



Universidad Nacional de Córdoba  
Facultad de Matemática, Astronomía y Física

TRABAJO FINAL  
Para obtener el título de  
**ESPECIALISTA EN CRIMINALÍSTICA Y ACTIVIDADES PERICIALES**  
Gestión de la Calidad Forense:

*Aflatoxinas AFM<sub>1</sub> en Leche de Consumo:  
Aspectos Toxicológicos y Metodológicos  
de Evaluación Pericial*

*Bioquímica Jessica Romina Altamirano*

Director: Dr. Enzo R. Bracamonte

2019



Aflatoxinas AFM<sub>1</sub> en Leche de Consumo: Aspectos Toxicológicos y Metodológicos de Evaluación Pericial. Por Altamirano, Jessica Romina. Se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).



**DIRECTOR**

.....  
BRACAMONTE, ENZO

**CO- DIRECTOR**

.....  
CELSO CAMUSSO

**COMISIÓN DE TRABAJO FINAL**

.....

**Nota:** .....

## **Agradecimientos**

A mi director Dr. MSc. Enzo R. Bracamonte, por ser mi guía en el trabajo, por su apoyo en lo profesional y en lo personal.

Al Dr. Celso Camusso por su colaboración y consejos.

Al encargado de la gestión de calidad de la planta Sancor: Mauricio Manci por su cálido recibimiento y sus aportes.

A mis padres, que me han dado su apoyo incondicional y a quienes debo este triunfo profesional, por todo su trabajo y dedicación para darme una formación académica y sobre todo humanística.

A todas aquellas personas que de un modo u otro colaboraron para que alcanzara hoy esta meta.

A todos, Gracias!

## Índice general

Resumen.....	1
Summary.....	3
Introducción.....	5
Concepto legal de lesión.....	5
Las lesiones y el código penal.....	5
Clasificación legal de las lesiones.....	6
Estudio legal de las lesiones causadas por agentes biológicos.....	6
Intoxicaciones alimentarias.....	6
Micotoxinas.....	6
Desarrollo del trabajo.....	11
Aflatoxinas.....	11
Mecanismo de acción de las aflatoxinas e impactos en la salud humana y animal.....	13
Toxicidad y riesgos para la salud pública.....	14
Clasificación de las aflatoxinas según su riesgo cancerígeno.....	16
Aflatoxina M1 (AFM1).....	16
La leche, composición e importancia como alimento.....	20
Presencia de aflatoxina M1 en leche.....	21
Límites de aflatoxina M1 en leche. Legislación.....	21
Control y prevención de contaminación por aflatoxina.....	22
Descontaminación y detoxificación.....	24
Gestión de la Calidad e Inocuidad de la industria láctea.....	30
Normas establecidas para la gestión de la calidad.....	31
BPM y la Norma IRAM NM-323:2010.....	31
Contaminación en el proceso de envasado industrial de la leche.....	32
Gestión de Calidad e Inocuidad en la industria láctea de Córdoba.....	34
Detección y cuantificación de aflatoxinas: marco metodológico base para las actividades periciales.....	39
Conclusiones.....	44
Consideraciones finales.....	46
Bibliografía.....	47
Anexo.....	54
Anexo 1.....	55

## Índice de Abreviaturas

- AFB<sub>1</sub>: aflatoxina B1. 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 25, 27, 28, 29
- AFB1-epóxido: aflatoxina B1-epóxido. 13
- AFB1-8,9-epóxido: aflatoxina B1-8,9-epóxido. 13
- AFG<sub>1</sub>: aflatoxina G1. 29
- AFM<sub>1</sub>: aflatoxina M1. 9, 11, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 25, 26, 32, 33
- AOAC: AOAC Internacional (Asociación de Químicos Analíticos Oficiales). 39
- Aw: Actividad de Agua. 12
- BPM: Buenas Prácticas de Manufactura. 31
- CAA: Código Alimentario Argentino. 20
- CIIC: Centro Internacional de Investigación sobre el Cáncer. 16
- DIEA: Dirección de Investigación y Estadística Agropecuaria. 20
- DL50: Dosis letal cincuenta. 14
- DON: Vomitoxina. 8
- ECS: Comité Europeo de Normalización (por sus siglas en inglés, *European Committee for Standardization*). 39
- ELISA: enzimoimmunoensayo (por sus siglas en inglés, *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*). 41, 42, 43
- epóxido-N-7 guanina: epóxido-Nitrógeno-7 guanina. 15
- ESIL: Escuela Superior Integral de Lechería. 34
- FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (por sus siglas en inglés, *Food and Agriculture Organization*). 19, 20, 21
- FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos (por sus siglas en inglés, *Food and Drug Administration*). 21
- GC/ MS: Cromatografía Gaseosa/Espectrometría de masas (por sus siglas en inglés, *Gas Chromatography/Mass Spectrometry*). 42

GMC: Grupo Mercado Común. 21

HACCP: Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (por sus siglas en inglés, *Hazard analysis and critical control points*). 22, 32, 35, 36, 37

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución (por sus siglas en inglés, *High Performance Liquid Chromatography*). 42, 43

IARC: Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (por sus siglas en inglés, *International Agency for Research on Cancer*). 19

MERCOSUR: Mercado Común del Sur. 21

MGAP: Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. 20

MVP: Medicina Veterinaria Preventiva. 30

N-7: Nitrógeno-7. 17

O<sub>3</sub>: Ozono. 28

OMS: Organización Mundial de la Salud. 16

OTA: Ocratoxina. 8

PCC: Punto crítico de control. 37

RIA: Radioinmunoensayo (por sus siglas en inglés, *Radioimmunoassay*). 41

SOP: Procesos de Operación Estándar (por sus siglas en inglés, *Standard Operating Procedures*). 30

SRP: resonancia de plasmones superficiales (por sus siglas en inglés, *Surface Resonance Plasmon*). 41

TIA: toxiinfecciones alimentarias. 9

UHT: Temperatura Ultra Alta (por sus siglas en inglés, *Ultra High Temperature*). 20

UPLC: Cromatografía Líquida de Ultra Performance (por sus siglas en inglés, *Ultra Pressure Liquid Chromatography*). 42

UV: Ultravioleta. 27, 39

ZEA: Zearalenona. 8



## Índice de Figuras

Figura 1. Fase de crecimiento fúngico y localización de la síntesis de micotoxinas.....	7
Figura 2. Estructura química de las aflatoxinas B1, B2, G1, G2 y M1.....	12
Figura 3. Biotransformación de la aflatoxina B1 en aflatoxina M1.....	17
Figura 4: Nuevo formato de envases de las Leches Sancor.....	35

## Índice de Tablas

Tabla 1. Principales Hongos productores de Micotoxinas.....	8
Tabla 2. Dosis letal cincuenta (DL50) de aflatoxinas.....	14
Tabla 3. Grado de carcinogénesis de las distintas micotoxinas.....	16
Tabla 4. Incidencia de aflatoxinas totales y de la AFM <sub>1</sub> en alimentos en América Latina	18
Tabla 5. Mercado mundial y consumo de leche en países desarrollados y en desarrollo.	19
Tabla 6. Límites máximos admisibles de concentración de aflatoxina M <sub>1</sub> en leche.....	21
Tabla 7. Reducción de AFM <sub>1</sub> en leche por pasteurización y esterilización.....	25
Tabla 8. Reducción de AFM <sub>1</sub> en alimentos por pasteurización y esterilización.....	26
Tabla 9. Ventajas y desventajas de métodos tradicionales y emergentes para el análisis de micotoxinas.....	43

## Resumen

En la actualidad existe una gran preocupación en los organismos de salud nacionales e internacionales debido a la incidencia de intoxicaciones causadas por la contaminación de los alimentos producidas por agentes biológicos de origen natural o antropogénica. Los efectos tóxicos agudos o crónicos sobre la anatomía y funcionalidad de las personas expuestas a contaminaciones químicas de alimentos involucran aspectos jurídicos que contemplan la presunción de daño anatómico-funcional del cuerpo o de la salud de las personas, los cuales deben ser considerados para su evaluación. Entre ellos, la presencia de la toxina AFM<sub>1</sub> en los sistemas productivos primarios no controlados y en plantas procesadoras lácteas cuyo efecto a largo plazo podría manifestarse como cáncer u otros síndromes dañinos para la salud humana. En el proceso industrial, el envasado representa una de las operaciones donde el riesgo de contaminación alimentaria por un entorno contaminado con AFM<sub>1</sub>, podría incorporarse al alimento debido a que la operación de llenado puede variar según la magnitud de la industria láctea. Las determinaciones analíticas con alta sensibilidad y rapidez en las líneas de producción/envasado permiten reducir los costos de producción y el tiempo de exposición a contaminantes. Los datos epidemiológicos, los signos clínicos y las lesiones patológicas permiten un diagnóstico presuntivo parcial que debe confirmarse con pruebas de identificación y cuantificación de laboratorio. La presencia de AFM<sub>1</sub> constituye un biomarcador confiable de intoxicación alimentaria por aflatoxina AFB<sub>1</sub>. Las pruebas de laboratorio establecen una etapa clave para poder determinar un marco metodológico base para actividades periciales bioquímicas en eventos toxicológicos, tanto en animales como en humanos. Pruebas hepáticas de enzimas en sangre periférica, trastornos hematológicos y pruebas inmunológicas alteradas por efecto de inmunosupresión que ejerce la aflatoxina en el organismo animal constituyen pruebas confiables de efectos de aflatoxinas. La utilización de biosensores constituye una herramienta muy útil, fácil y rápida a nivel de campo para la detección de muestras “positivas” de aflatoxinas. El método más aconsejado para la identificación y/o confirmación es el uso de columnas de inmunoafinidad con anticuerpos monoclonales específicos para AFM<sub>1</sub> seguido de detección y cuantificación por HPLC. Para cumplir con los estándares de calidad e inocuidad que permitan reducir los riesgos a un mínimo aceptable es necesario que los sistemas productivos primarios adopten y cumplan las normas emitidas por el Codex Alimentarius y las de la FAO. La implementación de las

Buenas Prácticas de Manufactura en la industria láctea, incluidas en el Código Alimentario Argentino (CAA) y la Norma IRAM NM-323:2010 constituyen herramientas clave para lograr la inocuidad de los alimentos lácteos producidos. Es en esta etapa donde toma importancia establecer un marco metodológico base para actividades periciales bioquímicas en eventos toxicológicos, tanto en animales como en humanos. Evaluaciones en empresas lácteas de Córdoba muestran que cumplen con todas las normas de inocuidad necesarias para evitar el riesgo toxicológico asociado a la Aflatoxina AFM<sub>1</sub> en la etapa del envasado de la leche. Por ello, el objetivo de este trabajo de investigación es concientizar sobre esta sensible problemática, aportando una valiosa información para que las autoridades políticas, de salud y empresariales permitan seleccionar, planificar y desarrollar alternativas tecnológicas y científicas que fortalezcan las medidas legislativas inherentes a la prevención y control de eventos toxicológicos derivados de la exposición a aflatoxinas. Además, que los resultados obtenidos permitan avanzar hacia la formación, consolidación y capacitación de equipos de trabajo e investigación interdisciplinarios capacitados en la problemática de salud pública asociada a las cadenas agroalimentarias.

Palabras claves: *lesiones, aflatoxina, micotoxina, normas de inocuidad.*

## Summary

National and international health organizations are highly concerned at present due to the occurrence of food poisoning produced by biologic agents which are of natural or anthropogenic source. Acute or chronic toxic effects on anatomy and functionality of people exposed to chemical food poisoning involve legal aspects which consider presumption of anatomic functional damage of the body or people's health, which must be considered and evaluated. Among them, the presence of the AFM<sub>1</sub> toxin in uncontrolled primary productive systems and in milk processing plants, whose long term effect could be cancer or other syndromes harmful to human health. In the industrial process packing constitutes a stage where the risk of food poisoning due to a contaminated environment with AFM<sub>1</sub> could occur. The toxin could enter the product because the filling process could vary depending on the scale of the milk industry. Analytic determinations with high sensitivity and promptness in the production/packing lines allow to reduce production costs and exposure time to contaminants. Epidemiological data, clinical signs and pathological injuries enable a partial presumptive diagnosis which must be confirmed with identification and quantification lab tests. The presence of AFM<sub>1</sub> constitutes a reliable biomarker for food poisoning due to aflatoxin AFB<sub>1</sub>. Lab tests establish a key phase so as to determine a methodological frame for biochemical expert's activities of toxicological events in animals and human beings. Liver function tests of peripheral blood enzymes, hematological disorders and immune system tests altered by the effect of immunosuppression made by the aflatoxin in animal organism constitute reliable tests for aflatoxins. The use of biosensors constitutes a very useful, easy and quick tool for field-level detection of aflatoxin "positive" samples. The most advised method for identification and/or confirmation of the use of immunoaffinity columns with specific monoclonal antibodies for AFM<sub>1</sub> followed by detection and quantification of HPLC. To comply with high quality and food safety standards which allow to reduce risks to a minimum acceptable level it is needed that productive primary systems adopt and comply with standards issued by the Codex Alimentarius and FAO. The implementation of good manufacturing practices in dairy industry, included in the Argentine Food Code (Código Alimentario Argentino) and the standard IRAM NM-323:2010 constitute key elements to achieve safety of the produced dairy products. In this stage it is important to determine a grounding methodological frame for biochemical expert's activities of toxicological events in

animals and human beings. Assessments made in dairy industries in Cordoba show that they comply with all safety standards necessary to avoid toxicological risk associated with Aflatoxin AFM<sub>1</sub> in the packing stage of milk. Therefore, the objective of this research paper is to raise awareness on this sensitive issue, by contributing valuable information for political, health and industry authorities to select, plan and develop technological and scientific alternatives which strengthen legal measures related to the prevention and control of toxicological events derived from the exposure to aflatoxins. Besides, it is expected that the results obtained from this research paper enable to create, consolidate and train interdisciplinary work and investigation teams with qualified skills in public health issues associated with agro food chains.

Key words: *injuries, Aflatoxin, mycotoxin, safety norms.*

## Introducción

En la actualidad existe una gran preocupación en los organismos de salud nacionales e internacionales debido a la alta incidencia de intoxicaciones causadas por la contaminación de los alimentos producidas por agentes de origen natural o antropogénica. Estas contaminaciones producen efectos agudos o crónicos sobre la anatomía y funcionalidad de las personas expuestas.

