

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**DETERMINACIÓN DE NIVELES DE AFLATOXINA M₁ EN QUESOS
ARTESANALES DEL URUGUAY**

“por”

**Juan Andrés BORGUNDER
Agustín JABIEL**

TESIS DE GRADO presentada como uno
de los requisitos para obtener el título de
Doctor en Ciencias Veterinarias

Orientación: Higiene, Inspección Control y
Tecnología de los Alimentos de Origen
Animal

MODALIDAD: ENSAYO EXPERIMENTAL

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2022**

PÁGINA DE APROBACIÓN

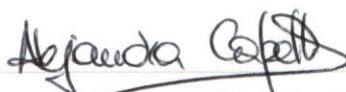
Tesis de grado aprobada por:

Presidente de la mesa:



Dra. Carmen García y Santos

Segundo miembro (Tutor):



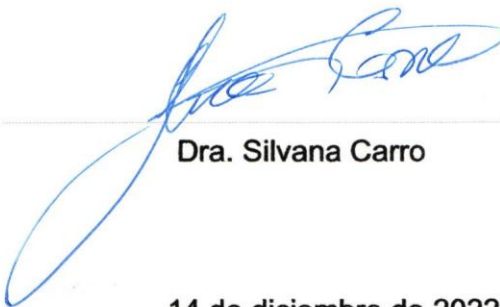
Dra. Alejandra Capelli

Tercer miembro:



Dra. Stella Maris Reginensi

Cuarto miembro:



Dra. Silvana Carro

Fecha:

14 de diciembre de 2022

Autores:



Br. Juan Andrés Borgunder Soria



Br. Agustín Jabel Arenas

AGRADECIMIENTOS

A nuestra tutora Dra. Alejandra Capelli y co-tutora Dra. Silvana Carro, por su dedicación, el apoyo y la paciencia.

Dr. Gonzalo Suárez y a los funcionarios de Biblioteca por su colaboración con este trabajo.

A nuestras familias y amigos que nos han acompañado y apoyado a lo largo de nuestra formación, pilar fundamental para seguir adelante.

A la Facultad de Veterinaria, por formarnos académica y personalmente, por permitirnos conocer personas maravillosas, que durante todos estos años nos hicieron sentir en casa.

PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	5
RESUMEN.....	6
SUMMARY	7
INTRODUCCIÓN.....	8
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
<i>Quesería Artesanal en Uruguay</i>	9
<i>Adaptación del sistema productivo</i>	10
<i>Inocuidad Alimentaria</i>	12
<i>Hongos toxicogénicos y micotoxinas</i>	12
<i>Aflatoxinas</i>	15
<i>Aflatoxinas B₁ y M₁</i>	17
<i>Alfatoxina M₁ y su comportamiento durante la producción de quesos</i>	19
<i>Micotoxicosis</i>	14
<i>Aflatoxicosis</i>	16
<i>Normativa quesería artesanal en Uruguay</i>	21
<i>Normativa Internacional</i>	22
<i>Métodos de detección de Aflatoxinas</i>	23
<i>Métodos de control de Aflatoxina B₁</i>	24
HIPÓTESIS	25
OBJETIVOS	25
MATERIALES Y MÉTODOS	25
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
CONCLUSIÓN	37
ANEXO.....	44

