789$) no estuvieron asociados con la presencia de plaguicidas en leche durante el presente estudio. No obstante, el porcentaje de hectáreas destinadas a la implantación de pasturas y cultivos agrícolas, estuvo asociada con la presencia de plaguicidas en la leche ($P=0,037$). El 58,8% de los establecimientos destinaban más del 60% de la superficie a cultivos agrícolas y dentro de ellos, el 53,3% presentó residuos de plaguicidas en la leche. Estos resultados indican que la mayor cantidad de residuos de plaguicidas en la leche podría derivar de la agricultura, no resultando en este estudio ser la única fuente de contaminación.

Los productos fitosanitarios no son inocuos, por eso deben ser utilizados de manera responsable y solamente para el fin que fueron creados: proteger los cultivos de plagas, malezas y enfermedades para poder producir alimentos en cantidad y calidad (CASAFE, 2017). El uso seguro y responsable de los productos fitosanitarios comprende la realización de ciertas prácticas de manejo previo a la aplicación (realizar el diagnóstico del cultivo, contar con receta agronómica, calibración de las máquinas pulverizadoras, etc.), durante la aplicación (chequear condiciones ambientales) y posterior a la aplicación (respetar los tiempos de carencia, manejo de envases vacíos, etc.). Estas prácticas fueron relevadas durante el presente estudio en cada establecimiento para identificar su posible asociación a la presencia de residuos de plaguicidas en la leche.

Todos los establecimientos poseían algún tipo de asesoramiento agronómico respecto al manejo de cultivos, ya sea a través de un profesional contratado por el productor o por profesionales pertenecientes a las empresas que le proveen insumos de semillas, agroquímicos y fertilizantes, por lo que esta variable no estuvo asociada a la presencia de residuos de plaguicidas en leche ($P=0,874$).

El monitoreo de los cultivos es la observación detallada del estado fitosanitario del mismo, con el objetivo de realizar un diagnóstico para determinar la necesidad de

aplicación de un plaguicida (CASAFE, 2017). En cada establecimiento, se relevó durante el presente estudio información acerca de quién realizaba el diagnóstico en los cultivos para la aplicación de los plaguicidas. En el 67,7% de los establecimientos el ingeniero agrónomo realizaba el diagnóstico de los cultivos y en el 32,3% restante el diagnóstico era realizado por el productor. Aunque esta variable no estuvo asociada a la presencia de residuos de plaguicidas en la leche ($P=0,192$), se pudo observar que en aquellos establecimientos en los cuales se detectó plaguicidas en leche, el productor fue quién realizó el diagnóstico de los cultivos (73,3%), respecto a aquellos establecimientos en los cuales no se detectó plaguicidas en leche, donde el diagnóstico fue realizado por un ingeniero agrónomo (79,2%).

El 82,4% de los establecimientos realizaba la compra y aplicación de los plaguicidas sin la receta realizada por un profesional competente. Sólo el 17,6% de los productores utilizaba receta. Sin embargo esta variable no estuvo asociada a la presencia de residuos de plaguicidas en la leche ($P=0,877$).

El 69,1% de los productores contrataba el servicio para realizar las pulverizaciones, el 27,9% de los productores poseía equipo propio para realizar las aplicaciones y el 2,9% realizaba una combinación de ambas, es decir, utilizaba equipos propios para las pulverizaciones sobre áreas pequeñas y contrataba el servicio cuando requería aplicar en grandes superficies. El 48,5% de los equipos que se utilizaban para realizar las pulverizaciones no se encuentra registrado, ya sea de dominio propio o contratado. Ambas variables, equipo propio o contratado ($P=0,364$) y registro de equipos ($P=0,713$) no se encontraron asociadas a la presencia de plaguicidas en la leche.

Todos los productores manifestaban chequear las condiciones climáticas antes de aplicar un plaguicida, sobretodo dirección y velocidad del viento y temperatura, principalmente en la época estival. El registro de los tratamientos permite no sólo realizar un seguimiento de los principios activos aplicados en el lote sino también es una herramienta valiosa para el productor que le permite chequear y respetar los

tiempos de carencia. El período de carencia es el número de días que debe transcurrir entre la última aplicación del plaguicida y el momento de cosecha o uso del cultivo tratado (frutos, granos, pastoreo) (SENASA, 2012). Las variables, registro de los tratamientos aplicados en los establecimientos ($P=0,009$) y cumplimiento de los tiempos de carencia ($P=0,071$), estuvieron asociadas a la presencia de residuos de plaguicidas en la leche (Tabla 8).

Tabla 8: Modelo de regresión logística multivariable final para la contaminación de plaguicidas en la leche de tanque de tambos de la cuenca central de Argentina (n= 68 muestras de leche).

Variables predictivas	P	OR	OR IC 95%
Registro de los tratamientos	0,009	1,23	0,258 - 2,726
Respeto de tiempos de carencia	0,071	2,86	0,524 - 3,472

Referencias: OR= Odds Ratio; IC= Intervalo de Confianza

El 70,6% de los productores no llevaba registro de los tratamientos aplicados en sus establecimientos. Estos tuvieron un riesgo de 1,23 veces superior de hallar residuos de plaguicidas en la leche que producen, respecto a los que sí llevaban registros de los tratamientos que aplicaban a sus cultivos. Por otra parte, el 38,2% respetaba los tiempos de carencia, principalmente los que tienen que ver con el reingreso de los animales a las pasturas y el 61,8% no se informaba ni respetaba los tiempos de carencia. En aquellos establecimientos en los cuales se detectaron residuos de plaguicidas en la leche, el 86,7% de los productores no respetaban los tiempos de carencia. Los productores que no respetaban los tiempos de carencia tuvieron 2,86 veces más riesgo de hallar residuos de plaguicidas en la leche que producen, respecto a los que lo respetaban.

Dallegrave *et al.* (2018) realizaron una correlación entre el contenido de lípidos de varias matrices alimenticias, entre ellas la leche, con la cantidad detectada de insecticidas, especialmente piretroides y organofosforados, ya que los mismos son lipófilos y pueden migrar a porciones lipofílicas de los alimentos. EEstos autores observaron que no existía una correlación entre el contenido de lípidos y los residuos de insecticidas en la leche. La cantidad de piretroides y organofosforados en la leche

estuvo estrechamente relacionada con el tiempo transcurrido entre las aplicaciones y el ordeño, reafirmando lo hallado en este estudio.

Finalmente, se consultó a los productores sobre el manejo de los envases vacíos de los plaguicidas luego de la aplicación. El 61,8% de los productores realizaban un triple lavado y perforación en la base del envase vacío y luego lo vendían a compradores que pasaban a domicilio. En el 23,5 % de los casos el contratista luego de la aplicación se llevaba el envase vacío del establecimiento, realizando un lavado a presión mediante el sistema de bombas de la pulverizadora y sólo el 10% de los productores acumulaba los envases, sin lavado ni perforado en su base, hasta el momento en el que el comprador pasaba por su domicilio. Estas prácticas de manejo de los envases vacíos, no estuvieron asociadas a la presencia de plaguicidas en la leche ($P= 0,916$).

El amplio espectro de control de los insecticidas piretroides podría ser una explicación de la alta incidencia en las muestras realizadas durante el presente estudio. Además, podemos afirmar que cuando no se cumplen las buenas prácticas agrícolas en la aplicación de plaguicidas, estos pueden llegar a la leche y constituirse en un peligro para la salud de los consumidores.

3.3. Evaluación de la concentración de nitratos y nitritos en la cuenca lechera central de Argentina y factores de riesgo asociados

3.3.1. Detección de nitratos y nitritos en agua

El suministro de agua en los establecimientos evaluados se realizaba mediante molinos de viento de bombeo de agua, suministrando agua principalmente a corrales y potreros, o mediante bombas, cuando el agua se destinaba a las casas e instalaciones de ordeño. La cantidad media \pm DE de pozos en los establecimientos (contando ambas fuentes mencionadas) fue de $3,2 \pm 4,1$ pozos.

Los establecimientos productivos evaluados estaban ubicados sobre tierras de capacidad productiva alta (n=27), con suelos de buen drenaje (argiudoles típicos y ácuicos) a media-alta (n=6) con suelos de drenaje moderadamente bueno (argiudoles ácuicos, argialboles) e inclusiones de suelos de menor aptitud (Natrалboles y Natracualfes). Sólo un establecimiento se encontró ubicado sobre tierras de productividad media-baja con suelos de imperfecta a pobremente drenados (argialboles y natralboles) (Visor GeoINTA).

Los valores promedios de nitratos (NO₃) y nitritos (NO₂) en las muestras de agua provenientes de establecimientos dedicados a la producción primaria de leche en la cuenca central de Argentina, se muestran en la Tabla 9. Las concentraciones de nitratos variaron desde no detectado (<0,87 mg/l) a 1489 mg/l y las de nitritos desde no detectado (<0,25 mg/l) a 8,11 mg/l.

Tabla 9: Valores medios de nitratos y nitritos (mg/l) en agua por estación climática en tambos de la cuenca lechera central de Argentina, y muestras que exceden los límites de detección y los establecidos en la regulación.

Estación	Analito	Nº de muestras	M ± DE	Min	Max	Muestras positivas n (%)	Exceden los límites n, (%)	
							45(mg/l) ^a	100(mg/l) ^b
O-I	NO ₃	51	159 ± 288	nd	1489	39 (76,5)	24(61)	17(44)
	NO ₂		0,03 ± 0,22	nd	1,57	1 (2)		
P-V	NO ₃	39	151 ± 249	nd	1119	36 (92,3)	18(50)	13(36)
	NO ₂		2,5 ± 2,53	nd	8,11	22 (56,4)		
Media	NO ₃	90	156 ± 270	nd	1489	75 (83)	42(56)	30(40)
	NO ₂		1,09 ± 2,06	nd	8,11	23 (25)		

Referencias: O-I: otoño-invierno; P-V: primavera-verano; Media (M) ± desvío estándar (DE); niveles mínimos (Min.) y máximos (Max.); nd: <límite de detección.

^aLímite de NO₃ del CAA para agua de consumo humano. ^bLímite máximo de NO₃ para agua de bebida animal (Adams, 1986; Bavera, 1999; NRC, 2001)

El Código Alimentario Argentino (CAA) define los criterios de potabilidad que debe reunir el agua para consumo humano. Para el ganado bovino no hay especificaciones reglamentarias, pero existen recomendaciones surgidas de trabajos de investigación realizadas por diversos autores (NRC, 1980; Adams, 1986; Van Horn y Wilcox, 1992; NRC, 2001). Sin embargo, algunos países (Unión Europea, 1992) interpretan que los criterios para consumo animal y uso en el tambo son similares que

los establecidos para uso humano, incluso estas exigencias son trasladadas a las industrias lácteas de nuestro país, que exportan leche para fórmulas infantiles.

El valor de NO_3 a partir del cual pueden aparecer problemas en ganado lechero, es de 45 mg/l (NRC, 1980), coincidiendo con el admitido para seres humanos según el CAA (De la Canal, 1994). Según diversos autores (Adams, 1986; Bavera, 1999; NRC, 2001) el valor máximo de tolerancia para bovinos de leche de NO_3 es de 100 mg/l. Cuando los contenidos son mayores a 500 mg/l, no se deben utilizar estas fuentes de agua para bebida (Yeruham *et al.*, 1997).

En el presente estudio el 83% de las muestras analizadas (75/90) tenían niveles detectables de NO_3 y el 25% de las muestras (23/90) tenían niveles detectables de NO_2 . Como puede observarse en la Tabla 9, independientemente de la estación del año, más del 50% de las muestras presentaban valores promedio de NO_3 que superaban el límite de 45 mg/l y el 40% superaba el valor máximo tolerable recomendado para bebida animal, con valores extremos que excedían los 500 mg/l.

Los niveles detectados de nitratos realizados por otros autores en establecimientos lecheros de Argentina son variables. Un estudio tomó muestras de la aguada principal de 162 tambos ubicados en Santa Fe, Córdoba, Buenos Aires, Santiago del Estero y Entre Ríos. Los valores promedios de NO_3 fueron de 80,1 mg/l \pm 99,4 mg/l con valores máximos de 330 mg/l (Maiztegui *et al.*, 2014). Resultados más recientes (Baudracco *et al.*, 2014) surgidos de un relevamiento de tambos de la cuenca lechera de Santa Fe y Córdoba, mostraron valores promedios de nitratos de 55,1 mg/l \pm 18,4 mg/l. Otro estudio realizado por Gaggiotti *et al.* (2014) en 21 tambos ubicados en los departamentos Castellanos y Las Colonias de la provincia de Santa Fe, encontraron que los niveles promedios de NO_3 y NO_2 fueron de 63,36 mg/l \pm 76,69 mg/l y 1,34 mg/l \pm 5,48 mg/l, siendo los máximos 299 mg/l y 36 mg/l, respectivamente. Para este último caso, los valores de NO_2 fueron superiores a los hallados en el presente estudio.

Relevamientos realizados en 400 tambos ubicados en diferentes cuencas

lecheras de la Argentina indicaron que aproximadamente el 50% presentaban una concentración superior al valor de 45 mg/l (Herrero *et al.*, 1998). Un muestreo realizado por INTA Rafaela, en 110 tambos de la cuenca lechera central (Charlón, 2002), reportó que el 76% de las muestras superaba el valor límite, con promedios de 293 mg/l \pm 2,69 mg/l. En otro relevamiento realizado por Herrero (2009) sobre 129 tambos de la cuenca centro de Santa Fe mostró valores promedio de nitratos de 130,08 mg/l \pm 137,93 mg/l, donde el 40% de las muestras resultaban aptas para bebida humana.

Los niveles de nitratos han sido también estudiados en sistemas de producción agropecuarios bonaerenses. Costa *et al.* (2002) encontraron niveles por encima de los 45 mg/l en el 36% de las muestras de 214 pozos en el sureste de Buenos Aires. Herrero *et al.* (2000a) hallaron niveles detectables de nitratos en el 91% de los pozos rurales, donde el 29% de ellos, tenían niveles superiores a los 45 mg/l. Estos mismos autores encontraron niveles detectables en el 92,85% de los pozos en un estudio más extenso (1.085 pozos) y entre el 30 y el 70% superaron los 45 mg/l de nitratos, según las áreas que se evaluaron (Herrero *et al.*, 2000b).

Estudios internacionales, realizados en los Estados Unidos por Gelberg *et al.* (1999) encontraron niveles detectables de nitratos en el 95% de los pozos domésticos y más del 15,7% excedió el límite máximo de nitratos (44 mg/l) establecido por la Agencia de Protección Ambiental de EE.UU. Kross *et al.* (1993) en un estudio realizado en el estado de Iowa (EE.UU.) encontraron niveles que superaban el valor límite en el 18% de las muestras. En Chile, Claret *et al.* (2003), encontraron niveles superiores a 45 mg/l en 0,6% de los pozos muestreados.

La diferencia de estos resultados en distintas zonas o área geográficas permite inferir que la contaminación por nitratos podría estar asociada a prácticas de manejo o características de sitio específicas. Los nitratos no son un componente natural del agua, por el contrario, su presencia supone algún tipo de contaminación con materia orgánica. En algunos casos esta contaminación obedece a un alto nivel de carga

bacteriológica sobre todo de bacterias coliformes (Taverna, 2004). Por esta razón en el presente estudio, se realizó una evaluación microbiológica de las muestras de agua utilizadas en los establecimientos. Estos resultados, y los valores considerados aptos para uso humano y para higiene de las instalaciones de ordeño se presentan en la Tabla 10.

Respecto a parámetros físico-químicos, los valores de pH obtenidos no se consideran como un problema, dado que la mayoría de las fuentes de agua presentaron valores entre 6,45 y 8,55. Los valores promedios \pm DE de conductividad fueron $4,96 \pm 2,90$ mS/cm.

Tabla 10: Calidad microbiológica del agua proveniente de tambos de la cuenca lechera central de Argentina y porcentaje de muestras aptas

Análisis	M \pm DE ^a	Límite ^b	% aptas
Bacterias aerobias mesófilas (UFC/ml)	900 \pm 2780	<500 UFC/ml	77
Coliformes totales (NMP/100ml)	219 \pm 430	<3/100 ml	36
	% muestras		
<i>Escherichia coli</i> (Presencia/100ml)	19	Ausencia/100 ml	79
<i>Salmonella</i> (Presencia/100ml)	0	Ausencia/100 ml	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Presencia/100ml)	1	Ausencia/100 ml	99

Referencias: ^aM: Media, DE: desvío estándar. ^bSegún Código Alimentario Argentino para agua potable (CAA, 2007).

El recuento de coliformes totales superó el valor límite para consumo humano según la normativa vigente (>3 NMP/100ml) en el 64% de las muestras. En el caso del recuento de bacterias aerobias mesófilas, el 23% de las muestras superaron el valor establecido por el CAA (>500 UFC/ml). El 21% de las muestras presentaron valores de *E. coli* por encima de lo establecido, sucediendo lo contrario para *Pseudomonas*, donde casi la totalidad de las muestras presentó ausencia. De igual modo, no se evidenció contaminación con *Salmonella* en agua.

Un estudio realizado sobre las fuentes de agua de 10 tambos representativos ubicados en noreste de la provincia de Santa Fe, demostró que el 60% de los tambos presentaron recuentos de bacterias coliformes totales superiores al límite (>3/100ml) y en un 20% y 40 % de los casos se detectaron *Escherichia coli* y *Pseudomonas*

aeruginosa, respectivamente. Estos resultados son coincidentes con los hallados en este estudio, con excepción de *Pseudomonas*.

Como se puede observar en la Tabla 10, las mayores contaminaciones ocurrieron por la presencia de bacterias coliformes, indicando una probable contaminación con materia fecal. Para ello, se analizó su relación con variables de manejo que pudieran estar relacionadas. Las siguientes variables, profundidad del pozo ($P=0,276$), profundidad de la napa freática ($P=0,410$), la distancia de la perforación al tambo ($P=0,349$) y a la laguna de los efluentes ($P=0,400$), no estuvieron asociadas con la presencia de bacterias coliformes en el agua, mientras que el tipo de construcción del pozo ($P=0,001$), la edad de la construcción del pozo ($P=0,005$), la distancia de la perforación a los corrales de alimentación de las vacas lecheras ($P=0,055$) y al pozo ciego de la casa habitación ($P=0,012$) estuvieron asociadas con la presencia de estas bacterias en el agua.

Estos resultados son coincidentes con los reportados por Picone *et al.* (2003), en un estudio realizado en el área rural de la cuenca alta del arroyo Pantanoso (Balcarce), provincia de Buenos Aires. En el mismo se evaluaron 39 pozos y encontraron que la contaminación por coliformes estaba asociada a la presencia de pozos ciegos y/o cámaras sépticas en las cercanías de donde se realizó la toma de las muestras y en los corrales de encierre, donde la hacienda permanecía hacinada durante la noche, mientras que en los pozos que estaban bien construidos y las condiciones de higiene eran las adecuadas, la cantidad de coliformes fue menor.

Por otra parte, en el presente estudio se compararon los valores de nitratos con cada uno de los resultados microbiológicos por prueba de correlación de Spearman, no hallándose asociación entre ellos ($r=0,12$). Estos resultados coinciden con el estudio mencionado recientemente (Picone *et al.*, 2003) y con otro realizado por Herrero (2014) en perforaciones y tanques de almacenamiento en instalaciones de ordeño de la cuenca de Abasto Sur, donde no se observó ninguna asociación entre los pozos contaminados con bacterias coliformes y aquellos con nitratos, indicando que el

origen de estas contaminaciones obedecería a procesos distintos. Sin embargo, en un estudio realizado en el norte de Buenos Aires los nitratos presentaron relación con los coliformes totales ($r=0,85$) en muestras provenientes de perforaciones cercanas a pozos negros (Silva Busso y Santa Cruz, 2005).

3.3.2. Detección de nitratos y nitritos en leche

Los valores promedios de NO_3 y NO_2 en las muestras de leche provenientes de establecimientos dedicados a la producción primaria de leche en la cuenca lechera central de la Argentina, se muestran en la Tabla 11. Las concentraciones de NO_3 variaron desde no detectado ($<0,5$ mg/l) a 3 mg/l y las de NO_2 desde no detectado ($<0,2$ mg/l) a 0,5 mg/l. El 69% y el 82% de las muestras de leche presentaron concentraciones inferiores al límite de detección de la técnica utilizada para NO_3 y NO_2 , respectivamente.

Tabla 11: Valores medios de nitratos y nitritos (mg/l) en leche de tanque por estación climática en tambos de la cuenca lechera central de Argentina, y muestras que exceden los límites de detección y los establecidos en la regulación.

Estación	Analito	Nº de muestras	M ± DE	Min	Max	Muestras positivas, n (%)	Exceden los límites n, (%)	
							CAA ^a	China ^b
O-I	NO_3	34	0,5±0,8	nd	3	11 (32)	1(3)	5(15)
	NO_2		0,2±0,2	nd	0,5	12 (35)	12(35)	12(35)
P-V	NO_3	34	0,4±0,6	nd	2	10 (29)	0(0)	3(9)
	NO_2		nd	nd	nd	0 (0)	0(0)	0(0)
Media	NO_3	68	0,5±0,7	nd	3	21 (31)	1(1,5)	8(12)
	NO_2		0,1±0,2	nd	0,5	12 (18)	12(18)	12(18)

Referencias: O-I: otoño-invierno, P-V: primavera-verano; Media (M) ± desvío estándar (DE); niveles mínimos (Min.) y máximos (Max.); nd: <límite de detección

^aLímites para leche de 3 y 0,2 mg/l de NO_3 y NO_2 , respectivamente. ^bLímites para leche de 2 y 0,2 mg/l de NO_3 y NO_2 , respectivamente

El Código Alimentario Argentino (CAA) establece valores máximos de 3 y 0,2 mg/l para NO_3 y NO_2 en leche, respectivamente. Los requerimientos establecidos por ciertos países importadores que destinan mayoritariamente la leche a fórmulas infantiles son más estrictos. Por ejemplo, China establece valores de nitratos en leche <2 mg/l. Tomando como referencia estos límites, el 1,5% y 18% de las muestras superaron los valores del CAA para NO_3 y NO_2 , respectivamente. Si se considerara el

límite de NO₃ requerido por China para leche infantil, el 12% de las muestras lo superarían (el límite de NO₂ es igual al del CAA).

Los valores de nitratos en leche fueron inferiores a los reportados por estudios previos, resultando los valores de nitritos superiores. Gaggiotti *et al.* (2014) encontraron, en leche de 21 tambos de la provincia de Santa Fe, valores promedios de 2,88 mg/l ± 3,59 mg/l y 1,05 mg/l ± 0,31 mg/l de NO₃ y NO₂, respectivamente. El 7% y 1% de las muestras superaron los valores del CAA para NO₃ y NO₂, respectivamente, mientras que el 7% de las muestras superaron el valor establecido por China.

Otro estudio realizado en 12 tambos ubicados en la provincia de Córdoba (Costamagna *et al.*, 2016), reportó valores promedios y (rango) de 1,72 mg/l (0,40-21 mg/l) y 0,13 (0,10-0,50 mg/l) mg/l para NO₃ y NO₂, respectivamente. El 64% de las muestras presentaron concentraciones inferiores al límite de detección para el NO₃ y un 93% para el NO₂. El 36% y 6,9% de las muestras superaron los valores del CAA para NO₃ y NO₂, respectivamente y el 19,4% de las muestras superaron el valor establecido por China para formulas infantiles, valor que coincide con lo hallado en el presente estudio.

3.3.3. Evaluación de las concentraciones de NO₃ en agua y leche, y su relación con prácticas de manejo en los establecimientos

Se evaluaron las prácticas y condiciones del sitio de cada establecimiento que pudieran estar asociadas a la contaminación del agua por nitratos, y que por ende podrían ser una de las vías de ingreso de este contaminante a la leche (Tabla 12).

Las estaciones del año no estuvieron asociadas al nivel de NO₃ en agua ($P=0,678$) y en leche ($P=0,715$) a pesar que las precipitaciones en el área de estudio fueron superiores a la media para el período primavera-verano, hecho que podría tener un efecto sobre la lixiviación de los nitratos por fuera de la zona de alcance de las raíces y contaminar el agua subterránea.

El tipo de sistema, considerando desde más pastoriles a estabulados, tampoco estuvo asociado a la presencia de NO₃ en agua ($P=0,304$) y en leche ($P=0,950$), como así tampoco la carga animal medida en vacas totales por hectárea de cada establecimiento ($P=0,636$ y $P=0,614$ para agua y leche, respectivamente).

Tabla 12: Definiciones de variables explicativas seleccionadas ($P<0,15$) mediante análisis univariado incluidas en el análisis para la asociación potencial de la presencia de nitratos en agua de tambos provenientes de la cuenca central de Argentina (n= 90 muestras de agua).

Variable	Nivel	Media	DE	P-valor
Estación climática	Otoño-Invierno	0,587	0,105	0,678
	Primavera-Verano	0,594	0,110	
Tipo de sistema	Pastoril con suplementación	0,625	0,120	0,304
	Pastoril con encierre estratégico	0,410	0,173	
	Estabulado	0,785	0,170	
Carga animal	-	-	-	0,636
Tipo de construcción	Encamisado	0,307	0,102	0,099
	No encamisado	0,801	0,076	
Edad de la construcción	1 y 10 años	0,922	0,090	0,116
	11 y 25 años	0,407	0,147	
	>25 años	0,583	0,115	
Localización topográfica del pozo	Aguas arriba	0,942	0,036	0,023
	A nivel	0,167	0,076	
	En declive	0,027	0,045	
Distancia de la perforación a los corrales de encierre	-	-	-	0,127
Distancia de la perforación a pozos ciegos	-	-	-	0,087
Distancia de la perforación a la laguna de efluentes	-	-	-	0,224
Distancia de la perforación al tambo	-	-	-	0,378
Profundidad de los pozos	-	-	-	0,553
Nivel de la napa freática	-	-	-	0,615

Referencias: DE= desvío estándar

Respecto a las condiciones del sitio de los pozos evaluados, el tipo de construcción de los pozos ($P=0,011$), la edad de construcción de los pozos ($P=0,082$), la localización topográfica del pozo respecto al resto de las instalaciones ($P=0,001$), la distancia de la perforación a los corrales de encierre permanente o temporario ($P=0,027$) y la distancia a los pozos ciegos ($P=0,059$), fueron las variables que estuvieron asociadas a la presencia de NO₃ en agua (Tabla 13).

Tabla 13: Modelo de regresión logística multivariable final (selección hacia atrás) para la contaminación de nitratos en agua proveniente de tambos de la cuenca central de Argentina (n= 90 muestras de agua).

Variables predictivas	P	OR	OR IC 95%
Tipo de construcción	0,011	4,17	2,462 – 33,627
Edad de la construcción	0,082	1,68	2,327 – 3,520
Localización topográfica del pozo	0,001	5,73	2,166 – 9,300
Distancia de la perforación a los corrales de encierre	0,027	3,28	2,875 – 7,057
Distancia de la perforación a pozos ciegos	0,059	1,23	2,235 – 4,553

Referencias: OR= Odds Ratio; IC= Intervalo de Confianza

De las 42 muestras que presentaron valores de NO₃ superiores a 45 mg/l, el 75% derivó de pozos no encamisados, mientras que el 75,6% de las muestras con niveles inferiores a dicho límite derivó de pozos encamisados. Los pozos no encamisados tuvieron 4,17 veces más probabilidad de contaminación con NO₃ por encima de los límites establecidos, respecto a los pozos encamisados.

Sólo el 2,8% de las muestras que provenían de pozos de entre 1 y 10 años (pozos nuevos), mostraron niveles de NO₃ superiores al límite del CAA (>45 mg/l), mientras que el 44,4% y el 52,8% de las muestras que provenían de pozos de mediana edad (entre 11 y 25 años) y antiguos (más de 25 años), respectivamente, superaban dicho límite. Los pozos más antiguos tuvieron 1,68 veces más probabilidad de contaminación con NO₃ por encima de los límites establecidos, respecto a los más nuevos.

Aquellos pozos que estaban localizados aguas arriba, el 91,1% de las muestras no presentaban contaminación con NO₃, mientras que las ubicadas a nivel (56%) o en declive (35,9%), presentaron valores por encima de los 45 mg/l. Esto podría deberse al hecho de que el agua tiende a fluir cuesta abajo y los niveles freáticos tienen la tendencia para seguir la pendiente del terreno. La comprensión de estos patrones de flujo, antes de la construcción del pozo, podría ser de gran ayuda para encontrar sitios de construcción apropiados, en los que los contaminantes fluyen lejos del pozo.

Se evaluaron las posibles fuentes de contaminación del agua ubicadas en las cercanías de las perforaciones muestreadas. La variable distancia a los corrales temporarios o permanentes de las vacas lecheras (según el tipo de sistema), fue

categorizada. El 92,7% de las muestras que provenían de pozos que estaban ubicadas a menos de 20 metros de los corrales de encierre, presentaron valores de NO_3 superiores a 45 mg/l. De igual manera, el 75% de las muestras halladas con más de 45 mg/l tenían el pozo ciego ubicado a menos de 50 metros de distancia del pozo.

La distancia del pozo a la laguna de efluentes ($P=0,224$) y al tambo ($P=0,378$) no estuvo asociada a la presencia de NO_3 en agua. No obstante, sólo el 30% de los establecimientos cumplimentaba con las distancias mínimas requeridas.

A diferencia de otros resultados reportados por la bibliografía (Carbó *et al.*, 2009), la profundidad de los pozos ($P=0,553$) y el nivel de la napa freática ($P=0,615$) no estuvieron asociados a la presencia de NO_3 en el agua.

Los factores asociados a la contaminación del agua por nitratos están en concordancia con los reportados por estudios previos realizados en la provincia de Buenos Aires (Herrero *et al.*, 2000b; Herrero, 2014). Galindo *et al.* (2004) recomendaron tener en cuenta el encamisado cuando se construyen las perforaciones, ya que si bien el tipo de suelos de la región pampeana son ricos en carbonato de calcio y permiten que la pared de las perforaciones no se derrumbe, no es garantía de baja contaminación para la construcción de pozos sin camisa (caño protector). Esta situación no impide que los contaminantes de fácil lixiviación, como los nitratos, lleguen al pozo desde la napa freática por las paredes de la perforación (Ceplecha *et al.*, 2004). Goss *et al.* (1998) también encontraron esta causa asociada a la contaminación del agua por NO_3 .

El presente estudio mostró que la edad del pozo tiene un efecto sobre la concentración de NO_3 , al igual que lo reportado en un estudio preliminar (Herrero, 2014). Goss *et al.* (1998) también detectaron un aumento estadísticamente significativo en la concentración de NO_3 con la edad del pozo. Este hecho podría estar asociado a características constructivas más precarias de los pozos antiguos.

Rutkoviene *et al.* (2005) y Herrero (2014) demostraron que la concentración de nitratos estaba asociada a las mismas fuentes de contaminación halladas durante el

presente estudio. Sin embargo, estos autores encontraron otras fuentes como el uso de fertilizantes y la distancia desde el pozo a las lagunas de efluentes, contrariamente a nuestros resultados. Por otro lado, Gelberg *et al.* (1999) no encontraron una asociación significativa entre la distancia a las fuentes de contaminación y la concentración de nitrato. Por el contrario, Liu *et al.* (2005) encontraron que las distancias entre el pozo de agua y tres posibles fuentes de contaminación (corrales de animales, sistemas sépticos y cultivos agrícolas) no mostraron un efecto significativo en la concentración de NO_3 .

Todo lo antes mencionado nos permiten concluir que no existe una única fuente de contaminación del agua con nitratos y que depende de las condiciones de sitio específicas, aunque se pueden identificar algunas fuentes de contaminación repetitivas en todos estos estudios que condicionan la calidad del agua y que podrían ser un riesgo tanto para la salud humana como animal.

Los valores de NO_3 en agua y en leche fueron correlacionados mediante la prueba de correlación de Spearman, no hallándose asociación entre ellos ($r=0,35$), es decir que la concentración de nitratos en leche sería independiente de la calidad del agua. Esto indicaría que existen otras probables fuentes de contaminación como los nitratos contenidos en los alimentos de las vacas lecheras, sobre todo las pasturas y/o prácticas adoptadas por los operarios, especialmente en los procesos de sanitización de equipos de ordeño.

3.4. Análisis espacial

No se detectaron agrupaciones espaciales significativas ($P > 0,05$) en la región estudiada para los tres contaminantes evaluados. El nivel de contaminación en la leche, independientemente del contaminante considerado, fue similar en todas las zonas ($P=0,22$). Esto puede deberse a que las condiciones geográficas del área evaluada son bastante homogéneas y que la presencia de los contaminantes no está condicionada por dicha variable.

4. CONCLUSIONES PARCIALES

La prevalencia y los niveles de AFM₁ en la leche producida y comercializada en Argentina no es un problema de relevancia. Sin embargo, se han identificado prácticas que podrían aumentar los niveles de contaminación.

La semilla de algodón es el ingrediente de mayor riesgo en las dietas de ganado lechero y las condiciones de almacenamiento de los subproductos en los establecimientos se asociaron a la presencia de AFM₁ en leche.

Se demostró la presencia de diferentes insecticidas en muestras de leche, aunque los niveles detectados no representan riesgos considerables para la salud de los consumidores.

Los insecticidas organofosforados se utilizan ampliamente en la agricultura y ganadería debido a su amplio espectro de acción y su persistencia más corta en el medio ambiente respecto a otros. Estas características, sumado a los factores de riesgo identificados podrían ser una explicación de la alta incidencia de estos residuos en las muestras de leche. Por lo tanto, se recomienda la necesidad de mejorar las buenas prácticas agrícolas como, por ejemplo, llevar registros de las aplicaciones para respetar los tiempos de carencia, ya que resultaron ser las principales fuentes de contaminación de los alimentos con residuos de plaguicidas

Se detectaron altos contenidos de nitratos en las muestras de agua de la región bajo estudio, cuyos principales usos son para bebida humana y animal como para el lavado de las instalaciones de ordeño, constituyéndose en una vía de ingreso de nitratos en la leche.

Las causas de contaminación estuvieron ligadas a características constructivas de los pozos de abastecimiento de agua y la distancia y ubicación de los mismos respecto a posibles fuentes de contaminación. Este factor podría ser un indicio para

comenzar a considerar leyes y regulaciones relativas a la ubicación y construcción de los pozos futuros.

Si bien no hubo una correlación entre el contenido de nitratos y los aspectos microbiológicos del agua, la mayoría de las muestras estuvieron contaminadas con bacterias del grupo coliformes, representando un alto riesgo sanitario. La planificación del uso racional del suelo para proteger las fuentes de agua, evitando en lo posible la localización cercana a fuentes potenciales de contaminación, sería una medida adecuada a fin de evitar la contaminación del agua.

Para promover la inocuidad de los alimentos y la protección de los consumidores, es necesario implementar programas de buenas prácticas de manejo y promover acciones preventivas para minimizar los riesgos para la salud humana y animal.

Dado que los requisitos de calidad son cada vez más estrictos, cualquier reducción de los límites normativos internacionales establecidos tendría un grave impacto en la producción nacional. Por esa razón, Argentina debe mejorar su programa de monitoreo de contaminantes en la leche.

El mejoramiento de la calidad total en la producción lechera argentina constituye un desafío para mejorar su presencia exportadora. Esto permitirá mantener una ventaja comparativa de nuestro país como productor de alimentos bajo condiciones que garanticen la inocuidad de los productos.

CAPITULO II: Cuantificación de aflatoxina M₁ desde los alimentos del ganado bovino lechero hasta los productos y subproductos lácteos

1. INTRODUCCION

La leche se considera un alimento natural perfecto para consumidores de todas las edades, especialmente niños, debido a su alto valor nutricional por su contenido de proteínas, aminoácidos y una valiosa fuente de calcio, vitaminas y antioxidantes (Zeluta *et al.*, 2009). La confirmación de estos beneficios nutritivos hace al consumo extendido y constante de leche y productos lácteos en varios países (Galvano *et al.*, 1996). Según Silva *et al.* (2007) el consumo de productos lácteos constituye más del 80% de los hábitos y la ingesta dietética de niños en todo el mundo. Si bien se considera a la leche como un alimento nutricionalmente completo, la posible presencia de toxinas, como la aflatoxina M₁ (AFM₁), puede crear peligros para la salud de los consumidores (Jawaid *et al.*, 2015).

La AFM₁ es una toxina muy importante en la leche y productos lácteos ya que es el principal derivado hidroxilado de AFB₁ formado en el hígado de los animales por medio de enzimas citocromos P450 y secretada en la leche a través de la glándula mamaria de las vacas lecheras (Hwang y Lee, 2006). Aunque, la toxicidad de AFM₁ es menor que su compuesto original, AFB₁, el IARC (2002) de la OMS clasificó a AFM₁ como carcinógeno humano del Grupo 1 debido a sus efectos citotóxicos y cancerígenos bien probados. Por lo tanto, AFM₁ representa un riesgo potencial para los seres humanos a través del consumo de leche y productos lácteos (Galvano *et al.*, 1996).