### *Concepto legal de lesión*

En el sentido legal, lesión involucra un aspecto Jurídico que implica presunción de daño anatómico- funcional del cuerpo o de la salud de una persona (culposo o doloso), de origen accidental o voluntario, intencionado o inesperado, por negligencia o impericia en el proceder, por ignorancia o falta de cumplimiento de deberes o de funciones de un cargo, que implica un deber de cuidado y da lugar a sanciones previstas en la ley [1].

### *Las lesiones y el código penal*

Las lesiones constituyen delitos contra las personas. La ley califica tres medidas de gravedad progresiva, teniendo en cuenta las penas:

- a) Lesiones leves: Art. 89. “Se impondrá prisión de un mes a un año, al que causare a otro, en el cuerpo o en la salud, un daño que no esté previsto en otra disposición de este código”.
- b) Lesiones graves: Art. 90. “Se impondrá reclusión de uno a seis años, si la lesión produjere una debilitación permanente de la salud, de un sentido, órgano o miembro, o una dificultad permanente de la palabra, o si hubiere puesto en peligro la vida del ofendido, le hubiere inutilizado para el trabajo por más de un mes, o le hubiere causado una deformación permanente del rostro”.
- c) Lesiones gravísimas: Art. 91. “Se impondrá reclusión o prisión de tres a diez años, si la lesión produjere una enfermedad mental o corporal, cierta o probablemente incurable, la inutilidad permanente para el trabajo, la pérdida de un sentido, de un órgano, de un miembro, del uso de un órgano o un miembro, de la palabra o de la capacidad de engendrar o concebir”.

### *Clasificación legal de las lesiones*

- De acuerdo al elemento productor
  - Físicos: Frío, calor, radiaciones ionizantes, electricidad.
  - Mecánicos: golpes propiamente dichos, accidentes de tránsito, proyectiles, arma blanca.
  - Químicos: ácidos y álcalis.
  - Biológicos: microorganismos productores de lesiones.

### *Estudio legal de las lesiones causadas por agentes biológicos*

Estos daños pueden ser provocados por sustancias de origen vegetal o animal. A menudo se trata de secreciones animales que actúan directamente sobre la piel o mucosas. En otras circunstancias las lesiones son producto de la acción tóxica de animales ponzoñosos como arañas y escorpiones, o mordeduras de serpientes [2]. Otras veces se deben a la ingestión de sustancias tóxicas como ocurre en las intoxicaciones alimentarias por alimentos en mal estado o por reacciones graves consecutivas a la ingesta.

### *Intoxicaciones alimentarias*

Son las enfermedades originadas al ingerir un alimento que contiene toxinas previamente generadas como metabolitos de los microorganismos [3]. Un ejemplo de esta condición son las intoxicaciones secundarias o indirectas [4] causadas por consumo de productos de origen animal, tales como leche y sus derivados contaminados con micotoxinas. Estas toxinas se caracterizan por ser químicamente estables y resistentes a los métodos físicos y químicos de destrucción usuales, y por lo tanto capaces de persistir en los productos alimenticios terminados aun cuando el microorganismo haya sido destruido.

### *Micotoxinas*

El término micotoxina proviene de dos palabras griegas: “mykes” que significa hongo y “toxicum” que significa veneno.

Según Cameán *et al*, 2006 las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por algunas cepas de hongos, entre ellas, se destacan aquellas pertenecientes a los géneros

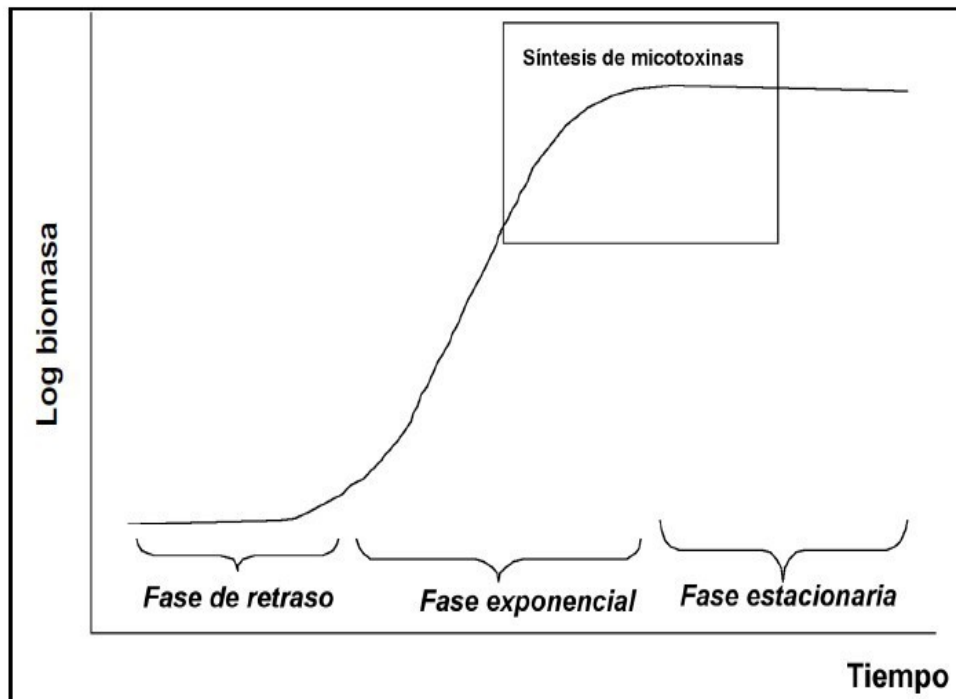


*Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, los cuales pueden variar su capacidad de sintetizar micotoxinas aun dentro de una misma especie. Son considerados metabolitos secundarios debido a que son procesos metabólicos primarios que no intervienen en el crecimiento del hongo.

Los hongos se desarrollan en rangos de temperatura entre 40°C y 45°C, mientras que la toxina puede ser producida entre 11°C y 35°C, siendo las condiciones óptimas de producción 22°C y 80 - 90% de humedad relativa [3].

Flores (2006) señala que las micotoxinas son moléculas relativamente pequeñas de bajo peso molecular con una estructura química policetónica que tienen lugar cuando en determinadas condiciones físicas, químicas y biológicas se interrumpe la reducción de los grupos cetónicos en la biosíntesis de los ácidos grasos realizada por los hongos. Estos ácidos grasos son metabolitos primarios utilizados por los hongos como fuente de energía [5]. Aunque las micotoxinas son genotípicamente específicas para un grupo de especies, el mismo compuesto puede también ser elaborado por hongos pertenecientes a géneros distintos.

Las micotoxinas se suelen formar al final de la fase exponencial o al principio de la fase estacionaria del crecimiento de los hongos toxicogénicos (Figura 1) [6].



**Figura 1.** Fase de crecimiento fúngico y localización de la síntesis de micotoxinas

(Soriano del Castillo, 2007)

Desde el punto físico-químico, las micotoxinas son sustancias cristalinas que se disuelven en solventes ligeramente polares como el cloroformo, metanol y agua a razón de 10 – 20 mg / litro. Éstas sustancias presentan fluorescencia a la luz ultravioleta (Asociación Española de Fabricantes de Harinas y Sémolas de España. 2015) [7].

Los principales géneros de hongos toxigénicos pueden observarse en la Tabla 1 [8].

**Tabla 1.** Principales Hongos productores de Micotoxinas (Acosta Yamandú M. y otros. 2016)

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

Las micotoxinas poseen un efecto tóxico inmediato, actuando como inmunosupresores, mutagénicos, teratogénicos y carcinogénicos. El principal órgano diana de los efectos tóxicos y carcinogénicos es el hígado, representando un peligro latente tanto para la salud humana como animal. Las micotoxinas se caracterizan por su gran ubicuidad, por estar presentes de modo natural en todo el mundo, en un gran número de productos agrícolas utilizados para la preparación de alimentos balanceados para animales o como contaminantes o residuos tóxicos de los productos de las explotaciones ganaderas (leche, huevos, carnes). Esta

ubicuidad hace que sea difícil controlarlas, y por ello, pueden constituir un riesgo<sup>1</sup> significativo para la salud, pudiendo producir epidemias. La contaminación del producto puede ocurrir en cualquier punto de la cadena alimenticia, desde la cosecha, pasando por la recolección, almacenaje, transporte, elaboración y conservación (Peraica, 2000) [9].

Se conocen actualmente casi 500 tipos de micotoxinas, entre ellas, las más importantes por su ocurrencia y toxicidad son las Aflatoxinas, Ocratoxinas, Rubratoxinas y Tricotecenes, siendo las primeras las más destacadas y evaluadas por constituir un riesgo toxicológico importante para la salud humana. Entre ellas, la aflatoxina M1 (AFM<sub>1</sub>) constituye un riesgo latente de diferentes afecciones en la salud debido a que su consumo aún en dosis bajas puede causar efectos tóxicos en corto tiempo (agudos), como a largo plazo (crónicos), siendo estos últimos los más frecuentes observados, aunque más difíciles de identificar.

Pese a las mejoras tecnológicas introducidas, en la actualidad los productos lácteos siguen siendo causa de brotes de toxiinfecciones alimentarias (TIA). Los productos lácteos pueden contener también micotoxinas, entre ellas, la AFM<sub>1</sub> ha sido descrita su presencia en numerosas publicaciones. Su presencia en productos lácteos es posible si en su elaboración se emplea leche procedente de animales alimentados con alimentos contaminados con hongos micotoxigénicos, debido a la contaminación cruzada en el envasado de la leche o el desarrollo de estos mohos durante la elaboración de los quesos. La presencia de esta aflatoxina constituye un riesgo toxicológico importante para la salud que merece ser analizado considerando aspectos legales, productivos, económicos, nutricionales, toxicológicos y químicos, mediante un marco metodológico técnico y científico.

Por lo anteriormente citado, en el desarrollo de este trabajo se analizarán los aspectos más relevantes de las micotoxinas, su incidencia en la cadena agroalimentaria Argentina y en el mundo con énfasis en la aflatoxina M1 en la cadena láctea. Se evaluará su incidencia toxicológica sobre la salud humana, la legislación actual nacional e internacional relacionada, los procedimientos de control y prevención, los métodos de descontaminación y detoxificación en el campo y en la industria. Finalmente se analizarán las principales metodologías para su detección y cuantificación en la línea de trazabilidad de la leche con el

---

<sup>1</sup> Riesgo: Combinación de la probabilidad de ocurrencia de un daño y de la gravedad de ese daño (IRAM, L.p., Norma Argentina IRAM-NM 323: 2010. Pág. 4).

objetivo de constituir un marco metodológico base para actividades periciales bioquímicas en eventos toxicológicos humanos.

## Desarrollo del trabajo

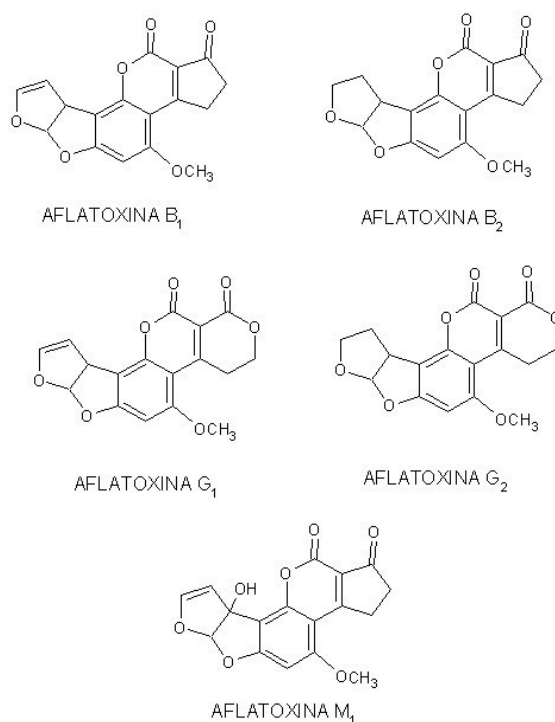
### *Aflatoxinas*

Las aflatoxinas son productos metabólicos secundarios que pueden encontrarse en el organismo de los animales que han consumido alimentos contaminados con aflatoxinas [10].

Según Treviño (2000), la palabra aflatoxina es un neologismo, cuyas primeras cuatro letras (afla) son un acrónimo, formado a partir del nombre latinizado del hongo: *Aspergillus flavus* productor de toxina de donde se tomó la letra A del género (*Aspergillus*) y las primeras letras, fla, de la especie (*flavus*) de la que se aisló la toxina [11].

Según Cameán *et al*, 2006 las aflatoxinas son un grupo de toxinas naturales producidas por diferentes hongos, entre ellos el *Aspergillus Flavus*. Algunas de las micotoxinas presentes en la producción bovina son degradadas rápidamente por los microorganismos del rumen en compuestos con diferente estructura química que presentan menor o mayor toxicidad que la micotoxina original. Cuando las vacas ingieren la AFB<sub>1</sub> que se encuentran en forrajes o balanceados contaminados luego de un período de tiempo de treinta días se metaboliza principalmente a la AFM<sub>1</sub> y se excreta en la leche [3].

Químicamente son un grupo de compuestos orgánicos no proteicos, de bajo peso molecular, cuya estructura básica es un anillo de furano unido al núcleo de cumarina (Figura 2)



**Figura 2.** Estructura química de las aflatoxinas B1, B2, G1, G2 y M1.

Las aflatoxinas más comunes son las B1, B2, G1 y G2, las cuales toman el nombre con base en la fluorescencia que presentan en capa fina de gel, y la M1 que es el metabolito hidroxilado de la AFB<sub>1</sub>, que se elimina en la leche de los animales que ingieren forrajes contaminados con AFB<sub>1</sub> [12].

La naturaleza y cantidad de micotoxinas producidas se ve influenciada por la interacción de varios factores como: tipo de sustrato, humedad, nutrientes disponibles, temperatura, humedad del ambiente circundante (Marin Sillué *et al*, 2000).

Las aflatoxinas poseen la habilidad de crecer, desarrollarse y producir las micotoxinas correspondientes en condiciones de relativa baja actividad de agua (*Aw*), siendo la *Aw* mínima para el desarrollo y producción de toxinas de 0,75 y de 0,83 respectivamente.