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Límites internacionales para AFM ₁ en leche y derivados lácteos para consumo humano	23
Tabla 2. Descripción de los tipos de quesos muestreados.....	30
Tabla 3. Media $\pm$ desvío estándar de los parámetros fisicoquímicos analizados agrupados según tipo de queso	30
Tabla 4. Clasificación de los quesos artesanales (QA) (n=69) en base a la humedad conforme al Reglamento Bromatológico Nacional (Uruguay, 1994).....	31
Tabla 5. Coincidencias entre la denominación de los quesos por el productor y clasificación del Reglamento Bromatológico Nacional conforme a la humedad.....	31
Figura 1. Evolución del consumo aparente de alimentos concentrados desde el año 2007 al 2020 (en miles de toneladas).....	11
Figura 2. Fases de crecimiento fúngico y fase donde se produce la síntesis de micotoxinas.	14
Figura 3. Estructura química de las aflatoxinas.....	16
Figura 4. Metabolismo de la aflatoxina B ₁ en rumiantes.	18
Figura 5. Biotransformación de AFB ₁ a AFM ₁ por la enzima citocromo p450 hepática	19
Figura 6. Concentración, media y desvío estándar de los niveles de AFM ₁ obtenidos en las muestras de quesos.	32
Figura 7. Niveles de AFM ₁ en quesos y límite establecido por la Unión Europea y por países más exigentes, Suiza, Austria, Turquía y Holanda.	33
Figura 8. Correlación entre los niveles de aflatoxina M ₁ y porcentaje de humedad en las muestras de quesos.	34
Figura 9. Correlación entre los niveles de aflatoxina M ₁ y actividad del agua en las muestras de quesos.	34
Figura 10. Correlación entre los niveles de aflatoxina M ₁ y porcentaje materia grasa en las muestras de quesos.	35
Figura 11. Correlación entre los niveles de aflatoxina M ₁ y porcentaje de cloruros en las muestras de quesos.	35
Figura 12. Correlación entre los niveles de aflatoxina M ₁ y pH en las muestras de quesos.....	36

RESUMEN

Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos producidos por hongos toxicogénicos, como *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. y *Fusarium* spp. Estas pueden desarrollarse en una gran variedad de productos agrícolas y su acumulación en los alimentos destinados a consumo humano y animal representa una amenaza para la salud, debido a su efecto carcinogénico, mutagénico e inmunosupresor. *Aspergillus* spp. produce diferentes micotoxinas, entre las que se destacan las aflatoxinas y de estas la aflatoxina B₁ (AFB₁). Pueden ser ingeridas por los animales lecheros a través de alimentos contaminados, se absorben rápidamente por vía gastrointestinal y son biotransformadas en el hígado en diferentes metabolitos. El más importante es la aflatoxina M₁ (AFM₁), que se excreta a través la leche. Se ha demostrado que, como la AFM₁ tiene mayor afinidad por las proteínas de la leche, en los quesos se distribuye de manera desigual entre el suero y la cuajada, con mayor concentración en esta última. Asimismo, diferentes autores determinaron que las aflatoxinas son estables en los procesos productivos utilizados normalmente para la elaboración de quesos como la pasteurización y maduración. Cuando se usa leche contaminada con AFM₁ para hacer queso, ésta se encuentra en el producto lácteo a niveles 2,5 a 5,8 veces más altos que en la leche utilizada para su elaboración. Los quesos artesanales en Uruguay son elaborados con leche producida en el predio exclusivamente y se destinan al mercado interno, estimando su producción en 14.000 toneladas al año, aproximadamente el 50% del volumen total de queso consumido en el país. El objetivo de este trabajo fue determinar los niveles de aflatoxinas presentes en 69 muestras de quesos artesanales producidos en la zona sur oeste del país por el método de ELISA y comparar con los límites establecidos por la normativa nacional e internacional. También se analizaron los siguientes parámetros fisicoquímicos: pH, cloruros, aw y materia grasa de todas las muestras de quesos y se evaluó si existía correlación lineal entre estos parámetros y la presencia de AFM₁. En la totalidad de las muestras se detectó la presencia de AFM₁, sin embargo, ninguna muestra presentó niveles superiores a los permitidos por la normativa nacional. Tampoco se encontró correlación lineal entre los niveles de AFM₁ y los parámetros fisicoquímicos de los quesos. Este estudio nos permite concluir que a pesar de los bajos niveles de contaminación de AFM₁, la presencia de estos metabolitos en todas las muestras y el gran consumo de quesos artesanales, en nuestro país, sería recomendable realizar un monitoreo de los niveles de AFM₁. En este sentido, se debería hacer énfasis en la prevención y control de contaminación con AFB₁ del alimento para el ganado lechero mediante la aplicación de buenas prácticas agrícolas en los establecimientos productores.