Para minimizar este riesgo, varios países han establecido niveles máximos de residuos de AFM₁ en leche, leche en polvo, yogures y quesos que protegen a los consumidores, especialmente a los niños, por el importante papel de la leche en su dieta (Campagnollo *et al.*, 2016). El destino de AFM₁ hacia los productos lácteos es variable y depende del tratamiento utilizado para el procesamiento de la leche, es decir, pasteurización, esterilización o secado (Galvano *et al.*, 1996).

A pesar de esto, los estudios han demostrado que AFM₁ es relativamente estable al procesamiento térmico y al secado debido a que las temperaturas de

descomposición de las aflatoxinas se encuentran entre 237°C y 306°C (Rustom, 1997). Por lo tanto, si la leche cruda contiene AFM₁, es probable que la misma se encuentre en el producto final. Sin embargo, la literatura todavía es contradictoria sobre la influencia del proceso tecnológico aplicado a la leche y productos lácteos en los niveles de AFM₁ (Campagnollo *et al.*, 2016).

En la elaboración de quesos, dos productos se derivan de la leche: el queso y el suero, donde el queso representa aproximadamente el 10% de la masa inicial de leche, siendo la porción restante suero (Galvano *et al.*, 1996). Los resultados de numerosas investigaciones mostraron una unión preferencial de AFM₁ a la caseína (Brackett y Marth, 1982a; Galvano *et al.*, 1996) y por lo tanto un enriquecimiento en queso, que varía de 1,7 a 8,0 veces si se compara con la contaminación original de la leche. Esta variación puede originarse en el proceso de elaboración del queso, las composiciones químicas de los quesos, la cantidad de agua extraída durante el procesamiento, los métodos analíticos empleados en la cuantificación y el grado de contaminación de la leche (Blanco *et al.*, 1988; Oruc *et al.*, 2006).

A pesar de la interacción AFM₁-caseína durante la producción de quesos, parte del contenido de aflatoxinas se drena de la cuajada junto con el suero de queso (Cattaneo *et al.*, 2013). Varios estudios sobre la partición de AFM₁ durante la fabricación de queso informan una amplia gama de distribución de AFM₁ entre el suero y el queso. Algunos autores observaron que la mayor parte de la AFM₁ se transfiere al suero (Lopez *et al.*, 2001; Fernandes *et al.*, 2012; Cavallarin *et al.*, 2014), mientras que otros informan que la mayoría de la AFM₁ queda retenida en el queso (Brackett y Marth 1982b; Colak, 2007; Motawee y McMahon, 2009).

El mayor porcentaje de la leche producida en Argentina se destina a la elaboración de quesos (OCLA, 2018), siendo el suero lácteo el principal subproducto derivado de esta elaboración. El tratamiento como efluente industrial del suero líquido es costoso debido a su elevada carga orgánica (alta demanda bioquímica de oxígeno). Por tal motivo se ha comenzado a trabajar en la revalorización de este subproducto

lácteo (Terán *et al.*, 2008). Dentro de las tecnologías disponibles en la actualidad para el tratamiento del suero, una de ellas es la tecnología de membranas que ha revolucionado la industria láctea generando nuevos procesos tecnológicos y desarrollos de productos innovadores (Vikram y Maubois, 2017).

Las proteínas presentes en el suero lácteo han demostrado amplias propiedades nutricionales y funcionales. El principal producto obtenido del procesamiento por membranas del suero es el concentrado de proteínas de suero (Whey Protein Concentrate 35%, 50% y 80%). Este producto es utilizado como componente funcional en una amplia gama de productos comerciales, como aditivos alimentarios, o también pueden fraccionarse en proteínas de suero individuales (Morr, 1989). Todos estos productos pueden contribuir a la ingesta de AFM₁.

OBJETIVO

En Argentina, no existen datos publicados sobre el nivel de AFM₁ en productos y subproductos lácteos, así como la tasa de transferencia de aflatoxina a lo largo de toda la cadena láctea. Los objetivos de este capítulo fueron:

1. Cuantificar la ocurrencia natural de AFB₁ en los alimentos en un sistema de producción de leche representativo de la región lechera central de Argentina y estimar la tasa de transferencia de AFB₁ a AFM₁ en leche.
2. Cuantificar la transferencia de AFM₁ de la leche a los productos y subproductos lácteos.
3. Estudiar la distribución y estabilidad de la AFM₁ en los diferentes productos y subproductos derivados del procesamiento de la leche y sometidos a diferentes tratamientos tecnológicos.

El conocimiento de los mecanismos por los cuales AFM₁ se ve afectada durante el proceso de elaboración de productos y subproductos lácteos es de gran

importancia para proporcionar información útil y precisa en el desarrollo de estudios de evaluación de riesgos y estrategias de gestión de los mismos.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Muestreos

El estudio se realizó en un Sistema de Ordeño Voluntario (VMS) ubicado en la región lechera central de Argentina, con un sistema de producción semi-intensivo donde las vacas tienen acceso a pasturas, forrajes conservados y alimentos concentrados durante todo el año, similar al promedio de los establecimientos lecheros del país.

Se recolectaron, con una frecuencia mensual, un total de 66 muestras de los alimentos que consumían las vacas en ordeño: 18 muestras de pasturas, 24 muestras de balanceado comercial y 24 muestras de Raciones Parcialmente Mezcladas (PMR) compuestas de silaje de maíz y trigo, semilla de algodón, heno de alfalfa y subproductos como expeller de soja y pellet de girasol. La duración total del estudio fue de dos años.

Mensualmente, se tomaron muestras de leche de tres vacas seleccionadas al azar según la etapa de lactancia: a) <90 días de lactancia (alta producción de leche); b) entre 90 y 150 días de lactancia (producción de leche mediana) y c) >150 días de lactancia (baja producción de leche). Durante el primer año (2016), se tomaron muestras de 12 vacas por cada momento de lactancia descrito, obteniéndose un total de 36 muestras de leche. La leche de cada animal fue individualizada y utilizada para la producción de mini-quesos blandos. A su vez, se realizaron muestreos de leche de vacas elegidas al azar, hasta completar *pooles* de 180 litros para la elaboración de quesos duros de pasta cocida.

Durante el segundo año (2017), se tomaron muestras de 12 vacas por cada momento de lactancia descrito, obteniéndose un total de 36 muestras de leche. La

leche de cada animal fue individualizada y utilizada para la producción de leche en polvo.

2.2. Elaboraciones de productos lácteos

2.2.1. Quesos de pasta blanda

Se fabricaron un total de 36 mini-quesos blandos de acuerdo con el proceso estándar para el queso Cremoso Argentino, adaptado para quesos miniatura (Costabel *et al.*, 2017) en el área de procesos del Laboratorio de Calidad de Leche y Agroindustria del INTA Rafaela. En cada elaboración, se partió de una muestra de 6 litros de leche cruda, la cual fue termizada a 38-40°C y homogeneizada. Luego, se colocó 1 litro de leche en mini cubas que se llevaron a un baño termostático hasta alcanzar la temperatura de coagulación (38,5°C ± 0,5°C) y se añadió CaCl₂ (Merck, Darmstadt, Alemania) para alcanzar una concentración final en la leche de 0,2 g/l.

Posteriormente, se adicionó el fermento comercial de ST1-12 (Chr. Hansen Argentina, Quilmes, Argentina) a una concentración de 10⁶ UFC/ml de leche. La enzima coagulante (CHY-MAX® extra, 600 IMCU/ml, Chr. Hansen) se añadió a una concentración de 0,09 ml/l de leche. A continuación, se introdujo en la minitina el coagulómetro (INRA, PIGNAT, France) y se detectó el tiempo de coagulación usando el software Coag del equipo (*Figura 4*). El tiempo de coagulación fue de 9,84 ± 4,79 min (valor medio ± desviación estándar). Una vez que la cuajada alcanzó la firmeza apropiada, se cortó manualmente al tamaño de grano adecuado para este tipo de queso (*Figura 4*). La mezcla de las partículas de cuajada y el suero se agitó suavemente y se calentó a 39°C durante 2 min para reducir la humedad en los granos de cuajada. Luego, la mezcla de suero y granos de cuajada fue vertida en moldes miniatura microperforados de 5,5 cm de diámetro y 10 cm de alto, en el cual se logró la separación del suero y de la cuajada. Los quesos en miniatura se mantuvieron en sus recipientes en una cámara a 37°C hasta que se alcanzó un pH de aproximadamente 5,20. El pH se controló cada 1 hora.



Figura 4: Coagulación y corte de cuajada en la elaboración de quesos miniatura.

Los quesos fueron transferidos a salmuera saturada a 4°C durante 3 min. A continuación, los quesos se pesaron y se envasaron al vacío (*Figura 5*) en bolsas Cryovac BB2800CB (permeabilidad al O₂ 30 cm³ m⁻² 24 h⁻¹ bar⁻¹; CO₂ 150 cm³ m⁻² 24 h⁻¹ bar⁻¹; vapor de agua 20 g 24 h⁻¹ m⁻²; Sealed Air Co., Buenos Aires, Argentina). Todos los quesos se maduraron 20 días a 4°C.



Figura 5: Almacenamiento de quesos miniatura envasados al vacío.

2.2.2. Quesos de pasta dura

Se elaboraron un total de 9 quesos duros de pasta cocida de acuerdo con el proceso estándar para el queso Reggiano Argentino (Gallino, 1994) en el área de procesos del Laboratorio de Calidad de Leche y Agroindustria del INTA Rafaela. Para cada elaboración se utilizaron 180 litros de leche cruda. La misma fue estandarizada

hasta una relación grasa/proteína de $0,70 \pm 0,02$, por mezcla de leche entera y leche desnatada. Posteriormente se pasteurizó en tina a 65°C durante 20 min y se enfrió hasta $32\text{-}33^{\circ}\text{C}$, temperatura óptima para la coagulación de esta variedad de queso. Una vez alcanzada esa temperatura se agregó CaCl_2 (Merck, Darmstadt, Alemania) a una concentración final de $0,02\%$ (p/v). Posteriormente, se procedió a acidificar la leche mediante el agregado de ácido láctico ($1,5\%$ p/v) (Tuteur, Buenos Aires, Argentina), hasta obtener un valor de pH de $6,25 \pm 0,02$. Luego se adicionó el fermento, el cual se trató de un fermento comercial de *Lactobacillus helveticus* (Chr. Hansen Argentina, Quilmes, Argentina). La enzima coagulante consistió en quimosina pura 100% , 570 IMCU ml^{-1} (CHY-MAX®, Chr. Hansen) la cual fue adicionada a la leche a una concentración de $0,06 \text{ ml/l}$ de leche. Luego de adicionar el coagulante, se introdujo en la tina el coagulómetro (INRA, PIGNAT, France) y se detectó el tiempo de coagulación usando el software Coag del equipo. El tiempo de coagulación promedio \pm la desviación estándar correspondiente a las 9 elaboraciones fue $3,96 \pm 1,4 \text{ min}$. El corte de la cuajada se realizó cuando el coágulo adquirió fuerza suficiente, lo que ocurrió luego de transcurrido un lapso extra igual a un tercio del tiempo de coagulación detectado. Se efectuaron cortes sucesivos separados por etapas de agitación hasta obtener un tamaño de grano similar a la mitad de un grano de arroz. El corte y agitación se realizó utilizando liras mecánicas a velocidad controlada automáticamente. La mezcla de granos de cuajada y suero se calentó lentamente ($0,5^{\circ}\text{C/min}$) hasta 42°C , lo que comúnmente se denomina rampa de secado. El secado de los granos de cuajada se completó manteniendo a 42°C durante 15 min. Culminada esta etapa, se procedió a elevar rápidamente la temperatura (1°C/min) hasta 51°C . El tiempo de cocción a 51°C fue de 3 min. Posteriormente se realizó el pre-prensado de la cuajada, durante 20 min. Los quesos se formaron en moldes de acero inoxidable de tamaño adecuado para quesos Reggianito. Luego de moldeados, los quesos fueron prensados durante 20 horas en prensa horizontal y posteriormente se salaron en salmuera saturada a 12°C , a razón de 1 día por kg de queso. El peso promedio de los

quesos a la salida de salmuera fue de 3,9 kg. Posteriormente, todos los quesos se maduraron en cámara con temperatura y humedad controlada (12°C, 85% de humedad) por un período máximo de 180 días.

2.2.3. Leche concentrada y en polvo

De un *pool* de 6 litros de leche, se usaron 533 ml de leche para el secado spray de las muestras, realizado en el área de procesos del Laboratorio de Calidad de Leche y Agroindustria del INTA Rafaela. Las muestras de leche se pasteurizaron a 72°C durante 10 min y se concentraron hasta un 30% de materia seca total mediante Rotavapor Buchi R (68-70°C bajo vacío). En promedio, se obtuvieron 202 ml de leche concentrada. Luego, las leches concentradas se secaron con un Mini Spray Büchi B-290, utilizando las siguientes condiciones de deshidratación: temperatura del aire de entrada de 145°C, temperatura del aire de salida de 80-120°C, % de alimentación de la bomba de 5 ml/min, flujo de aire de atomización de 60 l/h y % de secado por aspiración de aire de 38 m³/h. Los pesos de las muestras de leche en polvo fueron, en promedio, de 24 g.

2.3. Detección de AFB₁ en alimentos de ganado bovino lechero

La metodología de extracción y análisis de AFB₁ en muestras de alimentos se describió en el CAPITULO I.

Además, el tamaño de partícula de la PMR se midió mediante el separador de partículas *Penn State Particle Separator* (PSPS). El mismo consta de cuatro bandejas apiladas que tienen agujeros de diferentes diámetros, comenzando desde la parte superior con 19 mm, la segunda con 8 mm, la tercera que retiene partículas entre 2 a 8 mm y la cuarta con la capacidad de retener materiales menores a 2 mm. Se colocó una muestra de 500 g de la PMR en la bandeja superior y se sacudió enérgicamente durante 2 min en distintas direcciones. Luego se pesaron los materiales de las respectivas bandejas y se calcularon las proporciones en cada una.

Esta medición se realizó bajo la hipótesis de que una reducción en el tamaño de las partículas de forraje (proporción no adecuada de fibra efectiva en la dieta) podría afectar el tiempo de retención de los alimentos en el rumen, evitando la degradación de micotoxinas por parte de los microorganismos del rumen y, en consecuencia, podría aumentar la tasa de transferencia de la AFM₁ a la leche.

2.4. Detección de AFM₁ en leches, productos y subproductos lácteos

Las muestras de leche cruda, leche concentrada, leche en polvo, suero y quesos fueron analizadas usando el kit de prueba RIDASCREEN (R-Biopharm, Alemania) para detectar y cuantificar AFM₁. Los límites de detección (LD) fueron de 5 ng/l para leche cruda, concentrada y en polvo y 50 ng/l para quesos y suero. Las soluciones estándar utilizadas fueron 0, 5, 10, 20, 40, 80 µg/l. Se consideró que una muestra era positiva para AFM₁ si los niveles excedían el límite de detección para el ensayo

2.4.1. Preparación de las muestras

La extracción de AFM₁ de las muestras de cada matriz analizada, se detalla a continuación:

Leche concentrada: Veinte mililitros (20 ml) de leche fueron calentados a 50°C en un baño de agua durante 30 min y luego se centrifugaron durante 10 min a 3500 g/10°C. La capa de grasa se eliminó mediante aspiración con pipeta Pasteur y la leche desnatada restante se usó directamente en la prueba (100 µl por pocillo).

Leche en polvo: Se colocaron diez gramos de leche en polvo en un matraz y se agregaron 100 ml de agua destilada. La mezcla se agitó durante 5 min y se calentó la solución de leche en polvo a 50°C en un baño de agua durante 30 min. Luego se centrifugó durante 10 min a 3500 g/10°C. Después de la centrifugación, la capa superior de grasa se eliminó mediante la aspiración con pipeta Pasteur, la leche desnatada restante se usó directamente en la prueba (100 µl por pocillo).

Quesos blando y duro: una muestra de queso representativa (5 g) se trituró finamente con un mezclador y se homogeneizó con 20 ml de metanol al 70% en un tubo de 50 ml y se incubó a 50°C durante 30 min en un baño de agua, agitando vigorosamente 5 veces durante el período de incubación. Las muestras se centrifugaron a 10 min/3000g/10°C. Luego, se tomaron 2 ml de la fase acuosa y se añadieron 2 ml de hexano agitando durante 10 s. Luego se centrifugó en las mismas condiciones y se tomó una alícuota de la fase acuosa inferior y se diluyó 1:5 con la dilución de muestra tampón y se usaron 100 µl por pocillo directamente en la prueba.

Suero: Las muestras se centrifugaron 10 min/3500 g/10 °C. Después de eso, la capa de crema superior se eliminó por completo usando una pipeta Pasteur, el resto se usó directamente en la prueba (100 µl por pocillo).

2.4.2. Análisis de AFM₁ en leche, productos y subproductos lácteos

Las muestras de leche cruda, leche concentrada, leche en polvo y suero fueron analizadas bajo el mismo procedimiento descrito en el CAPITULO I.

Se detalla a continuación el procedimiento de análisis para detección y cuantificación de AFM₁ en quesos:

Se añadieron 100 µl de solución de anticuerpo al fondo de cada pocillo, luego se mezclaron suavemente sacudiendo la placa manualmente y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente. Luego, el líquido se vertió fuera de los pocillos y los mismos se llenaron con 250 µl de tampón de lavado y se descartó nuevamente el líquido. Este paso de lavado se repitió dos veces.

En la siguiente etapa, se añadieron 100 µl de las soluciones estándar y muestras preparadas al fondo de cada pocillo, luego se mezclaron suavemente agitando la placa manualmente y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente en oscuridad. Trascorrido este lapso, el paso de lavado se repitió tres veces. Luego, 100 µl de solución de conjugado fue añadida y se incubó nuevamente durante 15 min

a temperatura ambiente en oscuridad. Seguidamente, el paso de lavado se repitió tres veces.

Posteriormente, se añadieron 100 µl de solución sustrato/cromógeno al pocillo y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente en oscuridad. Luego se añadieron 100 µl de solución *stop* a cada pocillo, lo que conduce a la decoloración amarilla del cromógeno y se mezcló suavemente agitando la placa manualmente. La lectura de las absorbancias se realizó como se describió en el CAPITULO I.

2.5. Análisis de calidad fisicoquímica e higiénico-sanitaria de la leche y productos lácteos.

2.5.1. Leche

La determinación de grasa y proteína se realizó utilizando el equipo MilkoScan Minor (FOSS) por método infrarrojo según ISO 9622 (IDF, 2013), acreditada por el Organismo Argentino de Acreditación (OAA) según norma ISO 17025:2005. El pH se midió por método potenciométrico, utilizando el autoanalizador automático Titroline Alpha Plus (SHOOT Instruments). La acidez se determinó por titulación manual, con acidímetro (IRAM, 2006).

El Recuento de Células Somáticas (RCS) se determinó por método infrarrojo, utilizando el equipo FOSSomatic (FOSS). El Recuento de Bacterias Totales (RBT) se determinó por citometría de flujo, utilizando un equipo BactoScan (Bentley) (IDF, 1995).

2.5.2. Quesos

Se realizaron análisis de humedad, proteínas, materia grasa y pH a los quesos elaborados en ambos ensayos. El porcentaje de humedad se determinó por secado de las muestras de cuajada/queso en estufa a $102 \pm 2^{\circ}\text{C}$ hasta pesada constante, de acuerdo a la metodología normalizada de la Federación Internacional de Lechería (IDF, 2004). El contenido de materia grasa en la cuajada/queso fue determinado por el

método butirométrico de Van Gulik (IDF, 1997), empleando un butirómetro específico para queso. El contenido de proteínas totales se determinó mediante el método de Kjeldahl, de acuerdo a la norma IDF N° 20B (IDF, 1993). Por último, la determinación de pH en las muestras de cuajada/queso se realizó de acuerdo al método estándar de la APHA (Bradley *et al.*, 1993).

2.6. Determinación de la tasa de transferencia de AFB₁ a AFM₁

Para determinar la tasa de transferencia (TT), se utilizó la misma metodología descrita en el CAPITULO I mediante la siguiente fórmula:

$$TT = \frac{\text{Excreción de AFM}_1 \text{ leche } (\mu\text{g/vaca})}{\text{AFB}_1 \text{ ingerida } (\mu\text{g/vaca})}$$

Donde la excreción de AFM₁ en la leche y la AFB₁ ingerida, se calculan como:

$$\text{Excreción } (\mu\text{g}) = \text{AFM}_1 \text{ leche } (\mu\text{g/l}) * \text{Producción leche } (\text{l/vaca})$$

$$\text{Ingesta AFB}_1 (\mu\text{g}) = \text{AFB}_1 \text{ alimentos } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{kg}}\right) * \text{consumo de alimento } (\text{Kg/vaca})$$

2.7. Análisis de aflatoxina M₁ en sueros procesado por tecnología de membranas, obtenido de PYMES lácteas de la cuenca lechera central.

Se obtuvieron muestras de suero, permeado y concentrado de proteínas de suero de dos empresas PYMES lácteas de la cuenca lechera central que se dedican a procesar suero de quesería mediante tecnologías de membranas de ultrafiltración (UF) y nanofiltración (NF). El objetivo de este muestreo fue evaluar el porcentaje de distribución de AFM₁ hacia el permeado y el concentrado de proteínas de suero.

En la empresa I, se realizaron 6 muestreos de pool de suero de queso: azul, duro y semiduro procesado mediante membranas de UF. Se obtuvieron 6 muestras de suero, 6 muestras de permeado y 6 muestras de concentrado de proteínas. En la empresa II, se realizaron 6 muestreos de suero proveniente de la elaboración de

queso mozzarella procesado mediante membranas de NF. Se tomaron 6 muestras de suero, 6 muestras de permeado y 6 muestras de concentrado de proteínas.

La tecnología de membranas aplicada por la empresa I cuenta con dos etapas. En la primera se realiza una nanofiltración para eliminar agua y concentrar sólidos y en la segunda una ultrafiltración para concentrar proteínas. El volumen de suero procesado es de 130.000 l diarios. El equipo cuenta con 6 membranas de filtración. El caudal de entrada es de 3.500 l/h y el caudal de salida es de 720 l/h. En una primera etapa el suero, que presenta un valor promedio de 6,4% de sólidos totales, es filtrado por NF para lograr una concentración del 18% de sólidos totales. Luego en una segunda etapa es filtrado por UF donde se llega a una concentración final de 27% de sólidos totales. La presión de trabajo fue de 2,6 bar a la entrada del equipo, en la etapa NF fue 6,6 bar y en la etapa UF fue 7,2 bar. La temperatura de trabajo durante el proceso de filtrado fue de 9,5°C. El tiempo total operacional del equipo fue de 12 horas.

Con respecto a la tecnología aplicada por la empresa II, realiza un proceso de nanofiltración para eliminar agua y concentrar sólidos. La planta procesa un volumen de suero de 200.000 l diarios en un equipo que cuenta con 20 membranas. El caudal de entrada es de 12.500 l/h y el caudal de salida es de 4.000 l/h. El suero, que presenta un valor promedio de 6,7% de sólidos totales, es filtrado por las membranas logrando una concentración final de 18,2% de sólidos totales. La presión total de trabajo fue de 19,6 bar, la presión de entrada fue de 16,5-17,0 bar y la de salida 4,5 bar. La temperatura de trabajo fue de 14,5°C. El tiempo total operacional fue de 8 horas.

En todas las muestras de suero, permeado y concentrado de proteínas de suero se analizó pH (método potenciométrico), acidez (por titulación), grasa, proteínas y sólidos totales (método infrarrojo para suero, permeado y concentrado de proteínas según normas ISO 7208:2012, ISO 8968-3:2004 e ISO 2920:2012 para grasa, proteínas y sólidos totales, respectivamente), perfil nitrogenado: proteína total (PT),

nitrógeno total (NT), nitrógeno no caseínico (NNC) y caseína (AOAC, 1998 N° 976.05), perfil de minerales: calcio (Ca), potasio (K), magnesio (Mg) y sodio (Na) (Absorción Atómica) y fósforo (P) (método colorimétrico).

Además, en las muestras de suero se analizaron finos de caseína (centrifugación y secado a 102°C) y finos sedimentables (Cono de Imhoff). Todos los análisis mencionados fueron realizados en el Laboratorio de Calidad de Leche y Agroindustria del INTA Rafaela.

2.8. Evaluación del porcentaje de distribución de AFM₁ en productos y subproductos lácteos

La cantidad de AFM₁ en cada fracción se calculó considerando la concentración de toxina ([AFM₁]) y la masa (M) de la materia prima utilizada o el producto obtenido en cada experimento.

$$AFM1 (\mu g) = [AFM1](\mu g/Kg) \times M (Kg)$$

El porcentaje de distribución de AFM₁ se calculó a partir de siguiente fórmula:

$$\% \text{ Distribución} = \frac{AFM1 \text{ producto } (\mu g)}{AFM1 \text{ material original } (\mu g)} \times 100$$

Finalmente, se calculó el factor de concentración (FC) en quesos:

$$FC = \frac{AFM1 \text{ queso } (\mu g/Kg)}{AFM1 \text{ leche } (\mu g/Kg)} \times 100$$

2.9. Análisis estadístico

El efecto de las estaciones del año, los días en lactancia, la producción de leche, el recuento de células somáticas, el tamaño de partícula (consideradas variables independientes) sobre la concentración de AFM₁ en la leche y en la tasa de transferencia de AFB₁ (ambas variables de resultado) se evaluó mediante modelos lineales generalizados con distribución Gamma como función de enlace. Este modelo estadístico se seleccionó dado que las variables de resultado no se distribuyeron

normalmente. Los análisis estadísticos se realizaron con el software InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2012).

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. Cuantificación de la tasa de transferencia de aflatoxina M₁ durante la elaboración de quesos blandos y duros a partir de leche cruda contaminada naturalmente

3.1.1. Alimentos

Durante el año 2016, se analizaron 32 muestras de alimento destinado a ganado bovino lechero y la prevalencia general (número de muestras con concentración de AFB₁ mayor al límite de detección/número total de muestras) para AFB₁ fue del 76%, con una media diaria de AFB₁ en la dieta de $3,3 \pm 1,8$ µg/kg de materia seca (Tabla 14). El consumo de materia seca (MS) promedio fue de $23,87 \pm 1,8$ kg de MS/vaca/día.

La Unión Europea (UE) (European Community, 2002) y el MERCOSUR (MERCOSUR, 2002) determinan un nivel máximo de 5 y 20 µg/kg de AFB₁ en los alimentos para el ganado lechero, respectivamente. En este estudio, el 19% de los alimentos ofrecidos al ganado lechero excedió el valor establecido por la UE, pero ninguno de ellos el valor establecido por el MERCOSUR (Tabla 14).

La concentración de AFB₁ en los alimentos no se vio influenciada por las estaciones del año ($P=0,106$), aunque las mayores concentraciones se obtuvieron en los meses de otoño-invierno debido a los cambios que se realizan en las proporciones de los alimentos en la dieta, con una mayor participación de PMR compuesta por forrajes conservados y subproductos, en detrimento de las pasturas. Por otro lado, la prevalencia de AFB₁ fue particularmente alta en la PMR, aunque las mayores concentraciones se observaron en las pasturas.

Tabla 14: Media (M) \pm desvío estándar (DE), mínimo (Min.) y máximo (Max.) niveles de aflatoxina B₁ ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en diferentes estaciones y alimentos evaluados durante el año 2016.

Estación	Nº de muestras	M \pm DE	Min	Max	Nº de muestras positivas, n (%)	Exceden el límite, n (%)	
						20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^a	5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^b
Verano	9	2,9 \pm 1,2	0,8	5,2	8 (89)	0 (0)	1 (11)
Otoño	6	3,5 \pm 2,1	nd	5,7	5 (83)	0 (0)	2 (33)
Invierno	8	4,1 \pm 1,8	1,9	7,6	8 (100)	0 (0)	2 (25)
Primavera	9	2,3 \pm 2,4	nd	8,1	4 (44)	0 (0)	1 (11)
Alimentos							
Pasturas	8	4,4 \pm 2,6	0,5	7,6	7 (87)	0 (0)	4 (50)
Balanceado	12	2,3 \pm 1,7	nd	5,7	8 (67)	0 (0)	1 (8)
PMR ^c	12	3,2 \pm 1,2	1,1	5,3	11 (92)	0 (0)	1 (8)
Promedio	32	3,3 \pm 1,8	0	8,1	26 (76)	0 (0)	6 (19)

nd: <límite de detección; ^aLímite MERCOSUR (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$); ^bLímite Unión Europea (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

^cPMR= Ración Parcialmente Mezclada

3.1.2. Leche

Los niveles de AFM₁ en las 36 muestras de leche variaron entre 0,003 $\mu\text{g}/\text{l}$ y 0,064 $\mu\text{g}/\text{l}$ con una media de 0,014 $\mu\text{g}/\text{l}$ (Tabla 15).

Tabla 15: Media (M) \pm desvío estándar (DE), niveles mínimos (Min.) y máximos (Max.) de aflatoxina M₁ ($\mu\text{g}/\text{l}$) en leche cruda por estación climática, durante el 2016.

Estación	Nº de muestras	M \pm DE	Min	Max	Muestras positivas, n (%)	Exceden los límites n, (%)		
						0,5 ^a	0,05 ^b	0,025 ^c
Verano	9	0,011 \pm 0,011	0,003	0,036	8 (89)	0(0)	1(11)	2(22)
Otoño	9	0,013 \pm 0,019	0,004	0,061	5 (55)	0(0)	1(11)	1(11)
Invierno	9	0,021 \pm 0,020	0,003	0,064	8 (89)	0(0)	1(11)	3(33)
Primavera	9	0,011 \pm 0,005	0,004	0,017	7 (78)	0(0)	0(0)	0(0)
Media	36	0,014 \pm 0,013	0,003	0,064	28 (78)	0(0)	3(8)	6(17)

^aLímite MERCOSUR (0,5 $\mu\text{g}/\text{l}$); Límite Unión Europea para ^bleche fluida (0,05 $\mu\text{g}/\text{l}$) y ^cleche para fórmula infantil (0,025 $\mu\text{g}/\text{l}$).

Veintiocho de las 36 muestras de leche (77,8%) tuvieron niveles detectables de AFM₁. De acuerdo con la regulación del MERCOSUR, no existen diferencias en los niveles de tolerancia de la leche fluida y los destinados a los lactantes. Sin embargo, la Unión Europea, teniendo en cuenta la mayor susceptibilidad de esta población, fijó la tolerancia en la leche infantil a la mitad del valor requerido para los adultos (0,025 $\mu\text{g}/\text{l}$) (European Community, 2004). Al respecto, el 8% y 17% de las muestras presentó concentraciones superiores a los límites establecidos por la regulación europea 0,05 $\mu\text{g}/\text{l}$ para leche fluida y 0,025 $\mu\text{g}/\text{l}$ para leche infantil, respectivamente. Por el contrario,

todas las muestras se encontraron por debajo de los niveles establecidos por la legislación del MERCOSUR (0,5 µg/l) (MERCOSUR, 2002).

La presencia y concentración de AFM₁ en la leche no estuvo influenciada por las estaciones del año ($P=0,325$) aunque los mayores valores se detectan en los meses de otoño-invierno, probablemente explicado por los cambios que ocurren en la alimentación de las vacas en ordeño, donde los forrajes conservados y los subproductos se presentan en mayor proporción.

3.1.3. Tasa de transferencia de AFB₁ de los alimentos a la leche

La tasa de transferencia promedio de AFB₁ a AFM₁ fue del 0,84% con una variación entre el 0,05% y el 5,93% (Tabla 16).

Tabla 16: Valores medios \pm desvío estándar de la ingesta de aflatoxinas, producción de leche y tasa de transferencia por período de lactancia

Producción de leche	Ingesta AFB ₁ (µg/día)	Producción diaria (l/día)	Concentración AFM ₁ en leche (µg/l)	Excreción AFM ₁ en leche (µg/día)	Tasa de transferencia % (rango)
Alta (n=12)	66,08 \pm 27,5	34,12 \pm 9,7	0,016 \pm 0,02	0,484 \pm 0,43	0,88 ^a (0,06 – 1,99)
Media (n=12)	66,92 \pm 26,0	30,54 \pm 5,5	0,015 \pm 0,02	0,514 \pm 0,63	1,09 ^a (0,07 – 5,93)
Baja (n=12)	67,50 \pm 25,6	20,15 \pm 5,7	0,011 \pm 0,01	0,239 \pm 0,22	0,56 ^a (0,05 – 3,22)
Media (rango)	66,8 (15 – 108)	28,27 (13 – 49)	0,014 (0,003 - 0,064)	0,413 (0,039 – 2,405)	0,84 (0,05 – 5,93)

Referencias: ^{abc} Los grupos con letras distintas difieren significativamente ($P < 0,05$) por el modelo lineal generalizado con gamma como función de enlace.

La ingesta de AFB₁ y la excreción de AFM₁ para cada estado de lactancia se resumen en la Tabla 16. Las concentraciones de AFM₁ en leche variaron entre 0,004-0,064 µg/l, 0,003-0,061 µg/l y 0,003-0,036 µg/l para las vacas de alta, media y baja producción, respectivamente. Teniendo en cuenta la cantidad de leche diaria producida, el nivel promedio de AFM₁ en la leche de vaca individual fue de 0,413 µg (mínimo = 0,039 µg - máximo = 2,405 µg). La ingesta diaria media total de AFB₁ fue de 66,8 µg/día (rango=15 µg a 108 µg).

3.1.4. Quesos blandos

La composición de la leche utilizada para la elaboración de quesos blandos se describe en la Tabla 17. Estos valores estuvieron dentro de los requisitos establecidos por el sistema de leche de referencia de Argentina (SAGPyA, 2016).

El rendimiento de los mini-quesos (promedio \pm desvío estándar) fue de 10,31% \pm 1,38%, y los valores de pH, humedad, grasa y proteína total en base seca fueron 5,40 \pm 0,05, 48,99% \pm 1,15%, 51,23% \pm 2,91%, y 37,60% \pm 6,01%, respectivamente. Teniendo en cuenta estos rangos, de acuerdo con el Código Alimentario Argentino, los quesos obtenidos se clasifican como grasos, de alta humedad o pasta blanda.

Tabla 17: Composición de la leche utilizada para elaborar los mini-quesos

Items	Alta producción (n=12)	Media producción (n=12)	Baja producción (n=12)
Grasa (%) ¹	3,19 \pm 0,20 ^a	3,71 \pm 0,23 ^a	3,65 \pm 0,23 ^a
Proteína (%)	3,21 \pm 0,09 ^a	3,46 \pm 0,09 ^b	3,59 \pm 0,09 ^c
pH	6,73 \pm 0,06 ^a	6,72 \pm 0,05 ^a	6,73 \pm 0,06 ^a
Acidez (°D)	17,33 \pm 0,36 ^a	17,08 \pm 0,36 ^a	16,58 \pm 0,35 ^a
Células Somáticas (x1000 cel./ml)	81 \pm 139 ^a	101 \pm 105 ^a	107 \pm 94 ^a
Bacterias Totales (Log ufc/ml)	4,62 \pm 0,29 ^a	4,63 \pm 0,29 ^a	4,27 \pm 0,27 ^a

Referencias: ^{abc} Los valores con distintas letras en una misma columna difieren significativamente (P < 0,05).

¹ Modelos Lineales Generalizados con gamma como función de enlace.

La leche utilizada para los ensayos de producción de queso presentó valores de concentración natural de AFM₁ de 0,016, 0,015 y 0,011 μ g/l. Se detectó AFM₁ en 19 (52,8%) de las 36 muestras de queso analizadas, donde solo una de las muestras de queso superó el nivel máximo aceptable establecido por los países de la Unión Europea que regulan la AFM₁ en los quesos (0,25 μ g/kg). De igual manera, sólo una de las muestras de suero presentó valores de AFM₁ superiores a 0,05 μ g/l.

La Tabla 18 muestra la distribución de AFM₁ en queso y suero durante la producción de quesos blandos a partir de la leche contaminada naturalmente con AFM₁.

Tabla 18: Distribución de AFM₁ en leche, suero y queso, para el método de producción de Queso Cremoso Argentino.