Las condiciones óptimas para su máxima producción de toxinas son temperaturas de 25 °C y una *Aw* de 0,95. No obstante, ciertas estirpes de *Aspergillus flavus*, en sustrato como por ejemplo el arroz, pueden crecer entre 6 y 45 °C, con una óptima de 37 °C, la máxima producción de micotoxinas se verificó a la temperatura de 30 °C (Hesseltine, 1976) [13,14].

Se ha reportado la presencia mundial de aflatoxinas, sobre todo en semillas de cultivos

cuyas zonas geográficas de vegetación se sitúan en clima tropical, donde están reunidas las condiciones óptimas de crecimiento de los hongos aflatoxigénicos, 80 a 90% de humedad relativa y temperatura de 30 a 35 °C [6].

### *Mecanismo de acción de las aflatoxinas e impactos en la salud humana y animal*

La AFB<sub>1</sub> constituye la aflatoxina con mayor toxicidad hepática aguda (lesiones hepáticas con edema, proliferación biliar y necrosis) mediante su conversión en el metabolito reactivo AFB<sub>1</sub>-8,9-epóxido, el cual se une a proteínas hepáticas formando nuevos productos químicos. El daño hepático se evidencia por la degeneración y cambios por necrosis individual de hepatocitos, esteatosis mixta a gota grande y pequeña sin distribución zonal específica, con congestión intraparenquimatosa y proliferación focal de ductos biliares.

Pruebas hepáticas en sangre periférica alteradas por los trastornos mencionados son realizadas con estudios enzimáticos de aminotransferasas, fosfatasa alcalina, gama glutamil transpeptidasa, bilirrubina total y directa y otras. Los trastornos hematológicos importantes se evidencian con estudios de trombocitopenia, tiempos de coagulación, fibrinógeno y hierro sérico alterados por los efectos de la toxina en el organismo de los animales. También se realizan pruebas inmunológicas alteradas por efecto de inmunosupresión que ejerce la toxina (aflatoxina) en el organismo animal.

Después de la formación de la AFB<sub>1</sub>-epóxido pueden formarse dihidrodioles (8,9-dihidro-8,9-dihidroxi aflatoxina B<sub>1</sub>), metabolitos de la AFB<sub>1</sub> que se unen a proteínas celulares mediante la formación de bases de Schiff induciendo a daño celular y eventualmente a muerte celular. Es importante resaltar que la AFB<sub>1</sub>-epóxido puede formar aductos con los residuos de lisina de la albúmina y otras proteínas celulares, cerca del 5% de la dosis ingerida de AFB<sub>1</sub> se une a la albúmina.

La AFB<sub>1</sub>-epóxido puede también reaccionar con glutatión mediante un mecanismo mediado por la glutatión-s-transferasa; esta conjugación de tipo competitivo representa el paso de detoxificación más importante con respecto a otros tipos de biotransformación en la obtención de metabolitos menos tóxicos de AFB<sub>1</sub>.

Estudios de activación y de detoxificación de la AFB<sub>1</sub>-epóxido en diferentes especies animales proveen la base para entender porque las especies varían en su sensibilidad a los efectos tóxicos y carcinogénicos inducidos por la AFB<sub>1</sub>. La respuesta diferencial depende de

factores propios de la individualidad de cada organismo, entre ellos la absorción a través del tracto digestivo, la distribución en el organismo y los mecanismos de metabolismo y excreción usado por las distintas especies animales. Así, se ha encontrado variabilidad de los impactos en la salud por aflatoxinas entre las razas humanas ocasionados por exposición crónica a estas toxinas, la dosis tóxica (TD50, en  $\mu\text{g kg}^{-1}$  peso corporal/día) para carcinogénesis de la AFB<sub>1</sub> para humanos es 132 [15].

En la siguiente tabla se reflejan los datos relativos a la toxicidad de las aflatoxinas más nocivas en orden decreciente de toxicidad (Tabla 2).

**Tabla 2.** Dosis letal cincuenta (DL50) de aflatoxinas (Cameán *et al*, 2008)

<i>Aflatoxina</i>	<i>DL50 (mg/kg peso vivo)</i>
M1(Derivado metabólico de la B1 en algunos animales, principalmente vacas)	0,000
B1	$0,364 \times 10^3$
G1	$0,784 \times 10^3$
M2(Derivado metabólico de la B2 en algunos animales)	$1,228 \times 10^3$
B2	1,696
G2	$3,450 \times 10^3$

### *Toxicidad y riesgos para la salud pública*

La toxicidad de las Aflatoxinas en humanos depende de varios factores: a) la biodisponibilidad y la toxicidad de la micotoxina; b) los sinergismos entre ellas; c) la cantidad de micotoxina ingerida diariamente en función de la concentración de la micotoxina y la cantidad de alimento ingerido; d) la continuidad o intermitencia de ingestión del alimento contaminado; e) el peso del individuo y el estado fisiológico y de salud; f) la edad del individuo (Gimeno, 2005) [16].

Por los factores anteriormente señalados, los niños y jóvenes presentan mayor riesgo a la acción de las micotoxinas, debido a que pueden no tener suficientes mecanismos bioquímicos de detoxificación (Gimeno, 2005) [16].



Actualmente no se dispone de datos suficientes de los efectos de las aflatoxinas en el ser humano, debido a la dificultad para exponerlo en forma experimental al riesgo de ingerir alimentos que contengan la sustancia tóxica. No obstante, se ha comprobado que en los países donde se acostumbra consumir alimentos enmohecidos con presencia de aflatoxinas, la incidencia de cáncer de hígado es muy alta. Esto sucede en algunas regiones de África, India y del sureste de Asia, donde el carcinoma hepatocelular es una de las causas de muerte por cáncer (Peraica *et al*, 1999).

Los efectos principales que conllevan a la unión de aflatoxinas a macromoléculas son la alteración en la síntesis de ADN, ARN y proteínas (enzimas, inmunoglobulinas). Esta alteración provoca la aparición de cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial, disgregación temporal de los ribosomas, disminución en la respiración celular por desacoplamiento en el mecanismo de fosforilación oxidativa e interrupción del transporte de electrones. Además, produce alteración de la glicólisis y gluconeogénesis, así como la disminución de ciertas hormonas al establecerse una competencia por los receptores específicos (la AFB<sub>1</sub> en cantidades muy baja compite con el estradiol por los receptores localizados en el útero).

La formación de compuestos de gran reactividad que se unen a los ácidos nucleicos especialmente al ADN mitocondrial es el responsable del poder carcinogénico de las aflatoxinas, actúan como agentes genotóxicos dando lugar a la activación de oncogénesis y la iniciación de un proceso tumoral.

La primera de estas lesiones se origina tras la eliminación de forma espontánea o la reaparición enzimática de las posiciones con conjugados epóxido-N-7 guanina, dando lugar a sitios apurínicos donde la adenina tiene una gran afinidad por insertarse en la posición correspondiente de la cadena opuesta del ADN. Esta reacción puede dar lugar a una mutación por sustitución de un par de bases guanina-citosina por un par timina-adenina.

La segunda lesión premutacional se produce al originarse un derivado formamidopirimidinico resistente a los procesos de reparación enzimática del ADN, que puede dar lugar a mutaciones si está presente en la fase de replicación del ADN (Wogan, 1992) [17].

### Clasificación de las aflatoxinas según su riesgo cancerígeno

El Centro Internacional de Investigación sobre el Cáncer (CIIC) de la Organización Mundial de la Salud (OMS), determinó en 1998 que existen suficientes datos demostrativos del efecto carcinógeno de mezclas naturales de aflatoxinas en el ser humano, las cuales se clasifican por ello como carcinógeno del grupo 1, salvo en el caso de la aflatoxina M<sub>1</sub> que se considera posible carcinógena para el hombre grupo 2B [18].

**Tabla 3.** Grado de carcinogénesis de las distintas micotoxinas (CIIC, 1998)

Producto	Grado de Evidencia del Riesgo de Cáncer		Evaluación Global
	Hombre	Animal	
Aflatoxinas	S	S	1
Aflatoxina B1	S	S	
Aflatoxina B2		L	
Aflatoxina G1		S	
Aflatoxina G2		I	
Aflatoxina M1	I	S	2B
Citrinina	ADS	L	3
Ocratoxina A	I	S	2B
Patulina	ADS	I	3
Esterigmatocistina	ADS	S	2B

S: Prueba suficiente L: Prueba I: Prueba insuficiente, ADS: Ausencia de datos suficientes, Grupo 1(1): El producto es cancerígeno para el hombre, Grupo 2A(2A): El producto es probablemente cancerígeno para el hombre, Grupo 2B(2B): El producto es un posible cancerígeno para el hombre, Grupo 3(3): No se puede pronunciar en cuanto al riesgo cancerígeno para el hombre.

#### *Aflatoxina M1 (AFM<sub>1</sub>)*

La AFM<sub>1</sub> es el primer y más importante producto conocido procedente de la metabolización de la AFB<sub>1</sub> en las vacas, por lo que se la ha detectado en los productos alimenticios procedentes del ganado vacuno. Por ello, es muy importante el control sanitario de los animales productores de carne y de leche, así como también de los alimentos derivados de ellos que son de consumo masivo para evitar los efectos tóxicos graves que pueden producirse.

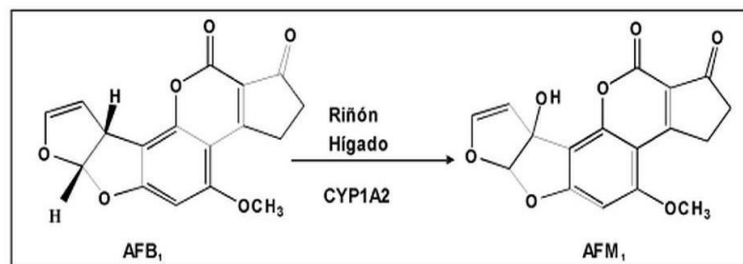
Actualmente aún no está del todo claro el metabolismo de la AFM<sub>1</sub>, su activación y mecanismos de detoxificación en humanos. Existen múltiples estudios de evaluación del

riesgo asociado a la exposición a AFM<sub>1</sub> *in vitro* en rata. Estos estudios han evidenciado que la AFM<sub>1</sub> es tan hepatotóxica aguda como la AFB<sub>1</sub>, siendo además mutagénica, teratogénica y carcinogénica (aunque en menor proporción que la AFB<sub>1</sub>) aún a bajos niveles ( $\leq 1$  ng/kg p.c. /día). Estos resultados muestran que no hay una dosis umbral por debajo de la cual no se produzca formación de tumores [6,18,19,20,21,22,23].

El fenómeno de mutagenicidad puede explicarse mediante la formación de un compuesto estable por la unión con el N-7 de los residuos guanil del ADN (o ARN).

En el proceso de replicación del ADN la guanina sufre transversión a timina, esto ocurre en el codón 249 del gen p53 (gen implicado como punto de chequeo durante la síntesis y reparación del ADN), si el daño no se repara esta misma proteína induce apoptosis.

Las aflatoxinas M1 y M2 constituyen metabolitos oxidativos de las aflatoxinas B1 y B2 ingeridas, apareciendo en la leche materna (humana y animal), orina y las heces [6,9,24]. La estructura química de las AFM<sub>1</sub> es el derivado 4-hidroxi de la aflatoxina B1 (Figura 3).



**Figura 3.** Biotransformación de la aflatoxina B1 en aflatoxina M1 (Soriano del Castillo, 2007)

La metabolización de AFB<sub>1</sub> que ocurre en el hígado es realizado por el citocromo P450 de los hepatocitos.

La aflatoxina M1 tiene una masa molecular relativa de 328 Da y su fórmula molecular es C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub> (Figura 2). La existencia de un núcleo bifurano confiere a las moléculas de aflatoxina una gran rigidez lo que favorece la interacción con algunos componentes celulares.

En vacas lecheras, el paso de aflatoxina B1 a la leche en forma de aflatoxina M1 está relacionado de manera lineal con la producción de leche y se calcula que el porcentaje de

aflatoxina B1 de la dieta excretada en la leche en forma de aflatoxina M1 corresponde al 0,09 - 2% de la dosis consumida.

Para otros autores (Veldman *et al*, 1992; Pettersson *et al*, 1989), en función de estudios realizados con vacas de alta producción de leche encontraron tasas de conversión de AFB<sub>1</sub> a AFM<sub>1</sub> del orden de 2,6 a 6,2%. Para dichas investigaciones la relación aumenta a medida que se incrementa la producción de leche; analizando todos los datos de los distintos estudios, daría un incremento del 0,1% por cada kg de leche obtenida. También determinaron que para vacas de más de 25 kg de leche / día la tasa de conversión fue de (2,66 ± 1,24)% [25,26].

La mayor tasa de excreción observada en vacas de alto rendimiento lechero podría estar relacionado con la mayor permeabilidad en las membranas plasmáticas de los alveolos secretores de leche (Veldman *et al*, 1992); por otra parte, explicaría también de esta manera el mayor incremento de la excreción de AFM<sub>1</sub> en leche de vacas con mastitis [25].

Las vacas pueden biotransformar AFB<sub>1</sub> en AFM<sub>1</sub> dentro de las 12 – 24 horas posteriores a la ingestión del alimento contaminado, incluso a las 6 horas ya pueden aparecer residuos de AFM<sub>1</sub> en la leche (Gimeno, 2005).

La presencia de AFM<sub>1</sub> en leche es transitoria, alcanzando un máximo a los dos días del consumo del alimento contaminado y desapareciendo después de 4 a 5 días de retirado el alimento (Dragacci *et al*, 2001) [27].

Las tasas de biotransformación de AFB<sub>1</sub> en AFM<sub>1</sub> pueden variar según la raza de la vaca, la concentración de AFB<sub>1</sub> en la ración, la cantidad y duración del consumo del alimento contaminado y el estado de salud del animal (Gimeno, 2005).

La incidencia de aflatoxinas totales y de la AFM<sub>1</sub> en América Latina varía según el alimento, país y concentración observada (Tabla 4).