SUMMARY

Mycotoxins are toxic secondary metabolites produced by toxigenic fungi, such as *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. and *Fusarium* spp. These can develop in a wide variety of agricultural products and their accumulation in food intended for human and animal consumption represents a threat to health, due to its carcinogenic, mutagenic and immunosuppressive effect. *Aspergillus* spp. produces different mycotoxins, among which aflatoxins stand out, in particular aflatoxin B₁ (AFB₁). They can be ingested by dairy animals through contaminated feed, are rapidly absorbed through the gastrointestinal tract and are biotransformed in the liver into different metabolites. The most important is aflatoxin M₁ (AFM₁), which is excreted through milk. It has been shown that, since AFM₁ has a higher affinity for milk proteins, in cheeses it is distributed unevenly between whey and curd, with a higher concentration in the latter. Likewise, different authors determined that aflatoxins are stable in the production processes normally used for cheese making, such as pasteurization and maturation. When AFM₁-contaminated milk is used to make cheese, it is found in the dairy product at levels 2.5 to 5.8 times higher than in the milk used. Artisanal cheeses in Uruguay are made with milk produced exclusively on the farm and are destined for the domestic market, estimating its production at 14,000 tons per year, approximately 50% of the total volume of cheese consumed in the country. The objective of this work was to determine the levels of aflatoxins present in 69 samples of artisan cheeses produced in the south-west of the country by the ELISA method and to compare them with the limits established by national and international regulations. The following physicochemical parameters were also analyzed: pH, chlorides, aw and milk fat of all the cheese samples and it was evaluated if there was a linear correlation between these parameters and the presence of AFM₁. The presence of AFM₁ was detected in all the samples, however, no sample presented higher levels than those allowed by national regulations. Neither was a linear correlation found between AFM₁ levels and the physicochemical parameters of the cheeses. This study allows us to conclude that despite the low levels of AFM₁ contamination, the presence of these metabolites in all samples and the large consumption of artisan cheeses, in our country, it would be advisable to monitor AFM₁ levels. In this sense, emphasis should be placed on the prevention and control of AFB₁ contamination of feed for dairy cattle through the application of good agricultural practices in producing establishments.

INTRODUCCIÓN

Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos producidos por hongos toxicogénicos, algunos de los principales géneros son *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. y *Fusarium* spp. (Hollinger y Ekperingin, 1999). Se han identificado hasta ahora más de 200 micotoxinas, sin embargo, las aflatoxinas (AF) se consideran las micotoxinas de mayor importancia desde el punto de vista normativo y de inocuidad alimentaria (Díaz, 2005). Las aflatoxinas son micotoxinas producidas por algunas cepas de hongos como *Aspergillus flavus*, que produce principalmente aflatoxinas B₁ y B₂ y *A. parasiticus*, *A. nominus* que producen aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ (Fallah, Jafari, y Rahnama, 2009). Estas micotoxinas son posibles de encontrar en una gran variedad de productos agrícolas, y su presencia representa un riesgo importante para la salud humana y animal, debido al poder carcinogénico, mutagénico e inmunosupresor de algunas de ellas (Food and Agriculture Organization, s.f.).

El ganado lechero al consumir alimento contaminado con aflatoxina B₁ (AFB₁) genera un metabolito hidroxilado como forma de detoxificación, la aflatoxina M₁ (AFM₁), la cual es eliminada a través de la leche generando un riesgo para el consumo humano (Applebaum, Brackett y Wi, 1982). En el año 1993 la Agencia Internacional para la Investigación sobre el cáncer (IARC) ratifica en base a la existencia de suficientes estudios el poder carcinogénico de las AF, clasificando a AFB₁ como clase 1 (carcinógeno para humanos) y a AFM₁ como clase 2B (posible carcinogénico para humanos).

Debido a la afinidad de AFM₁ por la caseína puede existir un aumento de su concentración en quesos, en donde resulta superior con respecto a la leche que fue utilizada para su elaboración (Devicci, 2006; Govaris, Roussi, Koidis y Botsoglu, 2001, Kamkar, Karim, Aliabadi, y Khaksar, 2008; Oruc, Cibik, Yilmaz, y Gunes, 2007). La mayoría de los autores coincide que la presencia de aflatoxinas B₁ y M₁ no disminuyen por los tratamientos térmicos realizados en la elaboración de los productos lácteos, ya que son termoestables (Aparecida Becker-Algeri et al., 2016; Gimeno, 2005; Prandini, et al., 2009; Soriano del Castillo, 2007; Toral, 2010; Yousef y Marth, 1989).