Producción de leche	Muestras	Cantidad (ml or g)	AFM ₁		% de distribución de AFM ₁ ^a
			(µg/l o µg/kg)	Total masa (µg)	
Alta (n=12)	Leche	1000	0,01607	0,01607	
	Suero	851	0,01289	0,01097	56,9
	Queso	107	0,07768	0,00831	43,1
^b Factor de concentración en queso = 4,8					
Media (n=12)	Leche	1000	0,01564	0,01564	
	Suero	850	0,01283	0,01090	58,1
	Queso	107	0,07349	0,00786	41,9
Factor de concentración en queso = 4,7					
Baja (n=12)	Leche	1000	0,01094	0,01094	
	Suero	848	0,00877	0,00744	56,7
	Queso	107	0,05312	0,00568	43,3
Factor de concentración en queso = 4,8					
Promedio (n=36)	Leche	1000	0,01422	0,01422	
	Suero	849	0,01150	0,00976	57,2
	Queso	107	0,06825	0,00730	42,8
Factor de concentración en queso = 4,8					

^a [(Total de masa de AFM₁ (µg) en suero o queso) * 100 / (AFM₁ en queso + suero)]

^b Concentración de AFM₁ en queso sobre leche

En las muestras de suero, los niveles de AFM₁ fueron entre 56% y 58% de la cantidad total de la toxina presente en la leche contaminada naturalmente, encontrándose el porcentaje restante en los quesos. Con respecto al factor de concentración AFM₁ de la leche al queso, la concentración de AFM₁ resultó ser más alta en queso en comparación con la leche original. El nivel de AFM₁ resultó ser en promedio, 4,8 veces mayor en quesos blandos en comparación con la leche utilizada para su fabricación.

3.1.5. Quesos duros

La composición de la leche utilizada para la elaboración de quesos duros se describe en la Tabla 19. Estos valores estuvieron dentro de los requisitos establecidos por el sistema de leche de referencia de Argentina (SAGPyA, 2016).

El rendimiento promedio de los quesos duros fue de 7,06% ± 0,46% y los valores (promedio ± desvío estándar) de pH, humedad, grasa y proteína total en base seca fueron 5,18 ± 0,04, 31,02% ± 0,64%, 47,72% ± 0,67%, y 40,86% ± 1,57%, respectivamente. Teniendo en cuenta estos rangos, de acuerdo con el Código

Alimentario Argentino, los quesos obtenidos se clasifican como semi-grasos, de baja humedad o pasta dura.

Tabla 19: Composición de la leche utilizada para elaborar quesos duros

Items	Elaboración 1 (n=3)	Elaboración 2 (n=3)	Elaboración 3 (n=3)
Grasa (%) ¹	3,45 ± 0,20 ^a	3,67 ± 0,33 ^a	3,60 ± 0,09 ^a
Proteína (%)	2,99 ± 0,21 ^a	3,23 ± 0,10 ^a	3,25 ± 0,17 ^a
pH	6,85 ± 0,13 ^a	6,82 ± 0,10 ^a	6,80 ± 0,14 ^a
Acidez (°D)	13,67 ± 2,31 ^a	15,00 ± 1,00 ^a	15,00 ± 1,73 ^a
Células Somáticas (x1000 cel./ml)	90,81 ± 123 ^a	115 ± 98 ^a	150 ± 82 ^a
Bacterias Totales (Log ufc/ml)	4,80 ± 0,25 ^a	4,71 ± 0,27 ^a	4,62 ± 0,25 ^a

Referencias: ^{abc} Los valores con distintas letras en una misma columna difieren significativamente (P < 0,05).

¹Modelos Lineales Generalizados con gamma como función de enlace.

La leche utilizada para los ensayos de producción de queso tenía un valor promedio de concentración natural de AFM₁ de 0,005 µg/l. Se detectó AFM₁ en ocho (89%) de las 9 muestras de queso analizadas, aunque las mismas estuvieron dentro del nivel máximo aceptable establecido por los países de la Unión Europea que regulan la AFM₁ en los quesos (0,25 µg/kg). Del mismo modo, ninguna de las muestras de suero presentó valores de AFM₁ superiores a 0,05 µg/l.

La Tabla 20 muestra la distribución de AFM₁ en queso y suero durante la producción de quesos duros a partir de leche contaminada naturalmente. En las muestras de suero, los niveles de AFM₁ fueron entre 72% y 75% de la cantidad total de la toxina presente en la leche contaminada naturalmente, encontrándose el porcentaje restante en los quesos. La concentración de AFM₁ resultó ser más alta en queso en comparación con la leche original. El nivel de AFM₁ fue, en promedio, 11,8 veces mayor en quesos duros en comparación con la leche utilizada para su fabricación.

Tabla 20: Distribución de AFM₁ en leche, suero y queso, para el método de producción de Queso Reggiano Argentino.

Producción de leche	Muestras	Cantidad (l o kg)	AFM ₁		% de distribución de AFM ₁ ^a
			(µg/l, kg)	Total masa (µg)	
Elaboración 1 (n=3)	Leche	165	0,0053	0,8750	
	Suero	160	0,0049	0,7917	75,4
	Queso	3,67	0,0704	0,2583	24,6
^b Factor de concentración en queso = 13,3					
Elaboración 2 (n=3)	Leche	151	0,0054	0,8150	
	Suero	139	0,0052	0,7208	73,7
	Queso	3,85	0,0668	0,2572	26,3
Factor de concentración en queso = 12,4					
Elaboración 3 (n=3)	Leche	131	0,0039	0,5110	
	Suero	122	0,0036	0,4446	72,5
	Queso	4,31	0,0391	0,1686	27,5
Factor de concentración en queso = 10,0					
Promedio (n=9)	Leche	149	0,0049	0,7301	
	Suero	139	0,0047	0,6482	74
	Queso	3,94	0,0578	0,2278	26
Factor de concentración en queso = 11,8					

^a [(Total de masa de AFM₁(µg) en suero o queso) * 100 / (AFM₁ en queso + suero)]

^b Concentración de AFM₁ en queso sobre leche

Los resultados de numerosas investigaciones sobre la estabilidad de AFM₁ durante la elaboración y maduración del queso indican que el nivel de AFM₁ en el queso es función de diferentes factores, que incluyen: tipo de queso, estrategias tecnológicas adoptadas en el proceso de fabricación, cantidad de agua eliminada durante el procesamiento, pH de salmuera saturada, tamaño de corte, temperatura de cuajado, tiempo de prensado, grado de contaminación de la leche, diferencias en la calidad de la leche y también de los métodos analíticos empleados en la cuantificación (van Egmond *et al.*, 1989; Brackett y Marth, 1982a,b; Galvano *et al.*, 1996; Oruc *et al.*, 2006; Deveci, 2007; Kamkar *et al.*, 2008; Sengun *et al.*, 2008; Ardic *et al.*, 2009; Mohammadi *et al.*, 2009; Fernandes *et al.*, 2012; Motawee, 2013).

En el presente estudio, independientemente del tipo de queso, la concentración de AFM₁ resultó ser mayor en el queso en comparación con la leche original, en consecuencia, la concentración de AFM₁ en el suero fue proporcionalmente menor. Considerando el tipo de queso, los de tipo duro resultaron tener mayores concentraciones de AFM₁ que los quesos blandos respecto a la leche con la cual fueron elaborados. Esto sugiere que el factor responsable del nivel de concentración de AFM₁ de la leche al queso está más relacionado con la pérdida de humedad

durante el procesamiento que con la tecnología de fabricación del queso, coincidiendo con lo reportado por la bibliografía (Cavallarín *et al.*, 2014).

Algunos investigadores explican que las concentraciones de AFM₁ son 3-16 veces mayores en el queso que en la leche (Ardic *et al.*, 2009). Brackett y Marth (1982b) elaboraron quesos Parmesano y Mozzarella con leche naturalmente contaminada con AFM₁. El parmesano presentó un nivel de AFM₁ de 5,8 veces superior en comparación con la leche inicial naturalmente contaminada, mientras que en el queso mozzarella se observó un aumento en la concentración de la micotoxina de 8,1 veces. En otros estudios también se ha informado que la concentración de AFM₁ es aproximadamente tres veces mayor en quesos blandos y cinco veces mayor en quesos duros en comparación con la leche utilizada en la fabricación (Bakirci, 2001; Deveci, 2007; Kamkar *et al.*, 2008; Prandini *et al.*, 2009).

La afinidad de AFM₁ por la caseína podría mencionarse como una de las razones para explicar el aumento de la concentración AFM₁ en el queso. Brackett y Marth (1982a) estudiaron el proceso de unión de AFM₁ a la caseína utilizando diálisis de equilibrio y observaron que las suspensiones de caseína tenían 2,5 y 2,9 veces más toxina cuando se dializaban con 10 o 20 ng/ml de AFM₁, respectivamente. Ardic *et al.* (2009) concluyeron que el queso es una fuente potencial de AFM₁ en comparación con otros productos lácteos porque esta toxina está asociada a la fracción de caseína (que se concentra en el queso). Además, esta toxina es químicamente un componente soluble en agua y, por lo tanto, su alta concentración en los quesos puede deberse a la afinidad con la parte hidrófila de la molécula de caseína (Dosako *et al.*, 1980).

Por otro lado, las proteínas del suero son altamente susceptibles a la desnaturalización inducida por el calor, lo que significa que los tratamientos térmicos provocan una alteración significativa de las estructuras secundarias y las interacciones entre proteínas lácteas. Consecuentemente, cuando se exponen a altas temperaturas, las proteínas del suero pueden mostrar grupos reactivos capaces de interactuar con

otros componentes, como puede ser con la AFM₁. Esto también podría explicar por qué durante la fabricación de queso, cuando las proteínas de suero están en un estado nativo, AFM₁ no parece reaccionar con ellas y prefiere hacerlo con la caseína, para la cual la afinidad es probablemente mayor en esas condiciones (Cattaneo *et al.*, 2013).

Cuando la leche utilizada para la fabricación de queso está contaminada con AFM₁, esta toxina se transfiere al queso y al suero (Kiermier y Buchner, 1977; Van Egmond *et al.*, 1989). Se han realizado numerosos estudios sobre el destino de AFM₁ en diferentes tipos de quesos, los cuales reportan una amplia gama de distribución de AFM₁ entre el queso y el suero (Galvano *et al.*, 1996). En nuestro estudio, la distribución de AFM₁ fue de 43% y 57% para quesos blandos y, 26% y 74% para quesos duros en el queso y suero, respectivamente. En ambos casos fue evidente que la parte principal de AFM₁ (en promedio el 65%) se perdió en la porción líquida (suero) mientras que solo el 35% permaneció en los quesos. Esto coincide con los hallazgos de Fernandes *et al.* (2012), donde evaluaron la transferencia de AFM₁ de la leche al queso Minas Frescal, el queso más popular que se consume en Brasil, encontrando variaciones del 30,6% al 42,3%. López *et al.* (2001) estudiaron la distribución de AFM₁ en queso fresco producido en Argentina utilizando leche artificialmente contaminada con AFM₁ (a niveles de 1,7-2,0 ng/ml), encontrando valores del 40% y 60% en el queso y suero, respectivamente, en comparación con la leche original.

Brackett y Marth (1982b) produjeron queso Cheddar con leche naturalmente contaminada con AFM₁ y observaron un aumento de 4,3 veces en la concentración de AFM₁ en la cuajada, lo que demuestra que aproximadamente el 45% de la toxina total permaneció en el producto final. Oruc *et al.* (2006) demostraron que las concentraciones de AFM₁ en la cuajada eran 2,9, 3,2 y 3,4 veces mayores en comparación con las de la leche (50, 250 y 750 ng/l AFM₁, respectivamente). La distribución de AFM₁ fue 40-46% en la cuajada y 53-58% en suero.

Una investigación llevada a cabo por Cavallarin *et al.* (2014) siguiendo tres métodos tradicionales de producción de queso italiano, encontró que en el método de producción Robiola, los niveles de AFM₁ en suero variaron entre 30% y 65% de la cantidad total de la toxina presente en la leche, mientras que Primosale y Maccagno, que comparten el mismo procedimiento de fabricación de queso basado en cuajo, mostró un mayor porcentaje de partición de AFM₁ al suero (60-82,7%). Los quesos frescos mostraron un factor de concentración de 1,43 y 2,20 para Primosale y Robiola, respectivamente, mientras que el queso duro Maccagno mostró un valor de 6,71. Este estudio además demostró que aquellos quesos en los que el pH después de la sinéresis era de alrededor de 4,50, poseían un porcentaje de partición de AFM₁ menor al suero que aquellos que tenían un pH de 6 (Cavallarin *et al.*, 2014). En estudios previos (Barbiroli *et al.*, 2007) observaron que la acción combinada de calor y pH bajo utilizado para la producción de queso Ricotta alteraron la estructura de las proteínas de suero hasta un punto en el que pierden la capacidad de unión con la AFM₁, mostrando una menor concentración de la micotoxina en el suero. Tanto en la elaboración de los quesos *Cremano Argentino* y *Reggianito Argentino*, el pH del suero después de la sinéresis, fue en promedio de 6,6 y 6,3, respectivamente. Por lo tanto, las proteínas solubles (punto isoeléctrico: 4,8) no perdieron su afinidad por AFM₁, lo que podría explicar el mayor porcentaje de partición de AFM₁ en suero encontrado en el presente estudio.

3.2. Cuantificación de la tasa de transferencia de aflatoxina M₁ durante la elaboración de leche en polvo a partir de leche cruda contaminada naturalmente

3.2.1. Alimentos

Durante el año 2017, se analizaron 34 muestras de alimento y la prevalencia de AFB₁ fue del 76%, con una media diaria de AFB₁ en la dieta de $2,8 \pm 1,7$ µg/kg de

materia seca (Tabla 21). El 15% de los alimentos ofrecidos al ganado lechero excedió el valor establecido por la UE (5 µg/kg) y ninguno excedió el valor establecido por el MERCOSUR (20 µg/kg) para AFB₁ en la alimentación del ganado lechero.

Tabla 21: Media (M) ± desvío estándar (DE), mínimo (Min.) y máximo (Max.) niveles de aflatoxina B₁ (µg/kg) en diferentes estaciones y alimentos evaluados durante el año 2017.

Estación	Nº de muestras	M ± DE	Min	Max	Nº de muestras positivas, n (%)	Exceden el límite, n (%)	
						20 ug/kg ^a	5 ug/kg ^b
Verano	8	2,7 ± 1,8	nd	6	6 (67)	0 (0)	1 (12)
Otoño	9	1,9 ± 1,9	nd	6,2	6 (67)	0 (0)	1 (12)
Invierno	8	4,1 ± 1,8	1,9	7,6	8 (100)	0 (0)	2 (25)
Primavera	9	2,3 ± 2,4	nd	8,1	4 (44)	0 (0)	1 (12)
Alimentos							
Pasturas	10	4,3 ± 2,7	0,5	8,1	7 (87)	0 (0)	5 (50)
Balanceado	12	1,4 ± 1,3	nd	4	8 (67)	0 (0)	0 (0)
PMR ^c	12	2,7 ± 1,1	0,4	4,1	11 (92)	0 (0)	0 (0)
Promedio	34	2,8 ± 1,7	nd	8,1	26 (76)	0 (0)	5 (15)

nd: < al límite de detección

^a Límite del MERCOSUR (20 µg/kg); ^b Límite Unión Europea (5 µg/kg)

^c PMR= Ración Parcialmente Mezclada

La concentración de AFB₁ en los alimentos no estuvo influenciada por las estaciones del año ($P=0,883$), aunque las mayores concentraciones se observaron, por un lado, en el invierno probablemente debido al mayor consumo de PMR y por el otro, en verano debido a que el porcentaje de pasturas se incrementa en la dieta y éstas presentaron altas concentraciones de AFB₁. Por otro lado, la prevalencia fue particularmente alta en la PMR.

3.2.2. Leche

La prevalencia de AFM₁ en la leche cruda fue del 81%. Los niveles de AFM₁ en las 36 muestras de leche variaron de 0,003 µg/l a 0,064 µg/l con una media de 0,014 µg/l (Tabla 22). Ninguna de las muestras mostró niveles de AFM₁ superiores al límite de seguridad establecido por el MERCOSUR (0,5 µg/l). Sin embargo, si se consideran los requisitos de la Unión Europea, un bajo porcentaje de muestras (3%) excedió el límite para leche fluida (0,05 µg/l), mientras que el 14% de las muestras excedió el límite para leche infantil (0,025 µg/l).

Tabla 22: Media (M) \pm desvío estándar (DE), niveles mínimos (Min.) y máximos (Max.) de aflatoxina M₁ ($\mu\text{g/l}$) en leche cruda por estación climática, durante el 2017.

Estación	Nº de muestras	M \pm DE	Min	Max	Muestras positivas, n (%)	Exceden los límites n, (%)		
						0,5 ^a	0,05 ^b	0,025 ^c
Verano	9	0,011 \pm 0,008	0,003	0,025	6 (67)	0(0)	0(0)	1(11)
Otoño	9	0,012 \pm 0,010	0,004	0,036	8 (89)	0(0)	0(0)	1(11)
Invierno	9	0,021 \pm 0,020	0,003	0,064	8 (89)	0(0)	1(11)	1(11)
Primavera	9	0,011 \pm 0,005	0,004	0,017	7 (78)	0(0)	0(0)	2(22)
Media	36	0,014 \pm 0,011	0,003	0,064	29 (81)	0(0)	1(3)	5(14)

^aLímite MERCOSUR (0,5 $\mu\text{g/l}$); Límite Unión Europea para ^bleche fluida (0,05 $\mu\text{g/l}$) y ^cleche destinada a fórmula infantil (0,025 $\mu\text{g/l}$).

Al igual que en el ensayo de quesos, las estaciones del año ($P=0,476$) no se asociaron con concentración de AFM₁ en la leche, aunque los mayores valores se detectaron en los meses de otoño-invierno.

3.2.3. Tasa de transferencia de AFB₁ de los alimentos a la leche

La tasa de transferencia promedio de AFB₁ fue de 0, 90% con una variación de 0,05% a 3,22% (Tabla 23). La producción de leche de cada vaca se registró diariamente, con una media de 30,92 \pm 9,7 l/día. Aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas, las vacas de lactancia temprana (<90 días) y lactancia media (entre 90 y 150 días), mostraron las mayores producciones de leche (>30 l/día) y una mayor tasa de transferencia que las vacas de lactancia tardía (>150 días), cuando la producción de leche decae de forma natural (<30 l/día).

La ingesta de AFB₁ y la excreción de AFM₁ para cada estado de lactancia se resumen en la Tabla 23. Las concentraciones de AFM₁ variaron entre 0,004-0,064 $\mu\text{g/l}$, 0,004-0,036 $\mu\text{g/l}$ y 0,003-0,022 $\mu\text{g/l}$ para las vacas de alta, media y baja producción, respectivamente. Teniendo en cuenta la cantidad de leche diaria producida, el nivel promedio de AFM₁ en la leche de vaca individual fue de 0,406 μg (mínimo=0,039 μg - máximo=1,275 μg).

Tabla 23: Valores medios \pm desvío estándar de la ingesta de aflatoxinas, producción de leche y tasa de transferencia por periodo de lactancia

Producción de leche	Ingesta AFB ₁ (μ g/día)	Producción diaria (l/día)	Concentración AFM ₁ en leche (μ g/l)	Excreción AFM ₁ en leche (μ g/día)	Tasa de transferencia % \pm DE
Alta (n=12)	59,83 \pm 25	39,01 \pm 8	0,017 \pm 0,02	0,66 \pm 0,40	1,11 \pm 0,69 ^a
Media (n=12)	57,92 \pm 29	30,62 \pm 8	0,015 \pm 0,01	0,46 \pm 0,21	0,79 \pm 0,66 ^a
Baja (n=12)	56,83 \pm 22	23,13 \pm 6	0,010 \pm 0,01	0,23 \pm 0,18	0,41 \pm 0,67 ^a
Media	58,19	30,92	0,014	0,406	0,90
(rango)	(20 – 117)	(13 – 49)	(0,003 - 0,064)	(0,039 – 1,275)	(0,05 – 3,22)

Referencias: ^{abc} Los valores con distintas letras en una misma columna difieren significativamente (P < 0,05) por el modelo lineal generalizado con gamma como función de enlace.

3.2.4. Leche concentrada y en polvo

La leche desnatada en polvo producida a partir de leche de vaca en diferentes etapas de la lactancia, contaminada naturalmente con AFM₁, y los efectos de las etapas del proceso (concentración y secado *spray*) sobre los contenidos de AFM₁ se presentan en la Tabla 24.

Tabla 24: Contenido total de Aflatoxina M₁ (AFM₁) en muestras de leche cruda, leche concentrada y en polvo naturalmente contaminadas.

Producción de leche	Muestras	Cantidad (l o Kg)	AFM ₁ ^a		% retenido AFM ₁
			(μ g/l,kg)	Total de masa (μ g)	
Alta (n=12)	Leche	0,529	0,017	0,0089	100
	Leche concentrada	0,195	0,021	0,0041	46
	Leche en polvo	0,021	0,015	0,0003 ^a	3,5
Media (n=12)	Leche	0,547	0,015	0,0077	100
	Leche concentrada	0,204	0,022	0,0045	58,4
	Leche en polvo	0,026	0,012	0,0003 ^a	4,0
Baja (n=12)	Leche	0,524	0,010	0,0052	100
	Leche concentrada	0,208	0,014	0,0029	55,8
	Leche en polvo	0,025	0,011	0,0003 ^a	5,8
Promedio (n=36)	Leche	0,533	0,014	0,0073	100
	Leche concentrada	0,202	0,019	0,0038	52
	Leche en polvo	0,024	0,012	0,0003	4,1

^a Valores medios

^{abc} Los valores con distintas letras en una misma columna difieren significativamente (P < 0,05) por Modelos Lineales Generalizados con gamma como función de enlace.

Las leches desnatadas tenían un contenido total de AFM₁ de 0,0089, 0,0077 y 0,0052 μ g para alta, media y baja producción, respectivamente. El proceso de concentración disminuyó el contenido de AFM₁ a una tasa de 54%, 41,6% y 44,2% para las vacas de alta, media y baja producción de leche, respectivamente. Los niveles

de AFM₁ en leche concentrada disminuyeron a 0,0041, 0,0045 y 0,0029 µg, respectivamente, de aquellos inicialmente presentes en la leche (Tabla 24).

Se han informado datos contrastantes sobre la influencia del proceso de concentración de la leche sobre el contenido de AFM₁. Algunos autores informan que no hay variaciones en el contenido de AFM₁ (Van Egmond *et al.*, 1989), mientras que otros autores observaron reducciones del 64% (Purchase *et al.*, 1972) y del 60% al 75% después del proceso de concentración de la leche (Applebaum y Marth, 1982). Estudios más recientes observaron una reducción del 35%-40% en el nivel de AFM₁ en muestras de leche desnatada pasteurizadas como resultado del proceso de concentración (Deveci y Sezgin, 2006). Estos resultados podrían deberse a la eliminación de agua que se realiza mediante este proceso donde la aflatoxina podría perderse con la misma, al ser un compuesto hidrosoluble.

Durante el presente estudio, cuando se secó la leche concentrada el contenido total de AFM₁ se redujo a 0,0003 µg en leche de vacas tanto de lactancia temprana como en lactancia tardía. Esto indicó una pérdida de AFM₁ del 92,7%, 93,3% y 89,6%, respectivamente, aunque estas pérdidas no fueron estadísticamente significativas (P <0,05) entre los períodos de lactancia.

El tratamiento térmico es posiblemente la principal causa de la reducción de AFM₁ durante el proceso de secado, no debido al tratamiento térmico en sí ya que AFM₁ es termoestable, sino porque puede generar la descomposición de las proteínas de la leche y, consecuentemente, las interacciones hidrofílicas entre AFM₁ y caseína cambian (Deveci y Sezgin, 2006).

Nuestros resultados mostraron que en promedio, el secado *spray* redujo en aproximadamente el 96% del contenido de AFM₁ de la leche naturalmente contaminada. En Argentina no hay estudios sobre cómo el secado de la leche afecta la estabilidad de la AFM₁ y en el mundo este tipo de estudios son limitados. Compra *et al.* (1997) observaron una reducción del 86,5% en la leche secada mediante secado *spray*. A pesar de esto, una revisión de Galvano *et al.* (1996) informaron que algunos

autores no encontraron una reducción en la concentración de AFM₁ en respuesta al proceso de secado, mientras que otros investigadores observaron reducciones en el rango del 60% al 75% según la concentración inicial de AFM₁ en la leche. Estudios más recientes en leche desnatada en polvo producida a partir de leche de vaca contaminada artificialmente con AFM₁ a dos niveles diferentes, 1,5 y 3,5 µg/l, reportaron pérdidas en el contenido de la toxina de 40% y 35% en leche concentrada y 68% y 59% en leche en polvo, respectivamente (Deveci y Sezgin, 2006).

La regulación de EE.UU. ha establecido un límite de 0,5 µg/kg para AFM₁ en leche y productos lácteos, incluida la leche en polvo (Stoloff *et al.*, 1991). Sin embargo, la Unión Europea y el Codex Alimentarius han fijado el límite en un máximo de 0,05 µg/kg de AFM₁ en leche líquida y productos lácteos secos o procesados (Comisión del Codex Alimentarius, 2001; European Community, 2001). Por su parte, el MERCOSUR estableció un límite de 5 µg/kg para la leche en polvo (MERCOSUR, 2002). Según los resultados obtenidos en este estudio (Tabla 24), ninguna muestra de leche en polvo excedió los límites establecidos en las regulaciones mencionadas.

Para concluir, podemos mencionar que la prevalencia total de AFB₁ en los alimentos analizados durante ambos estudios (período 2016-2017) fue similar a la informada por Signorini *et al.* (2012) en las dietas de ganado lechero en establecimientos ubicados en la misma región de producción lechera de Argentina, con una prevalencia general de AFB₁ de 78,9%. No obstante, el nivel promedio de AFB₁ en las dietas de ganado lechero fue mayor que el encontrado en este estudio (4,7 µg/kg), así como también el porcentaje de muestras que excedieron los límites establecidos por las regulaciones internacionales. Las diferentes condiciones climáticas de los años de estudio podrían ser la causa que explica estas diferencias.

La prevalencia promedio de AFM₁ en leche de ambos estudios, fue del 79,4%. Estudios previos realizados en la región lechera central de Argentina (Costamagna *et al.*, 2013; Michlig *et al.*, 2016) reportaron prevalencias de 4 y 38,8% en muestras de leche de tanque. Los mayores valores encontrados en este trabajo pueden deberse a

las diferentes fuentes de muestreo (leche de vaca individual vs. leche de tanque). En estos estudios, las muestras fueron tomadas desde el tanque de frío de cada tambo (almacenamiento de leche de dos ordeños diarios de todas las vacas en lactancia), situación que podría generar un efecto de dilución de micotoxinas en la leche y, como consecuencia, presentar concentraciones más bajas. Sin embargo, en todos los estudios, las concentraciones de AFM₁ estaban por debajo de los niveles máximos tolerables establecidos por la legislación del MERCOSUR.

3.3. Factores de riesgo que impactan sobre las concentraciones de AFM₁ en leche y en la tasa de transferencia

La concentración de AFM₁ en la leche durante los dos años de muestreo, no estuvo influenciada por las estaciones del año ($P=0,325$) ni por los días en la lactancia de las vacas ($P=0,130$). De manera similar, tanto el nivel de producción de leche individual ($P=0,514$) como el estado de salud de la glándula mamaria (medido como recuento de células somáticas) ($P=0,896$) no se asociaron con la concentración de esta micotoxina. Por otro lado, la cantidad consumida de PMR ($P=0,285$), pasturas ($P=0,118$) y concentrado ($P=0,758$) no se asoció con los niveles de AFM₁ en la leche.

Estos resultados son opuestos a los reportados por Signorini *et al.* (2012) y pueden deberse al sistema evaluado en este estudio, donde la composición de la dieta es estable a lo largo del año, especialmente en alimentos como silajes, productos y subproductos de la agroindustria (ingredientes muy susceptibles a hongos micotoxigénicos), contrariamente a lo informado por Signorini *et al.* (2012) donde los establecimientos evaluados tenían una composición de la dieta más diferenciada entre estaciones climáticas, con una mayor proporción de forrajes conservados y subproductos en otoño-invierno debido al déficit de pasturas en esa temporada.

En ambos años, la tasa de transferencia de AFB₁ a AFM₁ en la leche no se vio afectada por la producción individual de leche ($P=0,237$), la etapa de lactancia de las vacas ($P=0,298$), ni por el recuento de células somáticas en la leche ($P=0,864$). Sin

embargo, cuando se consideró la producción de leche individual, independientemente de los días de lactancia, la tasa de transferencia se vio afectada ($P=0,001$).

Durante el año 2016, la tasa de transferencia fue en promedio de 1,21% (rango 0,23% - 5,93%) en vacas de alta producción (>28,5 l/día) mientras que vacas de baja producción (<28,5 l/día) presentaron una tasa de transferencia promedio de 0,48% (rango 0,05% - 2,12%). De manera similar en 2017, las vacas de alta producción de leche (>30 l/día) presentaron una mayor tasa de transferencia (1,8%) que las vacas de menor producción de leche (<30 l/día), con tasas de transferencia promedio de 0,90%.

Por otro lado, la variabilidad observada en la transferencia de AFM₁ entre animales se ha relacionado con varios factores, entre ellos la salud de la ubre, expresada como un alto recuento de células somáticas, las diferencias en la actividad de degradación del rumen y en el sistema enzimático de oxidación de AFB₁ (Price *et al.*, 1985; Munksgaard *et al.*, 1987; Veldman *et al.*, 1992; Masoero *et al.*, 2007; Fink-Gremmels, 2008).

En este estudio, el recuento de células somáticas de la leche no estuvo asociado a la tasa de transferencia. Esto puede deberse al bajo recuento de células somáticas observado en la leche muestreada para realizar las elaboraciones de quesos durante el año 2016 (promedio de 96.000 cel./ml de leche para queso blando y 119.000 cel./ml en leche para queso duro) y de leche en polvo durante el 2017 (promedio de 111.600 cel./ml). La falta de variabilidad en los datos obtenidos de células somáticas en este estudio, imposibilitaron corroborar dichas afirmaciones.

El tamaño de partícula de la PMR retenido en la bandeja superior del separador (partículas mayores de 1,9 cm que proporcionan la fibra efectiva), fue otra variable que se relacionó con la concentración de AFM₁ en la leche y la tasa de transferencia. Se recomienda que el 5 al 8% del material permanezca retenido en la bandeja superior, dado que este rango de valores indicaría que el animal tiene suficiente fibra efectiva en la dieta y de un tamaño adecuado para el correcto funcionamiento del rumen (Giordano *et al.*, 2010).

Durante el año 2016 se observó que el tamaño de partícula de la PMR retenido en la bandeja superior del separador se asoció con la concentración de AFM₁ en la leche ($P=0,010$) y la tasa de transferencia ($P=0,030$). En dietas en las que el tamaño de partícula en la bandeja superior del separador excedió el 8% del material que debía retenerse presentó una mayor concentración de AFM₁ (0,0164 µg/l) y tasa de transferencia (0,61%) que en la PMR en la que el tamaño de muestra fue ideal, dentro del rango del 5 al 8% (0,0075 µg/l y 0,34%, respectivamente). Por el contrario, durante el 2017, esta variable no se asoció con la concentración de AFM₁ en la leche ($P=0,657$) y la tasa de transferencia ($P=0,141$).

La diferencia mencionada, puede explicarse debido a la implementación de prácticas de manejo tendientes a mejorar la calidad de la fibra ofrecida a las vacas en lactancia. Esta medida incorporada tuvo un gran impacto en las tasas de transferencia obtenidas en los distintos años de estudio. Durante el primer año, 9 de las 12 (75%) PMR ofrecidas a las vacas lecheras, no cumplieron con el tamaño de partícula ideal obteniéndose tasas de transferencias altas (rango: 0,05% a 5,93%), mientras que durante el segundo año de evaluación, sólo el 16% de las PMR ofrecidas tenían un tamaño de partícula fuera del ideal. Esto se vio reflejado en una reducción a casi la mitad de la tasa de transferencia (rango: 0,05% a 3,22%).

El rumen tiene cierta capacidad natural para degradar parcialmente las aflatoxinas, pero esta capacidad depende de las características del rumen (pH y permanencia del alimento en el rumen) (Díaz *et al.*, 2004). Un tamaño de partícula adecuada en la ración (8% del material retenido en la bandeja superior del separador) permite una función del rumen adecuada (Heinrichs y Kononoff, 2002). Cuando este porcentaje es mayor, hay un exceso de fibra efectiva en la dieta por falta de homogeneidad en el alimento, lo que lleva a las vacas a seleccionar partículas de menor tamaño que pasan rápidamente por el rumen acortando el tiempo de permanencia del alimento, lo que evita que las bacterias degraden las micotoxinas (Moschini *et al.*, 2006).

La incorporación de menor cantidad de fibra efectiva afecta el equilibrio ruminal por fluctuaciones del pH, lo que resulta en tasas de crecimiento más bajas de algunos grupos bacterianos identificados en el procesamiento y desintoxicación de micotoxinas (Jouany y Díaz, 2005). Estas situaciones podrían aumentar la tasa de transferencia de aflatoxinas a la leche y por consiguiente su concentración.

Durante el presente estudio la ingesta diaria media total de AFB₁ fue de 66,8 µg/día durante el 2016 y 58,2 µg/día durante el 2017 y afectó la tasa de transferencia en ambos casos ($P=0,001$). Aquellas vacas que tenían un consumo menor a la media, presentaron menores tasas de transferencias (1,99 y 0,92% durante el 2016 y 2017, respectivamente) respecto a aquellas vacas en las que el consumo fue superior a la media (3,22% y 1,6% durante el 2016 y 2017, respectivamente).

La tasa de transferencia hallada en este estudio durante el período 2016-2017, al igual que los factores asociados a la misma, coincidieron con lo reportado en la bibliografía. Creppy (2002) informó que aproximadamente 0,3% a 6,2% de la AFB₁ total ingerida por los animales se transforman generalmente en AFM₁ en la leche. Bakirci (2001) afirmó que existe una relación lineal entre la cantidad de AFM₁ en la leche y los alimentos contaminados con AFB₁ que consumen las vacas. De acuerdo con Battacone *et al.*, (2005), la tasa de transferencia en las vacas varía de 0,35% a 3%. Además, Masoero *et al.*, (2007) observaron que la excreción total de AFM₁ y su transferencia en la leche se vieron afectados por la producción de leche, en la cual las vacas con alta producción presentaban una mayor excreción de AFM₁ en comparación con las vacas de baja producción.

Los estudios enunciados anteriormente coinciden con lo informado por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2004), donde declara que la tasa de transferencia en rumiantes, está entre 1 y 3%. Sin embargo, para las vacas lecheras de alta producción con hasta 40 l/día de leche, esta tasa puede alcanzar el 6%. Britzi *et al.* (2013) sugirieron que la producción de leche es el factor principal que

afecta la tasa de transferencia, con tasas promedio de 2,5% para vacas de baja producción (<35 l/día) y 5,4% para vacas de alta producción (>35 l/día).

En este estudio, se observó un comportamiento similar a lo reportado por la bibliografía recientemente mencionada. La mayor tasa de transferencia en vacas de alta producción puede estar asociada a una mayor ingesta de alimentos como así también al tipo de alimentos consumidos, generalmente concentrados y subproductos identificados como potenciales factores asociados a la presencia de AFM₁ en la leche. Sin embargo, se observó que existen factores de manejo que impactan en la tasa de transferencia, que mediante la aplicación de buenas prácticas en los establecimientos lecheros se podría prevenir la aparición de niveles indeseables de AFM₁ en leche.

3.4. Análisis de aflatoxina M₁ en sueros procesado por tecnología de membranas, obtenido de Pymes Lácteas de la Cuenca Lechera Central. Destino de AFM₁ en permeado y concentrado de proteínas de suero

En la producción de queso, AFM₁ se distribuye entre cuajada y suero, estando presente en productos derivados del procesamiento de suero de queso. La afinidad de AFM₁ por las caseínas de la leche ha sido estudiada, pero existe muy poca información disponible sobre la interacción AFM₁-proteínas del suero.

En los ensayos de quesos blandos y duros descriptos anteriormente, más del 50% de la AFM₁ contenida en la leche para elaborar quesos, migró al suero, aunque en bajas concentraciones. En consecuencia, debido al amplio uso de suero en productos para consumo humano, se investigó el destino de AFM₁ en sueros procesados provenientes de dos empresas, sometidos a diferentes tratamientos tecnológicos.

La empresa I utilizaba la tecnología de ultrafiltración, donde se recuperan en el retenido las proteínas del suero y sales coloidales en mayor proporción. Por su parte, el permeado se encuentra compuesto por agua y lactosa en mayor proporción y

minerales solubles, nitrógeno no proteico y vitaminas hidrosolubles (Vikram y Maubois, 2017).