**Tabla 4.** Incidencia de aflatoxinas totales y de la AFM<sub>1</sub> en alimentos en América Latina

Alimentos	País	Incidencia (%)	Aflatoxinas	Concentración (µg kg <sup>-1</sup> )	Referencia
Maíz	México	56,00	Totales	0,00	[28]
Maíz	Argentina	8,23-15,52	Totales	9,72-15,52	[29]

Maíz	Perú	82,00	Totales	4,20	[30]
Maíz	México	33,10	Totales	1,00-18,00	[31]
Leche	Colombia	20,00	M1	15,60	[32]
Queso	Colombia	67,00	M1	240,00	[33]
Maíz, cereal, arroz, semillas y snacks y cereales para el desayuno.	Colombia	8,90	Totales	12,60	[34]
Maíz	Guatemala	28,57	Totales	0,00	[35]

Las lesiones de las aflatoxinas AFM<sub>1</sub> sobre los organismos vivos son evidentes, y son consideradas como un biomarcador de exposición a aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>). Esta aflatoxina ha sido clasificada por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) como cancerígeno grupo 2B para el hombre.

El riesgo de padecer cáncer de hígado es directamente proporcional a la exposición por consumo de leche contaminada con aflatoxina M<sub>1</sub> (peligro). Por ello, la probabilidad de adquirir esta enfermedad varía según el nivel de consumo de leche en diferentes países del mundo.

La producción, comercialización y consumo mundial de leche muestra un incremento sostenido en los últimos años, principalmente en los países en desarrollo (FAO, 2018) (Tabla 5).

**Tabla 5.** Mercado mundial y consumo de leche en países desarrollados y en desarrollo (FAO, 2018).

<b>BALANCE MUNDIAL</b>	<b>2015</b>	<b>2016</b>	<b>2017</b>	<b>Variación (%) 2017/ 2016</b>
Producción total de leche (millones de toneladas de leche equivalente)	278.00	279.40	284.00	1.65
Comercio total de leche (millones de toneladas de leche equivalente)	30.60	30.70	31.20	2.00

#### **INDICADORES DE OFERTA Y DEMANDA**

Consumo humano per cápita de alimentos:

Mundial (kg/ año)	111.50	111.10	111.40	0.30
Participación del comercio en la producción (%)	11.00	11.00	11.00	0.00

Actualmente 6.000 millones de personas consumen leche y productos lácteos en el mundo, la mayoría de ellas correspondientes a los países en desarrollo.

El consumo de leche (kg leche equiv/hab./año) varía según el país considerado, siendo elevado (mayor a 150 kg/año) en América del Norte, Argentina (> 200 kg/hab./año), Armenia, Australia, Costa Rica, Europa, Israel, Kirguistán y Pakistán; medio (30 a 150 kg/año) en India, Japón, Kenia, México, Mongolia, Nueva Zelanda, la República Islámica de Irán, África septentrional y meridional, la mayoría del Oriente Próximo y la mayor parte de América Latina y el Caribe; bajo (menor que 30 kg/año) en China, Etiopía, la mayoría de África central y la mayor parte de Asia oriental y sudoriental. En Asia meridional, se prevé que el consumo de leche y productos lácteos aumente en un 125 % para 2030 (FAO, 2018).

Considerando la evolución por tipo de leche, se ha observado una tendencia creciente de producción de la leche UHT (Ultra High Temperature), la cual presentó un crecimiento promedio de un 10% en el período 2013-2014 (MGAP-DIEA, 2017).

Actualmente la lechería argentina lidera el crecimiento mundial de la producción láctea, y es uno de los países clasificado dentro del grupo de consumo elevado de leche per cápita, en consecuencia, de alto riesgo toxicológico para la salud de los consumidores.

### *La leche, composición e importancia como alimento*

Según el Código Alimentario Argentino (CAA) “Se denomina Leche al producto obtenido por el ordeño total e ininterrumpido, en condiciones de higiene, de la vaca lechera en buen estado de salud y alimentación, proveniente de tambos inscriptos y habilitados por la Autoridad Sanitaria Bromatológica Jurisdiccional y sin aditivos de ninguna especie. La leche proveniente de otros animales, deberá denominarse con el nombre de la especie productora” [36].

La leche y sus derivados son alimentos especialmente ricos en proteínas y calcio de fácil asimilación, nutrientes muy importantes en la etapa de crecimiento y desarrollo, y también para el mantenimiento de la masa ósea y muscular del ser humano.

La importancia alimenticia de la leche radica en su composición fisicoquímica, en la calidad de sus proteínas y carbohidratos, su contenido de calcio, vitaminas A1, B1 y B2, su alta digestibilidad y su alto aporte nutritivo y energético. La leche debe ser de alta calidad microbiológica, carente de microorganismos patógenos. Por lo tanto, la presencia de elementos físicos, químicos y biológicos, como los microorganismos patógenos exógenos pueden alterar su composición fisicoquímica provocando una disminución de la calidad exigible.

#### *Presencia de aflatoxina M1 en leche*

La aflatoxina M1 pasa a los humanos a través de la leche de animales contaminados [4], y debido a que la exposición humana no puede evitarse completamente, el riesgo para la salud del ser humano depende de los límites que se establezcan (Tabla 6).

#### *Límites de aflatoxina M1 en leche. Legislación*

La presencia de AFM<sub>1</sub> está estrictamente regulada por diversas agencias internacionales. En la Unión Europea el límite para leches destinadas al consumo humano es 0,05 ug/L (ppb), mientras que la FDA y el MERCOSUR (basado fundamentalmente en el Artículo 556 del Código Alimentario Argentino -Res. Conj. SPRyRS 33/2006 y SAGPyA 563/2006, 13/09/2006) permiten hasta 0,5 ug/L (ppb) para leche fluida y hasta 5 ug/L para leche en polvo. Desconociéndose normativas referidas a quesos y otros productos lácteos. Igualmente, este límite varía entre naciones (Van Egmond, 1989, FAO 2001, Mercosur/ GMC/Res. N° 25/02) [16,20,37,38,39,40].

**Tabla 6.** Límites máximos admisibles de concentración de aflatoxina M<sub>1</sub> en leche  
(Mercosur/ GMC/Res. N° 25/02)

<b>Alimento</b>	<b>Aflatoxina</b>	<b>Límite</b>
Leche fluida	M1	0,5 µg/L
Leche en polvo	M1	5,0 µg/kg

En Argentina existe un subregistro del número de intoxicaciones por la Aflatoxina AFM<sub>1</sub>,

no observándose su presencia en las estadísticas oficiales del Ministerio de Salud, entidad encargada de este reporte [41]. Esta falta de registros hace suponer que la tasa de riesgo sea superior a la indicada, agravando aún más esta problemática. Una fuente útil para obtener datos acerca de la epidemiología de esta problemática, lo constituyen las estadísticas registradas en los hospitales de niños, entre los cuales se menciona al Hospital de Niños de la Santísima Trinidad de Córdoba, el cual no dispone de un registro detallado de casos de aflatoxicosis debido a que carece de los medios necesarios para determinar la identidad y concentración de AFM<sub>1</sub> (Llebeili, 2018, comunicación personal).

La falta de detección, identificación y de información de esta sustancia tóxica en los alimentos representa un riesgo significativo para la salud humana. Esta situación torna necesario reducir este riesgo generando conocimiento para desarrollar estrategias de control por parte de las empresas que suministran estos alimentos, al igual que un control estricto por parte de las autoridades sanitarias, en particular en el proceso de envasado de la leche.

#### *Control y prevención de contaminación por aflatoxina*

La trazabilidad o rastreabilidad puede definirse como la posibilidad de encontrar y seguir el rastro, a través de todas las etapas de la producción, transformación y distribución de un alimento, un pienso, un animal destinado a la producción de alimentos o sustancias destinadas a ser incorporadas a los alimentos o con posibilidad de serlo, es lo que se conoce como la ruta “desde la granja a la mesa”. Básicamente, la trazabilidad contribuye fuertemente al éxito de tres elementos [42]:

- 1) *Buenas prácticas agrícolas*: referido a todos los procedimientos que se realizan en el campo y durante la cosecha con el fin de prevenir o evitar la contaminación o el desarrollo de hongos que producen las toxinas.
- 2) *Buenas prácticas de almacenamiento y manufactura*: son todas las etapas de empaquetamiento, almacenamiento, transporte e industrialización donde se debe controlar variables como: humedad (menor al 12%), contenido de agua en el alimento (menor a 0,7), temperatura (20-22°C), y una adecuada ventilación con aire frío y húmedo para evitar el crecimiento de hongos toxigénicos y la posible producción de micotoxinas.
- 3) *Sistema de análisis de peligros y puntos críticos de control* (HACCP: Hazard analysis and critical control points). Este sistema permite tener dominio completo del proceso



productivo [43].

Dentro de las medidas que se pueden llevar a cabo en el campo para prevenir la producción de aflatoxinas, se pueden mencionar [44]:

#### **Durante la siembra**

- Limpieza del terreno de siembra para el nuevo cultivo destruyendo o eliminando los frutos y semillas (maíz, maní y otros) de especies susceptibles de acumular aflatoxinas.
- Hacer estudios de suelo para solo usar la cantidad necesaria de fertilizantes, herbicidas e insecticidas.
- Uso de semillas resistentes a variedades de hongos micotoxigénicos.
- Evitar una alta densidad de siembra.
- Establecer una adecuada rotación de cultivos.

#### **Durante la etapa de recolección**

- Recolectar los cultivos cuando estén completamente maduros, para evitar dejar que el cultivo en plena madurez se exponga a condiciones extremas de calor y lluvias.
- Realizar un secado postcosecha, evitar apilamiento de productos húmedos, con lo que se fomentaría el crecimiento de hongos y posteriormente la producción de aflatoxinas.
- Proteger contra la lluvia durante el secado al sol.

#### **Durante el almacenamiento y transporte**

- Tomar las medidas adecuadas de saneamiento (desinfección y desinsectación) en las estructuras de almacenamiento y transporte.
- Protección de la lluvia y contacto con el agua.
- Impedir el acceso a insectos, roedores y aves.
- Cuando se almacena en bolsas, ubicarlas encima de estibas o introducir un medio de aislamiento impermeable entre las bolsas y el suelo.
- Asegurarse de que los cultivos que hayan de almacenarse estén libres de mohos e

insectos y que se sequen hasta alcanzar niveles de humedad seguros. Lo ideal sería que los cultivos se secan hasta llegar a tener un contenido de humedad en equilibrio con una humedad relativa del 70%).

- Procurar una ventilación constante para asegurar el mantenimiento de las condiciones de aireación y temperatura.
- Utilizar conservantes como el ácido propiónico (ácido orgánico), en dosis que garanticen la inhibición del hongo, pero que no sobrepasen los niveles permitidos en la comercialización nacional e internacional.

### *Descontaminación y detoxificación*

La descontaminación se refiere a los métodos por los cuales las micotoxinas son eliminadas o neutralizadas de los alimentos, mientras que la detoxificación son los procedimientos para reducir las propiedades tóxicas de las micotoxinas. El método de descontaminación o detoxificación ideal debe ser fácil de usar, económico, no formar compuestos más tóxicos que la micotoxina original y no alterar las propiedades nutricionales ni organolépticas de los alimentos. Existen diferentes métodos de descontaminación físicos, químicos y biológicos aunque se suele usar combinaciones entre ellos [6].

### *Métodos físicos de descontaminación y detoxificación*

Estos métodos incluyen: extracción con solventes, adsorción, inactivación por calor e irradiación.

*Extracción:* se ha utilizado este método para remover aflatoxinas en semillas oleaginosas, como maní y semillas de algodón. Estas semillas solo pueden ser usadas para alimentación animal. Los solventes usados incluyen etanol al 95%, acetona acuosa al 90%, isopropanol al 80%, hexano-metanol, metanol-agua, acetonitriloagua, hexano-etanol-agua y acetona-hexanoagua. La proporción solvente/muestra ha mostrado ser crucial para la recuperación de la toxina. La extracción con solventes puede remover trazas de aflatoxinas con formación de subproductos tóxicos o reducción del contenido de proteínas y calidad, sin embargo, su aplicación a gran escala es limitada por los altos costos y problemas relacionados con la disposición de residuos tóxicos [45].

*Adsorción:* los agentes adsorbentes son aquellos que tienen la capacidad de quelar las micotoxinas, reduciendo su disponibilidad. Estos agentes se unen a las micotoxinas que se encuentran en las premezclas de las dietas de los animales, formando con las toxinas en el tracto gastrointestinal complejos insolubles incapaces de atravesar el epitelio de los intestinos siendo en consecuencia eliminados en las heces y evitando su disociación en el tracto digestivo del animal. De manera general, los agentes adsorbentes se clasifican como adsorbentes minerales (arcillas, carbón activado, tierra de diatomeas) y adsorbentes orgánicos (fibras de plantas, extractos de paredes celulares de levadura y bacterias) [46]. Actualmente, se están realizando varios estudios sobre el uso de arcillas para disminuir la amenaza de la aflatoxina. Un estudio propone que la arcilla de esmectita sea administrada a alimentos contaminados para actuar como un agente de unión. La arcilla se une con moléculas de AFB<sub>1</sub>, blindando su absorción en el sistema digestivo cuando se consume alimento con esta aflatoxina [47].

*Calor:* las aflatoxinas precisan temperaturas altas de descomposición que oscilan entre 237°C y 306°C. El uso de calor para inactivar las aflatoxinas en alimentos contaminados puede afectar las cualidades organolépticas y nutricionales de los mismos. Es importante considerar en estos tratamientos, no solo la temperatura, sino el tiempo de exposición, ya que esta variable puede conllevar una mayor efectividad en el proceso de descontaminación de AFM<sub>1</sub>[6] (Tabla 7 y 8).

**Tabla 7.** Reducción de AFM<sub>1</sub> en leche por pasteurización y esterilización [48]

<b>Tratamiento</b>	<b>Contaminación<sup>a</sup></b>	<b>Reducción (%)</b>
62°C, 30 min	N	32
62°C, 30 min	A	0
62°C, 30 min	A	35
71°C, 40 s	A	29
71°C, 40 min	N	6-13
72°C, 45 s	N	45

74°C, 30 min	A	40
75°C, 40 s	N	12
77°C, 16 s	N	0
80°C, 45 s	N	64
120°C, 15 min	N	24
120°C, 15 min	A	24
<u>Pasteurización</u>	<u>N</u>	<u>24</u>

<sup>a</sup>N, natural; A, artificial.