En nuestro país hay una importante producción de quesos artesanales, que es volcada en su totalidad al mercado interno. Se estima que el volumen producido es de 14.273 ton/año, lo que equivale al 50 % del total del consumo de queso en Uruguay, representando un consumo de 8,7 kg/cápita/año (Martínez, 2022; Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, 2021). Se define al queso artesanal por el decreto del MGAP, N° 65/003 como “el queso elaborado con leche cruda, pasteurizada o termizada, producida en el predio, exclusivamente” (Uruguay, 2003). En ocasiones la leche puede estar contaminada con altos niveles de AFM₁, y como consecuencia concentrarse en la producción de quesos. Por otra parte, en la producción industrial, debido a la mayor existencia de controles del producto y a la utilización de leche de diferentes orígenes, que generaría un efecto de dilución, el riesgo de presencia de contaminación con AFM₁ respecto a los quesos artesanales sería menor (Anfossi et al., 2011).

Debido a la importancia que tiene la quesería artesanal para nuestro país, al volumen de quesos que se consume, y a como la AFM₁ se comporta en la elaboración de los mismos el objetivo de este trabajo fue monitorear los niveles de AFM₁ en muestras de quesos artesanales producidos en la zona sur oeste del país.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Quesería Artesanal en Uruguay

La producción de Quesos Artesanales comenzó en nuestro país a fines del siglo XIX junto con los inmigrantes suizos, los cuales se instalaron en la zona comprendida entre el Río Rosario y el Arroyo Cufre, hoy Departamento de Colonia. Con el paso del tiempo su cultura y tecnología de producción se fue extendiendo a zonas vecinas del Departamento de San José (Bagnato, 2004). La primera quesería conocida fue la del colono Juan Teófilo Karlen y al poco tiempo la de un suizo – francés Abraham Félix, ubicadas las dos, en la zona de Colonia Suiza (Borbonet, 2001).

Los pequeños productores de leche han encontrado en la quesería artesanal una alternativa para continuar en el medio rural al agregar valor transformando la leche en un producto como el queso, mejorando sus ingresos, utilizando generalmente mano de obra familiar y manteniendo la tradición heredada de sus antepasados (Acuerdo Interinstitucional para el Desarrollo de la Quesería Artesanal (AIDQA), Asociación del Queso Artesanal (ADQA), Facultad de Ingeniería (FING), Instituto Nacional de la Leche (INALE), Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU) / Latitud, Fundación LATU y Ministerio de Industria, Energía y Minería (MIEM), 2017; Borbonet, 2001). En su mayoría, la producción de quesos artesanales se desarrolla en establecimientos de pequeño a mediano tamaño, que producen diariamente de 100 a 3000 litros de leche y que poseen entre 10 y 100 vacas (AIDQA, ADQA, FING, INALE, LATU, MIEM, 2017).

Según la estimación del Instituto Nacional de la Leche (INALE) realizada en el año 2019, existen 891 establecimientos dedicados a la quesería artesanal en todo el país, y el 80 % de ellos se ubican en los departamentos de Colonia y San José. La quesería artesanal elabora cerca del 5,3 % de la producción total de leche y representa el 26 % de los establecimientos lecheros del país (AIDQA, ADQA, FING, INALE, LATU, MIEM, 2017). Por otra parte, el Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca en el Anuario Estadístico 2021 de la Dirección de Estadísticas Agropecuarias (DIEA), informa que en nuestro país se destinaron al mercado interno 28.000 toneladas de queso, sin discriminar entre producción artesana e industrial, sin embargo, de acuerdo a la estimación realizada por Martínez (2022) la producción de queso artesanal sería de 14.273 ton/año en 2021, representando aproximadamente un 50% de la producción total de quesos.