Con respecto a la tecnología aplicada por la empresa II, realizaba un proceso de nanofiltración para eliminar agua y concentrar sólidos. La NF se utiliza para la separación de componentes de bajo peso molecular (agua y sales minerales disueltas) que se encuentran en el permeado y componentes de elevado peso molecular (proteínas y lactosa principalmente) que se encuentran en el concentrado (Vikram y Maubois, 2017).

Se determinaron las concentraciones de AFM₁ en el suero de queso proveniente de la Empresa I procesado mediante tecnología de ultrafiltración (UF) y de la Empresa II procesado mediante tecnología de nanofiltración (NF) y en ambas soluciones obtenidas luego del procesamiento (retenido y permeado) (Tabla 25).

Tabla 25: Distribución de Aflatoxina M₁ entre retenido y permeado sometidos a diferentes procesos tecnológicos

Proceso Tecnológico	Muestras	Cantidad (l)	Concentración de AFM ₁		% distribución AFM ₁
			(µg/l)	Total de masa (µg)	
Empresa I	UF	Suero	3500	0,0067	23,45
		Permeado	720	0,0063	4,53
		Retenido	2780	0,0062	17,24
Empresa II	NF	Suero	12500	0,0084	105
		Permeado	4000	0,0080	32
		Retenido	8500	0,0058	49,3

Los datos en la Tabla 25 muestran una mayor concentración de AFM₁ en retenido que en permeado para ambos procesos de filtración. El porcentaje de distribución en el retenido estuvo en el rango del 60,6-79,2%, mientras que en el permeado el rango varió entre 20,8 y 39,4%. Estos resultados sugieren que AFM₁ es transferida preferencialmente a la fracción rica en proteínas, a pesar de ser un compuesto de bajo peso molecular (328 g/mol) el cual se esperaría que pase la membrana.

La composición físico-química, perfil proteico y perfil mineral de los sueros, permeados y retenidos (WPC o concentrado de proteínas de suero al 35%) fue

realizado con el fin de analizar su posible interacción con la AFM₁. En la Tabla 26 se presentan los resultados obtenidos de la composición analítica de los sueros utilizados para realizar los procesos de UF y NF, en la empresa I y II, respectivamente.

Tabla 26: Resultados promedios y desviación estándar (DE) de la caracterización analítica de los sueros utilizados para los procesos de filtración de las empresas I y II.

Sueros	Empresa I	Empresa II
Variable	Medias ± DE	
Materia Grasa % (gr/100ml)	0,15 ± 0,08 ^a	0,29 ± 0,10 ^a
Sólidos Totales % (gr/100ml)	6,47 ± 0,31 ^a	6,40 ± 0,08 ^a
Lactosa % (gr/100ml)	4,97 ± 0,14 ^a	4,84 ± 0,04 ^a
pH	6,28 ± 0,09 ^a	4,54 ± 0,15 ^b
Acidez (°D)	14,33 ± 1,53 ^a	33,00 ± 3,69 ^b
Nitrógeno total (gr N / 100ml)	0,16 ± 0,02 ^a	0,19 ± 0,01 ^a
Proteína Total (gr/100ml)	1,04 ± 0,15 ^a	1,20 ± 0,11 ^a
Nitrógeno No Caseínico (gr/100ml)	0,16 ± 0,03 ^a	0,18 ± 0,02 ^a
Calcio (mg/100ml)	57,45 ± 3,61 ^a	48,78 ± 10,08 ^a
Magnesio (mg/100ml)	10,10 ± 0,14 ^a	9,45 ± 1,07 ^a
Sodio (mg/100ml)	99,20 ± 13,01 ^a	111,72 ± 11,67 ^a
Fósforo (gr/100ml)	0,09 ± 0,02 ^a	0,10 ± 0,01 ^a

Referencias: ^{ab} Los grupos con letras distintas difieren significativamente (P <0,05) por el test de Mann-Whitney.

Se encontraron diferencias significativas entre ambos sueros respecto al pH, acidez (P<0,05). Considerando estos parámetros es posible identificar dos tipos de suero. El suero utilizado en la empresa I se clasifica como un *suero dulce* (Gösta Bylund, 2002). Este *pool* de suero corresponde a una mezcla de sueros provenientes de elaboraciones de quesos azules, semiduros y duros. La empresa II solo procesaba suero proveniente de la elaboración de queso mozzarella, el cual se clasifica como un *suero ácido* (Gösta Bylund, 2002). Por ende, la diferencia observada en el pH, puede deberse a los distintos orígenes del suero.

En la Tabla 27 se presentan los resultados obtenidos de la composición analítica de los permeados obtenidos luego de realizar los procesos de UF y NF, en la empresa I y II, respectivamente.

Tabla 27: Resultados promedios y desviación estándar (DE) de la caracterización analítica de los permeados obtenidos para los procesos de filtración de la empresa I y II.

Variables	Permeado UF	Permeado NF
	Empresa I	Empresa II
	Media ± DE	
Materia Grasa % (gr/100ml)	0,02 ± 0,03 ^a	0,02 ± 0,01 ^a
Sólidos Totales % (gr/100ml)	15,34 ± 0,80 ^a	2,53 ± 5,23 ^b
Lactosa % (gr/100ml)	14,59 ± 0,55 ^a	0,15 ± 0,04 ^b
pH	6,26 ± 0,12 ^a	6,31 ± 0,15 ^a
Acidez (°D)	36,67 ± 1,15 ^a	5,33 ± 5,28 ^b
Nitrógeno total (gr N / 100ml)	0,09 ± 0,02 ^a	0,05 ± 0,01 ^b
Proteína Total (gr/100ml)	0,53 ± 0,13 ^a	0,30 ± 0,09 ^b
Nitrógeno No Caseínico (gr/100ml)	0,09 ± 0,02 ^a	0,05 ± 0,01 ^b
Calcio (mg/100ml)	148,57 ± 16,22 ^a	7,38 ± 1,36 ^b
Magnesio (mg/100ml)	25,57 ± 5,10 ^a	1,30 ± 0,47 ^b
Sodio (mg/100ml)	135,37 ± 18,64 ^a	99,78 ± 20,50 ^a
Fósforo (gr/100ml)	0,16 ± 0,05 ^a	0,08 ± 0,03 ^b

Referencias: ^{ab} Los grupos con letras distintas difieren significativamente (P <0,05) por el test de Mann-Whitney.

El pH del permeado UF no se alteró con el proceso de filtración, por el contrario, el porcentaje de acidez aumentó a 36,67 ± 1,15°D. Esto puede relacionarse al incremento en los sólidos totales del permeado, el cual está compuesto principalmente por lactosa. Esta característica es la principal responsable de su elevada carga orgánica contaminante (Berruga Fernández, 1999). El tamaño de poro de la membrana de UF permite el paso de la lactosa al permeado, observándose una concentración de lactosa superior a diferencia de la membrana usada para NF que posee un tamaño de poro menor y, por lo tanto, no permite el paso de la lactosa al permeado. Se observó el efecto contrario en el permeado de NF con respecto al pH que aumenta y la acidez disminuye marcadamente. Esto puede relacionarse directamente con el tipo de filtración utilizada, lo que genera un permeado donde solo se halla agua y sales minerales. El permeado de un proceso de UF está compuesto principalmente de agua, lactosa y sales minerales (solutos orgánicos de bajo peso molecular) a diferencia del permeado obtenido a través de un proceso de NF. En este

tipo de proceso el objetivo es la desalinización parcial del lactosuero, esta diferencia se observa en los valores obtenidos de minerales en la Tabla 27 para ambos tipos de permeados.

En la Tabla 28 se presentan los resultados obtenidos de la composición analítica de los concentrados de proteína obtenidos luego de realizar los procesos de UF y NF, en la empresa I y II, respectivamente.

Tabla 28: Resultados promedios y desviación estándar (DE) de la caracterización analítica de los concentrados obtenidos para los procesos de filtración de la empresa I y II.

Variables	Concentrado UF	Concentrado NF
	Empresa I	Empresa II
	Media ± DE	
Materia Grasa % (gr/100ml)	0,89 ± 0,34 ^a	0,13 ± 0,02 ^b
Sólidos Totales % (gr/100ml)	25,02 ± 1,12 ^a	18,45 ± 1,02 ^b
Lactosa % (gr/100ml)	15,02 ± 0,39 ^a	15,80 ± 0,58 ^a
pH	6,25 ± 0,08 ^a	6,31 ± 0,08 ^a
Acidez (°D)	60,67 ± 0,58 ^a	34,83 ± 4,26 ^b
Nitrógeno total (gr N / 100ml)	1,46 ± 0,24 ^a	0,38 ± 0,03 ^b
Proteína Total (gr/100ml)	9,36 ± 1,51 ^a	2,36 ± 0,20 ^b
Nitrógeno No Caseínico (gr/100ml)	1,39 ± 0,15 ^a	0,35 ± 0,02 ^b
Calcio (mg/100ml)	255,90 ± 36,32 ^a	123,80 ± 9,03 ^b
Magnesio (mg/100ml)	41,47 ± 7,90 ^a	25,88 ± 0,53 ^b
Sodio mg/100ml)	171,20 ± 25,85 ^a	151,02 ± 9,45 ^a
Fósforo (gr/100ml)	0,20 ± 0,06 ^a	0,16 ± 0,01 ^a

Referencias: ^{ab} Los grupos con letras distintas difieren significativamente (P <0,05) por el test de Mann-Whitney.

El pH del concentrado UF no se alteró con el proceso de filtración. Sin embargo, el porcentaje de acidez aumentó a 60,67 ± 0,58°D. En el caso del concentrado de proteínas del proceso de NF, se observó aumento de acidez e incremento de pH, comparado con el valor del suero ácido inicial. Estos cambios podrían atribuirse al incremento en el nivel de los sólidos totales retenidos por la membrana (Berruga Fernández, 1999).

Como se observa en la Tabla 28, comparando con los niveles iniciales de proteínas en el suero, en el caso del proceso UF, se produce una concentración de

proteínas de suero entre 11 a 12 veces, mientras que en el proceso NF las mismas se concentran 2 veces. La mayor concentración de proteínas obtenida por la tecnología de UF podría estar explicando el mayor contenido de AFM₁ en el retenido respecto al proceso de NF.

Esta micotoxina tiene un peso molecular del mismo orden que la lactosa: 328,3 y 442 g/mol, respectivamente. En ausencia de cualquier interacción con otros compuestos presentes en el suero de queso, la aflatoxina M₁ debería dividirse como la lactosa entre el permeado y el retenido. La mayor afinidad de AFM₁ por la fracción retenida puede deberse a una interacción entre esta micotoxina y las proteínas.

En cuanto a los resultados del perfil mineral analizado (Calcio, Magnesio, Sodio, y Fósforo) se observó que el concentrado obtenido por el proceso de UF presentó valores levemente superiores de minerales en comparación con los niveles observados en el concentrado obtenido por el proceso de NF, lo cual se debe a que la membrana del proceso de NF permite el pasaje de sales minerales al permeado. Por lo tanto, si bien existe una concentración de los minerales comparado con los valores hallados en el suero inicial, es menor que la que se encuentra en el caso de UF.

Se evaluó el destino de AFM₁ durante el fraccionamiento del suero de queso por ultrafiltración y nanofiltración. La distribución de AFM₁ entre permeado y retenido aparentemente contradice la baja afinidad de AFM₁ por las proteínas séricas citadas por Bakirci (2001), al igual que lo hallado por Mendonça y Venancio (2005) donde demostraron que los niveles de AFM₁ en el permeado (fracción rica en lactosa del suero de leche) eran más bajos que en el retenido (fracción de suero rico en proteínas) después de la ultrafiltración. Sin embargo, Dosako *et al.* (1980) informaron que la afinidad de AFM₁ por las proteínas séricas es más baja en comparación con su afinidad por las caseínas. Como estas últimas están casi ausentes en el suero de queso, la interacción entre AFM₁ y las proteínas del suero puede ocurrir.

Finalmente se realizó una correlación mediante la prueba de Spearman sobre los parámetros físico-químicos, perfil proteico y mineral y la concentración de AFM₁ en

las matrices evaluadas. Se encontró una correlación negativa entre la concentración de AFM₁ y el pH del suero ($P=0,019$; $r= -0,45$), es decir que sueros con menores pH podrían presentar valores de concentración más elevados de AFM₁. Esta asociación podría explicar, la mayor concentración de AFM₁ en el suero de la empresa II (suero ácido) respecto a la empresa I (suero dulce).

Estos resultados sugieren que la producción de proteína de suero por tecnología de membranas podría conducir a una mayor concentración de AFM₁ que en el suero original. Sin embargo ambas fracciones, concentrado de proteínas de suero y permeado pueden contener niveles considerables de AFM₁. Se debe examinar el impacto en la salud pública derivado del consumo de estos productos elaborados con suero, ya que la interacción con las proteínas de suero que puede ocurrir en ciertas circunstancias no puede ser ignorada, especialmente considerando la posibilidad de reutilizar la fracción de proteína como materia prima en otros procesos.

4. CONCLUSIONES PARCIALES

La prevalencia y los niveles de AFM₁ en la leche producida y comercializada en Argentina no es un problema de relevancia. Sin embargo, es importante mantener un nivel bajo de AFB₁ en los alimentos destinados a vacas lecheras a fin de evitar la transformación de AFB₁ en AFM₁, ya que un bajo porcentaje de muestras, tanto de alimentos como de leche, excedieron el valor establecido por el comercio de la UE.

La aplicación de buenas prácticas de manejo, como por ejemplo la preparación de una dieta adecuada para las vacas en lactancia, pueden convertirse en herramientas valiosas que ayuden al productor a minimizar las tasas de transferencias y, por ende, las concentraciones de AFM₁ en la leche.

Se ha demostrado que debido a la solubilidad en agua de la AFM₁ y a procesos térmicos, se pueden lograr reducciones de la toxina en leche concentrada y en polvo, obteniéndose concentraciones de AFM₁ por debajo de los límites establecidos internacionalmente.

Por otro lado, en el caso de los quesos, AFM₁ incrementa su concentración respecto a la leche original debido a su afinidad con la fracción de caseína de la leche. Los quesos duros presentan mayores concentraciones que los quesos blandos, debido probablemente a la pérdida de humedad. Sin embargo, una gran proporción de AFM₁ migra hacia el suero.

Los resultados, demuestran que cada proteína láctea exhibe una unión diferencial hacia la AFM₁ y puede desempeñar un papel distinto en su desintoxicación. Por lo tanto, la presencia de proteínas lácteas y su propio procesamiento influyen en gran medida en la asociación, retención y afinidad hacia AFM₁.

Con base en el comportamiento discutido de la AFM₁ en productos y subproductos lácteos, la distribución de AFM₁, el destino y la interacción con otros componentes lácteos no deben ser ignorados porque el suero y productos relacionados, que antes se consideraban desechos del proceso, ahora se utilizan en la alimentación animal y como suplementos nutricionales para humanos.

Todos estos hallazgos indicaron que AFM₁ podría estar disponible en productos lácteos elaborados a partir de leche naturalmente contaminada y su presencia no debe subestimarse, ya que la toxina puede tener diferentes comportamientos de acuerdo con el proceso al que se somete. En consecuencia, este tema es un problema grave para la salud pública ya que todos los grupos de edad, incluidos los bebés y los niños, consumen estos productos en todo el mundo. Por esta razón, la leche y los productos lácteos deben monitorearse continuamente para detectar contaminación por AFM₁.

El conocimiento de los mecanismos por los cuales AFM₁ se ve afectada durante los procesos tecnológicos y de elaboración de alimentos es de gran importancia para proporcionar información útil y precisa para desarrollar estudios de evaluación de riesgos para la formulación de políticas destinadas a minimizar los riesgos para la salud humana y animal debido a las micotoxinas.

CAPITULO III: Evaluación de riesgos de aflatoxina M₁ asociado al consumo de leche y productos lácteos producidos en Argentina

1. INTRODUCCION

La evaluación del riesgo se define como la estimación de la probabilidad de que tengan lugar efectos adversos para la salud, conocidos o potenciales, resultantes de la exposición de los seres humanos a peligros transmitidos por los alimentos, siendo la base científica primaria para las legislaciones que regulan el comercio internacional de los alimentos (FAO, 2002).

En este sentido, la evaluación de riesgo es una metodología utilizada para analizar información científica con el fin de estimar la probabilidad y la gravedad de un evento adverso para la salud pública a lo largo de las cadenas agroalimentarias (Tsakiris *et al.*, 2013). La misma es ampliamente aceptada en la actualidad como el medio preferido para evaluar los posibles vínculos entre los peligros en la cadena alimentaria y los riesgos reales para la salud humana (FAO-WHO, 2006).

Debido a la globalización, la leche y sus productos pueden viajar por todo el mundo (Tsakiris *et al.*, 2013). Este hecho, en combinación con las principales situaciones de crisis alimentaria (por ejemplo, la contaminación de la leche con melamina) ha provocado que los consumidores sean cada vez más conscientes en términos de seguridad y calidad del producto.

Se ha demostrado que la aflatoxina M₁ es uno de los xenobióticos más importantes que representa un riesgo considerable para los humanos debido al alto consumo de leche en todos los grupos de edad y especialmente en los niños, siendo uno de los factores de exposición más importantes en la dieta para AFM₁ (Rahimi *et al.*, 2010; Prandini *et al.*, 2009).

Debido a lo anterior es que resulta imperioso implementar medidas de manejo tendientes a reducir la exposición a AFM₁ por el consumo de productos lácteos. Una de las herramientas más ampliamente aceptada para sustentar científicamente las medidas de manejo es la evaluación de riesgos.

OBJETIVO

Los **objetivos** de este capítulo fueron:

1. Desarrollar un modelo cuantitativo de exposición humana a aflatoxina M₁ a lo largo de la cadena láctea Argentina, a través del consumo de leche y productos lácteos.
2. Proponer medidas de gestión del riesgo con base científica en pos de proteger la salud humana y animal debido a los efectos de las aflatoxinas.
3. Evaluar el riesgo potencial a través de diferentes escenarios de evaluación de riesgos para direccionar futuras investigaciones y recomendaciones basadas en buenas prácticas de manejo en los establecimientos lecheros.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Desarrollo del modelo

La prevalencia y la concentración de aflatoxinas, en las diferentes etapas del proceso de producción de leche y productos lácteos, fue modelada de manera cuantitativa o estocástica. El modelo conceptual en el que se basó el modelo matemático se muestra en la *Figura 6*. El modelo se creó en Microsoft Excel 2007 con el paquete complementario @Risk (versión 5.1, Palisade Corporation, Nueva York, EE. UU.).

El modelo fue desarrollado utilizando, como principales insumos, datos propios recolectados en sistemas representativos de producción de leche de Argentina y que forman parte de otros capítulos de la presente tesis. Para modelar etapas que no fueron consideradas en esta tesis se emplearon, de manera preferencial, datos científicos provenientes de Argentina. La técnica de simulación del modelo de Monte Carlo (aplicando 5000 iteraciones mediante un sistema de muestreo Hiper cubo Latino) se usó para crear las distribuciones de salida que reflejen la incertidumbre y

variabilidad inherentes en cada variable de entrada. El número de iteraciones proporcionó una convergencia adecuada de las estadísticas de simulación (<1%).

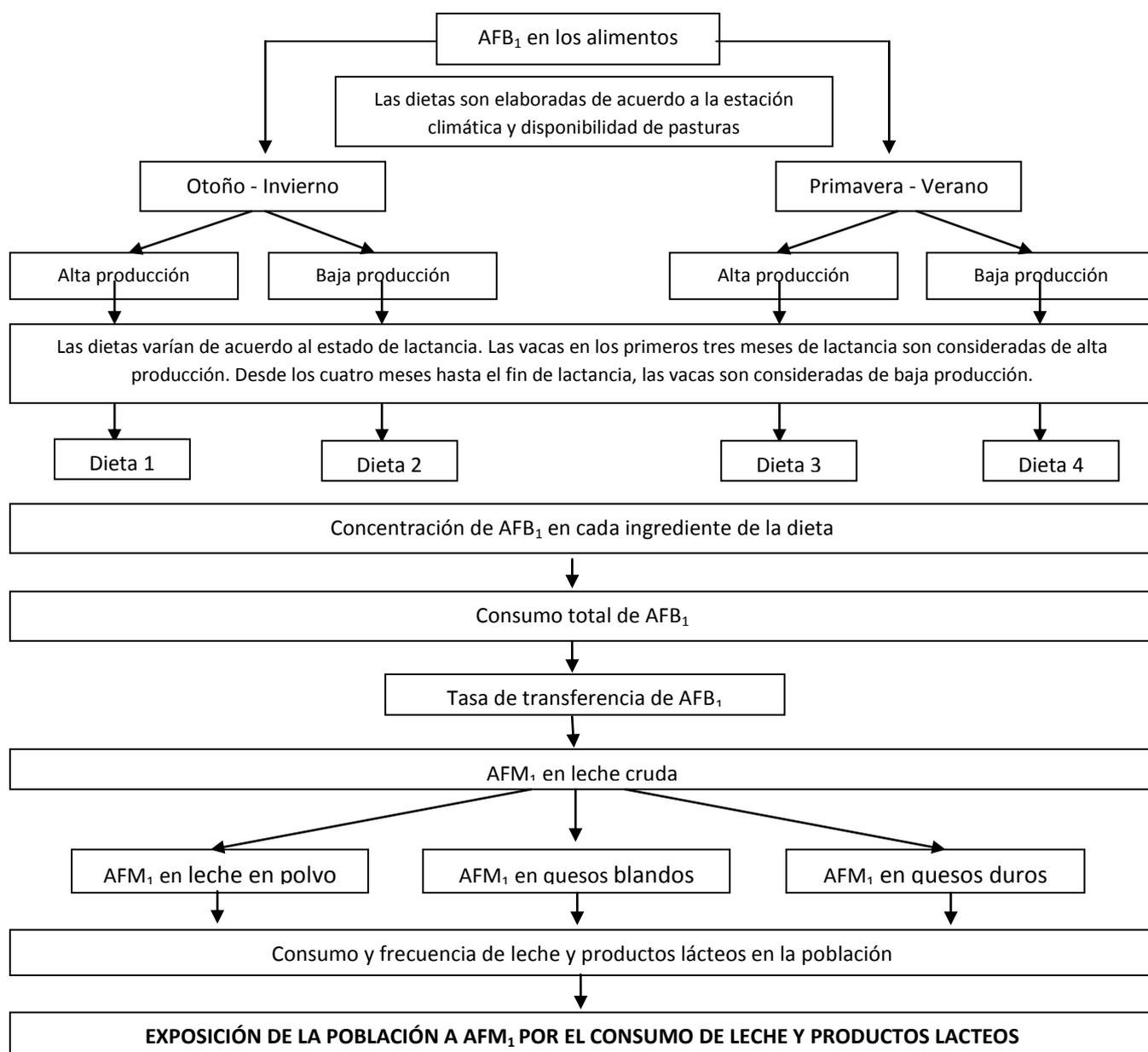


Figura 6: Diagrama de flujo del modelo matemático de evaluación de la exposición de aflatoxinas en leche y productos lácteos en Argentina.

2.2. Entradas del modelo

Todas las distribuciones de probabilidad empleadas en el modelo cuantitativo de riesgos se presentan en la Tabla 29.

Tabla 29: Descripción de las variables de entrada del modelo cuantitativo de riesgo

Símbolo	Variables	Unidad	Distribución
EC	Estación climática		Bernoulli (1,0,5)
ML	Mes de lactancia		Uniforme Discreta ({1;2;3;4;5;6;7;8;9;10})
AFB _{1p}	Nivel de AFB ₁ en pasturas	µg/kg	Lognorm(6.06,3.65,RiskTruncate(1.8,16.4))
Prev _p	Prevalencia de AFB ₁ en pasturas		Beta(89+1;(142-89)+1)
AFB _{1s}	Nivel de AFB ₁ en silajes	µg/kg	Lognorm(11.66,48.66,RiskTruncate(1.72,76))
Prev _s	Prevalencia de AFB ₁ en silajes		Beta(564+1;(870-564)+1)
AFB _{1h}	Nivel de AFB ₁ en henos	µg/kg	Lognorm(6,6.66,RiskTruncate(1.8,33))
Prev _h	Prevalencia de AFB ₁ en henos		Beta(42+1;(95-42)+1)
AFB _{1b}	Nivel de AFB ₁ en balanceados	µg/kg	Lognorm(7.87,13.56,RiskTruncate(1.78,19.22))
Prev _b	Prevalencia de AFB ₁ en balanceados		Beta(239+1;(393-239)+1)
AFB _{1sa}	Nivel de AFB ₁ en semilla de algodón	µg/kg	Lognorm(16.08,24.15,RiskTruncate(1.8,58.75))
Prev _{sa}	Prevalencia de AFB ₁ en semilla de algodón		Beta(65+1;(96-65)+1)
AFB _{1g}	Nivel de AFB ₁ en granos	µg/kg	Lognorm(15.89,24.29,RiskTruncate(1.8,116))
Prev _g	Prevalencia de AFB ₁ en granos		Beta(47+1;(120-47)+1)
Con _{AFB1}	Consumo total de AFB ₁	µg	(\sum (CMS*AFB ₁ ;(en cada ingrediente)))
PL _{temp}	Producción de leche (1º tercio lactancia)	lts	Normal(34.12,9.7,RiskTruncate(19,40))
PL _{tard}	Producción de leche (> tercio lactancia)	lts	Pert(14,26,27)
TT _{AFB1}	Tasa de transferencia	%	Lognorm(0,812;1,421;RiskTruncate(;7,27))
Con _L	Consumo de leche (niños 6-23 meses)	Lts/día	Normal(482,4;289,4;RiskTruncate(0;1061,2)))/1000
Con _L	Consumo de leche (niños 2-5 años)	Lts/día	Normal(400,4;265,2;RiskTruncate(0;930,8)))/1000
Con _L	Consumo de leche (mujeres 10-45 años).	Lts/día	Normal(191,6;126,4;RiskTruncate(0;444,4)))/1000
Freq _L	Frecuencia de consumo de leche (niños 6-23 meses)		Binomial(1;0,513)
Freq _L	Frecuencia de consumo de leche (niños 2-5 años)		Binomial(1;0,638)
Freq _L	Frecuencia de consumo de leche (mujeres 10-45 años)		Binomial(1;0,38)
Con _{LP}	Consumo de leche en polvo (niños 6-23 meses)	g/día	Normal(60,5;38;RiskTruncate(0;136,5)))/1000
Con _{LP}	Consumo de leche en polvo (niños 2-5 años)	g/día	Normal(51,2;35,8;RiskTruncate(0;122,8)))/1000
Con _{LP}	Consumo de leche en polvo (mujeres 10-45 años)	g/día	Normal(29,3;15,7;RiskTruncate(0;60,7)))/1000
Freq _{LP}	Frecuencia de consumo de leche en polvo (niños 6-23 meses)		Binomial(1;0,323)
Freq _{LP}	Frecuencia de consumo de leche en polvo (niños 2-5 años)		Binomial(1;0,281)
Freq _{LP}	Frecuencia de consumo de leche en polvo (mujeres 10-45 años).		Binomial(1;0,071)
Con _{QB}	Consumo de queso blando (niños 6-23 meses)	g/día	Normal(32,8;20;RiskTruncate(0;72,8)))/1000
Con _{QB}	Consumo de queso blando (niños 2-5 años)	g/día	Normal(39,58;26,46;RiskTruncate(0;92,5)))/1000
Con _{QB}	Consumo de queso blando (mujeres 10-45 años)	g/día	Normal(58,8;48,2;RiskTruncate(0;155,2)))/1000
Freq _{QB}	Frecuencia de consumo de queso blando (niños 6-23 meses)		Binomial(1;0,058)
Freq _{QB}	Frecuencia de consumo de queso blando (niños 2-5 años)		Binomial(1;0,058)
Freq _{QB}	Frecuencia de consumo de queso blando (mujeres 10-45 años)		Binomial(1;0,089)
Con _{QD}	Consumo de queso duro (niños 6-23 meses)	g/día	Normal(6;5,1;RiskTruncate(0;16,2)))/1000
Con _{QD}	Consumo de queso duro (niños 2-5 años)	g/día	Normal(7,11;7,25;RiskTruncate(0;21,61)))/1000
Con _{QD}	Consumo de queso duro (mujeres 10-45 años)	g/día	Normal(8,9;7,8;RiskTruncate(0;24,5)))/1000
Freq _{QD}	Frecuencia de consumo de queso duro (niños 6-23 meses)		Binomial(1;0,064)
Freq _{QD}	Frecuencia de consumo de queso duro (niños 2-5 años)		Binomial(1;0,065)
Freq _{QD}	Frecuencia de consumo de queso duro (mujeres 10-45 años)		Binomial(1;0,059)
PC	Peso corporal (niños 6-23 meses)	Kg	Uniform(6,2;11,8)
PC	Peso corporal (niños 2-5 años)	Kg	Uniform(12,9;18)
PC	Peso corporal (mujeres 10-45 años)	Kg	Uniform(34;64)
Con _{tot}	Consumo total de AFM ₁ (en cada grupo poblacional)	g/día	Con _L *Freq _L + Con _{LP} *Freq _{LP} + Con _{QB} *Freq _{QB} + Con _{QD} *Freq _{QD}
Exp _{tot}	Exposición Total (en cada grupo poblacional)	g/kg PC/día	Con _{tot} / PC

2.2.1. Dietas de vacas en lactancia

La cantidad (kg de materia seca) de cada ingrediente en la dieta consumida diariamente por las vacas lecheras en Argentina depende de dos factores: a) la

estación del año (otoño-invierno y primavera-verano) y b) del nivel de producción de leche (vacas de alta y baja producción de leche). Se consideró la misma probabilidad para cada estación del año, utilizando una distribución Bernoulli con probabilidad=0,5.

Las vacas en los primeros tres meses de lactancia se consideraron como de alta producción de leche y las del cuarto mes hasta el final de la lactancia se consideraron como baja producción de leche. Para desarrollar el modelo, se consideró que las vacas en lactancia tenían la misma probabilidad de encontrarse en cualquiera de los diez meses considerados y para ello se utilizó una distribución Uniforme Discreta.

Los ingredientes de cada dieta se muestran en la Tabla 30. Estas dietas (ingredientes y cantidades) fueron relevadas de establecimientos lecheros de la región que formaron parte de este estudio. Las mismas son un reflejo de las dietas utilizadas por los productores lecheros en la región láctea central de Argentina. Sin embargo, esas formulaciones de alimentos pueden modificarse regularmente dependiendo de la disponibilidad de los ingredientes y los precios.

Tabla 30: Composición de la dieta promedio de vacas de baja y alta producción de leche en las estaciones de otoño-invierno y primavera-verano para la cuenca lechera central de Argentina

Ingredientes	Cantidad en la dieta (kg/MS)			
	Otoño-Invierno		Primavera-Verano	
	Vacas de BP	Vacas de AP	Vacas de BP	Vacas de AP
Silajes	7	8		5
Balanceado comercial	4,5	5,5	4	5
Heno de alfalfa	1,5	2	2	2
Subproductos	2	4	1	2
Semilla de algodón	1	1	1	1
Pasturas	2	3	10	8

Referencias: BP = baja producción; AP = alta producción. MS: materia seca.

2.2.2. Contaminación de los alimentos con aflatoxina B₁

La prevalencia y concentración de aflatoxina B₁ (AFB₁) presente en los diferentes ingredientes fueron modelados a partir de una base de datos generada por

la Estación Experimental Agropecuaria Rafaela del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria y con datos propios de este estudio.

Se analizaron 1762 muestras de alimento (pasturas, silajes, heno, balanceados comerciales, semilla de algodón, granos y productos y subproductos de la agroindustria) recolectadas desde el año 2000 hasta 2017. Todas las muestras de alimento se obtuvieron de establecimientos lecheros ubicados en la región lechera central de Argentina (Gaggiotti *et al.*, 2001, Gaggiotti *et al.*, 2003, Costamagna *et al.*, 2018).

Para determinar los niveles de AFB₁ en los alimentos se utilizó un kit de prueba RIDASCREEN (R-Biopharm, Alemania), basado en un inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) cuyo límite de detección (LD) fue <1,7 µg/kg, bajo la metodología que se describió en el CAPITULO I. La prevalencia de AFB₁ en los alimentos fue modelada mediante una distribución Bernoulli, donde la probabilidad de que cada alimento sea positivo para esta micotoxina fue modelada a su vez empleando una distribución Beta para emplear la información obtenida de la base de datos. Por su parte, la concentración de AFB₁ en cada ingrediente fue modelada en función de la distribución de frecuencias observada para cada uno de ellos.

La cantidad total de aflatoxina ingerida por las vacas se calculó como la suma de la concentración de AFB₁ en cada ingrediente de la dieta por los kilogramos de materia seca de cada alimento ofrecido.

2.2.3. Residuos de aflatoxina M₁ en leche de vaca y productos lácteos

La presencia de AFM₁ se investigó en 149 muestras de leche de tanque recolectadas en establecimientos ubicados en la región productora de leche más importante de Argentina durante la estación de Otoño-Invierno 2016 a Primavera-Verano 2017. Además, se determinó la presencia de AFM₁ en muestras de productos lácteos tradicionales: queso blando y duro (n=45) y leche en polvo (n=36). Dichos estudios aportaron la información para poder modelar las tasas de transferencia de

AFB₁ a partir de los alimentos consumidos por las vacas hacia la leche (en forma de AFM₁) y luego la transferencia de AFM₁ presente en leche hacia los diferentes productos lácteos analizados (leche en polvo, quesos blandos y quesos duros).

El análisis de AFM₁ en estas matrices se realizó mediante el kit de prueba RIDASCREEN (R-Biopharm, Alemania), basado en un inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) con un límite de detección de 5 ng/l para leche cruda y leche en polvo y 50 ng/l para quesos, bajo la metodología que se describe en el CAPITULO I y II.

2.2.4. Tasa de transferencia de AFB₁ a AFM₁ y de AFM₁ en leche a productos lácteos

La tasa de transferencia fue calculada como se describió en el CAPITULO I. Brevemente, a partir de los datos de consumo de AFB₁ de los alimentos consumidos por las vacas y de la concentración de AFM₁ en la leche producida por las mismas, se calculó la proporción de AFB₁ que fue excretada por leche como AFM₁. De igual manera, a partir de los datos de concentración de AFM₁ encontrados en las leches crudas y su concentración en los productos lácteos de interés elaborados con esas mismas leches se evaluó la tasa de pasaje. En ambos casos, la tasa de transferencia se calculó modelando la distribución de frecuencias de las tasas de transferencia calculada para cada uno de los establecimientos lecheros analizados y productos lácteos elaborados.

2.2.5. Datos de consumo y cálculo de la ingesta diaria estimada

Las dosis ingeridas (D) de AFM₁ fueron calculadas en función de su concentración en la leche cruda y productos lácteos y las respectivas cantidades incorporadas por los consumidores argentinos en su dieta. A su vez, con finalidad de evaluar la toxicidad de la dosis ingerida, se estimó la dosis consumida por peso vivo del consumidor (kg). Considerando que los diferentes estratos poblacionales tienen

consumos particulares y susceptibilidades diferentes, se incorporaron al estudio tres grupos poblacionales: niños de 6 a 23 meses, niños de 2 a 5 años y mujeres de 10 a 45 años.

La media (M) expresada en gramos, desvío estándar (DE) y frecuencia de consumo (F) de leche fluida pasteurizada (LF), leche en polvo (LP), quesos blandos (QB) y quesos duros (QD), y el rango de peso corporal (pc) de diferentes categorías de edad, son descriptos en la Tabla 31.

Los datos sobre el consumo y frecuencia de consumo de cada producto fueron obtenidos a partir de la Encuesta Nacional de Nutrición y Salud (MSA, 2012). Para modelar la variabilidad en el consumo de cada producto por cada estrato poblacional, se emplearon distribuciones Normales a partir de los datos de media y desviación estándar para cada producto. La frecuencia de consumo fue integrada como probabilidad en una distribución Bernoulli para cada producto lácteo. Los pesos corporales de los tres grupos poblacionales considerados fueron obtenidos a partir de una Evaluación del crecimiento de niños y niñas en Argentina (Ortiz, 2012), siendo modelados mediante distribuciones Uniformes.

Tabla 31: Descripción de la media (M) en gramos, desvío estándar (DE), frecuencia de consumo (F) de leche y productos lácteos tradicionales de Argentina, y rango de peso corporal (PC) de diferentes grupos poblacionales.

Grupo poblacional	Leche fluida			Leche en polvo			Quesos blandos			Quesos duros			Rango PC (Kg)
	M	DE	F	M	DE	F	M	DE	F	M	DE	F	
Niños (6-23 meses)	482	289	51,3	60,5	38	32,3	32,8	20,0	5,8	6,0	5,1	6,4	6,2-11,8
Niños (2-5 años)	400	265	63,8	51,2	35,8	28,0	39,6	26,5	5,8	7,1	7,2	6,5	12,9 -18
Mujeres (10-49 años)	192	126	38,0	29,3	15,7	7,13	58,8	48,2	8,9	8,9	7,8	5,9	34-64

Fuente: Encuesta Nacional de Nutrición y Salud, Ministerio de Salud de Argentina, 2012.