**Tabla 8.** Reducción de AFM<sub>1</sub> en alimentos por pasteurización y esterilización [47]

<b>Tratamiento</b>	<b>Alimento</b>	<b>Aflatoxina</b>	<b>Nivel inicial</b> ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	<b>Destrucción</b> (%)	<b>Contaminación<sup>a</sup></b>
Asado: 204°C	Maní	B1-G1	253-186	53-41	N
Asado: 204°C	Maní	B1-G1	346-286	41-51	N
Asado: 121°C, 30 min	Maní	B1-G1	2200-4100	84-85	A
Asado: 121°C, 30 min	Maní	B1-G1	90-150	73-76	A
Asado: 204°C, 5 min	Maní	B1-G1	90-150	69-64	A
Asado: 204°C, 5 min	Maní	B1-G1	2200-4100	69-64	A
Asado: 150°C, 30 min	Maní	B1	370	48	N
Asado: 150°C, 30 min	Maní	B1	317	47	A
Autoclave: 116°C, 0,7 bar, 30 min, en salmuera 5% NaCl	Maní	Total <sup>b</sup>	5012-19992	80-100	A
Calentamiento: 200°C, 20 min	Aceite de oliva	B1	100	25	A

Calentamiento: 250°C, 10 min	Aceite de oliva	B1	100	65	A
Extrusión: 105°C	Maíz	Total	500	40-70	N

<sup>a</sup>N, natural; A, artificial. <sup>b</sup>B1 + G1 + B2 + G2.

*Irradiación:* esta herramienta es una de las últimas técnicas físicas empleadas, sin embargo no consigue eliminar las micotoxinas y evitar su mutagenicidad [6]. Las aflatoxinas son sensibles a los rayos UV., la AFB<sub>1</sub> absorbe luz UV a 222, 265 y 362 nm, lo cual puede llevar a la formación de más de 12 productos de fotodegradación que son menos tóxicos. Hay ejemplos de alimentos tratados con este método como aceite de maní, leche e higos secos [48]. El uso de radiación gamma para inactivar aflatoxinas fue investigada por Rustom (1997), el cual reportó que la toxicidad de una harina de maní contaminada con AFB<sub>1</sub> fue reducida entre un 75 y 100% después de la radiación con rayos gamma a una dosis de 1 a 10 kGy, respectivamente. La presencia de agua juega un importante papel en la destrucción de aflatoxina por rayos gamma, ya que la radiólisis del agua lleva a la formación de radicales libres altamente reactivos. Estos radicales libres pueden atacar la AFB<sub>1</sub>, en el anillo furano terminal, resultando en productos de baja actividad biológica [48].

#### *Métodos químicos*

Los estudios químicos han demostrado que los alimentos contaminados por aflatoxinas pueden ser detoxificados mediante el uso de sales inorgánicas y ácidos orgánicos, amonificación y el uso de los agentes aglutinantes de la AFB<sub>1</sub> [49].

- *Sales orgánicas y ácidos orgánicos:* Shekhar *et al*, (2009) mostraron la eficacia de seis productos químicos en la degradación de los niveles de aflatoxina en maíz almacenado. Estos productos químicos son no tóxicos y seguros para su uso en alimentos e incluyen carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, carbonato de potasio, carbonato de amonio, ácido acético y propionato de sodio [50]. Otro trabajo de investigación mostró los efectos del ácido cítrico en la detoxificación de arroz contaminado con aflatoxinas. Los investigadores mostraron que al aplicar ácido cítrico al arroz con bajos niveles de aflatoxinas (< 30 µg kg<sup>-1</sup>), éstas eran completamente degradadas. En el arroz que contenía altos niveles de aflatoxinas (≥ 30 µg kg<sup>-1</sup>), un 97,22% de las aflatoxinas eran degradadas [51].

- *Amonificación:* actualmente es la técnica más económica utilizada para

descontaminación. Esta técnica consiste en añadir el amoníaco en forma gaseosa a los cultivos en un área sellada durante 1 a 2 semanas. En un estudio sobre maíz contaminado artificialmente, la técnica de amonificación permitió eliminar 90% de aflatoxinas [52]. Esta práctica permite que los productos anteriormente inseguros para consumo, sean seguros para el consumo animal al permitir disminuir los niveles de aflatoxinas a un nivel menor. Estudios realizados con pollos de engorde alimentados con maíz contaminado con aflatoxinas, mostraron después de 6 semanas un aumento significativo en la tasa de mortalidad, en comparación con otro grupo alimentado con maíz contaminado con aflatoxinas que había sido tratado con amoníaco.

Los resultados también mostraron que la ingesta dietética, el aumento de peso y la tasa de conversión alimenticia fue suprimida en los pollos del primer grupo, mientras que los del grupo 2 mostraron un crecimiento normal [53].

- *Nixtamalización*: la nixtamalización o hidrólisis alcalina es un proceso precolombino de tratamiento del maíz para la obtención de una masa que se emplea en la fabricación de las tradicionales tortillas mexicanas. Numerosos estudios han informado que el uso del proceso de la nixtamalización permitió reducir entre 75 al 90% del contenido de aflatoxinas del grano. Un estudio realizado en México por Anguiano-Ruvalcaba *et al.* (2007) mostraron que la nixtamalización tradicional destruye 95% de la aflatoxina presente en maíz contaminado de manera natural. Además reportaron que el proceso es capaz de destruir el aflatoxicol, un compuesto reducido de la AFB<sub>1</sub> que se produce por la acción de una reductasa aislada de organismos superiores, pero que también surge de cepas toxigénicas de *A. flavus* y otros microorganismos [54]. Sin embargo, se ha sugerido que la detoxificación por nixtamalización parece no ser muy efectiva como se pensaba. Esto es debido a que un alto porcentaje del contenido original de aflatoxinas se revierte a su forma original fluorescente en el medio ácido (similar al que ocurre durante la digestión), con el consecuente riesgo que esto implica para la salud humana [55].

- *Ozonización*: el ozono (O<sub>3</sub>) reacciona a través de los doble enlaces 8,9 del anillo de furano de aflatoxinas a través de ataque electrofílico, causando la formación de ozónidos primarios seguido por transposición en derivados de monozonido tales como aldehídos, cetonas y ácidos orgánicos. Un estudio realizado en Turquía mostró que la reducción del contenido de AFB<sub>1</sub> en los pimientos rojos fue del 80% y el 93% después de la exposición a

33 mg L<sup>-1</sup> y 66 mg L<sup>-1</sup> de ozono durante 60 min, respectivamente [56].

### *Métodos biológicos*

Actualmente existen tres ramas crecientes de investigación en los métodos biológicos: el uso de agentes biológicos de control, de enzimas biotransformadoras y de plantas modificadas genéticamente [6].

El uso de métodos biológicos requiere utilizar hongos u otros microorganismos antagónicos que inhiben el crecimiento de hongos micotoxigénicos y por tanto la presencia de la micotoxina en el producto elaborado. El uso de cepas fúngicas no aflatoxigénicas de *A. flavus* y *A. parasiticus* compete con las cepas micotoxigénicas produciendo una reducción en la contaminación por aflatoxinas cercana al 99% cuando es aplicado en maní. La aplicación de microorganismos como *Flavobacterium aurantiacum*, que degradan ciertas micotoxinas, ha resultado eficiente para la degradación de AFB<sub>1</sub> en aceites vegetales, maíz, maní y derivados. También se ha observado que la aplicación de mezclas probióticas como *Lactobacillus* y *Propionibacterium* reduce la biodisponibilidad de la aflatoxina en la dieta [6]. Alberts *et al.* (2006) investigaron la degradación de la AFB<sub>1</sub> por *Rhodococcus erythropolis* y encontraron que este degradó efectivamente esta micotoxina mediante extractos celulares en cultivos líquidos, indicando que la degradación es enzimática y que las enzimas responsables son extracelulares y producidas constitutivamente. Además, la degradación coincidió con la pérdida de la mutagenicidad de la AFB<sub>1</sub> [57].

El empleo de enzimas biotransformadoras puede modificar la micotoxina en compuestos menos tóxicos o no tóxicos respecto a la micotoxina original, para eliminarlos por la orina o las heces, o bien pueden ser aplicados a la materia prima para reducirla *in situ*. Este caso puede tener relación con una enzima sintetizada por *F. aurantiacum* y que podría ser la responsable de la reducción de la AFB<sub>1</sub> [6].

El uso de plantas para control biológico, extractos acuosos obtenidos a partir de semillas y hojas de varias plantas medicinales, fueron evaluadas por su habilidad para detoxificar la AFG<sub>1</sub>. Se encontró que la degradación de las aflatoxinas B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y G<sub>2</sub> por los extractos de *Trachyspermum ammi*, planta medicinal perteneciente a la familia apiaceae, varió entre 46 y 65% en un intervalo de 6 a 24 h de incubación. Estos resultados permitieron concluir que el uso de extractos biológicos de *T. ammi* constituye un método biológicamente seguro para

proteger a los alimentos de las aves de corral o ganado y otros productos agrícolas de la contaminación por las aflatoxinas [58].

El uso de las técnicas citadas previamente permite concluir que el suministro de alimentos de calidad, con un adecuado plan sanitario y de vigilancia epidemiológica, con protocolos de trabajo estructurados bajo esquemas de la Medicina Veterinaria Preventiva (MVP) y las más recientes normas de bioseguridad y biocontención, posibilitaran obtener animales sanos a un menor costo en relación a lo erogado en el control de la enfermedad. Además, la utilización de antibióticos, suplementos vitamínicos, minerales, reconstituyentes y hormonales poseen el consiguiente riesgo para la salud debido a que sus residuos pasan a la carne y leche de consumo humano.

### *Gestión de la Calidad e Inocuidad de la industria láctea*

Actualmente la gestión de calidad constituye una cultura, una estrategia, un estilo de gerencia de la empresa. Supone la planificación, fijación de objetivos, coordinación, formación y adaptación de toda la organización involucrada. Genera un impacto estratégico y otorga una ventaja competitiva a las empresas que lo implementan. En este marco, la calidad se refiere al conjunto de propiedades y características de un producto o servicio que le confieren su aptitud para satisfacer unas necesidades explícitas o implícitas.

La Gestión de la calidad comprende el conjunto de actividades mediante las que la organización determina la política de calidad, los objetivos y las responsabilidades, provee los recursos y, determina los estándares de calidad que la empresa aplica. Pretende satisfacer las expectativas del cliente y del personal. Aspira a la mejora continua de la organización.

La gestión de calidad en sus diferentes niveles incluye las siguientes actividades y herramientas:

- Las Políticas de Calidad, que presentan los rasgos generales, reflejan el compromiso de la organización en su conjunto frente al sistema de garantía de calidad integral y sirven para la definición de los objetivos.

- Los Procedimientos de Garantía de Calidad o de Operación Estándar (SOP), que contienen lineamientos más específicos y describen como se implementan los diversos procesos de la organización.

- Los Instructivos de trabajo, que contienen una serie de directivas que indican cómo se



deben llevar adelante las actividades en cada área o sector.

- Los Registros de Calidad, en los cuales se deben compilar todos los datos que evidencian que la implementación del sistema de calidad se llevó a cabo según lo prescrito.

- La competencia y formación continua de los recursos humanos.

- La validación, calibración y mantenimiento del equipamiento.

- La selección, validación y evaluación de los métodos analíticos.

- El uso de materiales de referencia certificados.

- Las prácticas de control de calidad interno y externo.

- La ejecución de auditorías internas, como herramienta de evaluación y mejora del sistema implementado.

- La revisión por la dirección.

#### *Normas establecidas para la gestión de la calidad*

Los sistemas de aseguramiento de la calidad están basados en normas internacionales. Se entiende por norma a un documento consensuado que contiene especificaciones técnicas y criterios que deben ser utilizados como reglas o definiciones de características para asegurar que los materiales, productos, procesos o servicios cumplan los requerimientos especificados. Las normas deben estar aprobadas por un organismo de normalización y marcan pautas para la fabricación de productos, la realización de procesos, el desarrollo de servicios, la protección de la salud y el medio ambiente, y la facilitación de la cooperación tecnológica. Estas normas son de aplicación voluntaria.

#### *BPM y la Norma IRAM NM-323:2010*

Las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) son una serie de prácticas y procedimientos que se encuentran incluidos en el Código Alimentario Argentino desde el año 1997, por lo que son obligatorias para los establecimientos que comercializan sus productos alimenticios en el país y constituyen una herramienta clave para lograr la inocuidad de los alimentos de consumo humano [59].

La Norma IRAM NM-323:2010 [59], de aplicación voluntaria, establece los requisitos que debe cumplir un sistema de análisis de peligros y puntos críticos de control. La

implementación de ese sistema puede ser empleada por cualquier organización dentro de la cadena alimentaria para demostrar su capacidad de elaborar alimentos inocuos y para la evaluación o verificación de esa capacidad. Esta Norma se fundamenta en la aplicación del sistema Hazard para la identificación de peligros específicos, la evaluación de los mismos y en la toma de medidas necesarias que garanticen la inocuidad de los alimentos. El sistema HACCP, se podrá adaptar de acuerdo a cambios que surjan en el diseño del equipo, los procedimientos de elaboración o la tecnología de la industria. La aplicación del sistema HACCP posee las ventajas de facilitar la inspección por parte de las autoridades de reglamentación y promover el comercio a nivel internacional al aumentar la confianza en la inocuidad de los alimentos de una empresa con certificación HACCP [60].

#### *Contaminación en el proceso de envasado industrial de la leche*

El envasado constituye una etapa fundamental en el proceso industrial que impacta en la calidad e inocuidad de la leche. Esta etapa representa una de las operaciones donde el riesgo de contaminación alimentaria por un entorno contaminado con AFM<sub>1</sub>, podría incorporarse al alimento debido a que la operación de llenado puede variar según la magnitud de la industria láctea [61]. Por ello, es importante mantener las condiciones asépticas en esta etapa del proceso, y un modo de hacerlo es utilizando equipos herméticos con sistemas de llenado en condiciones estériles, capaces de realizar la esterilización del empaque antes del llenado, mediante el uso de Peróxido de Hidrógeno. Esta sustancia es removida posteriormente mediante una corriente de aire caliente.

El envase, tiene la finalidad de contener, proteger y conservar el alimento, además de servir para informar al consumidor, facilitar la venta y su empleo. En nuestro país se utilizan tres tipos de envases: bolsas asépticas de polietileno, envases plásticos rígidos o flexibles y envases Tetra Pak, siendo este último el más destacado por favorecer las condiciones de inocuidad.