Con el nombre genérico de queso se entiende al producto fresco o madurado que se obtiene por separación parcial del suero de leche o de leche reconstituida (entera, parcial o totalmente descremada), o de sueros lácteos, coagulados por la acción física del cuajo, de enzimas específicas, de bacterias específicas, de ácidos orgánicos, solos o combinados, todos de calidad apta para uso alimentario (Uruguay, 1994)

Existen cientos de variedades de quesos alrededor del mundo, y en algunos casos con siglos de tradición, con características particulares de acuerdo con las condiciones geográficas, culturales y métodos de producción. Algunos tipos de queso tienen una característica especial asociado a la localización geográfica, por lo que

llevan una denominación de origen, que los destaca a la hora de comercializarlos. Dentro de las variedades más conocidas de queso con denominación de origen encontramos el Camembert y Brie, ambos de Francia, pero también el Emmental y Gruyere de Suiza (Diverio y Bilinski, 2019).

No existe consenso mundial en cuanto a la definición de queso artesanal, si bien en algunos países está relacionado con diferentes tipos de quesos o determinadas regiones donde se producen, en nuestro país se define según el decreto N° 65/003 como “el queso elaborado con leche cruda, pasteurizada o termizada, producida en el predio, exclusivamente” (Uruguay, 2003). Por otra parte, el Reglamento Bromatológico Nacional define al queso artesanal como “el queso elaborado en condiciones artesanales, en forma individual, familiar o asociativa, exceptuando la producción masiva que implique instalaciones y procesos industriales” (Uruguay, 1994, p. 149).

Los principales quesos artesanales elaborados en nuestro país son de los tipos Sbrinz, Colonia y Dambo. La pasteurización de la leche para la elaboración de los quesos contribuye a la inocuidad de los mismos. A su vez, mejora los procesos de fermentación, de todas formas, seguramente por seguir la tradición europea, en nuestro país la mayoría de los quesos producidos artesanalmente son en base a leche cruda. Además se pueden elaborar otros quesos con leche cruda como el Sardo y el Parmesano entre otros, siempre que se parta de una leche de excelente calidad y que el tiempo de maduración de los quesos sea mayor de 60 días (Uruguay, 1994). Durante la pasteurización se eliminan los microorganismos indeseados, patógenos, pero también los que contribuyen con las características de los quesos, por lo cual al pasteurizar la leche es necesario el uso de fermentos lácticos para conseguir quesos de calidad y composición uniforme (Borbonet, Urrestarazu y Pelaggio, 2011).

Adaptación del sistema productivo

La lechería uruguaya se ha visto obligada a incrementar la productividad (litros por hectárea) en los últimos años debido al aumento en los precios de la tierra y el creciente valor de los productos agrícolas. Estos sucesos promovieron una mayor utilización de concentrados y reservas forrajeras (Figura 1), para compensar la disminución de la superficie pastoril (Chilibroste, 2015; Methol y Gorga, 2021).