La evaluación de la exposición humana de AFM₁ (µg/kg de peso corporal/día) se calculó en función de la exposición total de AFM₁ a través de las dosis ingeridas y el peso corporal (PC) para diferentes categorías de edad según la OMS.

2.3. Análisis de sensibilidad

Para determinar el impacto de cada variable de entrada en la variable de salida (por ejemplo, AFM₁ en leche y productos lácteos), se realizó un análisis de sensibilidad, utilizando el coeficiente de correlación de Pearson para determinar el grado de asociación. El análisis de sensibilidad se realizó con el software @ Risk® versión 5.1 (Palisade, Nueva York).

2.4. Suposiciones del modelo

Las siguientes suposiciones fueron aplicadas al modelo. Debido a que estos supuestos pueden impactar en los resultados obtenidos, deben tenerse en cuenta al considerar los resultados de las evaluaciones de riesgo:

i) El modelo consideró que la proporción de vacas en ordeño era la misma para cada estación climática.

ii) Para desarrollar el modelo, se consideró que la duración de la lactancia era la misma para todas las vacas y que cada vaca podría estar en cualquiera de los diez meses de lactancia con la misma probabilidad.

iii) Incluso considerando que las dietas (ingredientes y cantidades) fueron un reflejo de las dietas utilizadas en la región láctea central de Argentina, podrían cambiar regularmente dependiendo de la disponibilidad de los ingredientes y los precios.

iv) No se consideró el efecto de dilución entre la leche entera con diferentes niveles de micotoxinas a nivel de las fábricas procesadoras.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

La concentración de AFB₁ en las dietas de vacas lecheras se estimó en 8,2 µg/Kg (*Figura 7*). Se calculó la incertidumbre sobre el verdadero valor medio (intervalo de confianza del 95%) para AFB₁ (0,8–28,7 µg/Kg).

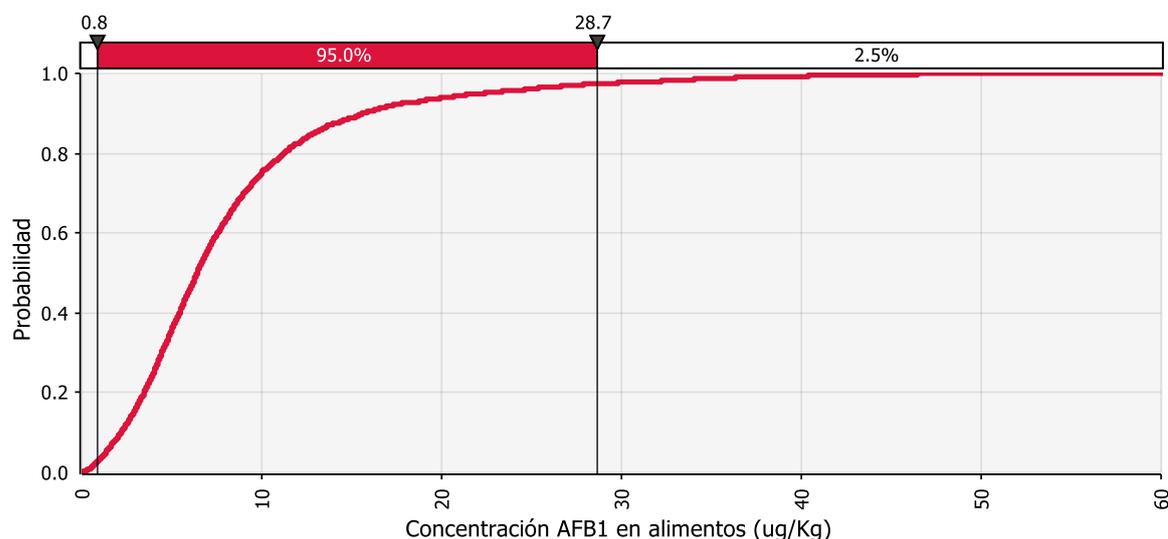


Figura 7: Distribución de probabilidad acumulada de la concentración de aflatoxina B₁ en alimentos destinados a bovinos lecheros.

Las regulaciones de la Unión Europea (UE) (Comisión Europea, 2002) y MERCOSUR (MERCOSUR, 2002) determinan un nivel máximo permitido de 5 y 20 µg/Kg de AFB₁ en alimentos para ganado lechero, respectivamente. De acuerdo con las estimaciones generadas por este modelo de riesgo, aproximadamente el 64% y el 6% de las dietas ofrecidas a las vacas lecheras en la región central de Argentina presentarían niveles más altos que los establecidos por las regulaciones internacionales mencionadas.

La concentración promedio de AFM₁ en la leche bovina se estimó en 0,046 µg/l (IC del 95% 0,002–0,264 µg/l) (*Figura 8*).

Teniendo en cuenta que AFM₁ se incluyó en el primer grupo por carcinogenicidad y la leche y sus derivados se consumen a diario, la mayoría de los países han establecido niveles máximos de residuos (LMR) de AFM₁ en la leche. El

LMR de AFM₁ en la leche varía de 0,05 µg/l en la Unión Europea (Comisión Europea, 2006) a 0,5 µg/kg establecido por los Estados Unidos (FDA, 2011) y el MERCOSUR (MERCOSUR, 2002). Considerando estas normativas, el nivel promedio estimado de AFM₁ en la leche bovina estuvo por debajo del límite máximo establecido por la regulación de la FDA y el MERCOSUR para leche fluida, pero se ubicó en el límite máximo (0,05 µg/l) para leche fluida y superó el límite para leche destinada a formulaciones infantiles (0,025 µg/l) establecidos por la regulación europea.

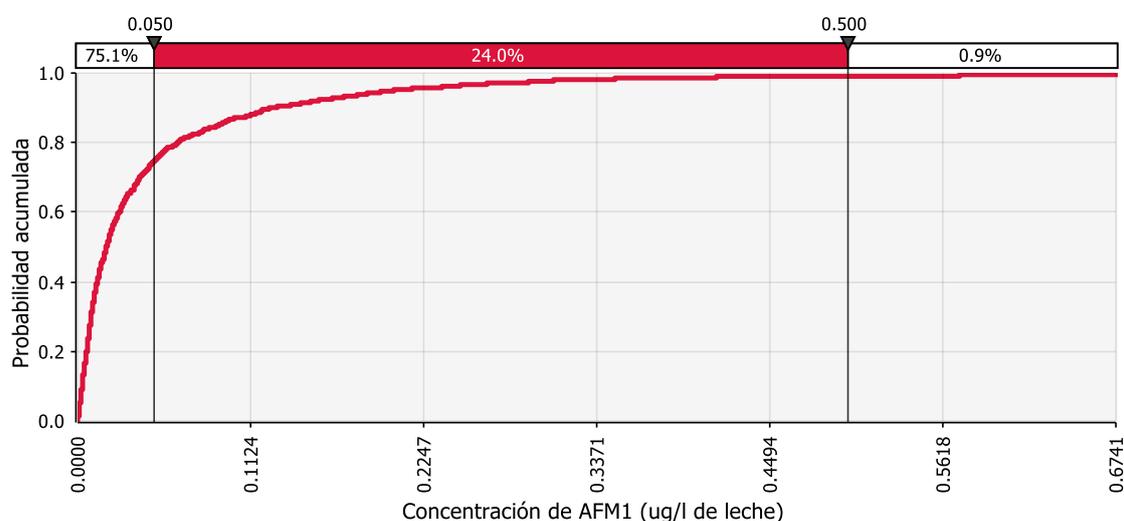


Figura 8: Distribución de probabilidad acumulada de la concentración de aflatoxina M₁ en leche bovina.

Considerando la tasa de transferencia obtenida, el 0,9% de la leche producida en la región láctea central de Argentina superaría el nivel máximo aceptado por el MERCOSUR. Por otro lado, cuando se consideran las normativas europeas, el 24,9% y 43% de la leche producida en la región láctea central de Argentina superaría el nivel máximo establecido para leche fluida y fórmulas infantiles, respectivamente.

Bajo estas estimaciones, la producción y comercialización de leche en Argentina se encontraría dentro del nivel de tolerancia para AFM₁ en la leche establecido por EE.UU y otros países de América Latina, entre ellos los que forman

parte del MERCOSUR, pero algunas muestras superarían las normativas europeas cuyo límite es 10 veces inferior.

Debido a la susceptibilidad de la población destino, los estándares de calidad se han redoblado y se muestra una tendencia mundial a reducir los límites máximos de residuos en los alimentos. Dentro de este contexto, cualquier escenario de crecimiento cuantitativo de la producción láctea nacional que deba orientarse hacia mercados externos, como por ejemplo la UE, tendría un grave impacto en la comercialización de la leche y productos lácteos. Por esa razón, Argentina debe mejorar su programa de monitoreo de aflatoxinas en la cadena láctea.

La concentración de AFM_1 en la leche bovina fue sensible a la tasa de transferencia ($r=0,80$), al nivel de AFB_1 en los silajes ($r=0,22$), pasturas durante la estación de primavera-verano ($r=0,11$), concentrado comercial ($r=0,08$) y semilla de algodón ($r=0,05$) y finalmente, a la producción de leche en el primer tercio de la lactancia durante la estación de primavera-verano ($r=-0,07$) (Figura 9).

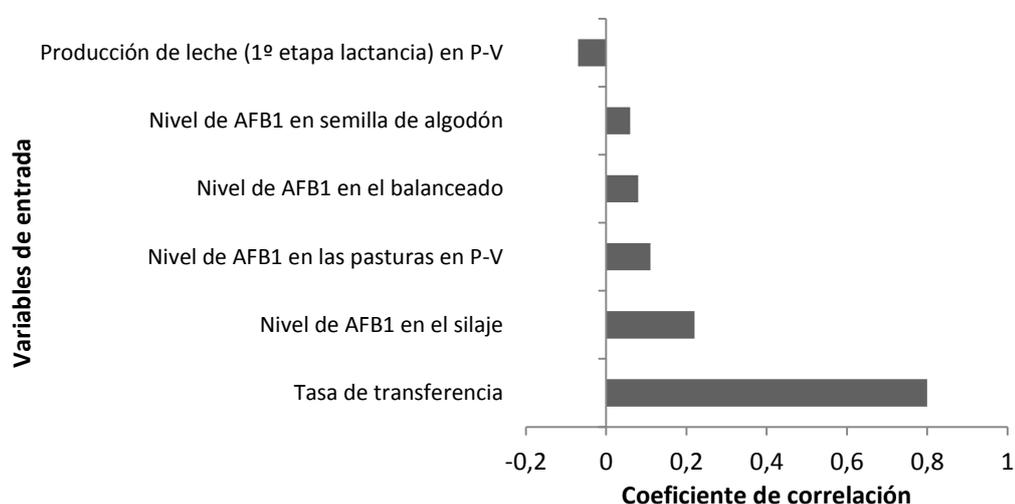


Figura 9: Análisis de sensibilidad para la concentración de AFM_1 en leche bovina

La tasa de transferencia de AFB_1 fue identificada como una variable de gran impacto en el modelo, debido a que está altamente correlacionada a la concentración de AFM_1 en la leche. Los estudios han demostrado una considerable variabilidad con

respecto al porcentaje de aflatoxinas transformadas en AFM₁ y la cantidad de esta micotoxina presente en la leche (Prado *et al.*, 1999).

La capacidad del ganado lechero para transformar AFB₁ del alimento a AFM₁ en la leche se ha examinado en muchos estudios, demostrando la variabilidad de factores que la afectan, siendo los principales la producción de leche y los días en lactancia (Diaz *et al.*, 2004, Masoero *et al.*, 2007). Factores adicionales que se ha demostrado que afectan la tasa de transferencia (a menudo en vacas individuales) fueron la salud general del animal, la capacidad de biotransformación hepática, la tasa de ingestión y la integridad de las membranas de las células alveolares mamarias (Fink-Gremmels, 2008; Battacone *et al.*, 2003). Por otro lado, como se pudo observar en el capítulo II de este estudio, la tasa de transferencia estuvo asociada a factores como el tamaño de partícula de la ración y la ingesta de AFB₁ en los alimentos de las vacas. Todos estos factores podrían explicar la variabilidad existente en la tasa de transferencia y su impacto en la concentración de AFM₁ en leche cruda.

Los alimentos como los silajes, pasturas, balanceados comerciales y semilla de algodón fueron los ingredientes de las dietas más correlacionados con el nivel de aflatoxinas en la leche. La proporción de AFB₁ en los silajes y las pasturas fue, en promedio, el 52,2% de la dieta total.

Como se pudo observar en los capítulos anteriores, las pasturas fueron el ingrediente de la dieta que mayor aporte de AFB₁ realizó en la ración. Si bien la misma forma parte de la dieta durante todo el año, la proporción cambia en las distintas estaciones variando desde un 20-25% en otoño-invierno a un 30-45% en primavera-verano. Generalmente, las pasturas no se encuentran asociadas a la presencia de AFB₁ en comparación con otros alimentos que forman parte de la dieta. Sin embargo, resultados recientes informaron prevalencias de AFB₁ en pasturas del 91% (Signorini *et al.*, 2012). Estos resultados podrían deberse a la presencia de *Aspergillus* en las plantas y que ante condiciones de estrés hídrico y alta variabilidad en el resto de las condiciones climáticas, generan la toxina.

Para el caso de los silajes, principal componente de la ración, los valores de agua libre y disponible (del cereal base) son substancialmente elevados y peligrosos para el desarrollo de los mohos y la probable formación de micotoxinas (Gimeno y Martins, 2011). En este sentido, existen buenas prácticas que se pueden aplicar para disminuir los niveles de AFB₁ en los silajes. Algunos ejemplos de las mismas son tener en cuenta los momentos óptimos de cosecha de la planta (contenido de humedad), y asegurar el mantenimiento de una atmósfera anaerobia que permita una correcta fermentación y almacenamiento sin riesgos de contaminación, ya que la mayor parte de los hongos productores de toxinas son aerobios.

El alimento balanceado y la semilla de algodón fueron los otros dos ingredientes correlacionados con la concentración de AFM₁ en la leche. El alimento balanceado está compuesto de varios granos, cosechados y almacenados en condiciones muy diversas y en algunos casos por granos contaminados que no pudieron ser usados en formulación de dietas de algunos monogástricos.

En comparación con los monogástricos, los rumiantes por lo general se consideran menos susceptibles a la aflatoxicosis, basado en el supuesto de que la flora del rumen degrada y desactiva a las micotoxinas presentes en el alimento (Díaz *et al.*, 2004). Por esta razón, los granos de óptima calidad se derivan a la elaboración de alimentos balanceados para monogástricos como por ejemplo pollos y cerdos y los de menor calidad se destinan a los rumiantes. Sin embargo, en el capítulo II se pudo comprobar que existen factores que podrían afectar la detoxificación de AFB₁ en el rumen, con la consecuente aparición de concentraciones más altas de AFM₁ en la leche.

La prevención de AFB₁ en los granos puede lograrse seleccionando variedades resistentes a los hongos toxigénicos, realizar una rotación adecuada del cultivo y, durante el período de cosecha, es importante evitar el daño excesivo a los granos, lo que puede predisponerlos a infectarse durante el almacenamiento (Campagnollo *et al.*, 2016). Como se identificó en el capítulo I, las malas condiciones de almacenamiento

de los subproductos en los establecimientos se asociaron con la prevalencia de la aflatoxina en la leche.

El control de las condiciones durante la post-cosecha de los granos y almacenamiento de subproductos, debe ser considerado ya que podrían favorecer el crecimiento de hongos y la posterior producción de toxinas. Algunas de las condiciones a controlar serían la actividad del agua de los productos almacenados, la temperatura, el daño de roedores e insectos y las interacciones microbianas (Binder *et al.*, 2007). El secado es un paso crítico antes del almacenamiento y proporciona condiciones ideales de temperatura, baja humedad y aireación (Beltrane y Machinski, 2005).

La variabilidad en los niveles de AFB₁ en los alimentos, refuerza la necesidad de implementar estrategias para reducir la producción y aparición de aflatoxinas en los alimentos. No obstante, si están presentes en los alimentos, se deben implementar programas de manejo para reducir la exposición de los animales a la aflatoxina (Pereira *et al.*, 2005).

En ciertas ocasiones, debido a la baja rentabilidad de la actividad lechera, los productores adquieren alimentos de bajo costo sin certificación de calidad. El conocimiento proporcionado por un análisis de calidad, no sólo nutricional sino microbiológico, es de gran importancia para definir prácticas de manejo de los alimentos contaminados. Ejemplos de ello, puede ser la mezcla del material contaminado con alimentos que tienen concentraciones más bajas (o ninguna) o ser destinados a otras categorías animales de menor susceptibilidad que las vacas lactantes, o la adición de secuestrantes de micotoxinas en la dieta (Gallo *et al.*, 2010; Masoero *et al.*, 2009).

Los resultados hallados en este estudio respecto a la proporción de muestras de alimento que excedieron el nivel máximo de AFB₁ aceptado por las regulaciones internacionales mencionadas, fue el doble de las estimadas en una evaluación cuantitativa de la exposición al riesgo del nivel de micotoxinas en la leche de vaca

producida en Argentina (Signorini *et al.*, 2012). Sin embargo, los niveles medios de AFM₁ en la leche y los valores que superan las regulaciones internacionales fueron similares a ligeramente inferiores.

Las diferencias respecto a los niveles de AFB₁ en los alimentos pueden deberse a la variabilidad climática y de alimentos considerados en la actual evaluación de riesgos. La disminución en los niveles de AFM₁ en la leche podría ser producto de un mejor ajuste del modelo, debido a que los datos incorporados surgen de mediciones reales en los sistemas productivos. Finalmente, los valores de producción individual, al ser datos reales, fueron superiores a los niveles de producción estimados utilizado en el modelo de Signorini *et al.* (2012). Esto demuestra la importancia de diseñar modelos a partir de datos reales y la necesidad de modificar las evaluaciones de riesgo a partir de nueva información disponible, lo que le da originalidad a este trabajo.

La ingesta diaria total estimada (IDE) para AFM₁ debido al consumo de leche fluida, leche en polvo, queso duro y queso blando para niños de 6 a 23 meses de edad, fue, en promedio, de $1,4 \times 10^{-3}$ µg/Kg pc/día (*Figura 10*).

Para niños de 2 a 5 años, la ingesta diaria total estimada de AFM₁ debido al consumo de leche fluida, y los productos lácteos considerados fue, en promedio, de $8,54 \times 10^{-4}$ µg/Kg pc/día (*Figura 11*), y para mujeres de 10 a 49 años, fue de $8,24 \times 10^{-5}$ µg/Kg pc/día, respectivamente (*Figura 12*).

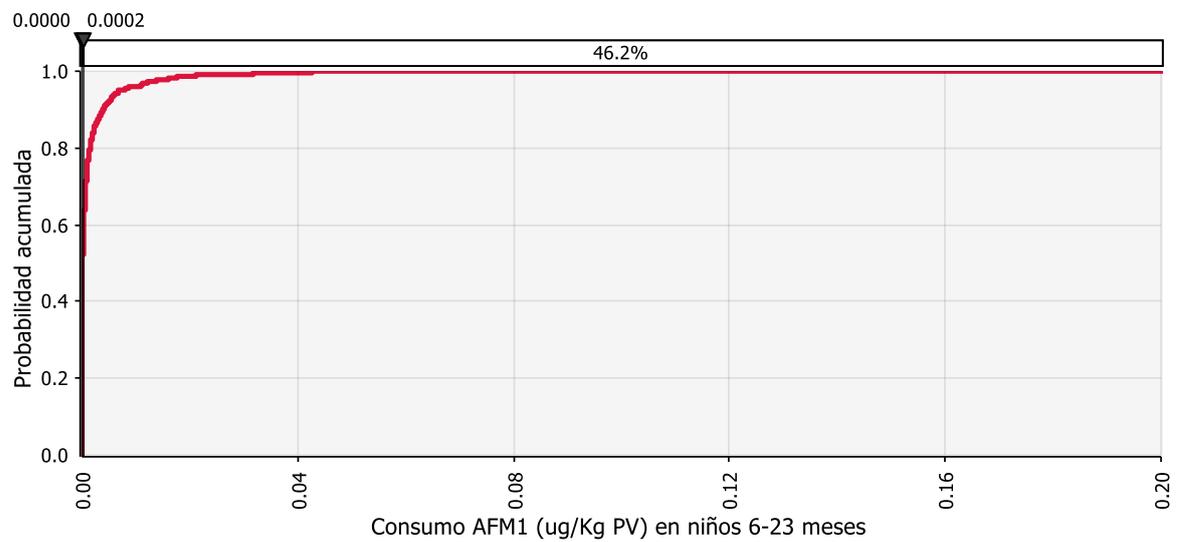


Figura 10: Distribución de probabilidad acumulada para el consumo total de AFM₁ por peso vivo en niños de 6 a 23 meses de edad.

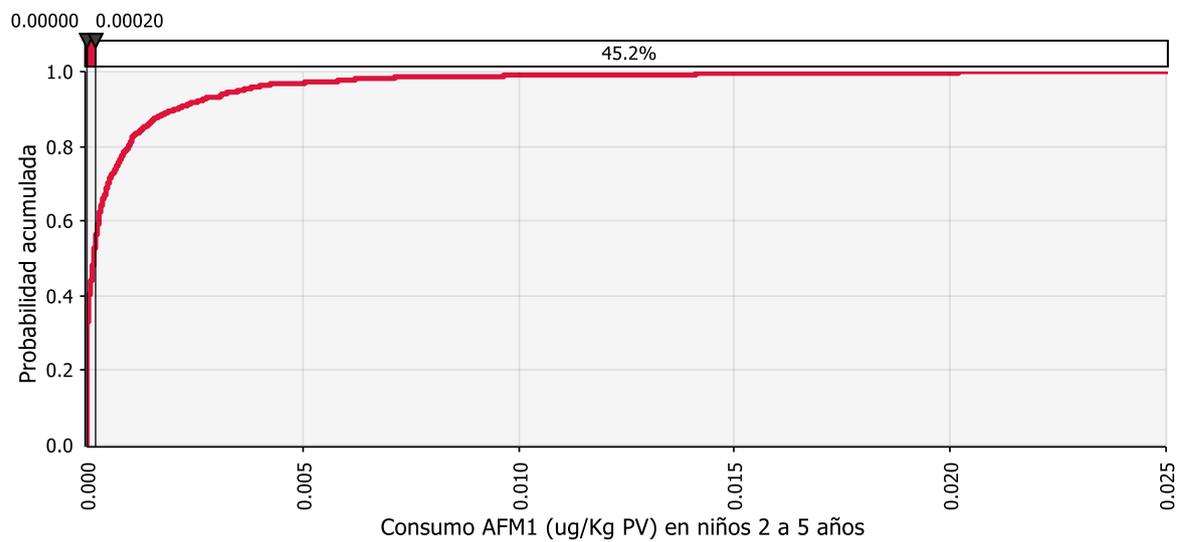


Figura 11: Distribución de probabilidad acumulada para el consumo de AFM₁ por peso vivo en niños de 2 a 5 años de edad.

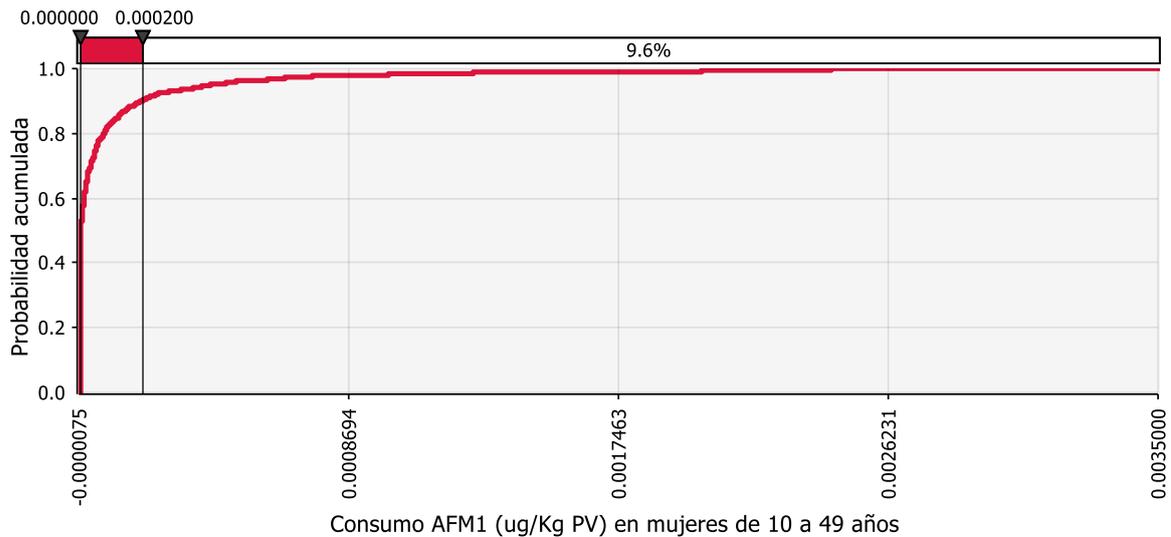


Figura 12: Distribución de probabilidad acumulada para el consumo de AFM₁ por peso vivo en mujeres de 10 a 49 años de edad.

La ingesta diaria total por cada grupo poblacional analizado estuvo correlacionada con la tasa de transferencia de AFM₁ a la leche y productos lácteos y con la frecuencia de consumo de estos productos (*Figura 13*).

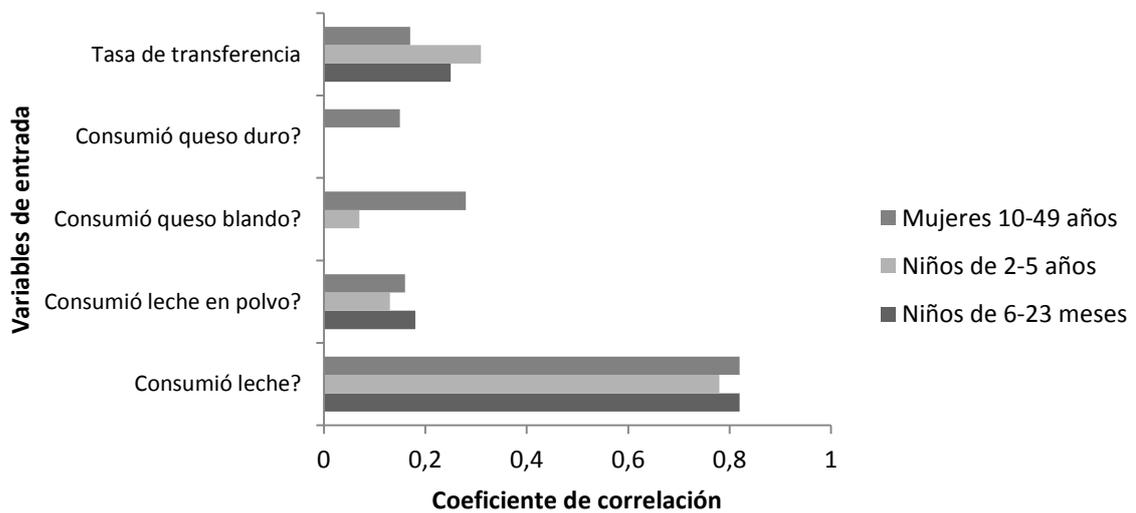


Figura 13: Análisis de sensibilidad para el consumo de AFM₁ por peso vivo por grupo poblacional

Las micotoxinas pueden causar efectos adversos en la salud humana: hepatotóxicos, nefrotóxicos, neurotóxicos, gastroentéricos, cancerígenos e inmunosupresivos. El riesgo en humanos que representa la ingestión de géneros alimenticios contaminados con micotoxinas, puede ser evaluado relacionando la IDT (dosis tolerable de micotoxina ingerida diariamente), TD50 (dosis con la cual el 50% de los individuos pueden desarrollar tumores malignos) y la exposición de los humanos a esas micotoxinas, con los valores medios de consumo diario de algunos géneros alimenticios, los niveles de micotoxinas en el alimento que es consumido y el peso corporal (Gimeno, 2004).

En la actualidad, aún no se ha determinado una ingesta diaria tolerable (IDT) para AFM₁. Kuiper-Goodman (1990) propuso y estimó una IDT para AFM₁ que se determina dividiendo el TD50 por un factor de incertidumbre de 5000. El valor propuesto es 0,0002 µg/kg de peso corporal/día, valor equivalente a un nivel de riesgo de 1: 100.000. Este valor límite se refleja en las *Figuras 10, 11 y 12*.

El alto consumo de leche en todos los grupos de edad y especialmente en los niños parece ser uno de los factores de exposición más importantes en la dieta para AFM₁ (Rahimi *et al.*, 2010; Prandini *et al.*, 2009). La mayoría de las ingestas estimadas previamente de AFM₁ a través del consumo de leche en algunos países se calcularon para adultos y algunas de ellas son las siguientes: 0,08 ng/kg pc/día en Brasil (Shundo *et al.*, 2009), 0,01 ng/kg pc/día en Francia (Leblanc *et al.*, 2005), 0,305 ng /kg pc/día en España (Cano-Sancho *et al.*, 2010), 0,897 ng/kg pc/día en Serbia (Škrbić *et al.*, 2014) y 3,26 ng/kg pc/día en Marruecos (Zinedine *et al.*, 2007).

En el presente estudio, la ingesta estimada de AFM₁ para adultos fue inferior a la informada en España, Marruecos y Serbia, más alta que la reportada en Francia y similar a la calculada en Brasil. Además, JECFA (2001) estableció la ingesta de AFM₁ para cinco regiones basándose en el consumo regional de leche, asumiendo el peso corporal (60 kg) y las concentraciones medias ponderadas de AFM₁ en la leche obtenida en varios programas de monitoreo de: 0,023; 0,022; 0,36; 0,005 y 0,002

ug/Kg en Europa, América Latina, Extremo Oriente, Oriente Medio y África, respectivamente. Con estos datos y las medias del consumo de leche, la ingesta de AFM₁ se estimó en 0,11, 0,058, 0,20, 0,10 y 0,002 ng/kg pc/día, respectivamente, siendo la ingesta de América Latina y África inferior a la calculada en este estudio.

En Argentina, la primera evaluación de riesgo cuantitativa para micotoxinas en leche reportó una ingesta diaria para adultos de 0,122 ng/Kg pc/día, es decir 1,64 veces por debajo de la IDT. La menor ingesta en la población adulta calculada en el presente estudio puede ser debida a un mejor ajuste del modelo. En este sentido, considerando la distribución de valores de la IDE por esta evaluación de riesgo, la probabilidad de que la ingesta diaria de los niños de 6 a 23 meses superara la IDT fue estimada en 46,2%, mientras que la probabilidad en niños de 2 a 5 años y de mujeres de 10 a 49 años fue de 45,2% y 9,6%, respectivamente. Es decir que, las dosis ingeridas de AFM₁ estimadas para niños de 6 a 23 meses y niños de 2 a 5 años fueron, en promedio, 8,6 y 4,06 veces mayor que la ingesta diaria tolerable, respectivamente. En la población de mujeres de 10 a 49 años, la IDE fue 3,32 veces menor que la IDT.

Según el análisis de sensibilidad, el consumo de leche es el alimento que más incidió en la exposición de AFM₁. La ingesta diferente de leche y el efecto del peso corporal para diferentes categorías de edad influyó en el riesgo más alto de superar la IDT de AFM₁ del menor grupo poblacional considerado. Sin embargo, esta probabilidad no significa que el 46,2% de la población de niños de 6 a 23 meses de edad podría contraer un efecto adverso para su salud, sino que este valor nos indica que el 46,2% de la población podría tener un riesgo de 1 en 100.000 de padecer problemas a consecuencia de la ingesta de leche y productos lácteos contaminados con AFM₁.

Si consideráramos que toda la leche consumida en Argentina tuviera una contaminación con AFM₁ de 0,05 µg/Kg (leche fluida) y 0,025 µg/Kg (fórmula infantil) establecidos por UE, la ingesta de AFM₁ en la dieta de niños de 6-23 meses

considerada como la población con mayor riesgo, sería de $5,56 \times 10^{-5}$ $\mu\text{g}/\text{persona}/\text{día}$ y $2,78 \times 10^{-5}$ $\mu\text{g}/\text{persona}/\text{día}$, donde el 55% y 53% superaría la IDT, respectivamente. Por su parte, si se considerase que toda la leche producida en Argentina se encontrara dentro de los límites establecidos por EE.UU y el MERCOSUR ($0,5 \mu\text{g}/\text{Kg}$), la exposición total a AFM_1 fue estimada en $5,6 \times 10^{-4}$ $\mu\text{g}/\text{persona}/\text{día}$, donde el 65% superaría la IDT. Bajo este escenario, la población más susceptible, podría encontrarse en riesgo, siendo necesario establecer medidas de prevención de la contaminación de AFM_1 en leche y productos lácteos.

4. CONCLUSIONES PARCIALES

Este estudio demostró que la dieta del ganado lechero presenta niveles de aflatoxinas considerables, siendo los silajes, pasturas, balanceados comerciales y semilla de algodón los ingredientes de las dietas más correlacionados con el nivel de aflatoxinas en la leche.

Estos resultados remarcan la necesidad de establecer programas de monitoreo y control de estos alimentos, además de la implementación de buenas prácticas de manejo para prevenir y/o inhibir el crecimiento de hongos (mejorar las condiciones de cosecha y post-cosecha y las prácticas de almacenamiento) o agregar secuestrantes en las dietas que permitan bloquear la acción de las micotoxinas.

Aunque las dietas para animales contienen niveles significativos de aflatoxinas, la leche producida no estuvo mayormente fuera de los límites internacionales máximos permitidos. Sin embargo, dado que los requisitos de calidad son cada vez más estrictos, cualquier reducción en los límites regulatorios internacionales establecidos sería un impacto grave en la producción nacional.

De acuerdo con los riesgos potenciales para la seguridad humana derivados del consumo de AFM_1 en la leche y los productos lácteos, la ingesta diaria estimada mostró que la cantidad de AFM_1 es más alta que la ingesta permisible recomendada

en las categorías de población infantil evaluada, siendo más baja para la población adulta. Aun así, los niños, considerados la población más susceptible, no estarían expuestos a un riesgo significativo por los efectos de AFM₁ a través del consumo de leche, aunque esta situación debería evaluarse a lo largo del tiempo.

CAPITULO IV: Efectos de la inclusión de un agente secuestrante en la dieta de vacas lecheras sobre la excreción de aflatoxina M₁ en la leche

1. INTRODUCCION

Las pasturas, los silajes, la semilla de algodón, el balanceado comercial y los subproductos de la agroindustria están frecuentemente contaminados por aflatoxinas cuando las plantas crecen en el campo y/o se conservan bajo condiciones inadecuadas de almacenamiento (González Pereyra *et al.*, 2008; Richard *et al.*, 2009), constituyéndose en fuentes de contaminación de la leche con AFM₁ (Unusan, 2006; Xiong *et al.*, 2013).

La aflatoxina B₁ (AFB₁), una vez ingerida por los mamíferos, se absorbe rápidamente en el tracto gastrointestinal y aparece como el metabolito aflatoxina M₁ (AFM₁) en la sangre después de tan solo 15 minutos (Moschini *et al.*, 2007) y en la leche al primer ordeño después de la ingesta de alimento contaminado con AFB₁ (Diaz *et al.*, 2004).

El resultado más importante de la exposición de las vacas lecheras a los niveles de AFB₁ en la dieta, incluso a concentraciones subtóxicas, es la excreción de AFM₁ en la leche debido a que cuando el humano ingiere leche o productos lácteos contaminados con AFM₁, ésta se introduce en el medio interno, lo que puede provocar problemas de salud en función de la dosis consumida y el tiempo de exposición (Galvano *et al.*, 1998).

En cuanto al impacto de la AFB₁ presente en las dietas del ganado sobre la salud animal, se pueden mencionar los siguientes: daños en la función hepática (Garrett *et al.*, 1968), inducción del síndrome de hígado graso (Colvin *et al.*, 1984; Cook *et al.*, 1986; Cockcroft, 1995), reducción de la producción y calidad de la leche, pérdida de condición corporal (Gonçalves *et al.*, 2015), deterioro de la respuesta inmune y aumento de la susceptibilidad a enfermedades infecciosas (Masoero *et al.*, 2007; Queiroz *et al.*, 2012). Los estudios señalan que las variaciones en la conversión de AFM₁ son significativas, aún a niveles altos o bajos de contaminación con AFB₁ (Prandini *et al.*, 2009; Van Eijkeren *et al.*, 2006).