#### *Envase Tetra Pak:*

Este envase se fabrica utilizando un rollo de cartón laminado que se coloca en máquinas exclusivas para este empaque. Está conformado por seis capas de los siguientes materiales que cumplen funciones específicas [62]. Desde la capa más externa hacia la más interna son:

- Polietileno: brinda protección contra la humedad exterior.

- Cartón: aporta resistencia y es donde se imprime la información referida al producto como: nombre de la firma, dibujos, etcétera, haciendo las veces de etiqueta.
- Polietileno: Sirve de adherencia entre la capa de cartón y la siguiente capa (aluminio).
- Aluminio: Es barrera contra la luz, oxígeno y agentes contaminantes externos.
- Polietileno: Evita que el aluminio este en contacto directo con el producto.
- Polietileno: refuerza la protección del aluminio con el producto.

Las ventajas de este tipo de envase son: mantener la vida útil del producto, asegurar la inocuidad de la leche y, por lo tanto, disminuir el riesgo para la seguridad y la salud del consumidor derivado del consumo de leche contaminada con AFM<sub>1</sub>. Entre las desventajas podemos mencionar: alto costo de inversión, ya que precisa una tecnología bastante completa que incluye procesos de: envasado, llenado y encartonado, además del costo que también es elevado.

## *Gestión de Calidad e Inocuidad en la industria láctea de Córdoba*

La provincia de Córdoba es una de las dos mayores productora de alimentos lácteos de Argentina, siendo la región de Villa María la mayor cuenca láctea del país. La industria instalada se encuentra dividida de acuerdo a su capacidad de producción en litros por día, observándose industrias de alta, mediana y baja capacidad de producción diaria y anual. Otros parámetros que permiten diferenciar a la industria láctea son su capacidad de innovación, de adquisición de nuevas tecnologías y de gestión integral, entre ellas en relación a calidad e inocuidad en la cadena de elaboración. Considerando estos últimos parámetros, es preciso poder establecer similitudes y diferencias entre empresas de gran capacidad de producción y comercialización con aquellas con menor producción diaria y baja inserción en el mercado. Entre las primeras se destacan la empresa SanCor y entre las últimas se podrían mencionar pequeñas cooperativas; emprendimientos o plantas piloto de colegios secundarios y universidades.

La empresa SanCor es la sexta empresa láctea más importante del país, produciendo más de 920.000 L de leche/día. La red comercial de SanCor es amplia, abasteciendo los centros de expendio diseminados en todo el país. Esta empresa desarrolla también una gestión de ventas a nivel internacional comercializando sus productos en más de 30 países de los cinco continentes. Además, esta cooperativa posee distribuidores exclusivos en los principales países de la región (Paraguay, Chile, Bolivia, Perú, Bolivia y Uruguay), y filiales en Brasil (SanCor do Brasil Productos Alimenticios), Estados Unidos (SanCor Dairy Corporation), delegaciones en México y otros países de Latinoamérica [63].

La Planta Piloto ESIL [64] es una planta piloto de leche, que si bien no es un modelo exacto de empresa tradicional privada chica, reúne en sí todas las características de la misma. Posee una producción a baja escala, autosostenible, rentable y con constante innovación. La planta está localizada en Villa María, Córdoba, procesando en la actualidad un volumen anual de 170.000 L de leche de excelente calidad proveniente de tambos de la región, comercializando leche, yogures, quesos, dulce de leche y helados. Esta empresa constituye un importante emprendimiento universitario, el cual se creó con el fin de formar a profesionales de la Escuela Superior Integral de Lechería ESIL y promover la investigación y el desarrollo del sector.

El análisis de uno de los puntos críticos de contaminación considerando parámetros de condiciones higiénicas-sanitarias durante el proceso de envasado de leche es posible utilizando como marco de referencia la Norma Mercosur IRAM-NM 323 que se aplica en Argentina.

Este análisis presenta dos enfoques, uno de ellos referido a la implementación de normativas de inocuidad en la industria láctea, y un segundo enfoque, relacionado con la elección del tipo de envasado de la leche para mejorar las condiciones de higiene del producto final. Por ello, es importante citar que la norma IRAM-NM 323 (2010) indica que la alta dirección empresarial debe revisar la eficacia del sistema HACCP según intervalos definidos, de acuerdo con la etapa de verificación. Deben realizar también verificaciones internas periódicas (auditorías, inspecciones u otro tipo de verificación interna) para asegurar que el sistema de seguimiento y los planes de acciones correctivas están siendo aplicados de acuerdo a los procedimientos establecidos [59].

La empresa SanCor, a pesar de los últimos desajustes financieros, cumple estas normas permitiéndoles su inserción a nivel nacional e internacional. Esta empresa ha incorporado en los últimos años las nuevas tecnologías Tetra Pak y Tetra Top. Estas tecnologías favorecen las condiciones de inocuidad, permitiendo mayor conservación, facilidad para abrir y servir, impedir el derrame de su contenido, facilitar su uso y conservar mejor todo el sabor y la calidad de la leche gracias a su tapón de rosca hermético (Figura 4).

**Figura 4:** Nuevo formato de envases de las Leches Sancor.



Los emprendimientos de menor envergadura, no tienden a considerar entre sus objetivos a las auditorías externas. Esto constituiría un aspecto a considerar si estas plantas decidieran aumentar su volumen de ventas o quisieran expandir su producción al mercado internacional.

Además, la implementación de tecnología en el packaging implica altos costos de inversión que se justifican si se compensan con un aumento de la inserción del producto en el mercado.

Considerando los aspectos microbiológicos, la norma IRAM 323:2010 [59] establece la verificación regular de los resultados de los ensayos microbiológicos, muestras de productos intermedios y finales, y si correspondiera, de las materias primas.

Para asegurar el cumplimiento de la norma IRAM en relación a los aspectos microbiológicos, se debe garantizar la calidad higiénico-sanitaria de las máquinas fraccionadoras de leche. Esto se lleva a cabo efectuando un hisopado de los dosificadores con el objetivo de determinar si el lavado de la máquina realizado cada 36 horas, fue completo o incompleto. Por otro lado, la calidad higiénico-sanitaria también involucra un control ambiental de las máquinas. Dicho control generalmente es realizado una vez por semana con el objetivo de determinar si la cantidad de hongos y levaduras que puedan llegar a desarrollarse como consecuencia de la circulación de aire en el interior de las máquinas, sea menor a 10 hongos y levaduras por metro cúbico de aire. En el caso que el valor sea mayor a 10 ufc/m<sup>3</sup>, deberá informarse y tomarse las medidas pertinentes para reducir la contaminación a valores aceptables de acuerdo a la política integral de la planta (Mansi, 2014, comunicación personal).

En la etapa final de elaboración, en cada producto terminado (ejemplo: leche entera), se extraen 5 muestras del comienzo, 5 muestras del producto final y una muestra del pallets que se generó a partir de los productos del medio. Se efectúa el control microbiológico de hongos y levaduras, consistente en un pre-incubado del producto terminado cerrado, por 4 días a 27°C; luego se extrae una muestra y se siembra en una placa de Petri durante 4 días a 27°C y finalmente, se realiza, el conteo de hongos y levaduras, el cual debe ser menor a 10 hongos y levaduras por metro cúbico. Es importante destacar que Sancor presenta la certificación HACCP, permitiéndole con este sistema de control microbiológico de las muestras, garantizar la ausencia de cualquier tipo de contaminación (Mansi, comunicación personal, 2014).

Los emprendimientos de menor envergadura, también garantizan la calidad e inocuidad microbiológica de los productos, de manera tal que la diferencia entre una grande y una pequeña empresa, radica principalmente en el control sistemático a nivel de un análisis de peligros y puntos críticos.

En estas pequeñas cooperativas, el procedimiento de envasado es en botellas de

Polietileno de alta densidad de manera manual utilizando jarras para volcar su contenido en las botellas correspondientes; mientras el personal de envasado se encuentra vestido con indumentaria blanca, barbijo, cofia y guantes [65]. Por lo tanto, los puntos críticos a tener en cuenta en cada una de las empresas mencionadas serán diferentes. Por ejemplo, en la planta piloto, no hay posibilidad de desprendimiento de una pieza de la maquinaria de envasado, pero van a presentarse peligros asociados a la manipulación manual.

Considerando los puntos críticos, la norma IRAM recomienda: “Establecer los límites críticos y las tolerancias para cada punto crítico de control: el equipo HACCP debe definir y documentar los parámetros y los límites críticos específicos para cada PCC. Los límites críticos específicos establecidos para cada PCC deben representar un valor del parámetro relacionado con cada PCC. Cuando sea posible, deben adoptarse límites críticos que puedan ser medidos rápida y fácilmente. Deben documentarse las fuentes de información utilizadas y los motivos para la elección de los límites críticos. Los criterios pueden incluir la evaluación visual del producto, análisis sensorial, pesadas, medición de temperatura, de tiempo, de nivel de humedad, de actividad de agua y otras determinaciones”.

En relación a esto, es importante destacar los valores de pH en el producto terminado, debido a que su valor determina el punto final de la leche y su consiguiente aceptación para su comercialización. La importancia de elección de este parámetro se refleja en el protocolo de Control ambiental que se aplica para el análisis de hongos, levaduras y bacterias, debido a que el pH presente en la leche fresca, cuyo rango va desde 6.60 a 6.80 (generalmente de 6.60), permite el crecimiento de estos microorganismos (Mansi, 2014, comunicación personal).

Considerando aspectos organizativos, la norma IRAM considera que la organización debe establecer y mantener un procedimiento de control de la documentación para asegurarse de que todo el personal que la necesite, tenga acceso a la documentación correspondiente.

Así, la diferencia entre una empresa grande y una pequeña, podría estar en la capacidad de innovación y de adquisición de nuevas tecnologías, como en la implementación del control de los documentos y de los registros, entre ellos los registros de eventos microbiológicos.

Una organización empresarial con mayor grado de jerarquización y personal puede gestionar sus documentos a través de un sistema informático, donde un cambio permita llegar inmediatamente a todo el personal involucrado. Este nivel de organización permite que todos

tengan conocimientos de los procedimientos y pautas a ser implementadas en la empresa, entre otras cosas, mientras que en una empresa pequeña esas mismas tareas recaen en unas pocas personas.



### ***Detección y cuantificación de aflatoxinas: marco metodológico base para las actividades periciales***

El diagnóstico de las enfermedades causadas por aflatoxinas muchas veces es difícil de confirmar, por ello, los datos epidemiológicos, los signos clínicos y las lesiones patológicas pueden indicarnos solo un diagnóstico presuntivo que luego con la ayuda del laboratorio se pueden confirmar. Esta certificación de la presencia y cuantificación de las micotoxinas por parte del laboratorio es lo que nos confirma si realmente estamos en presencia de una aflatoxicosis. ***Es en esta etapa donde toma importancia establecer un marco metodológico base para actividades periciales bioquímicas en eventos toxicológicos, tanto en animales como en humanos.***

Actualmente la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC) y el Comité Europeo de Normalización (ECS) proveen un marco metodológico normatizado para diferentes micotoxinas, validados por estudios interlaboratorio. La AOAC establece alrededor de cuarenta métodos validados para análisis de micotoxinas pertenecientes a diferentes familias químicas, mientras que el ECS ha publicado un documento con criterios específicos para varios métodos de análisis de micotoxinas.

La estructura cumarínica de la aflatoxina y la presencia de grupos cetónicos en la molécula, le confieren dos propiedades importantes para la detección cromatográfica: la polaridad y la fluorescencia bajo luz UV (Céspedes, 1997) [66].

Las técnicas analíticas más empleadas en el análisis de aflatoxinas, considerando la extracción, purificación, exploración o screening y de confirmación son las siguientes [6]:

#### ***a) Extracción y purificación***

La mayoría de los métodos utilizados para la determinación de micotoxinas precisan de métodos confiables de extracción y purificación. Estos pasos son vitales para un protocolo exitoso, ya que estas determinaciones consumen mucho tiempo, entre ellas, la preparación de la muestra insume aproximadamente dos tercios del tiempo total, afectando la elección final de procedimiento de detección.

El método utilizado para extraer micotoxinas de la matriz biológica es dependiente de la estructura de la toxina, entre ellas, las toxinas hidrófobas como las aflatoxinas se extraen

usando disolventes orgánicos [67]. Los solventes orgánicos más utilizados en la extracción son el metanol, acetona, acetato de etilo, acetonitrilo, diclorometano y hexano y mezcla de ellos [6].

### *Elegir solvente o disolvente*

La elección de los disolventes de extracción también es dependiente de la matriz de la que se requiere extraer la toxina, ya que mezclas químicas diferentes pueden afectarla. El procedimiento de purificación utilizado en un protocolo es el paso más importante, ya que la pureza de la muestra afecta la sensibilidad de los resultados. Cantidades traza de una molécula diana pueden estar enmascarados por compuestos que interfieren, encontrados no solo en la matriz, sino en los productos químicos, materiales y disolventes utilizados en la técnica. La cristalería también debe estar libre de contaminación, tales como detergentes alcalinos, que pueden formar sales con los compuestos y dando como resultado tasas de detección más bajas [67].

Las técnicas más utilizadas para extracción y purificación en el análisis de micotoxinas son las siguientes [6,68,69]:

1. Extracción en fase sólida:
  - Extracción en fase sólida convencional.
  - Extracción con columnas Mycosep.
  - Dispersión de matriz en fase sólida.
  - Microextracción en fase sólida.
2. Extracción con columnas de intercambio iónico.
3. Extracción con columnas de inmunoafinidad.
4. Extracción por fluidos supercríticos.
5. Extracción asistida por microondas.
6. Extracción acelerada por disolventes.

### *b) Técnicas de exploración o screening*

La finalidad analítica de estas técnicas es la de descartar, de una manera rápida, las muestras negativas y reducir al máximo el número de análisis. Se aplican cuando existe un gran número de muestras, sin embargo, es recomendable usar alguna técnica de confirmación para validar los resultados positivos, dado que en general los métodos de *screening* son relativamente sensibles, pero poco selectivos. Las técnicas de exploración más usadas para el análisis de micotoxinas son los inmunoensayos y los biosensores [6].