Actualmente no hay tecnología disponible que elimine por completo la contaminación con micotoxinas (Yiannikouris *et al.*, 2003). Son sustancias muy estables y no existe tratamiento físico y/o químico que se pueda aplicar sin alterar el valor nutricional de los alimentos a un bajo costo. Lo más común es el uso de técnicas para reducir la biodisponibilidad mediante el uso de agentes secuestrantes o adsorbentes (EFSA, 2009). Por lo tanto, una estrategia práctica para prevenir la aflatoxicosis en animales y para reducir el nivel de residuos de aflatoxinas en los alimentos, es la adición de secuestrantes no-nutritivos en el alimento.

Los agentes secuestrantes se definen como un nuevo grupo funcional de aditivos alimenticios que pueden suprimir o reducir la absorción, promover la excreción de micotoxinas o modificar su modo de acción, uniéndose a las aflatoxinas en el tracto gastrointestinal y reduciendo su biodisponibilidad y distribución en la sangre, hígado y otros órganos (Phillips y Horn, 2008, Avantaggiato *et al.*, 2015).

Se han realizado numerosos estudios de adsorción *in vitro*, incluso con fluido ruminal (Spotti *et al.*, 2005). Sin embargo, los adsorbentes deben ser evaluados *in vivo* para establecer la eficacia de la utilización en animales. Hasta el momento existen pocos estudios sobre la eficiencia de los diferentes adsorbentes en vacas lecheras, a diferencia de los realizados en otras especies animales. Se ha informado que, aluminosilicatos de sodio y calcio hidratados (Phillips *et al.*, 1988; Harvey *et al.*, 1991), montmorillonitas (Ramos y Hernández, 1996), bentonitas (Veldman, 1992; Schell *et al.*, 2000), zeolitas (Piva *et al.*, 1995), carbones activados (Galvano *et al.*, 1996; Diaz *et al.*, 2004) y glucomananos esterificados de la pared celular de levaduras (Aravind *et al.*, 2003) tienen una alta afinidad de unión por las aflatoxinas, tanto *in vitro* como *in vivo*, disminuyendo los niveles de AFM₁ en la leche.

OBJETIVOS

- Evaluar la eficiencia de un secuestrante comercial de aflatoxinas para reducir los niveles de AFM₁ en la leche de vacas expuestas a alimentos contaminados naturalmente con AFB₁.

- Evaluar la eficiencia del secuestrante comercial de aflatoxinas para reducir sus efectos toxicológicos y el impacto sobre los parámetros productivos, reproductivos y sanitarios de las vacas lecheras.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Animales y dieta

Se utilizaron 60 vacas en lactancia, divididas en dos grupos, T1= grupo control sin secuestrante (n=30); T2= grupo tratado con secuestrante comercial (n=30), con base al número de partos, producción de leche, días en lactancia y condición corporal. Las vacas fueron asignadas de manera aleatoria en ambos grupos en función del cronograma de partos.

Cada uno de los animales fue monitoreado a lo largo de la lactancia, dividida en 10 periodos: **(-1)** 15 días pre-parto, **(0)** parto, **(1)** 15 días post-parto, **(2)** 30 días post-parto, **(3)** 60 días post-parto, **(4)** 90 días post-parto, **(5)** 120 días post-parto, **(6)** 150 días post-parto, **(7)** 180 días post-parto y **(8)** al secado.

Las vacas fueron alimentadas con dietas contaminadas naturalmente con micotoxinas. Los ingredientes y cantidades de la dieta suministrada a las vacas en lactancia se muestran en la Tabla 32. La dieta para vacas lecheras se formuló de acuerdo a los requerimientos nutricionales recomendados por National Research Council (NRC, 2001) en función del nivel de producción de leche y el peso corporal.

Se utilizó un secuestrante comercial “*Antitox Coo Pil*” formulado a base de 60% de zeolita y 40% de pared celular de levaduras, destinado a la absorción de AFM₁. El ensayo se llevó a cabo en un sistema de ordeño robotizado el cual permitió administrar

una dosis de 20 gramos/vaca/día a través de una tolva de dosificación automática adicional en el box de ordeño donde se suministra el alimento balanceado.

Tabla 32: Composición promedio de la dieta suministrada a las vacas del grupo control y tratado durante los 20 meses

Ingredientes	Primavera- Verano	Otoño-Invierno
	Kg de MS/vaca/día	
Silaje de maíz	2,5	6,4
Silaje de trigo	2,5	-
Semilla de Algodón	2,2	2,2
Harina de soja	1,5	1,7
Pellet de girasol/Cáscara de soja	2	2
Balanceado comercial	5,3	6,2
Pastura alfalfa/avena	6	3
Heno de alfalfa	1,5	2
Total	23,5	23,5

Referencia: MS= Materia Seca

2.2. Muestras

2.2.1. Alimentos

Un total de 60 alimentos fueron muestreados mensualmente durante 20 meses para la determinación de AFB₁. El procedimiento para la determinación de AFB₁ en los alimentos fue detallado en el Capítulo I.

2.2.2. Leche

Se tomaron un total de 540 muestras individuales de leche de vaca en cada período descrito para la determinación de aflatoxina M₁, a excepción del período (-1). La metodología de análisis fue descrita en el Capítulo I.

2.2.3. Sangre

Se analizaron un total de 600 muestras de sangre de vaca individual en cada período descrito para análisis de componentes bioquímicos de la misma.

Para ello, se realizaron extracciones de 5 ml de sangre por punción yugular con agujas estériles, previa desinfección de la zona con alcohol 96°. La sangre extraída se colocó en tubos de centrifuga para la obtención de suero, donde posteriormente

permaneció en estufa a 37°C durante 2 horas para favorecer la coagulación. Seguidamente fueron colocadas en refrigeración a 5°C para la retracción del coágulo. Finalmente las muestras fueron centrifugadas durante 15 min a 2500 rpm hasta separación de fases. El suero se traspasó a microtubos correctamente rotulados. Todas las muestras se conservaron congeladas a -20° hasta su posterior análisis.

En suero, se analizaron distintos indicadores para comprobar los efectos de los tratamientos sobre la función hepática: Bilirrubina Directa (BD), Indirecta (BI) y Total (BT) fueron determinadas mediante método colorimétrico, Gamma Glutamil Transpeptidasa (GGT) y Ácidos Grasos No Esterificados (NEFA) fueron determinados por método espectrofotométrico, transaminasa oxalacética glutámica (GOT) por método UV optimizado (IFCC), Acido β-Hidroxibutírico (BHBA) por método enzimático. Los indicadores del estado energético más comúnmente utilizados son las concentraciones de NEFA y BHBA durante el período puerperal de la vaca, por lo que únicamente fueron medidos durante los períodos 0, 1 y 2 de este ensayo.

2.3. Tasa de transferencia de AFB₁ a AFM₁ en leche

La tasa de transferencia fue calculada como se describió en el CAPITULO I. Es decir, a partir de los datos de consumo y concentración de AFB₁ en los alimentos de las vacas y de la producción y concentración de AFM₁ en la leche producida por las mismas, se calculó la proporción de AFB₁ que fue excretada en leche como AFM₁.

$$TT = \frac{\text{Excreción de AFM1 leche } (\mu\text{g/vaca})}{\text{AFB1 ingerida } (\mu\text{g/vaca})}$$

Donde la excreción de AFM₁ en la leche y la AFB₁ ingerida, se calculan como:

$$\text{Excreción } (\mu\text{g/vaca}) = \text{AFM1 leche } (\mu\text{g/l}) * \text{Produccion leche } (\text{l/vaca})$$

$$\text{Ingesta AFB1 } (\mu\text{g/vaca}) = \text{AFB1 alimentos } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{kg}}\right) * \text{consumo de alimento } (\text{Kg/vaca})$$

2.4. Indicadores productivos, reproductivos y sanitarios

Con el objetivo de evaluar el efecto de las aflatoxinas sobre la performance de las vacas y la respuesta inmune a lo largo de la lactancia, mensualmente se monitoreó

en las vacas los siguientes eventos patológicos diagnosticados por un profesional veterinario, los cuales fueron clasificados como:

- *Patologías de la glándula mamaria*: Mastitis
- *Patologías dérmicas*: Dermatitis, úlcera en glándula mamaria, absceso en ubre.
- *Patologías podales*: Contusión solar, úlcera interdigital, úlcera coronaria, fisura en muralla, laminitis.
- *Patologías uterinas*: endometritis, metritis, retención de membranas fetales, involución uterina lenta.
- *Aborto*
- *Patologías metabólicas y digestivas*: acidosis, caída de producción, indigestión ruminal, hipocalcemia, diarreas con disminución de producción, desplazamiento de abomaso.
- *Patologías ováricas*: quistes ováricos.

Adicionalmente, se relevaron para cada período otros indicadores como: condición corporal (escala 1 al 5), recuento de células somáticas en leche (cel./ml), producción de leche (litros/día), grasa en leche (%), proteína en leche (%) y consumo de alimentos (Kg MS/vaca/día).

2.5. Análisis estadístico

La diferencia entre los tratamientos se evaluó mediante modelos lineales generalizados (MLG) con medidas repetidas para los distintos períodos muestreados. Las funciones de enlace fueron definidas de acuerdo a la distribución de frecuencias de las variables de resultado. Los análisis estadísticos se realizaron con el software InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2012).

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. Alimentos

La presencia natural de AFB₁ en la dieta suministrada a todas las vacas en lactancia fue, en promedio, de 2,31 ± 1,64 µg/kg de materia seca. El consumo de materia seca (MS) promedio fue de 23,5 ± 2,6 kg de MS/vaca/día.

Las concentraciones promedio de AFB₁ para las pasturas, balanceado comercial y PMR se muestran en la Tabla 33.

Tabla 33: Media (M) ± desvío estándar (DE), mínimo (Min.) y máximo (Max.) niveles de aflatoxina B₁ (µg/kg) en los alimentos evaluados durante 20 meses

Alimentos	n	M ± DE	Min	Max	Nº de muestras positivas, n (%)	Exceden el límite, n (%)	
						20 µg/kg ^a	5 µg/kg ^b
Pasturas	20	2,36 ± 2,02	0,3	7,4	11 (55)	0 (0)	3 (15)
Balanceado	20	1,24 ± 0,86	nd	2,5	3 (15)	0 (0)	0 (0)
PMR ^c	20	3,34 ± 2,04	nd	7,0	9 (45)	0 (0)	3 (15)
Promedio dieta	60	2,31 ± 1,64	0,0	7,4	23 (38)	0 (0)	6 (10)

nd: < al límite de detección

^a Límite del MERCOSUR (20 µg/kg); ^b Límite Unión Europea (5 µg/kg)

^c PMR= Ración Parcialmente Mezclada

La Unión Europea (UE) (Comisión Europea, 2002) y el MERCOSUR (MERCOSUR, 2002) determinan un nivel máximo de 5 y 20 µg/kg de AFB₁ en los alimentos para el ganado lechero, respectivamente. En este estudio, el 10% de los alimentos ofrecidos al ganado lechero excedió el valor establecido por la UE, pero ninguno de ellos, el valor establecido por el MERCOSUR (Tabla 33).

Los mayores valores de AFB₁ se detectaron en la PMR, seguidos por lo hallados en las pasturas, lo cual coincide con los resultados que se obtuvieron en relevamientos anteriores (Gaggiotti *et al.*, 2001; Michlig *et al.*, 2016). Sin embargo, las concentraciones naturales de AFB₁ en la dieta de vacas lecheras fueron, en términos generales, bajas.

3.2. Efectos del secuestrante sobre la concentración de AFM₁ en leche y la tasa de transferencia

Los niveles promedio de AFM₁ observados en el grupo control y tratado fueron de 0,016 ± 0,002 µg/l y 0,008 ± 0,001 µg/l, respectivamente. Las concentraciones de AFM₁ en la leche mostraron una reducción significativa ($P < 0,001$) cuando las vacas recibieron 20 g/vaca/día de secuestrantes en la dieta (Tabla 34).

Tabla 34: Concentración de AFM₁ en leche, tasa de conversión de AFB₁ a AFM₁ en la leche y porcentaje de reducción de AFM₁ (%) en el grupo control y tratado.

Grupos	Concentración AFM ₁ en leche (µg/l)	Excreción AFM ₁ en leche (µg/día)	Tasa de transferencia (%)	% de reducción de	
				AFM ₁ en leche	Tasa transferencia
Control	0,016	0,551	2,19	-	-
Tratado	0,008	0,272	0,77	50	65

Los valores de AFM₁ en la leche de las vacas sin incorporación de secuestrantes en la dieta fueron similares a los obtenidos en los diferentes ensayos que formaron parte de esta tesis, presentados en los capítulos I y II, y a los reportados por la bibliografía (López *et al.*, 2003).

Aún con bajas concentraciones de AFB₁ presentes en los alimentos, se detectó la presencia de AFM₁ en la leche por sobre el límite establecido por la Unión Europea (UE) de 0,05 µg/l, en 14 muestras de leche de vaca individual (EC N° 1881/2006). Las mismas fueron detectadas en el grupo control (n=11) en diferentes períodos de muestreo y en el grupo tratado (n=3) en días posteriores al parto (período 0), es decir al inicio de ensayo. Sin embargo, todas las muestras de leche de vaca individual presentaron niveles de AFM₁ por debajo de los niveles establecidos por la legislación del MERCOSUR (0,5 µg/l) (MERCOSUR, 2002).

Si bien, los valores de concentración promedio de AFM₁ en ambos grupos fueron bajos, el efecto del secuestrante permitió obtener concentraciones de 6,2 veces por debajo del límite establecido por UE (0,05 µg/l) y de 62 veces inferior al límite establecido por el MERCOSUR (0,5 µg/l).

La tasa de transferencia promedio fue de 2,19% y 0,77% en el grupo control y tratado, respectivamente, presentando diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,001$) indicando que existe un efecto del secuestrante sobre la transferencia a leche de la aflatoxina presente en los alimentos (Tabla 34). Estos valores estuvieron de acuerdo con los mencionados por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2004) como predecibles para las tasas de transferencia en vacas lecheras (1-6%).

En la *Figura 14* se muestra la evolución de la excreción de AFM₁ en leche y la producción diaria por vaca, a lo largo del período de lactancia del grupo control y tratado. Como se puede observar, ambos grupos al inicio de lactancia (período 0) tuvieron una excreción inicial en leche de 0,45 (µg/día), producto de una concentración inicial de 0,016 µg/l en leche y una producción diaria de 23,4 l/día. A medida que avanzó la etapa de lactancia, el efecto del secuestrante en el grupo tratado redujo la excreción en leche a niveles de 0,04 µg/día independientemente de los niveles de producción de leche. Por el contrario, la excreción de AFM₁ en leche en el grupo control varió de acuerdo a la curva de producción de leche alcanzando niveles de 0,4 µg/día al final de la lactancia.

Numerosos estudios (Battacone *et al.*, 2003; Masoero *et al.*, 2007; Fink-Gremmels, 2008; Britzi *et al.*, 2013) afirman que la tasa de transferencia aumenta exponencialmente con la producción de leche, lo cual fue observado durante el presente trabajo para el grupo control. Sin embargo, cuando se agrega secuestrante a la dieta de vacas lecheras, la tasa de transferencia se hace insensible al nivel productivo de las vacas.

La producción de leche ha sido identificada como los principales factores que contribuyen al aumento de la tasa de transferencia (Veldman *et al.*, 1992; Masoero *et al.*, 2007), al igual que lo observado en el capítulo II de esta tesis, donde se encontró que la tasa de transferencia estaba condicionada, entre otros factores, por la producción de leche. Por lo tanto, estos resultados indicarían que la adición de

secuestrantes en la dieta permitiría reducir la tasa de transferencia independientemente del nivel productivo de las vacas lecheras.

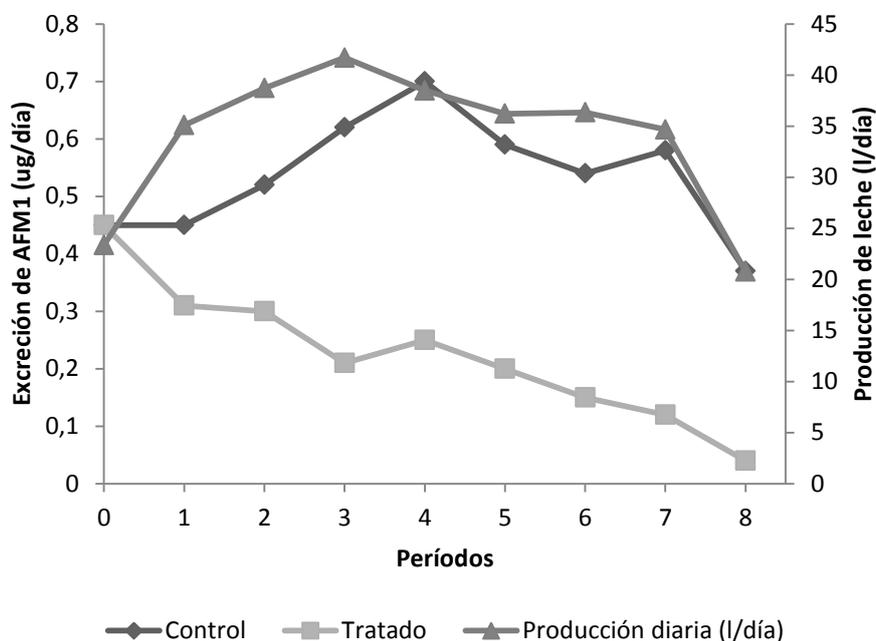


Figura 14: Evolución de la excreción de AFM₁ en leche y la producción de leche durante el período de lactancia de las vacas en el grupo control y tratado.

En varios estudios se han utilizado productos adsorbentes orgánicos o inorgánicos para estudiar sus efectos sobre la transferencia de AFB₁ presente en la dieta a AFM₁ en la leche con reducciones de AFM₁ dispares. Stroud (2006) comparó 8 agentes secuestrantes, incluidos 3 combinaciones de productos de levadura y arcilla y 5 productos de arcilla y reveló que una de las combinaciones levadura-arcilla y tres productos de arcilla redujeron en un 40% la concentración de AFM₁ en la leche con dosis del 0,5% (100 g/vaca/día) de la dieta de vacas lecheras, las cuales ingirieron 170 µg de AFB₁/kg de MS. Kutz *et al.* (2009) agregaron una preparación de cultivo celular de levadura modificada al 0,56% (12 g/vaca/día) a la dieta y observaron una reducción del 4% en la concentración de AFM₁ en la leche en vacas lecheras que recibieron 112 µg de AFB₁/kg de MS. Queiroz *et al.* (2012) encontraron una reducción del 17% de

AFM₁ en la leche en respuesta a la adición de aluminosilicatos de calcio y sodio hidratados al 0,2% y 1% (5 y 20 g/vaca/día) de la dieta.

Battacone *et al.* (2009) y Firmin *et al.* (2011), después de agregar pared celular de levadura (12 g/vaca/día) y levadura seca (2 g/kg de MS) en dietas que contenían aflatoxina (60 µg de AFB₁/kg de MS), no afectaron la concentración de AFM₁ en la leche de ovejas lecheras. Diaz *et al.* (2004) informaron que tres productos de bentonita de sodio y un producto de la pared celular de levadura redujeron la concentración de residuos de AFM₁ en la leche en un 50 a 65% a dosis de 10 g/día adicionado a una dieta de vacas lecheras contaminada con 55 µg de AFB₁/kg de MS. Un estudio reciente de Xiong *et al.* (2015) mostraron que un producto a base de levadura y montmorillonita sódica redujo la transferencia de aflatoxina a la leche en un 17% a una dosis de AFB₁ baja (20 µg/ kg) pero no tuvo efecto a una dosis de AFB₁ alta (40 µg/kg) con reducciones de sólo 2%. Es decir, que los agentes secuestrantes a base de pared celular de levadura resultaron secuestrantes efectivos de AFB₁ cuando la concentración de toxina en la dieta era menor (Diaz *et al.*, 2004; Xiong *et al.*, 2015).

Los resultados obtenidos por Díaz *et al.* (2004) coinciden con lo hallado en nuestro estudio, con concentraciones naturales de AFB₁ en la dieta muy inferiores. Además, en este experimento se obtuvo una tasa de transferencia en el grupo control (sin adición de secuestrante) de 2,25%, similar a la obtenida en el presente estudio. Los valores de tasa de transferencia (0,95%, 0,78% y 1,13%) así como las reducciones (61%, 65%, 50%) alcanzadas en los tres tratamientos probados fueron similares a las obtenidas en este estudio.

Según Xiong *et al.* (2015), la variabilidad de los datos informados sobre el efecto protector de los secuestrantes (principalmente levaduras) contra la excreción de AFM₁ en la leche en diferentes estudios puede estar relacionada con las diferencias en las especies animales utilizadas en los experimentos y en la composición de los productos probados.

En comparación con las especies monogástricas, los animales rumiantes generalmente se consideran menos susceptibles a los efectos adversos causados por la contaminación de los alimentos con aflatoxinas. Esto se basa en el supuesto de que la flora del rumen degradará e inactivará las micotoxinas, protegiendo así al animal. Sin embargo, las aflatoxinas resisten la degradación del rumen debido a que los rumiantes tienen un metabolismo complejo y muchos factores pueden influir en la capacidad de adsorción en el tracto gastrointestinal, causando distintos signos clínicos de intoxicación (Fink-Gremmels, 2008).

3.3. Efectos del secuestrante sobre la performance productiva y sanitaria de las vacas

No hubo diferencias significativas entre el grupo control y tratado en cuanto al consumo de MS, ingesta de AFB₁, producción de leche, composición química de la leche (contenido de grasa, proteína) y el recuento de células somáticas (Tabla 35).

Tabla 35: Medias \pm desvío estándar de consumo de materia seca (MS), ingesta de AFB₁, producción y composición de leche y recuento de células somáticas (RCS) en el grupo control y tratado.

Parámetros	Grupo Control	Grupo Tratado	P-valor
Consumo (Kg MS/vaca/día)	23,07 \pm 4,62	22,95 \pm 4,54	0,660
Ingesta AFB ₁ (μ g/día)	43,83 \pm 37,46	40,46 \pm 35,41	0,326
Producción de leche (l/día)	34,15 \pm 13,93	33,65 \pm 11,88	0,798
Grasa (%)	4,08 \pm 0,75	3,35 \pm 0,80	0,288
Proteína (%)	3,28 \pm 0,36	3,34 \pm 0,37	0,321
RCS (cel. \times 10 ³ /ml)	228 \pm 55	141 \pm 27	0,158

La bibliografía menciona que las principales manifestaciones de la aflatoxicosis en las vacas lecheras incluyen una disminución en el consumo de alimento, reducción de la producción de leche y cambios en su composición química (Gonçalves *et al.*, 2015). Sin embargo, algunos estudios han informado resultados contradictorios sobre los efectos de la AFB₁ en la ingesta de materia seca, producción y la composición de la leche, realizados con distintos secuestrantes (principalmente a base de arcillas y

extractos de levaduras). Gonçalez *et al.* (2004) observaron que 76,4 µg de AFB₁/kg en la dieta de vacas lecheras durante 6 meses eran suficientes para reducir la producción de leche.

Hallazgos similares fueron reportados por Queiroz *et al.* (2012), con vacas que recibieron 75 µg de AFB₁/kg de MS durante un período de 12 días con adición de diferentes dosis de adsorbente (arcilla como ingrediente principal; 0,2 o 1% de MS), con niveles más bajos de grasa y proteínas de la leche, pero sin efectos sobre la producción y la ingesta de MS. En contraste, Kutz *et al.* (2009) encontraron que las vacas lecheras alimentadas con 112 µg de AFB₁/kg de MS durante 28 días con dosis de secuestrantes a 0,56% de MS no tuvieron ninguna alteración en el consumo de alimento, producción de leche, porcentaje de grasa y proteína de la leche y recuento de células somáticas. Al igual que Xiong *et al.* (2015), en un ensayo con vacas lecheras alimentadas con dietas contaminadas a niveles de 0, 20 o 40 µg de AFB₁/kg de MS con dosis de secuestrantes a 0,25% de MS, reportó que no existían efectos significativos sobre la ingesta de materia seca, la producción y composición de la leche. Estos últimos estudios (Kutz *et al.*, 2009; Xiong *et al.*, 2015), coinciden con lo observado en el presente trabajo con una contaminación natural de AFB₁ y dosis de secuestrante incorporadas a la dieta (0,1% de MS) muy inferiores.

3.4. Efectos del secuestrante sobre indicadores de salud hepática

Los parámetros medidos en sangre de las vacas lecheras del grupo control y tratado se muestran en Tabla 36. No se observaron cambios estadísticamente significativos en ninguno de los parámetros evaluados sugiriendo que a las dosis naturales de AFB₁ a las que se encuentran expuestas las vacas lecheras, no afectaría la función hepática o la condición inmune en el medio interno de la vaca.

Tabla 36: Parámetros sanguíneos y condición corporal (CC) medido en vacas lecheras del grupo control y tratado

Parámetros	Grupo Control	Grupo Tratado	p-valor	Valor referencia
Bilirrubina directa (mg/dl)	0,09 ± 0,002	0,10 ± 0,002	0,130	0,20
Bilirrubina indirecta (mg/dl)	0,16 ± 0,005	0,16 ± 0,005	0,368	-
Bilirrubina total (mg/dl)	0,25 ± 0,008	0,26 ± 0,007	0,253	0,40
GOT (U/L)	90,57 ± 2,57	97,99 ± 4,29	0,138	≤95
GGT (U/L)	30,22 ± 1,71	33,75 ± 3,97	0,415	≤30
NEFA (meq/l)	0,67 ± 0,05	0,77 ± 0,08	0,268	0,1-0,9
BHB (mmol/l)	0,44 ± 0,02	0,60 ± 0,11	0,152	>1,2 - ≥2,5*
CC	2,78 ± 0,33	2,71 ± 0,29	0,351	2,75-3

* Cetosis sub-clínica: >1,2 mmol/l - Cetosis clínica: ≥2,5 mmol/L

Los parámetros GOT, GGT y bilirrubina se han propuesto como indicadores de la función hepática deprimida (Miller *et al.*, 1981). Esta condición, afecta la regulación y coordinación del metabolismo de lípidos durante el período de transición de la vaca, componente importante en la adaptación requerida para la lactancia (Noro y Bardoza, 2012). Una falla en estos mecanismos de compensación energética que inducen a la vaca a un balance energético negativo (BEN), causan cetosis, trastornos metabólicos y deficiente producción de leche (Ospina *et al.*, 2010).

Los parámetros NEFA y BHB en suero son indicadores de balance energético negativo en el ganado lechero posparto (Bell, 1995, Herdt y Dyk, 1997, Overton, 2003). Debido a este balance de energía negativo, se considera que las vacas en el período de transición son particularmente sensibles a la exposición de alimentos contaminados con aflatoxinas (Fink-Gremmels, 2008).

En este estudio, los valores promedio evaluados en suero estuvieron dentro del rango fisiológico a lo largo del período experimental, no observándose diferencias significativas en estos indicadores entre el grupo control y tratado (Tabla 36). Estos valores indican que las vacas de ambos grupos no se vieron afectadas en su función hepática debido a la exposición natural de AFB₁ en la dieta, permitiendo un adecuado balance energético de las vacas lecheras al inicio de la lactancia.

Consistente con el presente estudio, Battacone *et al.* (2005) informaron que la ingesta de 12 g/día de adsorbente (cultivo de levadura seca) no produjo cambios significativos en las concentraciones de GOT, GGT y bilirrubina de ovejas lecheras

alimentadas con una dieta contaminada con AFB₁ (1,13, 2,30 y 5,03 µg de AFB₁/kg de alimento). Xiong *et al.* (2015) informaron que agregar 20 o 40 µg/kg de AFB₁ a la dieta de las vacas lecheras no tuvo ningún efecto sobre las concentraciones de GOT y GGT.

La bibliografía informa que las dietas contaminadas con aflatoxina B₁ impactan directamente en la función hepática con la consecuente disminución de la inmunidad general del animal, lo que lleva a mayor predisposición del mismo a contraer enfermedades (Gonçalves *et al.*, 2015). La prevalencia de patologías presentadas por las vacas lecheras durante el período de lactancia, se muestran en la Tabla 37. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y tratado.

Tabla 37: Prevalencia (%) de patologías relevadas en vacas del grupo control y tratado a lo largo del período de lactancia.

Patologías	Grupo Control	Grupo Tratado	p-valor
De la glándula mamaria	8	6	0,459
Dérmicas	1	0	0,226
Podales	6	3	0,163
Uterinas	1	3	0,178
Abortos	1	1	0,688
Digestivas y metabólicas	1	2	0,634
Ováricas	1	1	0,998

Como se puede apreciar en la Tabla 37, no se observaron efectos agudos sobre la salud animal por el consumo de alimentos contaminados naturalmente con AFB₁, debido probablemente a los bajos niveles al que se encuentran expuesta las vacas lecheras. Es decir, cuando las vacas se ven expuestas a estos niveles de contaminación de la dieta, los efectos tóxicos descritos por la bibliografía (Marin *et al.*, 2002) no se observan, pudiendo reducirse a efectos de tipo crónico que no fueron objeto de la presente tesis.

3.5. Impacto de la aplicación de secuestrantes sobre la salud pública

Se realizó un análisis de escenario, que se utiliza para modelar el efecto que tendría la aplicación de alguna medida de manejo, en este caso la aplicación de secuestrante a la dieta de vacas lecheras, sobre la concentración de AFM₁ en la leche.

Considerando la reducción que se produce en la tasa de transferencia de AFB₁ a AFM₁ al agregar el secuestrante, se modeló por un lado, que porcentaje de leche producida en Argentina superaría los límites establecidos por las regulaciones internacionales y por el otro, la ingesta diaria estimada (IDE) de AFM₁ por el consumo de leche en niños de 6 a 23 meses de edad, determinada en el capítulo III como la población más expuesta a esta toxina.

Los valores que superan las normativas internacionales para aflatoxina M₁ en leche provenientes de datos relevados en la cuenca lechera central de Argentina, sin la utilización de secuestrantes fueron estimados en 24,9% y 43% para los límites establecidos por la Unión Europea para leche fluida (0,05 µg/Kg) y leche destinada a fórmulas infantiles (0,025 µg/Kg), respectivamente. Los datos obtenidos simulando la incorporación del secuestrante a la dieta de las vacas lecheras permitirían reducir los porcentajes de leche que superan estos límites a 7,26% y 17,54%, respectivamente.

De igual manera, pero considerando los límites establecidos por EE.UU y el MERCOSUR para leche fluida (0,5 µg/Kg), con la incorporación del secuestrante a la dieta de las vacas lecheras lograríamos reducir el porcentaje de leche que supera este límite al 0,2%, valor que ascendía a 0,9% sin la adición de secuestrante.

La IDE promedio sin la adición de secuestrantes en la dieta de las vacas lecheras fue estimada en $1,4 \times 10^{-3}$ µg/Kg peso corporal/día. Por su parte, la IDE promedio fue de $5,2 \times 10^{-4}$ µg/kg peso corporal/día cuando se simuló la adición de secuestrantes en la dieta de las vacas lecheras. En este sentido, la probabilidad de que la ingesta diaria de los niños de 6 a 23 meses superara la ingesta diaria tolerable (IDT) de 0,0002 µg/kg de peso corporal/día, fue estimada en un 46,2% y 33,1%, respectivamente.

Tomando en cuenta los datos anteriores es posible calcular el número de niños expuestos a IDE superiores a la IDT y su impacto en salud pública. De acuerdo al censo nacional 2010 (INDEC, 2012) en el país hay 2.029.712 niños entre 6 y 23 meses de edad. Se puede estimar entonces la cantidad de niños que superarían la

IDT de AFM₁ a partir del consumo de leche o productos lácteos en función del uso o no de secuestrantes en la alimentación de las vacas lecheras. Si las vacas no consumen secuestrantes, el número de niños con IDE>IDT se estima, en promedio, en 937.726, mientras que, si las vacas fueran suplementadas con secuestrantes, el número de niños expuestos se reduciría a 671.834, es decir, 265.892 niños menos expuestos.

4. CONCLUSIONES PARCIALES

La administración de secuestrante a razón de 20 g/vaca/día en dietas naturalmente contaminadas con bajos niveles de AFB₁ redujo la concentración de AFM₁ en leche y la tasa de transferencia respecto a las vacas que no lo recibieron.

La inclusión de un secuestrante en la dieta de vacas lecheras de alta producción no afectó la ingesta de materia seca, la producción y composición de la leche, el recuento de células somáticas, ni la función hepática a lo largo de la lactancia, probablemente debido a los bajos niveles de AFB₁ en dietas naturalmente contaminadas.

A estos niveles de exposición a los que se encuentran expuestas las vacas lecheras, no se apreciaron efectos metabólicos ni sanitarios sobre las mismas. Esta situación, de falta de signos clínicos en las vacas, dificulta el poder de convencimiento de los productores para la utilización del secuestrante en la dieta, y por ende, reducir los niveles de AFM₁ en la leche por su potencial impacto sobre la salud pública y el comercio internacional de lácteos.

Sin embargo, situaciones como la alta variabilidad en las condiciones climáticas sufridas en los últimos años que predisponen a los hongos a condiciones de estrés generando la toxina, sumado a que los granos y subproductos de alta calidad se destinan a monogástricos y los de menor calidad a rumiantes, las vacas lecheras de alta producción podrían sufrir algún efecto en su salud por lo que se hace necesario

incorporar secuestrantes a la dieta para reducir la transferencia de toxinas dentro de la cadena alimentaria.

La incorporación de esta medida de manejo, además podría mejorar la salud pública reduciendo los porcentajes de exposición de la población más susceptible al efecto de las micotoxinas por el consumo de leche y productos lácteos. Por otra parte, la reducción de los límites de AFM₁ debajo de los establecidos por las regulaciones internacionales permitiría mejorar la performance externa y acceder a mercados para leche, productos y subproductos lácteos como por ejemplo, el concentrado de proteínas de suero, que ocupa el segundo lugar en las exportaciones de nuestro país después de la leche en polvo con mercados importadores exigentes debido a su destino en la alimentación infantil.

CONCLUSIONES FINALES

La prevalencia y los niveles de los contaminantes evaluados, en la leche producida y comercializada en Argentina no es un problema de relevancia. Sin embargo, dado que los requisitos de calidad son cada vez más estrictos, cualquier reducción de los límites normativos internacionales tendría un grave impacto en la producción nacional. Por esa razón, Argentina debería mejorar su programa de monitoreo de contaminantes.

Los factores de riesgo identificados en los establecimientos, que explican la presencia de los contaminantes en la leche, estuvieron asociados a la implementación de prácticas de manejo inadecuadas. Las semillas de algodón fueron el ingrediente de mayor riesgo en las dietas de ganado lechero y las condiciones de almacenamiento de los subproductos en los establecimientos se asociaron a la presencia de AFM₁ en leche.

Se demostró la presencia de diferentes insecticidas en muestras de alimentos de origen animal, aunque los niveles detectados no representan riesgos considerables para la salud de los consumidores. De todos los plaguicidas evaluados, sólo uno superó los límites máximos permitidos establecidos para leche. La presencia de plaguicidas en la leche estuvo asociada a la falta de registro de las aplicaciones y de cumplimiento de los tiempos de carencia establecidos para los mismos.

Se detectaron altos contenidos de nitratos en las muestras de agua de la región bajo estudio y los factores de riesgo estuvieron ligados a características constructivas de los pozos de abastecimiento de agua y la distancia y ubicación de los mismos respecto a posibles fuentes de contaminación como corrales de encierre de los animales o pozos ciegos.

Si bien no se halló una correlación entre el contenido de nitratos en leche y en agua, y entre esta última y aspectos microbiológicos, la mayoría de las muestras

estuvieron contaminadas con bacterias del grupo coliformes, representando un alto riesgo sanitario, asociado a los factores enumerados. En este sentido, se requiere la puesta en marcha de un plan de buenas prácticas lecheras basadas en los factores identificados para minimizar los riesgos y asegurar una salud adecuada del ganado lechero y la población.

La tasa de transferencia de la aflatoxina B₁ contenida en los alimentos hasta aflatoxina M₁ en la leche estuvo asociada al nivel productivo de las vacas lecheras y al tamaño de partícula de la ración ofrecida a las mismas. Se comprobó que incorporando mejoras en la calidad de la dieta ofrecida, la tasa de transferencia se redujo a la mitad.

La AFM₁ tuvo un comportamiento diferencial pudiéndose reducir o concentrar respecto a los niveles presentes en la leche original con la cual fueron elaborados los distintos productos lácteos. Se demostró que debido a la solubilidad en agua de la AFM₁, se pueden lograr reducciones de la toxina en leche en polvo, obteniéndose concentraciones por debajo de los límites establecidos internacionalmente. Por otro lado, en el caso de los quesos, AFM₁ incrementa su concentración respecto a la leche original debido a su afinidad con la fracción de caseína de la leche. Los quesos duros presentan mayores concentraciones que los quesos blandos, debido probablemente a la pérdida de humedad. Sin embargo, una gran proporción de AFM₁ migra hacia el suero.