*Inmunoensayos.* La técnica de inmunoensayos para analitos moleculares pequeños (haptenos), como las aflatoxinas en solución, se pueden realizar como ensayos homogéneos sin separación de los reactivos, aunque siendo más comunes las pruebas heterogéneas en las que los reactivos sin reaccionar se eliminan antes de la evaluación. Hay tres tipos de ensayo que utilizan concentraciones limitadas de anticuerpos: 1) ensayo indirecto competitivo; 2) ensayo directo competitivo y 3) ensayo no competitivo [70].

Dos técnicas se han usado ampliamente para el análisis de micotoxinas: el radioinmunoensayo (RIA) y el enzimoimmunoensayo (ELISA). El primero de ellos consiste en añadir al medio de reacción un anticuerpo específico y una cantidad conocida de la micotoxina marcada radioactivamente, la cual se incuba con las muestras problema. Tras un lavado del medio, se mide la radioactividad emitida por la muestra con un contador de centelleo. La medida obtenida es inversamente proporcional a la concentración de la micotoxina en la muestra problema. La técnica de ELISA se basa en la reacción específica antígeno-anticuerpo y puede ser de tipo competitivo directo o indirecto [71].

*Biosensores.* Un biosensor es un dispositivo para la detección de un analito que combina un componente biológico con un componente detector fisicoquímico. Una tecnología prometedora para la detección rápida de aflatoxinas es el biosensor de resonancia de plasmones<sup>2</sup> superficiales (SRP). El principio de la resonancia de plasmón superficial se basa en la detección de un cambio del índice de refracción del medio, cuando un analito se une a una molécula inmovilizada (anticuerpo) [72].

La utilización de biosensores para la detección de aflatoxinas constituye una herramienta muy útil como una “prueba de campo” cualitativo/semicuantitativo para la identificación de muestras “positivas”, permitiendo reducir el número de muestras que se tienen que analizar

---

2 Plasmones: Modos colectivos de oscilación de los electrones de un metal (S Lal, 2007).

con métodos estándar. Los ensayos utilizando biosensores poseen la ventaja de ser rápidos, fáciles de realizar y de bajo costo en relación a ELISA o Cromatografía de Gases Masas (GC/MS) para el análisis de alimentos. Para asegurar la eficacia y confiabilidad en la utilización de biosensores son necesarias mejoras en los parámetros analíticos como la precisión, exactitud y los límites de detección, especialmente en aplicaciones para las aflatoxinas [72].

c) *Técnicas de confirmación*

Según Soriano *et al* (2007), las técnicas más empleadas en los últimos 30 años para el análisis de las aflatoxinas son: cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con un 70% de uso, cromatografía de capa fina con un 23% y electroforesis capilar con un 2% [6].

*Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)*. Esta metodología se constituye en la más utilizada para detectar aflatoxinas. Se basa en técnicas cromatográficas como el HPLC combinados con un detector de fluorescencia o con nuevos equipos como el UPLC (*Ultra Pressure Liquid Chromatography*) que mejoran sus características.

La cromatografía es un procedimiento analítico que se basa en la separación física, identificación y cuantificación de los constituyentes de una mezcla. El principio se fundamenta en los equilibrios de concentración de los compuestos presentes entre dos fases no miscibles. Una de ellas, llamada fase estacionaria, está inmovilizada en una columna o fijada sobre un soporte y la otra, llamada fase móvil líquida, normalmente constituida por una mezcla de disolventes de distinta fuerza eluotrópica, se desplaza en el seno de la primera. El proceso cromatográfico ocurre como resultado de una repetición de etapas de absorción/desorción durante el movimiento de los analitos a través de la fase estacionaria. Finalmente, la separación es consecuencia de los diferentes coeficientes de distribución entre los componentes de una muestra, jugando un papel fundamental la elección de la columna y de la fase móvil. La velocidad de elución de los analitos de interés presentes en la fase móvil dependerá de la solubilidad de éstos en la fase móvil y de la fuerza de interacción de dicho compuesto con la fase estacionaria [73].

Varios métodos analíticos han sido desarrollados y continuamente mejorados para la determinación de las principales aflatoxinas, teniendo cada uno de ellos ventajas y desventajas para su utilización (Tabla 9). Entre las técnicas más frecuentemente usadas para

medir micotoxinas en cereales y subproductos es la HPLC acoplada a extracción con columnas de inmunoafinidad [68,69]. Varios métodos inmunológicos, ELISA y otras pruebas rápidas basadas en anticuerpos, son generalmente usadas para *screening*, aunque estos métodos requieren a menudo análisis confirmatorios con métodos más robustos.

**Tabla 9.** Ventajas y desventajas de métodos tradicionales y emergentes para el análisis de micotoxinas [74]

Método	Ventajas	Desventajas
CG	Análisis simultáneo de micotoxinas, buena sensibilidad, puede ser automatizado (automuestreador).	Equipo costoso, requiere experticia, requiere derivatización, problemas de interferencia de matriz, curva de calibración no lineal, efectos de arrastre de la muestra anterior, variación en reproducibilidad y repetibilidad.
HPLC	Buena sensibilidad, buena selectividad, buena repetibilidad, puede ser automatizado (automuestreador), tiempos de análisis cortos, métodos oficiales disponibles.	Equipo costoso, requiere experticia, puede requerir derivatización.
LC/MS	Análisis simultáneo de micotoxinas, buena sensibilidad, provee confirmación, no requiere derivatización.	Muy costoso, requiere experticia, la sensibilidad depende de la técnica de ionización, curva de calibración asistida por la matriz (para análisis cuantitativo), falta de estándares internos.
ELISA	Preparación simple de la muestra, equipo no costoso, alta sensibilidad, análisis simultáneo de múltiples muestras, útil para <i>screening</i> , uso limitado de solventes orgánicos.	Reactividad cruzada con micotoxinas relacionadas, problemas de interferencia de matriz, posibles resultados falsos negativos/positivos, requiere confirmación.

GC = Gas Chromatography; HPLC = High Performance Liquid Chromatography. LC/MS = Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry; ELISA = Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay.

En España, el cribado de esta molécula se realiza por medio de técnicas inmunoquímicas, inmunocromatografía o ELISA, disponibles en formato kit comercial. Esta tecnología se destaca por su rapidez, costo y manipulación sencilla. La confirmación de las mismas se lleva a cabo mediante cromatografía de líquidos de alta resolución HPLC [68,69,75,76].

## Conclusiones

Con base en la información consultada y al análisis realizado en este trabajo de investigación es posible establecer las siguientes proposiciones:

- La presencia de toxina AFB<sub>1</sub> y AFM<sub>1</sub> en los sistemas productivos primarios no controlados y en plantas procesadoras lácteas representa un riesgo cuyo efecto a largo plazo podría manifestarse como cáncer u otros síndromes dañinos para la salud humana.
- Estas contaminaciones producen efectos agudos o crónicos sobre la anatomía y funcionalidad de las personas expuestas.
- Los efectos tóxicos derivados de contaminaciones químicas de alimentos involucran aspectos jurídicos que contemplan la presunción de daño anatómico-funcional del cuerpo o de la salud de las personas, los cuales deben ser considerados para su evaluación.
- La adopción de buenas prácticas agrícolas y ganaderas mediante el control sanitario de los animales productores de leche y en todas las etapas de los cultivos de la dieta animal permiten evitar o disminuir la contaminación de los animales y en los procesos industriales posteriores.
- Para cumplir con los estándares deseables de calidad e inocuidad que permitan reducir los riesgos a un mínimo aceptable es necesario que los sistemas productivos primarios adopten y cumplan las normas emitidas por el Codex Alimentarius y las de la Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la Agricultura (FAO).
- La implementación de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) en la industria láctea, incluidas en el Código Alimentario Argentino (CAA) y la Norma IRAM NM-323:2010 que establece un sistema de análisis de peligros y puntos críticos de control constituyen herramientas clave para lograr la inocuidad de los alimentos lácteos producidos.
- En el proceso industrial, el envasado representa una de las operaciones donde el riesgo de contaminación alimentaria por un entorno contaminado con AFM<sub>1</sub>, podría

incorporarse al alimento debido a que la operación de llenado puede variar según la magnitud de la industria láctea.

- Las determinaciones analíticas con alta sensibilidad y rapidez en las líneas de producción/envasado permiten reducir los costos de producción y el tiempo de exposición a contaminantes.
- Evaluaciones en empresas lácteas de Córdoba muestran que cumplen con todas las normas de inocuidad necesarias para evitar el riesgo toxicológico asociado a la Aflatoxina AFM<sub>1</sub> en la etapa del proceso de envasado de la leche.
- Las empresas de baja producción, aunque cumplen las normas de inocuidad, poseen un Sistema de Gestión de Inocuidad parcialmente documentado y poco eficaz, aumentando el riesgo de presencia de contaminantes en el proceso productivo a largo plazo.
- En los estudios biológicos, los datos epidemiológicos, los signos clínicos y las lesiones patológicas permiten un diagnóstico presuntivo parcial que debe confirmarse con pruebas de identificación y cuantificación de laboratorio.
- La presencia de AFM<sub>1</sub> constituye un biomarcador confiable de intoxicación alimentaria por aflatoxina AFB<sub>1</sub>.
- Las pruebas de laboratorio establecen una etapa clave para poder determinar un marco metodológico base para actividades periciales bioquímicas en eventos toxicológicos, tanto en animales como en humanos.
- Pruebas hepáticas de enzimas en sangre periférica, trastornos hematológicos y pruebas inmunológicas alteradas por efecto de inmunosupresión que ejerce la aflatoxina en el organismo animal constituyen pruebas confiables de efectos de aflatoxinas.
- La utilización de biosensores constituye una herramienta muy útil, fácil y rápida a nivel de campo para la detección de muestras “positivas” de aflatoxinas.
- El método más aconsejado para la identificación y/o confirmación es el uso de columnas de inmunoafinidad con anticuerpos monoclonales específicos para AFM<sub>1</sub> seguido de detección y cuantificación por HPLC (cromatografía líquida de alta resolución).

### **Consideraciones finales.**

El impacto de la presencia de microorganismos patógenos y contaminantes químicos de origen biológico continúa despertando preocupación en la industria alimentaria, autoridades políticas de la salud y en los consumidores. En este contexto y pese a las mejoras tecnológicas introducidas en los últimos años, los productos lácteos siguen siendo causa de eventos toxicológicos que afectan la salud de la población.

Considerando que la seguridad de los productos alimenticios lácteos se garantiza priorizando un enfoque preventivo, el objetivo de este trabajo de investigación es concientizar sobre esta sensible problemática, aportando una valiosa información para que las autoridades políticas, de salud y empresariales, tanto regionales como provinciales permitan seleccionar, planificar y desarrollar alternativas tecnológicas y científicas que fortalezcan las medidas legislativas inherentes a la prevención y control de eventos toxicológicos derivados de la exposición a aflatoxinas. Además, que los resultados obtenidos permitan avanzar hacia la formación, consolidación y capacitación de equipos de trabajo e investigación interdisciplinarios capacitados en la problemática de salud pública asociada a las cadenas agroalimentarias. Entre ellos, la actuación de los profesionales Peritos Químicos, especialistas en Bioquímica, se torna fundamental en la evaluación de las características biológicas de las muestras y de los procesos químicos derivados de intoxicaciones en los seres vivos. Su actuación permite además contextualizar, mediante estudios y análisis, los procesos bioquímicos involucrados con el objetivo de poder ayudar en las asignaciones de responsabilidades legales y contribuir para un marco de planificación estratégico de prevención y control de eventos toxicológicos de origen alimentario.



## Bibliografía

1. Gisbert Calabuig, J.A. y colab.: *Medicina legal y toxicología*. Masson - Salvat. Barcelona. 1994.
2. Basile, A.A.: *Fundamentos de medicina legal, deontología y bioética*. El Ateneo. Buenos Aires. 2004.
3. Cameán, A.M. Repetto, M.: *Toxicología Alimentaria*. Díaz de Santos. Madrid. 2006.
4. Romero Cabello, R.: *Microbiología y parasitología humana. Bases etiologicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias*. Editorial Médica Panamericana. México. 2007.
5. Flores, O. y colab.: *Contaminación por micotoxinas en alimento balanceado y granos de uso pecuario en México en el año 2003*. Tec Pec Méx. 2006; 44(2):247-256.
6. Soriano del Castillo, J.M., *et al.* Micotoxinas en alimentos. 1a ed. Madrid: Ediciones Díaz de Santos; 2007.
7. Asociación Española de Fabricantes de Harinas y Sémolas de España. 2015. “Recomendaciones para la prevención, el control y la vigilancia de las micotoxinas en las fábricas de harinas y sémolas”. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente Secretaría General Técnica. [En línea]. <https://publicacionesoficiales.boe.es/>
8. Acosta Yamandú M. y otros. INTA. 2016. “Micotoxinas en alimentos para el ganado: alternativas para la mitigación de efectos adversos y criterios para la utilización más segura de alimentos contaminados”. [En línea]. [https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta\\_micotoxinas\\_alimento\\_ganado\\_y\\_algunos\\_criterios\\_utilizacion\\_alimentos\\_contaminados.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_micotoxinas_alimento_ganado_y_algunos_criterios_utilizacion_alimentos_contaminados.pdf)
9. PERAICA,M<sup>1</sup>.,RADIC,B<sup>2</sup>.,LUCIC,A<sup>3</sup>.,PAVLOVIC,M<sup>4</sup>.,et.al.(2000). *Efectos tóxicos de las Micotoxinas en el ser humano*, 77(9);754-766.
10. Urrego Novoa JR, Díaz GJ. Aflatoxinas: Mecanismos de toxicidad en la etiología de cáncer hepático celular. Rev Fac Med Univ Nac Colomb 2006; 54(2):108-116.
11. Treviño, J. 2000. “Aflatoxina”. obtenida el 8 de octubre de 2018, de <http://etimologias.dechile.net/?aflatoxina>
12. Rimblas Corredor ME. Los compuestos químicos en alimentos desde la perspectiva de

la seguridad alimentaria. España; 2004. ISBN 84-95393-46-8.

13. Marin Sillué, S. y otros. 2000. “Control de micotoxinas emergentes. Situación legislativa actual”. Unidad de Microbiología, Departamento de Tecnología de Alimentos, CeRTA. Universidad de Lleida, Lleida, España.

14. Hesseltine, C. W. 1976. “Conditions leading to mycotoxin contamination of foods feeds”. In mycotoxins other fungal related food problems. Joseph V. Rodricks (Ed), American Chemical Society, Washington DC, pp. 1-22.

15. Bbosa GS, Kitya D, Lubega A, Ogwal-Okeng J, Anokbonggo WW, Kyegombe DB. Capítulo 12: Review of the Biological and Health Effects of Aflatoxins on Body Organs and Body Systems. Creative Commons Attribution License: INTECH; 2013.

16. Gimeno A. 2005. Aflatoxina M1 en la leche. Riesgos para la Salud Pública, Prevención y Control. Disponible online en <https://www.engormix.com/micotoxinas/articulos/aflatoxina-leche-riesgos-salud-t26093.htm>

17. Wogan, O. (1992). *Aflatoxins as risk factors hepatocellular carcinoma in humans*. *Cancer Res. Suppl.* 52: 2145-21185.

18. IARC, 1993, *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans*, vol. 56, 245-395. World Health Organization, Lyon.

19. *ALINORM 01/12*, para. 129. Disponible online en [www.fao.org/input/download/report/27/A10112Ae.pdf](http://www.fao.org/input/download/report/27/A10112Ae.pdf)

20. FAO. *Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones en el año 2003*. FAO; 2004.

21. Samson R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J.C., Filtenborg O. 2000. *Introduction to food- and airborne fungi*. The Netherlands: Centraalbureau Voorschimmelculturs. Utrecht, Ponson and Looyen, Wageningen Press.

22. Martínez MM, Vargas del Río LM, Gómez VM. *Aflatoxinas: incidencia, impactos en la salud, control y prevención*. *Biosalud*. 2013; 12(2): 89-109.

23. Jonathan H Williams, Timothy D Phillips, Pauline E Jolly, Jonathan K Stiles, Curtis M Jolly, Deepak Aggarwal; Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions, *The American*

*Journal of Clinical Nutrition*, Volume 80, Issue 5, 1 November 2004, Pages 1108, <https://doi.org/10.1093/ajcn/80.5.1106>

24. GIMENO, A; MARTINS, M.L. (2001). *Métodos de Análisis de Micotoxinas en Alimentos Compuestos y Materias Primas*.

25. Veldman, A., Meijjs, J. A. C., Borggreve, G. J., Heeres-van der Tol, J. J. 1992. "Carry-over of aflatoxin from cows' food to milk". *Anim. Product.* 55, 163–168.

26. Pettersson, H., Bertilsson, J., Wennberg, O. 1989 "Carry-over of aflatoxin from dairy cattle feed to milk". *Proc World Assoc Vet Food Hygienists Symp.* Stockholm.

27. Dragacci, S., Grosso, F., y Gilbert, J. 2001. "Immunoaffinity column clean-up with liquid chromatography for determination of Aflatoxin M1 in liquid milk: Collaborative study". *Journal of AOAC International*, Vol.84 No.2, pp. 437-443.

28. Martínez Flores R, et al. Inspección de aflatoxinas en maíz cultivado, almacenado y transportado en el estado de Tamaulipas, México, en 1998. *Anales del Instituto de Biología, UNAM, Serie Botánica* 2003; 74(2):313-321.

29. Pacin A, Cano G, Resnik SL, Villa D, Taglieri D, Ciancio E. Incidencia de la contaminación por aflatoxinas en maíz argentino, período 1995-2002. *Procedente de IV Congreso Latinoamericano de Micotoxicología*. La Habana, Cuba; 2003.

30. Caballero J, Arbaiza T, Lucas O. Niveles críticos de aflatoxina en muestras de maíz para consumo animal en Lima metropolitana. *Rev Inv Vet* 2001; 12(1).

31. García G, Martínez R, Melgarejo J. Inspección para aflatoxinas en el maíz almacenado o transportado en el estado de Sonora, 1998 [Informe técnico]. *Anales del Instituto de Biología, UNAM, Serie Botánica* 2001; 72(2):187-193.

32. Combita AP, Mildenberg S. Detección de aflatoxinas M1 en leches frescas comercializadas en la zona del Valle del Cauca (Colombia) mediante la técnica de ELISA. Bogotá, Colombia: Universidad Pontificia Bolivariana; 2009.

33. Aranguren EM, Argüelles MJ. Detección de aflatoxina M1 en quesos frescos comercializados en el municipio de Yopal, Casanare, mediante la técnica de ELISA. Bogotá, Colombia: Universidad Pontificia Bolivariana; 2009.

34. Díaz GJ, Perrilla NS, Rojas Y. Occurrence of Aflatoxins in Selected Colombian Foods.

Mycotoxin research 2001; 17:1520.

35. Salazar Juárez LF. Determinación de la presencia de aflatoxinas en granos de maíz (Sea mays) producidos en Petén y distribuidos en la central de mayoreo de la ciudad capital, y elaboración de un Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC). Guatemala: Universidad de San Carlos; 2008.

36. asociados., D.I.C.y., *Código Alimentario Argentino*. 1997, Buenos Aires- Arg.

37. Van Egmond H.P.1989. *Introduction in mycotoxins in dairy products*. London: Elsevier Applied Science. p. 1-10.

38. FAO, WHO Food Additives. Series: 47. 2001.

39. *MERCOSUR/GMC. Res No. 25/02: Reglamento técnico Mercosur sobre límites máximos de aflatoxinas admisibles en leche, maní y maíz (derogación de la res. GMC n° 56/94)*. MERCOSUR; 2002. Disponible online en <https://sites.google.com/site/xenobioticos/micotoxinas/mercosur.pdf>

40. Díaz GJ. Aflatoxina M1: un carcinógeno de potencial presencia en la leche. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2005.

41. Santos Ohona, O.M.: *Importancia y Efectos de la Aflatoxina en los Seres Humanos*. Microbiología de Alimentos. Universidad Autónoma de Bucaramanga. Pág. 6.

42. Insua V. Trazabilidad avanzada: guía práctica para la aplicación de un sistema de trazabilidad en una empresa alimentaria. Ideas propias Editorial S.L.; 2006. ISBN 8498390133, 9788498390131.

43. FAO. Manual sobre la aplicación del sistema de análisis de peligros y de puntos críticos de control (APPCC) en la prevención y control de las micotoxinas. ISSN 1014-2916.

44. Comisión del Codex Alimentarius. Código de prácticas para reducir la Aflatoxina B1 presente en las materias primas y los piensos suplementarios para animales productores de leche. CAC/RCP 45-1997; 2007.

45. Borrell J, Gimeno G. Micotoxinas en los alimentos: medidas de prevención y detoxificación. Selecciones Avícolas 2003. p. 567-572.

46. Tapia M, et al. Uso de secuestrantes para disminuir la toxicidad de micotoxinas en alimentos para acuicultura. Memorias del Décimo Simposio Internacional de Nutrición

Acuícola; 2010. p. 514-542.

47. Dixon JB, Kannewischer I, Tenorio Arvide MG, Barrientos Velásquez AL. Aflatoxin sequestration in animal feeds by quality-labeled smectite clays: An introductory plan. *Applied Clay Science* 2008; 40:201-208.

48. Rustom IYS. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chemistry* 1997; 59(1):57-67.

49. United States Agency for International Development, USAID. Aflatoxin: A synthesis of the research in health, agriculture and trade. [En línea] [Citado el 27 de agosto de 2013]. Disponible en: <http://www.aflatoxinpartnership.org/~media/Files/Projects/Aflatoxin%20microsite/PACA%20general%20documents/Aflatoxin%20Desk%20Study%20Final%20Report%202012.pdf>

50. Shekhar M, Singh S, Khan AAA, Kumar S. Efficacy of Inorganic salts and Organic acids against Colony Growth of *Aspergillus flavus* and Their use to control Aflatoxin level in Post Harvest Maize. *Internet Journal of Food Safety* 2009; 11:4-10.

51. Safara M, Zaini F, Hashemi SJ, Mahmoudi M, Khosravi AR, Shojai-Aliabadi F. Aflatoxin detoxification in rice using citric acid. *Iranian J Publ Health* 2010; 39(2):24-2962.

52. Nyandieka HS, Maina JO, Nyamwange C. Detoxification of Aflatoxin in Artificially Contaminated Maize Crop by Ammoniation Procedures. *Discovery and Innovation* 2009; 21:1-2.

53. Allameh A, Safamehr A, Mirhadi SA, Shivazad M, Razzaghi-Abyaneh M, Afshar-Naderi A. Evaluation of biochemical and production parameters of broiler chicks fed ammonia treated aflatoxin contaminated maize grains. *Animal Feed Science and Technology* 2005; 122(3-4):289-301.

54. Anguiano GL, Vargas AV, Guzmán D. Inactivación de aflatoxina B1 y aflatoxicol por nixtamalización tradicional del maíz y su regeneración por acidificación de la masa. *Salud Pública Mex* 2007; 47:369-375.

55. Arámbula Villa G. La detoxificación de las aflatoxinas, lograda mediante el proceso de nixtamalización, es reversible. Procedente de 1er Simposio "La Investigación y el desarrollo Tecnológico". Queretaro; 2004.

56. Inan F, Pala M, Doymaz I. Use of ozone in detoxification of aflatoxin B1 in red pepper. *Journal of Stored Products Research* 2007; 43:425-429.
57. Alberts JF, Engelbrecht Y, Steyn PS, Holzapfel WH, Van Zyl WH. Biological degradation of aflatoxin B1 by *Rhodococcus erythropolis* cultures. *International Journal of Food Microbiology* 2006; 109:121-126.
58. Velazhahan R, Vijayanandraj S, Vijayasamundeeswari A, Paranidharan V, Samiyappan R, et al. Detoxification of aflatoxins by seed extracts of the medicinal plant, *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague ex Turrill – Structural analysis and biological toxicity of degradation product of aflatoxin G1. *Food Control* 2010; 21:719-725.
59. IRAM, L.p., *Norma Argentina IRAM-NM 323: 2010*.
60. *Depósito de documentos de Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*. obtenida el 07 de noviembre de 2017, de <http://www.fao.org/docrep/005/y1579s/y1579s03.htm>.
61. Rodríguez Peula, M.: *Envasado y acondicionamiento de productos lácteos*. INAE0209. IC Editorial. 2014.
62. Tetra Pak. (Junio de 2014). *Integridad de envases*. Guayaquil, Guayas, Ecuador.
63. *Sancor*. obtenida el 07 de noviembre de 2017, de <http://www.sancor.com/la-empresa/the-company-about-sancor>.
64. *Escuela Superior Integral de Lechería ESIL*. obtenida el 24 de marzo de 2018, de <http://escueladelecheria.com.ar/index.php?c=general&t=4&a=160>.
65. *Planta lechera de la Escuela Superior Integral de Lechería ESIL*. obtenida el 24 de marzo de 2018, de <http://www.youtube.com/watch?v=dWkb3GeYZ7I>.
66. Céspedes, A. 1997. “Desarrollo y estandarización de tres técnicas analíticas por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y determinación de los niveles de contaminación con aflatoxinas, zearalenona y ocratoxina A en materias primas y alimento terminado empleado para la nutrición de aves y cerdos en Colombia”. Trabajo de grado en Salud y Producción Animal. Universidad Nacional de Colombia.
67. Turner NW, Subrahmanyam S, Piletsky SA. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Anal Chim Acta* 2009; 632(2):168-180.

68. Franco, R. C., Rosim, R. E., Fernandes, A. M., & Oliveira, C. A. F. de. (2008). Determinação de aflatoxina em queijos Minas frescal e padrão comercializados no município de Pirassununga, Brasil: resultados preliminares. *Revista Universidade Rural. Série Ciências da Vida*, 28, 73-75.
69. Sebastião, L. S., Fagundes, H., Fernandes, A. M., Rosim, R. E., Corassin, C. H., & Oliveira, C. A. F. de. (2008). Determinação de aflatoxinas em ração animal e leite de propriedades leiteiras do estado de São Paulo, Brasil. *Revista Universidade Rural. Série Ciências da Vida*, 28, 76-78.
70. Peiwu Li, Zhang Q, Zhang W. Immunoassays for aflatoxins. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2009; 28(9):1115-1126.
71. Zheng MZ, Richar JL, Binder J. A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. *Mycopathologia* 2006; 161:261-273.
72. Mosiello L, Lamberti I. Biosensors for Aflatoxins Detection. [aut. libro] and Lamberti Ilaria Mosiello L. [ed.] Dr Irineo Torres-Pacheco. *Aflatoxins - Detection, Measurement and Control* 2011. p. 147-160.
73. Herrero Querol L. Puesta a punto y validación de un método de análisis de aflatoxinas en frutos secos y cereales. Universidad de Zaragoza; 2012.
74. Pascale MN. Detection methods for mycotoxins in cereal grains and cereal products. *Proc. Nat. Sci* 2009; 117:15-25.
75. *Detección de Aflatoxina M1 en leche*. obtenida el 08 de mayo de 2018, de <http://zeulab.com/blog/deteccion-de-aflatoxina-m1-en-leche/>
76. Quevedo Garza, Patricia Amanda; Trujillo Mesa, Antonio José, dir.; Cantú Martínez, Pedro César, dir. Ocurrencia y estimación de la exposición humana a aflatoxina M1 en muestras de leche procedentes de Monterrey (México). [Barcelona]: Universitat Autònoma de Barcelona, 2015. 1 recurs electrònic (197 p.). ISBN 9788449047954. Tesi doctoral - Universitat Autònoma de Barcelona. Departament de Ciència Animal i dels Aliments, 2014 <<https://ddd.uab.cat/record/130275>> [Consulta: 20 juny 2018].

## **Anexo**



NORMA  
ARGENTINA

IRAM-NM  
323\*

Primera edición  
2010-11-18

---

**Sistema de análisis de peligros y puntos  
críticos de control (HACCP)**

**Requisitos**

Hazard Analysis and Critical Control Points System (HACCP)  
Requirements

NORMA IRAM -  
COPIA FIEL DEL ORIGINAL  
IMPRESA EN EL  
CENTRO DE DOCUMENTACION DE IRAM  
INSTITUTO ARGENTINO DE  
NORMALIZACION Y CERTIFICACION  
Queda terminantemente prohibida  
su reproducción parcial o total  
sin autorización de IRAM

\* La presente reemplaza a la norma IRAM 14104: 2001.



Referencia Numérica:  
IRAM-NM 323:2010

Copia para uso exclusivo - FILIAL MEDITERRANEO - 30-52566278-2