El destino de AFM₁ durante el fraccionamiento del suero de queso por tecnologías de membranas indica que las mismas pueden migrar hacia el concentrado de proteínas de suero. Por ende, la toxina podría estar presente en productos lácteos elaborados a partir de leche naturalmente contaminada a niveles bajos y su presencia no debe subestimarse, ya que puede tener un grave impacto la salud pública donde la leche y los productos lácteos son consumidos por todos los grupos de edad en el mundo, incluidos los bebés y los niños. Además, productos como el suero, que antes

se consideraba un desecho del proceso de elaboración de quesos, ahora se utilizan en la alimentación animal y como suplementos nutricionales para humanos.

La ingesta diaria estimada de AFM₁ es más alta que la ingesta permisible recomendada en las categorías de población infantil evaluada, siendo más baja para la población adulta. Aun así, los niños, considerados la población más susceptible, no estarían expuestos a un riesgo significativo por los efectos de AFM₁ a través del consumo de leche, aunque esta situación debería evaluarse a lo largo del tiempo, implementando medidas destinadas a minimizar los riesgos para la salud humana debido a las micotoxinas.

La dieta del ganado lechero presenta niveles de AFB₁ bajos, siendo los silajes, pasturas, balanceados comerciales y semillas de algodón los ingredientes de las dietas más correlacionados con el nivel de aflatoxinas en la leche. Aun así, su presencia está sujeta a una serie de factores: condiciones climáticas variables experimentadas en los últimos años con mayor prevalencia de aparición de la toxina en forrajes verdes, la mayor intensificación de los sistemas productivos lecheros con un mayor uso de alimentos cosechados y almacenados en condiciones muy diferentes. Otro aspecto relevante es la utilización de granos y subproductos de menor calidad utilizados para rumiantes, producto de la selección de alimento de alta calidad para monogástricos debido a la susceptibilidad de esta categoría animal a las micotoxinas.

Los resultados de este estudio remarcan la necesidad de establecer programas de monitoreo y control de estos alimentos, además de la implementación de buenas prácticas de manejo para prevenir y/o inhibir el crecimiento de hongos (mejorar las condiciones de cosecha y post-cosecha y las prácticas de almacenamiento) o agregar secuestrantes en las dietas que permitan bloquear la acción de las micotoxinas.

El uso de secuestrantes en la dieta del ganado bovino lechero contaminada naturalmente con AFB₁, generó una reducción marcada en la tasa de transferencia de AFB₁ a AFM₁, lo que permite adecuar los niveles de esta micotoxina a los estándares

internacionales para productos y subproductos lácteos. Por otro lado, se comprobó un impacto beneficioso en la salud pública, reduciendo los porcentajes de exposición de la población más susceptible al efecto de las micotoxinas por el consumo de leche y productos lácteos.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, R.S. (1986). Water Quality for Dairy Cattle. Pennsylvania State University. Dairy and Animal Science, 95 (8), 1130-2890.
- Agnihotri, N.P. (1999). Pesticide safety evaluation and monitoring, Published all India coordinated research project of pesticide residues division of agricultural chemical. New Delhi: Indian Agricultural Research Institute, 119-146.
- Akhtar, S. y Ahad, K. (2017). Pesticides Residue in Milk and Milk Products: Mini Review. Pakistan Journal of Analytical and Environmental Chemistry, 18 (1), 37-45.
- Alavanja, M.C.R., Sandler, D.P., McMaster, S.B., Zahm, S.H., McDonnell, C.J., Lynch, C.F., Pennybacker, M., Rothman, N., Dosemeci, M., Bond, A.E. y Blair, A. (1996). The Agricultural Health Study. Environment Health Perspective, 104 (4), 362-269.
- Albert, L. (1997). Introducción a la Toxicología Ambiental. Ed. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud/OPS/OMS – Metepec, Gobierno del Estado de México. 471 p.
- Alfaro, M. y Salazar, F. (2005). Ganadería y contaminación difusa, implicancias para el sur de Chile. Agricultura Técnica, 65 (3), 330-340.
- Alonso, L., Demetrio, P., Etchegoyen, M., y Marino, D. (2018). Glyphosate and atrazine in rainfall and soils in agroproductive areas of the pampas region in Argentina. The science of total environment, 645, 89 – 96.
- Alonso, V. A., Monge, M. P., Larriestra, A., Dalcero, A. M., Cavaglieri, L. R., y Chiacchiera, S. M. (2010). Naturally occurring aflatoxin M₁ in raw bulk milk from farm cooling tanks in Argentina. Food Additives and Contaminants: Part A, 27, 373-379.
- AOAC Official Method 2007.01. (2007). Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate Gas Chromatography/Mass Spectrometry and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry First Action 2007.
- AOAC. (1998) Official methods of analysis. Nº 976.05. Cuantificación de Nitrógeno Total y nitrógeno no caseínico. 15 ed. (Section 994.13:1084-1085).
- APHA (American Public Health Association). (2005b). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21th Ed. Washington DC, USA: American Public Health Association.
- Applebaum, R. S., y Marth, E. (1982). Fate of aflatoxin M₁ in cottage cheese. Journal of Food Protection, 45, 903-904.
- Aravind, K.L., Patil, V.S., Devegowda, G., Umakantha, B. y Ganpule, S.P. (2003). Efficacy of esterified glucomannan to counteract mycotoxicosis in naturally

- contaminated feed on performance and serum biochemical and hematological parameters in broilers. *Poultry Science*, 82, 571–576.
- Ardic, M., Karakaya, Y., Atasever, M., y Adiguzel, G. (2009). Aflatoxin M₁ levels of Turkish white brined cheese. *Food Control*, 20, 196-199.
- Arregui, M. C., Grenón, D., Sánchez, D. y Ghione, J. (2013). Evaluación del riesgo de impacto ambiental de plaguicidas en cultivos anuales del centro de Santa Fe. *Revista FAVE, Sección Ciencias Agrarias*, 12, 1-2. ISSN 1666-7719.
- Asi, M. R., Iqbal, S. Z., Arino, A. y Hussain, A. (2012). Effect of seasonal variations and lactation times on aflatoxin M₁ contamination in milk of different species from Punjab, Pakistan. *Food Control*, 25, 34-38.
- Avantaggiato, G. Havenaar, R., Visconti, A. (2007). Assessment of the multi-mycotoxin-binding efficacy of a carbon/aluminosilicate-based product in an in vitro gastrointestinal model. *Journal of agricultural and Food chemistry*, 55, 4810-9.
- Avery, A. A. (1999). Infantile methemoglobinemia: reexamining the role of drinking water nitrates. *Environment Health Perspective*, 107, 583-586.
- Bakirci, I. (2001). A study on the occurrence of aflatoxin M₁ in milk and milk products produced in Van province of Turkey. *Food Control*, 12, 47–51.
- Barbiroli, A., Bonomi, F., Benedetti, S., Mannino, S., Monti, L., y Cattaneo, T. (2007). Binding of aflatoxin M₁ to different protein fractions in ovine and caprine milk. *Journal of Dairy Science*, 90, 532-540.
- Battacone, G., Nudda, A., Cannas, A., Cappio Borlino, A., Bomboi, G., y Pulina, G. (2003). Excretion of aflatoxin M₁ in milk of dairy ewes treated with different doses of aflatoxin B₁. *Journal of Dairy Science*, 86, 2667-2675.
- Battacone, G., Nudda, A., Palomba, M., Mazzette, A., Pulina, G. (2009). The transfer of Aflatoxin M₁ in milk of ewes fed diet naturally contaminated by aflatoxins and effect of inclusion of dried yeast culture in the diet. *Journal of Dairy Science*, 88, 3063-3069.
- Battacone, 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.
- Baudracco, J., Lazzarini, B., Lyons, N., Braida, D., Rosset, A., Jauregui, J. y Maiztegui, J. (2014). Informe Final del Proyecto INDICES: cuantificación de limitantes productivas en tambos de Argentina, 97.
- Bavera, G., Beguet, H. y Bocco, O. (1999). Aguas de bebida para bovinos. Editorial Hemisferio Sur, 113.
- Bell, A.W. (1995). Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *Journal of Animal Science*, 73, 2804-2819.

- Berruga Fernández, M.I. (1999). Desarrollo de procedimientos para el tratamiento de efluentes de quesería. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Veterinaria. Madrid.
- Bilandzic, N., Bozic, D., Dokic, M., Sedak, M., Kolanovic, B.S. y Varenina, I. (2014). Seasonal effect on aflatoxin M₁ contamination in raw and UHT milk from Croatia. *Food Control*, 40, 260-264.
- Binder, E.M., Tan, L.M., Chin, L.J., Handl, J., y Richard, J. (2007). Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities feeds and feed ingredients. *Animal Feed Science and Technology*, 137, 265–282.
- Blanco, J. L., Dominguez, L., Gomez-Lucia, E., Garayzabal, J. F. F., Garcia, J. A., y Suarez, G. (1988). Presence of aflatoxin M₁ in commercial ultra-high-temperature-treated milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 1622-1623.
- Boland, M., MacGibbon, A., y Hill, J.P. (2001). Designer milks for the new millennium. *Livestock Production Science*, 72, 99–109.
- Boudra, H., Barnouin, J., Dragacci, S., y Morgavi, P. (2007). Aflatoxin M₁ and ochratoxin A in raw bulk milk from French dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 90, 3197-201.
- Brackett, R. E., y Marth, E. H. (1982a). Association of aflatoxin M₁ with casein. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 174, 439-441.
- Brackett, R. E., y Marth, E. H. (1982b). Fate of aflatoxin M₁ in parmesan and mozzarella cheese. *Journal of Food Protection*, 45, 597-600.
- Bradley, R. L.; Arnold, E.; Barbano, D. M.; Semerad, R. G.; Smith, D.E. y Vines, B. K. (1993). Chemical and physical methods. En: *Standard methods for the examination of dairy product*. (Ed.: Marshall, R.). American Public Health Association (APHA), Washington, Estados Unidos, 433-531.
- Britzi, M., Friedman, S., Miron, J., Solomon, R., Cuneah, O., y Shimshoni, J.A. (2013). Carry-over of Aflatoxin B₁ to Aflatoxin M₁ in high yielding Israeli cows in mid- and late-lactation. *Toxins*, 5, 173-183.
- Burden, E. (1961). The toxicology of nitrates and nitrites with particular reference to the potability of water supplies. *Analyst* 86 (1024), 429–433
- CAA (Codigo Alimentario Argentino). (2007). Bebidas Hidricas, Agua y Agua Gasificada. Capitulo XII. Agua Potable. Artículo 982 (Res. Conj. SPRyRS y SAGPyA N° 68/2007 y N° 196/2007). http://www.anmat.gov.ar/codigoa/Capitulo_XII_Agua_2007-05.pdf
- Campagnollo, F. B., Ganev, K.C., Khaneghah, A. M., Portela, J. B., Cruz, A.G., Granato D., Corassin, C.H., Oliveira, C A.F. y Sant'Ana, A.S. (2016). The occurrence and effect of unit operations for dairy products processing on the fate of aflatoxin M₁: A review. *Food Control*, 68, 310-329.

- Cano-Sancho, G., Marin, S., Ramos, A. J., Peris-Vicente, J. y Sanchis, V. (2010). Occurrence of aflatoxin M₁ and exposure assessment in Catalonia (Spain). *Revista Iberoamericana de Micología*, 27, 130-135.
- Cao, Z.Y., Shafer, T.J., Crofton, K.M., Gennings, C., y Murray, T.F. (2011). Additivity of pyrethroid actions on sodium influx in cerebrocortical neurons in primary culture. *Environment Health Perspective*, 119 (9), 1239–1246.
- Carbó, L.I., Herrero, M.A., Breglia Lahore, A., Polydor, S., Bontá, M.A., Urquiza, M. y Toro, S. (2014). Lixiviación de nutrientes por lluvias intensas tras la aplicación de estiércol y fertilizantes comerciales. *Revista Argentina de Producción Animal*. Volumen 34 (1). ISSN 2362-3640.
- Carbó, L., Flores, M. y Herrero, M.A. (2009). Well site conditions associated with nitrate contamination in a multilayer semiconfined aquifer of Buenos Aires, Argentina. *Environmental Geology*, 57 (7), 1489-1500.
- CASAFE (Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes). (2017). *Guía de Productos Fitosanitarios para la República Argentina*. 18^o ed. CASAFE (ed.) Argentina.
- CASAFE (Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes). (2016). *Datos del Mercado Argentino de fitosanitarios*. Disponible en: <http://www.casafe.org/publicaciones/estadisticas/>
- Cattaneo, T.M.P., Marinoni, L., Iametti, S., Monti, L. (2013). Behavior of Aflatoxin M₁ in dairy wastes subjected to different technological treatments: Ricotta cheese production, ultrafiltration and spray-drying. *Food Control*, 32, 77-82.
- 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.
- Cephecha, Z.L., Waskom, R.M., Bauder, T.A., Sharkoff, J.L. y Khosla, R. (2004). Vulnerability assessment of Colorado ground water to nitrate contamination. *Water, Air and Soil Pollution*, 159, 373-394.
- Charlon, V., Taverna, M., Herrero, M. A. (2002). El agua en el tambo. En: *Manual de referencia para el logro de leche de calidad*, 43-54. 1^o Ed., Rafaela, Santa Fe, Argentina: Ed. INTA Rafaela.
- Chowdhury, S., Sandberg, M., Themudo, G. E., y Ersboll, A. K. (2012). Risk factors for *Campylobacter* infection in Danish broiler chickens. *Poultry Science*, 91, 2701–2709.
- Claret, M., Urrutia, R., Ortega, R., Abarzua, M., Perez, C., y Palacios, M. (2003) Estudio de la contaminación en agua de pozo destinada a consumo humano y su expresión espacial en el secano mediterráneo de Chile. Disponible en: http://www.portofentry.com/site/root/resources/case_study/2076.html.

- Cockcroft, P.D. (1995). Sudden death in dairy cattle with putative acute aflatoxin B₁ poisoning. *Veterinary Record*, 136, 248.
- Colak, H. (2007). Determination of aflatoxin M₁ levels in turkish white and kashar cheeses made of experimentally contaminated raw milk. *Journal of Food and Drug Analysis*, 15, 163-168.
- Colvin, B.M., Harrison, L.R., Gosser, H.S., y Hall, R.F. (1984). Aflatoxicosis in feeder cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 184, 956–958.
- Comisión Codex Alimentarius. (2001). Comments submitted on the draft maximum level for aflatoxin M₁ in milk. Codex Committee on food additives and contaminants 33rd session, Hague, The Netherlands. Available at: ftp://ftp.fao.org/codex/Meetings/CCFAC/cfac33/fa01_20e.pdf.
- Compra, R., Perez, K. y Luiz, J. (1997). Occurrence of aflatoxins B₁ and M₁ in milk powder and UHT. *Food Control*, 29, 1-6.
- Cook, W.O., Richard, J.L., Osweiler, G.D., y Trampel, D.W. (1986). Clinical and pathologic changes in acute bovine aflatoxicosis: rumen motility and tissue and fluid concentrations of aflatoxins B₁ and M₁. *American Journal of Veterinary Research* 47, 1817–1825.
- Coscollá, R. (1993). Residuos de plaguicidas en alimentos vegetales. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. España, 205.
- Costa, M.J., Massone, H., Martinez, D., Suero, E.E., Vidal, C.M., Bedman, F. (2002). Nitrate contamination of a rural aquifer and accumulation in the unsaturated zone. *Agriculture, Waste and Management*, 57, 33-47.
- Costabel, L., Audero, G.M.L., Cuatrin, A., Costamagna, D. (2017). Desarrollo de un protocolo para la elaboración de quesos blandos miniatura. En: XVI Congreso de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Mar del Plata, Buenos Aires. ISBN 978-987-22165-8-0.
- Costamagna, D., Gaggiotti, M.C., Signorini, M. (2018). Ocurrencia natural de aflatoxina M₁ en leche de tanque proveniente de tambos de la cuenca lechera central de Argentina y factores de riesgo asociados. *Información Técnica de Producción Animal*. Publicación Miscelánea Año VI - N° 4. ISSN en línea 2314-3126VII.
- Costamagna, D., Signorini, M., Páez, R., Albertengo, A., Molineri, A., Gaggiotti, M., Vitulich, C., Taverna, M., Ricca, A., y Rojas, D. (2013). Factores de riesgos asociados a la presencia de aflatoxina M₁ en leche cruda en tambos de la cuenca lechera central santafesina. *Revista Argentina de Producción Animal*, 33 (1), 285-289. ISSN 2314-324X.
- CREHA (Residue and Food Hygiene National Control Plan). (2017). Resultados 2016. Disponible en: http://www.senasa.gob.ar/sites/default/files/ARBOL_SENASA/ANIMAL/ABEJAS/PROD_PRIMARIA/PLAN_CREHA/CTROL_RES/resumen_resultados_plan_creha_2016.pdf

- Creppy, E. E. (2002). Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*, 127, 19-28.
- Dallegrave, A., Pizzolato, T.M., Barreto, F., Bica, V.C., Eljarratc, E., y Barceló, D. (2018). Residue of insecticides in foodstuff and dietary exposure assessment of Brazilian citizens. *Food and Chemical Toxicology*, 115, 329–335.
- Damalas C. A. y Eleftherohorinos I. G. (2011). Pesticide exposure safety issues, and risk assessment indicators. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8 (5), 1402-1419.
- Davis, J., Truman, C., Kim, S., Ascough, J., y Carlson, K. (2006). Antibiotic transport via run off and soil loss. *Journal of Environmental Quality*, 35, 2250-2260.
- De La Canal, J. J. (1994). Código Alimentario Argentino, Tomo I, Capítulo XII, Art. 982, Ed. De la Canal y Asociados, Bs. As., Argentina, 331.
- De Roos, A.J., Ward, M.H., Lynch, C.F., y Cantor, K.P. (2003). Nitrate in public water supplies and the risk of colon and rectum cancers. *Epidemiology*, 14, 640–649.
- Deeb, B., y Sloan, K. (1975). Nitrates, nitrites and health, Bulletin 750. University of Illinois, Illinois, 52.
- Demonte, L., Michlig, N., Gaggiotti, M., Adamb, C., Beldoménico, H., y Repetti M.R. (2018). Determination of glyphosate, AMPA and glufosinate in dairy farm water from Argentina using a simplified UHPLC-MS/MS method. *Science of the Total Environment*, 645, 34–43.
- Deshpande, S.S. (2002). Fungal toxins. In: Deshpande SS, editor. *Handbook of food toxicology*. New York: Marcel Decker, 387-456.
- Deveci, O. (2007). Changes in the concentration of aflatoxin M₁ during manufacture and storage of White Pickled cheese. *Food Control*, 18, 1103-1107.
- Deveci, O., y Sezgin, E. (2006). Changes in concentration of aflatoxin M₁ during manufacture and storage of skim milk powder. *Journal of Food Protection*, 69, 682-685.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., y Robledo, C. W. (2012). InfoStat version 2012. InfoStat group, FCA, Cordoba National University, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Diaz, D.E., Hagler, J.W.M., Blackwelder, J.T., Eve, J.A., Hopkins, B.A., Anderson, K.L., Jones, F.T., y Whitlow, L.W. (2004). Aflatoxin binders II: Reduction of aflatoxin M₁ in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed. *Mycopathologia*, 157, 233–241.
- Díaz, P.B., Lans, C.E., y Barrera, V.J.L. (2012). Residuos de insecticidas organoclorados presentes en leche cruda comercializada en el departamento de Córdoba, Colombia. *Acta Agronómica*, 61(1), 10-15.

- DNL (Dirección Nacional Láctea). (2017). Secretaria de Agroindustria. Disponible en: https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/ss_lecheria/
- Dosako, S., Kaminogawa, S., Taneya, S., y Yamauchi, K. (1980). Hydrophobic surface areas and net charges of α s1-, κ -casein and α s1-casein: κ -casein complex. *Journal of Dairy Research*, 47(1), 123-129.
- Driehuis, F., Spanjer, M.C., Scholten, J.M., y te Giffel, M.C. (2008). Occurrence of mycotoxins in feedstuffs of dairy cows and estimation of total dietary intakes. *Journal Dairy Science*, 91, 4261–4271.
- Dutton, M. F., Mwanza, M., De Kock, S. y Khilosia, L.D. (2012). Mycotoxins in South African foods: a case study on aflatoxin M₁ in milk. *Mycotoxin Research*, 28, 17-23.
- Echeverría, H.E., y Bergonzi, R. (1995). Estimación de la mineralización de nitrógeno en suelos del sudeste bonaerense. *Boletín Técnico 135. Estación Experimental Agropecuaria INTA Balcarce*, 15.
- EFSA (European Food Safety Authority). (2004). Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to aflatoxin B₁ as undesirable substance in animal feed. *The EFSA Journal*, 39, 1–27.
- EFSA (European Food Safety Authority). (2009). Review of micotoxin-detoxifying agents used as feed additives: mode of actions, efficacy and feed/food safety. *Scientific Report. The European Food Safety Authority Journal*, 19-46.
- Elsanhoty, R.M., Salam, S.A., Ramadan, M.F. y Badr, F.H. (2014). Detoxification of aflatoxin M₁ in yoghurt using probiotics and lactic acid bacteria. *Food Control*, 43, 129-134.
- European Commission (2015). Health and Food Safety. Disponible en: http://ec.europa.eu/food/index_es.htm
- European Community. (2002). Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council of 7 May 2002 on undesirable substances in animal feed. *Official Journal of the European Communities*, L221-L232
- European Community. (2004). Regulation (EC) N° 683/2004 of 13 April 2004 amending Regulation (EC) N° 466/2001 as regards aflatoxins and ochratoxin A in foods for infants and young children. *Official Journal European Union* L106, 3–5.
- European Community. (2006). Commission regulation N° 1881/2006 of 19 December 2006, setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of European Communities*, L128-132.
- European Community. (2010). Commission Regulation (EC) N° 165/2010 of 26 February 2010 Amending Regulation (EC) N° 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. *Official Journal of European Communities*, L50, 8-12.

- Fallah, A.A., Jafari, T., Fallah, A., y Rahnama, M. (2009). Determination of aflatoxina M₁ levels in Iranian white and cream cheese. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 1872-1875.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2009). Declaración de la Cumbre Mundial sobre la Seguridad Alimentaria (pp. 1-8). Roma. Disponible en:
http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/Summit/Docs/Final_Declaration/K60_50S_WSFS_OEWG_06.pdf
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2011). La Seguridad Alimentaria: Información para la toma de decisiones. Disponible en:
<http://www.fao.org/docrep/014/al936s/al936s00.pdf>
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). (2002). Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas. Roma, 28 de Octubre – 2 de Noviembre de 2002.
- FAO/WHO. (Food and Agriculture Organization of the United Nations-World Health Organization). (2012). Codex Maximum Limits for Pesticides Residues. Codex Alimentarius Commission, FAO and WHO, Rome, Italy.
- FAO-WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations-World Health Organization). (2006). Food safety risk analysis. A guide for national food safety authorities. FAO Food and Nutrition Paper N° 87.
- FDA (Food and Drug Administration). (2011). Guidance for industry: Action levels for poisonous or deleterious substances in human food and animal feed. Disponible en:
<http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/ChemicalContaminantsandPesticides/ucm077969.htm>
- Fernandes, A.M., Correa, 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.
- Fink-Gremmels, J. (2008). Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: a review. *Food Additives and Contaminants*, 25, 172-180.
- Firmin, S., Morgavi, D.P., Yiannikouris, A., y Boudra, H. (2011). Effectiveness of modified yeast cell wall extracts to reduce aflatoxin B₁ absorption in dairy ewes. *Journal Dairy Science*, 94, 5611–5619.
- FUNPEL (Fundación para la Promoción y el Desarrollo de la Cadena Láctea Argentina) (2014). Lechería Argentina Anuario 2014. Disponible en:
<https://www.inta.gob.ar/lacteos/pdf/lecheria.pdf> .
- Gaggiotti, M., Signorini, M, Costamagna, D. Taverna, M y Ramos EE. (2014). Concentraciones de nitratos y nitritos en leche y en agua en tambos de la región centro de la provincia de Santa Fe (Argentina). *Revista Argentina de Producción Animal*, 34 (1), 237-240. ISSN 2362-3640.

- Gaggiotti, M.C., Basílico, J.C., Chiericatti, C., y Romero, L.A. (2004). Relevamiento de micotoxinas en alimentos para bovinos. Disponible en: https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_relevamiento_de_micotoxinas_en_alimentos_para_bo.pdf
- Gaggiotti, M.C., Basílico, J.C., Romero, L.A., y Basílico, M.L.Z. de., (2003). Eficacia del uso de vomitoxina como indicadora de la presencia de otras micotoxinas en silajes. En: 26º Congreso Argentino de Producción Animal. Mendoza, 23 y 24 de Octubre de 2003.
- Gaggiotti, M.C., Caffaratti, S., Romero, L., Basílico, J.C., Basílico, M.L.Z. de, y Comerón, E. (2001). Ensilajes de maíz y sorgo forrajero: influencia de la compactación sobre la calidad micotoxicológica. En: 24º Congreso Argentino de Producción Animal. Rafaela, 19 al 21 de setiembre de 2001.
- Galindo G., Herrero M. A., Korol, S., y Fernandez Cirelli, A. (2004). Water resources in the Salado river drainage basin, Buenos Aires, Argentina. Chemical and microbiological characteristics. International Journal of Water resources, 29 (1), 81-91.
- Gallino, R. (1994). Queso Reggianito Argentino: Tecnología de Fabricación. Pages 244-287 in Tecnología de los Productos Lácteos. Medios Audiovisuales y Gráficos- CERIDE, Eds. Diagramma S.A. Santa Fe, Argentina.
- Gallo, A., Masoero, F., Bertuzzi, T., Piva, G., y Pietri, A. (2010). Effect of the inclusión of adsorbents on aflatoxin B₁ quantification in animal feedstuffs. Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment, 27, 54-63.
- Galvano, F., Galofaro, V., De Angelis, A., Galvano, M., Bognanno, M., Galvano, G. (1998). Survey of the occurrence of aflatoxin M₁ in dairy products marketed in Italy. Journal Food Protection, 61, 738-741.
- Galvano, F., Galofaro, V., y Galvano, G. (1996). Occurrence and stability of aflatoxina M₁ in milk and milk products. A worldwide review. Journal of Food Protection, 59, 1079-1090.
- Gazzotti, T., Sticca, P., Zironi, E., Lugoboni, B., Serraino, A., y Pagliuca, G. (2009). Determination of 15 Organophosphorus Pesticides in Italian Raw Milk. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 82, 251-254.
- Gelberg, K., Church, L., Casey, G., London, M., Sue Roerig, D., Boyd, J., y Hill, M. (1999). Nitrate levels in drinking water in rural New York State. Environment Research, 80(1), 34-40.
- Gimeno, A. y Martins, M.L. (2011). Micotoxinas y Micotoxicosis en Animales y Humanos. Tercera Edición Special Nutrients, Inc. USA (Ed.). Talleres gráficos del SRL, Buenos Aires (Argentina). pp. 1-160.

- Gimeno, A., (2004). Aflatoxina M₁ no leite; riscos para a saúde pública, prevenção e controlo Alimentação Animal. Revista da Associação Portuguesa dos Industriais de Alimentos Compostos para Animais IACA, 49: 32-44.
- Giorda L., y Baigorri H. (1997). El cultivo de soja en Argentina. INTA Centro Regional Córdoba. EEA Marcos Juarez y EEA Manfredi. Editar (Ed), San Juan, Argentina. pp 448.
- Giordano, J.M.; Gallardo, M.; Bragachini, M.; Peiretti, J.; Cattani, P.; Casini, C. (2010). Uso del mixer para formular dietas balanceadas (TMR) en base a forrajes conservados. INTA - PRECOP II. Manual Técnico N° 7. ISSN 1667-9199.
- Glanville, T.D., Baker, J.L. y Newman, J.K. (1997). Statistical analysis of rural well contamination and effects of well construction. Trans ASAE 40(2), 363–370.
- Gonçalves, E., Pinto, M.M., Manginelli, S., y Felicio, J.D. (2004). Intoxicacao de vacas leiteiras por farelo de algodao naturalmente contaminado com aflatoxinas. Ciencia Rural, 34, 171–174.
- Gonçalves, B. L., Corassin, C.H., y Oliveira, C.A.F. (2015). Mycotoxins in dairy cattle: A review. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances, 10, 752–760.
- Gonzalez Pereyra, M. L., Alonso, V.A., Sager, R., Morlaco, M.B., Magnoli, C.E., Astoreca, A.L., Rosa, C.A.R., Chiacchiera, S.M., Dalcero, M., Cavaglieri, L.R. (2008). Fungi and selected mycotoxins from pre- and post-fermented corn silage. Journal of Applied Microbiology, 104, 1034–1041.
- González, C., Alarcón, P., Castellano, G., Echegaray, A., Iuliano, R., y Lara, I. (2013). Relevamiento de la utilización de agroquímicos en la provincia de Buenos Aires. Disponible en: https://www.agro.unlp.edu.ar/sites/default/files/paginas/informe_agroquimicos_comprimido.pdf
- Goss, M.J., Barry, D.A.J., y Rudolph, D.L. (1998). Contamination in Ontario farmstead domestic wells and its association with agriculture: 1. Results from drinking water wells. Journal Contaminant Hydrology, 32, 267–293.
- Gösta Bylund M. (2002). Manual de Industrias Lácteas Tetra Pack. Editor Madrid Vicente A. 1º Edición. Editorial Mundi-Prensa. Madrid.
- Goulart, S.M., de Queiroz, M.E.L.R., Neves, A.A., y de Queiroz, J.H., (2008). Low-temperature clean-up method for the determination of pyrethroids in milk using gas chromatography with electron capture detection. Talanta, 75 (5), 1320–1323.
- Gournama, H. y Bullerman, L.B. (1995). *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds: a review. Journal Food Protect, 58, 1395–1404.
- Guglielmo, A.A., Castelli, M.E., Volpogni, M.M., Medus, P.D., Anziani, O.S., y Mangold, A.J. (2001). Comparación de la concentración letal 50 de diazinón y cipermetrina para *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) entre áreas de

producción de leche o carne de Santa Fe y Entre Ríos, Argentina. *Revista de Medicina Veterinaria*, 82, 209-211.

Hallberg, G.R. (1989). Nitrate in ground water in the United States. In: Follett RF (ed) Nitrogen management and groundwater protection. Elsevier, Amsterdam, pp 33–74.

Harvey, R.B., Phillips, T.D., Ellis, J.A., Kubena, L.F., Huff, W.E., y Petersen, H.D. (1991). Effects on aflatoxin M₁ residues in milk by addition of hydrated sodium calcium aluminosilicate to aflatoxincontaminated diets of dairy cows. *Animal Journal Veterinarian Research*, 52, 1556–1559.

Heinrichs, J., y Kononoff, P. (2002). Evaluando el tamaño de partícula de forrajes y RTM usando el Nuevo Separador de Partículas de Forraje de Penn State. Disponible en: <http://extension.psu.edu/animals/dairy/nutrition/forages/forage-quality-physical/separator/evaluando-el-tamano-de-particula-de-forrajes-y-rtm-usando-el-nuevo-separador-de-particulas-de-forraje-de-penn-state>

Herdt, T.H., y Dyk, P.B. (1997). Plasma nonesterified fatty acid testing in the evaluation of dry cow nutrition. *Michigan Dairy Review*, 2 (1).

Hernandez-Mendoza, A., Guzman-de-Pena, D., y Garcia, H. S. (2009). Key role of teichoic acids on aflatoxin B₁ binding by probiotic bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 107, 395-403.

Herrero, M. A., Sardi, G., Orlando, A.A., Maldonado May, V., Ormazabal, J.J. (1997). Protagonistas del desarrollo sustentable: El agua en el sector agropecuario, caracterización de la pradera pampeana. En: Agua, Uso y Manejo sustentable, 53-80. Buenos Aires, Argentina, Ed. Grupo Aguas, AUGM, EUDEBA.

Herrero, M.A. (1998). El agua y su importancia en la producción ganadera, *Revista Georgica*, 6, 67-87.

Herrero, M.A. (2014). Uso y manejo del agua y efluentes en un área rural: Consecuencias sanitarias y ambientales de la intensificación de la producción primaria de leche. Disponible en: http://repositorioub.sisbi.uba.ar/gsd/collect/posgrauba/index/assoc/HWA_789.d/r/789.PDF

Herrero, M.A. y Gil, S.B. (2008). Consideraciones ambientales de la intensificación en producción animal. *Ecología Austral*, 18, 273-289.

Herrero, M.A., Flores, M.C., Carbó, L.I. y Korol, S.E. (2012). Contaminación del agua subterránea según condiciones de construcción y manejo de perforaciones. *Revista Argentina de Producción Animal*, 32 (1), 21-79.

Herrero, M.A., Korol, S., Fortunatto, M., Gonzales Chaves, A., Flores, M., Bevillaqua, S., Galindo, G., Maldonado May, V., Sardi, G. y Fernandez Cirelli, A. (2000a). Nitrate levels in drinking water in rural areas of Buenos Aires Province, Argentina. Xth world water congress, Melbourne Convention Centre, Melbourne, Australia, 12–17 March 2000.

- Herrero, M.A., Maldonado May, V., Sardi, G., Flores, M., Orlando, A. y Carbó, L. (2000b) Distribución de la calidad del agua subterránea en sistemas de Producción Agropecuarios Bonaerenses. 2. Condiciones de manejo y grado de contaminación Revista Argentina de Producción Animal, 20(3/4), 237–245.
- Hubbard, R.K., y Sheridan, J.M. (1989). Nitrate movement to groundwater in the southeastern coastal plain. Journal of Soil and Water Conservation, 44, 20–27.
- Hussein, H.S. y Brasel, J.M. (2001). Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on human and animals. Toxicology, 167, 101-134.
- Hwang, J.H., y Lee, K.G. (2006). Reduction of aflatoxin B₁ contamination in wheat by various cooking treatments. Food Chemistry, 98(1), 71-75.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). (2002). Some mycotoxins, naphthalene and styrene in IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans: International Agency for Research on Cancer. 82,171.
- IDF (International Dairy Federation). (1993). Milk. Determinations of nitrogen content. N° 20B. Brussels. Belgium.
- IDF (International Dairy Federation). (1995). Enumeration of somatic cells. FIL-IDF Standard N° 148A, Brussels, Belgium.
- IDF (International Dairy Federation). (1997). Milk and milk products. Determination of fat content (general guidance on the use of butyrometric methods). N° 152A. Brussels. Belgium.
- IDF (International Dairy Federation). (2004). Cheese and processed cheese. Determination of the total solids content. N° 4A. Brussels. Belgium.
- IDF (International Dairy Federation). (2013). ISO 9622 IDF 141: Milk and liquid milk products – Guidelines for the application of mid-infrared spectrometry. Brussels. Belgium.
- INDEC. (2012). Censo Nacional de Población, Hogares y Viviendas 2010: censo del Bicentenario: resultados definitivos, Serie B n° 2. - 1ª ed. - Buenos Aires: Instituto Nacional de Estadística y Censos - INDEC, 2012. v.1, 378 p. ISBN 978-950-896-421-2.
- INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria). (2011). Protocolo de Muestreo, Transporte y Conservación de Muestras de Agua con Fines Múltiples (consumo humano, abrevado animal y riego). Disponible en: https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-protocolo_de_muestreo_de_aguas_inta.pdf
- Iqbal, S. Z., Asi, M. R. y Jinap, S. (2013). Variation of aflatoxin M₁ contamination in milk and milk products collected during winter and summer seasons. Food Control, 34, 714-718.

- IRAM (Instituto Argentino de Normalización y Certificación). (2006). Milk. Determination of titratable acidity. Part 1: Alkalimetric titration without sample dilution. Disponible en: <http://web.iram.org.ar/>
- ISO 2920:2004 (IDF 58:2004). Whey cheese: Determination of dry matter (Reference method). Brussels. Belgium.
- ISO 7208:2008 (IDF 22:2008). Skimmed milk, whey and buttermilk” - Determination of fat content -- Gravimetric method (Reference method). Brussels. Belgium.
- ISO 8968-3:2004 (IDF 20-3:2004). Milk: Determination of nitrogen content. Part 3: Block-digestion method (Semi-micro rapid routine method). Brussels. Belgium.
- Jawaid, S., Talpur, F.N., Nizamani, S.M., y Afridi, H.I. (2015). Contamination profile of aflatoxin M₁ residues in milk supply chain of Sindh, Pakistan. *Toxicology Reports* 2, 1418–1422.
- JECFA. (2001). Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food – Prepared by the 56th meeting of the JECFA (Join FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) – FAO Food and Nutrition Paper 74/WHO Foods Additives Series 47.
- Jouany, J.P., y Díaz, D.E. (2005). Effects of mycotoxins in ruminants. In: D.E. Diaz (ed.), *The Mycotoxin Blue Book* (pp. 295-321). Nottingham University Press, Nottingham.
- Kamkar, A., Karim, G., Aliabadi, F. S., y Khaksar, R. (2008). Fate of aflatoxin M₁ in Iranian white cheese processing. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 2236-2238.
- Kampire, E., Kiremire, B., Nyanzi, S., y Kishimba, M. (2011). Organochlorine pesticides in fresh and pasteurized cow's milk from Kampala markets. *Chemosphere*, 84, 923-927.
- Kensler, T.W., Roebuck, B.D., Wogan, G.N., y Groopman, J.D. (2011). Aflatoxin: A 50-year odyssey of mechanistic and translational toxicology. *Toxicology Science*, 120, 28–48.
- Kiermeier, E. y Buchner, M. (1977). Verhalten von aflatoxin M₁ während der reifung and lagerung von kase. *Z Lebensm Unters Forsch*, 164, 87-91.
- Knobeloch, L., Salna, B., Hogan, A., Postle, J., y Anderson, H. (2000). Blue babies and nitrate-contaminated well water. *Environment Health Perspective*, 108, 675–678.
- Kross, B.C., Hallberg, G.R., Bruner, D.R., Cherryholmes, K., y Johnson, J.K. (1993). The nitrate contamination of private well water in Iowa. *Animal Journal Public Health*, 83 (2), 270–272.
- Kuilman, M.E.M., Maas, R.F.M., y Fink-Gremmels, J. (2000). Cytochrome P450-mediated metabolism and cytotoxicity of aflatoxin B₁ in bovine hepatocytes. *Toxicology in Vitro*, 14, 321–327.

- Kuiper-Goodman, T. (1990). Uncertainties in the risk assessment of three mycotoxins: aflatoxin, ochratoxin and zearalenone. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 68, 1017–1024.
- Kulldorff, M., y Nagarwalla, N. (1995). Spatial disease clusters: Detection and inference. *Statistics in Medicine*, 14, 799–810.
- Kutz, R.E., Sampson, J.D., Pompeu, L.B., Ledoux, D.R. Spain, J.N., Vazquez-Anon, M., y Rottinghaus, G.E. (2009). Efficacy of Solis, Novasil Plus, and MTB-100 to reduce aflatoxin M₁ levels in milk of early to mid lactation dairy cows fed aflatoxin B₁. *Journal Dairy Science*, 92, 3959–3963.
- Leblanc, J. C., Tard, A., Volatier, J. L., y Verger, P. (2005). Estimated dietary exposure to principal food mycotoxins from the first French total diet study. *Food Additives and Contaminants: Part A*, 22, 652-672.
- Lestremau, F., Willemin, M.E., Chatellier, C., Desmots, S., y Brochot, C., (2014). Determination of cis-permethrin, trans-permethrin and associated metabolites in rat blood and organs by gas chromatography-ion trap mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406 (14), 3477–3487.
- Lindner, E. (1995). *Toxicología de los Alimentos*. Zaragoza: Acribia AS.
- Liu, A., Ming, J., Ankumah, R.O. (2005). Nitrate contamination in private wells in rural Alabama, United States. *Science Total Environment*, 346 (1–3), 112–120.
- López, C.E., Ramos, L.L., Ramadan, S.S., Bulacio, L.C. y Perez, J. (2001). Distribution of aflatoxin M₁ in cheese obtained from milk artificially contaminated. *International Journal of Food Microbiology*, 64, 211–215.
- López, C.E., Ramos, L.L., Ramadan, S.S., y Bulacio, L.C. (2003). Presence of aflatoxin M₁ in milk for human consumption in Argentina. *Food Control*, 14, 31–34.
- López, C.E., Ramos, L.L., Ramadan, S.S., y Bulacio, L.C. (2003). Presence of aflatoxin M₁ in milk for human consumption in Argentina. *Food Control*, 14, 31–34.
- Lorenzatti, E., Maitre, M., y Lenardon, A. (2003). Evaluación de la contaminación con plaguicidas en productos lácteos. *Revista FAVE - Ciencias Veterinarias*, 2 (1).
- Luzardo, O., Almeida, M., Enríquez, L.A., Zumbado, M., Álvarez, E., y Boada, L.D. (2012). Polychlorobiphenyls and organochlorine pesticides in conventional and organic brands of milk: Occurrence and dietary intake in the population of the Canary Islands (Spain). *Chemosphere*, 88 (3), 307-15.
- Maiztegui, J., Delbino, M., Baudracco, J., Lazzarini, B., Lyons, N., Jauregui, J. y Rosset, A. (2014). Relevamiento de la calidad de agua de bebida para el ganado. Proyecto INDICES: Parte 3. Comunicación. *Revista Argentina de Producción Animal*, 34 (1), 345-463.
- Marin, D.E., Taranu, I., Bunaciu, R.P., Pascale, F., Tudor, D.S., Avram, N., Sarca, M., Cureu, I., Criste, R.D., Suta, V., y Oswald, I.P. (2002). Changes in performance,

blood parameters, humoral and celular immune responses in weanling piglets exposed to low doses of aflatoxin. *Journal of Animal Science*, 80, 1250–1257.

Masoero, F., Gallo, A., Diaz, D., Piva, G., y Moschini, M. (2009). Effects of the procedure of inclusion of a sequestering agent in the total mixed ration on proportional aflatoxin M₁ excretion into milk of lactating dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, 150, 34-45.

Masoero, F., Gallo, A., Moschini, M., Piva, G., y Diaz, D. (2007). Carry-over of aflatoxin from feed to milk in dairy cows with low or high somatic cell counts. *Animal*, 1, 1344–1350.

Mendonça, C., y Venâncio, A. (2005). Fate of aflatoxin M₁ in cheese whey processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 2067-2070.

MERCOSUR. (2002). Reglamento técnico MERCOSUR sobre límites máximos de aflatoxinas admisibles en leche, maní y maíz. GMC/RES. N° 25/02. Disponible en: www.mercosur.int

Michlig, N., Signorini, M., Gaggiotti, M., Chiericatti, C., Basílico, J.C., Repetti, M.R., y Beldomenico, H.R. (2016). Risk factors associated with the presence of aflatoxin M₁ in raw bulk milk from Argentina. *Food Control*, 64, 151-156.

Miller, D.M., Stuart, B.P., y Crowell, W.A. (1981). Experimental aflatoxicosis in swine: Morphological and clinical pathological results. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 45, 343–351.

Mohamadi Sani, A., Khezri, M. y Moradnia, H. (2012). Determination of aflatoxina M₁ in milk by ELISA technique in Mashad (Northeast of Iran). *International Scholarly Research Notices: Toxicology*, 2012, 1-4.

Morr, C.V. (1989). Whey proteins: manufacture, in *Developments in Dairy Chemistry*, Ed by Fox PF. Elsevier, London, 245–258.

Moschini, M., Masoero, F., Diaz, D.E., Gallo, A., Pietri, A., Piva, G. (2006). Plasma aflatoxin concentrations over time in bolus fed lactating dairy cows. *Journal of Animal Science*, 84 (1), 74.

Motawee, M. M., y McMahon, D. J. (2009). Fate of aflatoxin M₁ during manufacture and storage of feta cheese. *Journal of Food Science*, 74, 42-45.

Motawee, M.M. (2013). Reduction of aflatoxin M₁ content during manufacture and storage of egyptian domaiti cheese. *International Journal of Veterinary Medicine: Research and Reports*, 2013, 1-10.

MSA (Ministerio de Salud de Argentina). (2012). Alimentos Consumidos en Argentina. Resultados de la Encuesta Nacional de Nutrición y Salud -ENNyS 2004/5. Buenos Aires: Ministerio de Salud. Disponible en: <http://www.msal.gob.ar>.

Munksgaard, L., Larsen, L., Werner, H., Andersen, P. E., y Viuf, B.T. (1987). Carryover of aflatoxin from cows' feed to milk and milk products. *Milchwissenschaft*, 42, 165-167.

- Nag, S. K., Mahanta, S. K., Raikwar, M. K. y Bhadoria, B. K. (2007). Residues in milk and production performance of goats following the intake of a pesticide (endosulfan). *Small Ruminant Research*, 67, 235-242.
- Noro, M., y Barboza, C.S. (2012). Cetosis en rebaños lecheros: presentación y control. *Spei Domus*, 8(17), 48-58.
- Novo R., Cavallo A., Cragolini C., Nóbile R., Bracamonte E., Conles M., Ruosi G. y Viglianco A. (2011). *Protección Vegetal*. 4^o edición. Ed. SIMA. Córdoba. Argentina. 492 pp.
- NRC (National Research Council). (1974). *Nutrients and toxic substances in water for livestock and poultry*. National Academy of Sciences, Washington, DC, p 93.
- NRC (National Research Council). (1980). *Mineral Tolerance of Domestic Animals*. National Academy Press. Washington, DC.
- NRC (National Research Council). (2001). *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7th rev. ed. National Academy Press, Washington, DC.
- OCLA (Observatorio de la Cadena Láctea Argentina). (2016). *Documentos e informes*. Disponible en: <http://www.ocla.org.ar/>
- OCLA (Observatorio de la Cadena Láctea Argentina). (2018). *Gráficos y cuadros*. Disponible en: <http://www.ocla.org.ar/>
- Ortiz, S. (2012). *Evaluación del crecimiento de niños y niñas*. Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF) 86 p. ISBN: 978-92-806-4642-9.
- Oruc, H. H., Cibik, R., Yikmaz, E., y Kalkanli, O. (2006). Distribution and stability of aflatoxin M₁ during processing and ripening of traditional white pickled cheese. *Food Additives and Contaminants*, 23(2), 190-195.
- Ospina, P.A., Nydam, D.V., Stokol, T., y Overton, T.R. (2010). Association between the proportion of sampled transition cows with increased nonesterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate and disease incidence, pregnancy rate, and milk production at the herd level. *Journal Dairy Science*, 93, 3595-601.
- Overton, T.R. (2003). *Managing the metabolism of transition cows*. Proceedings of the 6th Western Dairy Management Conference, March 12-14, Reno, Nevada.
- Pagliuca, G., Serraino, A., Gazzotti, T., Zironi, E., Borsari, A., y Rosmini, R. (2006). Organophosphorus pesticides residues in Italian raw milk. *Journal Dairy Research*, 73, 340–344.
- Parslow, R.C., McKinney, P.A., Law, G.R., Staines, A., Williams, R., y Bodansky, H.J. (1997). Incidence of childhood diabetes mellitus in Yorkshire, northern England, is associated with nitrate in drinking water: an ecological analysis. *Diabetologia* 40(5), 550–556.
- Pedraza, C. (1998). *Calidad de agua en Chile para uso en lechería*. Trabajo presentado en el Seminario Internacional Calidad de Agua en predios lecheros y

su impacto en la cadena agroindustrial. FEPALE- INIA-Universidad de la Republica, Montevideo, p.12.

- Pengue, W. (2001). Expansión de la soja en Argentina. Globalización, desarrollo agropecuario e ingeniería genética: un modelo para armar. Disponible en: http://www.biodiversidadla.org/Principal/Secciones/Documentos/Transgenicos/Expansion_de_la_soja_en_Argentina_Globalizacion_Desarrollo_Agropecuario_e_Ingenieria_Genetica_Un_modelo_para_armar Activo Noviembre de 2013
- Pereira, M.M.G., Carvalho, E.P., Prado, G., Rosa, C.A.R., Veloso, T., y Souza, L.A.F., (2005). Aflatoxinas em alimentos destinados a bovinos e em amostras de leite da regio de Lavras, Minas Gerais e Brasil. Ciencia e Agrotecnologia, 29: 106-112.
- Phillips, T.D., Kubena, L.F., Harvey, R.B., Taylor, D.R., y Heidelbaugh, N.D. (1988). Hydrated sodium calcium aluminosilicate: A high affinity sorbent for aflatoxin. Poultry Science, 67, 243–247.
- Phillips, W., y Horn, G. (2008). Intake and digestion of wheat forage by stocker calves and lambs. Journal Animal Science, 86 (9), 2424-2429
- Picinin, L.C.A., Cerqueira, M.M., Vargas, E.A., Lana, A.M.Q., Toaldo, I.M. y Bordignon-Luiz, M.T. (2013). Influence of climate conditions on aflatoxin M₁ contamination in raw milk from Minas Gerais State, Brazil. Food Control, 31, 419-424.
- Picone, L.I., Andreoli, Y.E, Costa, J.L., Aparicio, V., Crespo, L., Nannini, J., Tambascio, W. (2003). Evaluación de nitratos y bacterias coliformes en pozos de la cuenca alta del Arroyo Pantanoso (BS. AS). Revista RIA, 32 (1), 99-110.
- Piva, G., Galvano, F., Pietri, A., y Piva, A. (1995). Detoxification methods of aflatoxins. A review. Nutrition Research, 15, 767-776.
- Pordomingo, A. (2009). Gestión ambiental en el feedlot. Guía de buenas prácticas. Inta, 99 p.
- Prado, G., Oliveira, M. S., Abrantes, F. M., Santos, L. G., Soares, C. R., y Veloso, T. (1999). Ocorrência de aflatoxina M₁ em leite consumido na cidade de Belo Horizonte - Minas Gerais/Brasil - agosto/98 a abril/99. Ciencia e Tecnologia de Alimentos, 19: 420-423.
- Prandini, A., Tansini, G., Sigolo, S., Filippi, I., Laporta, M. y Piva, G. (2009). On the occurrence of aflatoxin M₁ in milk and dairy products. Food Chem. Toxicol., 47, 984–991.
- Price, R.L, Paulson, J.H., Lough, O.G., Gingg, C., y Kurtz, A.G. (1985). Aflatoxin conversion by dairy cattle consuming naturally-contaminated whole cottonseed. Journal Food Protection, 48, 11–15.
- Queiroz, O.C.M., Han, J.H., Staples, C.R., Adesogan, A.T. (2012). Effect of adding a mycotoxin-sequestering agent on milk aflatoxin M₁ concentration and the performance and immune response of dairy cattle fed an aflatoxin B₁ contaminated diet. Journal Dairy Science, 95, 5901–5908.

- Rahimi, E., Bonyadian, M., Rafei, M., y Kazemeini, H.R. (2010). Occurrence of aflatoxin M₁ in raw milk of five dairy species in Ahvaz, Iran. *Food Chemical and Toxicology*, 48, 129–131.
- Ramos, A.J., y Hernandez, E. (1997). Prevention of aflatoxicosis in farm animals by means of hydrated sodium calcium aluminosilicate addition to feedstuffs: A review. *Animal Feed Science Technology*, 65, 197–206.
- RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed). (2017). 2016 Annual Report. European Commission. Disponible en: http://ec.europa.eu/food/safety/rasff/index_en.htm
- Richard, E., Heutte, N., Bouchart, V., y Garon, D. (2009). Evaluation of fungal contamination and mycotoxin production in maize silage. *Animal Feed Science Technology*, 148, 309–320.
- Rojas, D., Páez, R., Ricca, A., Albertengo, A. y Lingua, M. (2012). Residuos de pesticidas y aflatoxina M₁ en leche. Disponible en: <https://inta.gob.ar/documentos/residuos-de-pesticidas-y-aflatoxina-m1-en-leche>
- Rothwell, J.T., Burnett, T.J., Hacket, K., Chevis, R., y Lowe, L.B., (2001). Residues of zeta-cypermethrin in bovine tissues and milk following pour-on and spray application. *Pesticide Management Science*, 57, 993–999.
- Rudolph, D.L., Barry, D.A.J., y Goss, M.J. (1998). Contamination in Ontario farmstead domestic wells and its association with agriculture: 2. Results from multilevel monitoring well installations. *Journal of Contaminant Hydrology*, 32, 295-311.
- Rustom, I.Y.S. (1997). Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chemistry*, 59, 57-67.
- Rutkoviene, V., Kusta, A., y Eesoniene, L. (2005). Evaluation of the impact of anthropogenic factors on the pollution of shallow well water. *Ekologija*, 4, 13–19.
- Sachin, K., Anil, S., Rawat, S.S., Jain, D.K. and Ghosh, S. (2013). Use of pesticides in agriculture and livestock animals and its impact on environment of India. *Asian Journal of Environmental Science*, 8(1): 51-57.
- SAGPyA. (2016). Sistema de Pago de la Leche Cruda. Resolución 229 - E/16. Disponible en: <http://www.loa.org.ar/legNormaDetalle.aspx?id=28888>
- Schell, T.C., Lindemann, M.D., Kornegay, E.T., Blodgett, D.J., y Doerr, J.A. (2000). Effectiveness of different types of clay for reducing the detrimental effects of aflatoxin-contaminated diets on performance and serum profiles of weanling pigs. *Journal Animal Science*, 71, 1226–1231.
- SENASA, Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (2014). Estadísticas sobre indicadores ganaderos por estrato, categoría y provincia. Disponible en: <http://www.senasa.gob.ar/cadena-animal/bovinos-y-bubalinos/informacion/informes-y-estadisticas>

- SENASA, Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. (2012). Manual para la Aplicación de Fitosanitarios, Buenos Aires, Argentina. Disponible en: http://www.senasa.gob.ar/sites/default/files/ARBOL_SENASA/INFORMACION/GESTION%20AMBIENTAL/Manuales/6_Manual_Aplicadores.pdf
- Sengun, I.Y., Yaman, D.B., y Gonul, S.A. (2008). Mycotoxins and mould contamination in cheese: a review. *World Mycotoxin Journal*, 1, 291-298.
- Shaker, E.M., y Elsharkawy, E.E. (2015). Organochlorine and organophosphorus pesticide residues in raw buffalo milk from agroindustrial areas in Assiut, Egypt. *Environment Toxicology Pharmacology*, 39, 433.
- Shundo, L., Navas, S. A., Lamardo, L. C. A., Ruvieri, V., y Sabino, M. (2009). Estimate of aflatoxin M₁ exposure in milk and occurrence in Brazil. *Food Control*, 20, 655-657.
- Signorini, M.L., Gaggiotti, M., Molineri, A., Chiericatti, C.A., Zapata de Basílico, M.L., Basílico, J.C., y Pisani, M. (2012). Exposure assessment of mycotoxins in cow's milk in Argentina. *Food Chemical Toxicology*, 50, 250-257.
- Silva Busso, A. y J. Santa Cruz, (2005). Distribución de elementos traza en las aguas subterráneas del partido de Escobar, Buenos Aires, Argentina. *Ecología Austral*, 15, 31-47.
- Silva, R.A., Chalfoun, S.M., Silva, M.A.M., y Pereira, M.C. (2007). Inquerito sobre o consumo de alimentos possíveis de contaminação por micotoxinas na ingesta alimentar de escolares da cidade de Lavras, MG. *Ciencia e Agrotecnologia*, 31, 439-447.
- Škrbić, B., Živančev, J., Antic, I., y Godula, M. (2014). Levels of aflatoxin M₁ indifferent types of milk collected in Serbia: assessment of human and animal exposure. *FoodControl*, 40, 113–119.
- Spears, R.A., Kohn, R.A., y Young, A.J. (2003). Whole-farm nitrogen balance on western dairy farms. *Journal Dairy Science*, 86, 4178–4186.
- Spotti, M., Fracchiolla, M.L., Arioli, F., Caloni, F. (2005). Aflatoxin B₁ Binding to Sorbents in Bovine Ruminal Fluid. *Veterinary Research Communications*, 29(6), 507-15
- Stoloff, L., Park, D. L., y Van Egmond, H. P. (1991). Rationales for the establishments of limits and regulations for mycotoxins. *Food Additive and Contaminant*, 8, 213-221.
- Stroud, J.S. (2006). The effect of feed additives on aflatoxin in milk of dairy cows fed aflatoxin contaminated diets. MS Thesis. North Carolina State Univ., Raleigh.
- Suárez, V.H., Castelli, M.E., Aguirre, D.H., Alcaraz, E., Cafrune, M.M., Cetrá, B., Fader, O.W., Luciani, C.A., Mangold, A.J., Medus, P.D., y Guglielmone, A.A. (2006). El uso de insecticidas para el control de *haematobia irritans* (L.) (Diptera: muscidae) en la argentina. *Revista RIA*, 35 (2), 21-35.

- Taverna, M. (2012). Documento base del Programa Nacional de Leches. Disponible en: https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-documento_base_del_programa_nacional_leche.pdf
- Taverna, M., Charlon, V., Panigatti, C., Castillo, A., Serrano, P. y Giordano, J. (2004). Manejo de los residuos originados en las instalaciones de ordeno. INTA Rafaela, Argentina, 75.
- Taverna, M., Paez, R., Resconi, V., Fabro, M. y Speranza, J. (2005). Procedimiento de muestreo de leche en el tambo y de medición de volumen y temperatura INTA-INTI. Disponible en: https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_inti_procedimiento_de_muestreo_leche.pdf.
- Tecles, F., Tvarijonaviciute, A. y Cerón, J. J. (2013). Determination of whole blood cholinesterase in different animal species using specific substrates. Pakistan Veterinarian Journal, 33, 458.
- Terán, J. C., Paez, R., Pirola, M. B., y Schmidt, E. (2008). Características generales sobre el uso del suero de queso en la Provincia de Santa Fe. <http://www.ecosuero.com.ar/userfiles/image/2267Publicacion%20%20Gestion%20del%20Suero%20-%20INTA%20-%20INTI.pdf>.
- Tsakiris, I.N., Tzatzarakis, M.N., Alegakis, A.K., Vlachou, M.I., Renieri, E.A., y Tsatsakis, A.M. (2013). Risk assessment scenarios of children's exposure to aflatoxin M₁ residues in different milk types from the Greek market. International Journal of Food Microbiology, 56, 261–265.
- Tsiplakou, E., Anagnostopoulos, C.J., Liapis, K., Haroutounian, S.A., y Zervas, G., (2010). Pesticides residues in milks and feedstuff of farm animals drawn from Greece. Chemosphere, 80, 504–512.
- Unión Europea. (1992). Directiva 92/46/CEE del Consejo por la que se establecen las normas sanitarias aplicables a la producción y comercialización de leche cruda, leche tratada térmicamente y productos lácteos. 16 de junio de 1992. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/>
- Unusan, N. (2006). Occurrence of aflatoxin M₁ in UHT milk in Turkey. Food and Chemical Toxicology, 44(11), 1897-1900.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency). (1983). Land application of municipal sludge process design manual. Municipal Environmental Research Laboratory, Cincinnati, OH. U.S.A., Govt. Print Office.
- Vademecum Veterinario. (2017). Guía de Productos Veterinarios para la República Argentina. Disponible en: <http://www.vademecumveterinario.com>
- Van Egmond, H.P. (1989). Mycotoxins in Dairy Products. Elsevier, London, 24–25.
- Van Eijkeren, J.C.H., Bakker, M.I., Zeilmaker, M.J. (2006). A simple steadystate model for carry-over of aflatoxins from feed to cow's milk. Food Additive and Contaminant, 23(8), 833-838.

- Van Horn, H.H. y Wilcox, C.J. (1992). Large Dairy Herd Management. Ed. American Dairy Science Association, 260-271.
- van Maanen J.M.S., van Dijk, A., Mulder, K., de Baets, M.H., Menheere, P.C.A., van der Heide, D., Mertens, P.L.J.M., y Kleinjans, J.C.S. (1994). Consumption of drinking water with high nitrate levels causes hypertrophy of the thyroid. *Toxicology Letter*, 72, 365–374.
- Velasco, A., Hernandez, S., Ramirez, M., Ortiz, I. (2014). Detection of residual organochlorine and organophosphorus pesticides in agricultural soil in Rio Verde region of San Luis Potosi, Mexico. *Journal of Environmental Science and Health*, 49.
- Veldman, A. (1992). Effect of sorbentia on carry-over of aflatoxin from cow feed to milk. *Milchwissenschaft*, 47, 777–780.
- Veldman, A., Meijs, J.A.C., Borggreve, J., y Heeres-van der Tol, J.J. (1992). Carry-over of aflatoxin from cows' food to milk. *Animal Production*, 55, 163–168.
- Viglizzo, E.F., y Roberto Z.E. (1997). El componente ambiental en la intensificación ganadera. *Revista Argentina de Producción animal*, 17(3), 271-295.
- Vikram, V.M., y Maubois, J.L. (2017). Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. (McSweeney P.L.H., Fox, P. F., Cotter, P. D., Everett D. W.) En: *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Vol. 4.
- Weisenberger, D.D. (1990) Environmental epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma in Eastern Nebraska. *American Journal of Industrial Medicine*, 18(3), 303–305
- Winter, J.W., Paterson, S., Scobie, G., Wirz, A., Preston, T. y McCoU, K.E. (2007). N-nitrosamine generation from ingested nitrate via nitric oxide in subjects with and without gastroesophageal reflux. *Gastroenterology*, 133, 164-174.
- Winter, J.W., Paterson, S., Scobie, G., Wirz, A., Preston, T. y McCoU, K.E. (2007). N-nitrosamine generation from ingested nitrate via nitric oxide in subjects with and without gastroesophageal reflux. *Gastroenterology*, 133, 164-174.
- Wu, C., Feng, C., Qi, X., Wang, G., Zheng, M., Chang, X., y Zhou, Z. (2013). Urinary metabolite levels of pyrethroid insecticides in infants living in an agricultural area of the province of Jiangsu in China. *Chemosphere*, 90 (11), 2705–2713.
- Xiong, J. L., Wang, Y.M. Nennich, T.D., Li, Y., y Liu, J.X. (2015). Transfer of dietary aflatoxin B₁ to milk aflatoxin M₁ and effect of inclusion of adsorbent in the diet of dairy cows. *Journal Dairy Science*, 98, 2545–2554.
- Xiong, J.L., Wang, Y.M., Ma, M.R., y Liu, J.X. (2013). Seasonal variation of aflatoxin M₁ in raw milk from the Yangtze River Delta region of China. *Food Control*, 34, 703–706.
- Yeruham, I., Shlosberg, A., Hanjii, V., Bellaiche, M. y Liberboim, M. (1997). Nitrate toxicosis in beef and dairy cattle herds due to contamination of drinking water and whey. *Vet. Human Toxicology*, 39 (5), 296-298.

- Yiannikouris, A., Poughon, L., Cameleyre, X., Dussap, C.G., François, J., Bertin, G., Jouany, J.P. (2003). A novel technique to evaluate interactions between *Saccharomyces cerevisiae* cell wall and mycotoxins: application to zearalenone. *Biotechnology Letter*, 25, 783-789.
- Zeluta, A., Maurizi, A., Frigola, A., Esteve, M.J., Coli, R., y Burini, G. (2009). Antioxidant capacity of cow milk, whey and deproteinized milk. *International Dairy Journal*, 19, 380–385.
- Zinedine, A., Gonzalez Osnaya, L., Soriano, J., Moltó, J., Idrissi, L., y Manes, J. (2007). Presence of aflatox in M₁ in pasteurized milk from Morocco. *International Journal of Food Microbiology*, 114(1), 25–29.

Anexo I: Cuestionario para la evaluación de prácticas de manejo

PARTE A: CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS TAMBOS

FECHA:

NOMBRE DEL ESTABLECIMIENTO:.....

LOCALIDAD:PROVINCIA:

TELÉFONO:.....e-mail:.....@.....

Nº VACAS EN ORDEÑO (promedio anual):.....

PRODUCCIÓN DIARIA (litros / día promedio anual):

SUPERFICIE TOTAL DE LA EXPLOTACIÓN (en ha) (propia + arrendada):..... ..

SISTEMA DE PRODUCCIÓN:

- TAMBO
- TAMBO-CARNE
- TAMBO-CARNE-AGRICULTURA
- TAMBO-AGRICULTURA

CROQUIS DEL ESTABLECIMIENTO (Ubique todas las fuentes de agua)

PARTE B: POTENCIALES FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS CON LA PRESENCIA DE CONTAMINANTES EN LA LECHE

Micotoxinas

1.- Describa qué tipo de ración comen las vacas en ordeño en el establecimiento para la presente estación del año. Verifique y especifique el uso de **Suplementos minerales**.

Lote/s	INGREDIENTE	Kg/vaca/día	Alimento originado en el propio establecimiento	Alimentos externos (comprados, ingresados por canje, etc.)

2.- ¿Cómo conserva el heno?

A la intemperie Bajo techo Otra: _____

3.- ¿Con que frecuencia realiza ensilados en su establecimiento?

Siempre	<input type="checkbox"/>
A veces	<input type="checkbox"/>
Nunca	<input type="checkbox"/>

4.- ¿Desde cuándo incorporó los ensilados a la alimentación del rodeo lechero?

.....

5.- ¿Los ensilados se los provee a todo el rodeo? SI NO

Detallar:.....

6.- Tipos de forrajes disponibles, forma de almacenamiento y suministro:

Forrajes conservados	Forma de almacenamiento	Uso de Inoculantes	Forma de suministro

7.- ¿Conoce lo que son las micotoxinas? SI NO

8.- ¿Realizan análisis de micotoxinas a los ingredientes que emplean en las dietas?

Marque con una cruz (X)	¿Con qué frecuencia?
Siempre	
A veces	
Nunca	

9.- Si su respuesta fue "siempre" o "a veces", detalle a qué tipo de ingredientes le realizó los análisis, qué micotoxinas solicitó analizar y cuáles fueron los resultados del último análisis.

INGREDIENTE ANALIZADO	CONCENTRACIÓN

10.- ¿Qué decisiones tomó en función de los resultados de los análisis realizados? Detallar cuál fue el criterio para determinar si el contenido de micotoxinas era aceptable o no y qué acciones tomó si el contenido era inaceptable.

.....

11.- ¿Quién confecciona el silo?

Usted	
Contratista	
Otro	

→ Detallar:

12.- ¿Aplica algún secuestrante en la alimentación de sus vacas? SI NO

Observaciones:.....

13. Defina la categoría de extracción de silaje del establecimiento

BUENA	
REGULAR	
MALA	

14. Defina la categoría de distribución de silaje del establecimiento

BUENA	
REGULAR	
MALA	

Criterios para definir las categorías de **extracción**:

BUENA:

- Silo bolsa sin roturas. Cara expuesta cerrada, con estructura de ayuda (postes, varillas, etc.).
- No se observa agua o efluentes del silo en el lugar de extracción.

REGULAR:

- Silo bolsa sin roturas. Cara expuesta abierta, sin estructura de ayuda para el cierre (postes, varillas, etc.).
- Se observa moderada cantidad de efluentes del silo en el lugar de extracción.

POBRE:

- Silo bolsa con roturas. Cara expuesta abierta.
- Abundante cantidad de agua y efluentes del silo en el lugar de extracción.

Criterios para definir las categorías de **distribución**:

BUENA:

- Comederos en los cuales el alimento no está en contacto con el suelo.
- No hay residuos de alimentos de suministros anteriores.
- Sector de distribución en lugar alto, con muy baja concentración de barro y bosta y con rotación diaria.
- Desecho de la fracción de silaje que muestra evidentes características indeseables.

REGULAR:

- Comederos en los cuales el alimento está en contacto con el suelo. Hay residuos de alimentos con evidente deterioro en el sector de distribución.
- Sector de distribución con baja concentración de barro y bosta y con rotación periódica.

POBRE:

- Comederos en los cuales el alimento está en contacto con el suelo. Hay muchos residuos de alimentos de silaje con evidente deterioro en el sector de distribución.
- Elevada concentración de barro y bosta mezclados con el alimento ofrecido. No se rota periódicamente el lugar de ofrecimiento.
- Sector de distribución utilizado normalmente como nochero.
- Se ofrece a las lecheras el silaje con evidentes características indeseables.

15. Defina cómo es el almacenamiento de productos y subproductos de la industria

BUENA	
MALA	

Observaciones:

.....

Criterios para definir las categorías de **almacenamiento**:

BUENA

- Compra productos y subproductos con una certificación fiable.
- Contenido de humedad en el momento de la compra de los alimentos recomendado y que se mantenga en niveles bajos.
- El diseño de las instalaciones de almacenamiento de los alimentos impide el ingreso y proliferación de insectos y roedores.
- Los alimentos están dispuestos sobre tarimas (de madera o plásticas), separadas de paredes, pisos y techos.

MALA

- Compra productos y subproductos a proveedores sin una certificación fiable.
- Los alimentos ingresan con un alto contenido de humedad en el momento de la compra.
- El diseño de las instalaciones de almacenamiento de los alimentos permite el ingreso y proliferación de insectos y roedores.
- Los alimentos no están dispuestos sobre tarimas (de madera o plásticas), separadas de paredes, pisos y techos.

Plaguicidas

1.- ¿Qué porcentaje de la tierra disponible en su establecimiento es utilizada para pasturas y qué porcentaje a agricultura?

% pasturas: _____

% agricultura: _____

2.- CARACTERÍSTICAS DE LOS CAMPOS COLINDANTES (marcar con una X según la característica que posean los campos colindantes):

Establecimiento ubicado al:	Agricultura		Tambo	Ganadería	Mixto
		Cultivo más importante			
NORTE					
SUR					
ESTE					
OESTE					

3.- ¿Cuáles son las plagas más comunes en sus cultivos?, ¿Con qué productos las trata? (detallar solamente las aplicaciones realizadas en el cuatrimestre previo a la toma de muestras)

Cultivo	Plaga	Producto	Dosis	Método de aplicación (aéreo/terrestre)

4.- ¿Su Ing. Agrónomo hace un diagnóstico del daño, receta el producto y especifica el tiempo de carencia?

Si No

5.- ¿Cuál es la disposición final de los envases vacíos de agroquímicos?

.....

6.- ¿Lleva registros de los tratamientos aplicados?

Si No

7.- El equipo para la aplicación, es:

Propio	<input type="checkbox"/>
Contratado	<input type="checkbox"/>

8.- Independientemente de la respuesta anterior, ¿Poseen registro?

Si No

Nitratos y Nitritos

Tipos de fuente de agua del establecimiento

Bebida animal	Pozo (Molino)	<input type="checkbox"/>
	Perforación (Bomba)	<input type="checkbox"/>
	Otra	<input type="checkbox"/>
Limpieza de las instalaciones	Pozo	<input type="checkbox"/>
	Perforación (Bomba)	<input type="checkbox"/>
	Otra	<input type="checkbox"/>

Fuentes	Cantidad	Capacidad
Molinos		Prof. del cilindro (mts.)
Bombas		(Litro/h)
Tanque Australiano		(Litros)
Bebederos		(m ²)

Profundidad del pozo: metros.

Profundidad de la napa:metros.

Tipo de construcción del pozo:

Encamisado	<input type="checkbox"/>
No encamisado	<input type="checkbox"/>
Otro	<input type="checkbox"/>

Edad de la perforación:años.

Pendiente general del establecimiento

0,5 -1 % 2 - 4%

Precipitación promedio anual (mm/año):

En caso de existir; **precipitación promedio mensual:**

Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre

Distancia desde/ a: (metros)	Tambo	Laguna de efluentes	Corrales de alimentación	Cámara séptica
Bebida Animal				
Limpieza de Equipos				

¿Realiza algún manejo de los efluentes?

SI	NO
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

¿Cuál es el destino final de los efluentes?

Laguna	
Cuneta	
Depósito temporario (Estercolero)	
Otro	

N° de lagunas:

¿Están impermeabilizadas?

NO	<input type="checkbox"/>
SI	<input type="checkbox"/>

Tiempo de funcionamiento de cualquier manejo
que realiza: _____ años.

¿Con qué material?

¿Separa la parte sólida del líquido?

NO
SI → ¿Qué hace con la fracción sólida?

Fabricación de Compost
Venta como abono
Aplicación directa como fertilizante

<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>

Transformación en Biogás
Fabricación de Lombricomposto
Otros:.....

Distribución con carro volcador en potreros
Distribución con carro c/dispersores en potreros

<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>

¿Reutiliza los efluentes?

NO	
SI	



¿Sobre qué superficie aplica los efluentes y/o residuos sólidos?

Superficies	Efluente	R. solidos
Pasturas		
Verdeos		
Cultivos para cosecha		
Barbechos		
Otros		

¿Aplica fertilizantes químicos en su establecimiento?

NO	
SI	



Detalle:

Fertilizante	Dosis	Cultivos	Frecuencia de aplicación

¿Aplica abonos de

.....

Indique la ubicación de la laguna / deposito temporario con respecto a la perforación de agua.

Topografía: A nivel Pendiente arriba Pendiente abajo

Indique la ubicación de la laguna / deposito temporario con respecto al tambo.

Topografía: A nivel Pendiente arriba Pendiente abajo