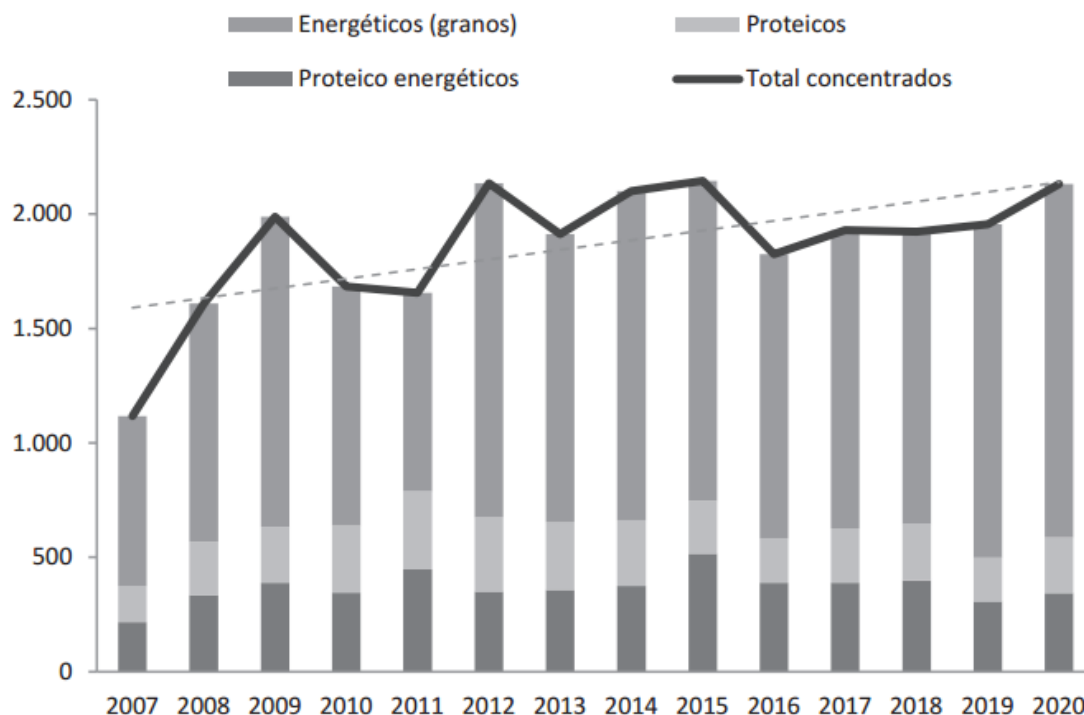


Figura 1. Evolución del consumo aparente de alimentos concentrados desde el año 2007 al 2020 (en miles de toneladas). Recuperado de Methol y Gorga, 2021

En Uruguay, la estacionalidad en el crecimiento de las pasturas lleva a que principalmente en el invierno, muchos de los tambos deban suplementar con concentrados (Mendoza y Acosta, 2020). El método más utilizado para conservar el alimento es el de silo-bolsa o silo-bag, esta técnica permite conservar granos con alta humedad dentro del mismo predio en el que se van a utilizar, así manejar la ingesta de energía en cantidades y momento deseado por el productor, resultando en beneficios económicos (Mioneto, 2017).

De acuerdo con lo establecido por Mendoza y Acosta (2020) en nuestro país un 30% del total de concentrados suministrados a las vacas lecheras son granos de cereales cosechados húmedos y conservados como ensilados.

Los silos de grano húmedo son una forma de almacenamiento del grano cosechado con una humedad entre 23 y 40% sin secado previo y almacenado en condiciones de anaerobiosis (Chalking y Brasesco, 2003). En estas condiciones los microorganismos presentes en el tejido vegetal fermentan los carbohidratos solubles del material ensilado produciendo ácido acético y ácido láctico, acidificando el medio hasta pH 4 aproximadamente. Al alcanzar ese pH se inhibe el desarrollo de microorganismos que pueden degradar los granos o producir toxinas como los hongos, conservando el alimento sin perder la calidad (Chalking y Brasesco, 2003; Duniere, Sindou, Chaucheryras-Durand, Chevallier y Thevenot-Sergentet, 2013; Gallop, Zakin, y Weinberg, 2005).

En el trabajo “Caracterización de productores de Queso Artesanal del litoral sur” realizado por Marian Lancibidad y Cecilia Loza (2011), observaron que, de un total de 28 establecimientos de producción de queso artesanal, el 86% de los mismos utilizaban algún tipo de reserva forrajera para la alimentación durante el invierno, de

éstas, el 83% eran ensilajes. En cambio, en los meses de noviembre solo el 36% de los establecimientos suplementan debido a la mayor disponibilidad de pasturas. Por otra parte, se observó que, la totalidad de los establecimientos de menor superficie utilizaban reservas, debido a la imposibilidad de cubrir los requerimientos nutricionales de los animales en una reducida superficie de pastoreo.

En base a la encuesta realizada por INALE en 2019 de 598 productores artesanales en los departamentos de Canelones, Colonia, Flores, Florida, Paysandú, Río Negro, San José y Soriano se observó que únicamente 4 productores declararon haber realizado análisis de micotoxinas en las reservas de alimentos, los cuales eran pertenecientes al estrato de mayor producción lechera (más de 280.000 litros anuales) (INALE, 2019).

Inocuidad Alimentaria

La alimentación es una de las necesidades básicas de los seres humanos, pero únicamente cuando los alimentos son inocuos, pueden contribuir con nuestra salud y seguridad alimentaria. La inocuidad alimentaria es el concepto que implica que los alimentos no causarán daños al consumidor cuando se preparen y/o consuman de acuerdo con su uso previsto. Si un alimento no es inocuo, no es un alimento (Food and Agriculture Organization, s.f.; Instituto Uruguayo de Normalización Técnica, 2010). Para la obtención de alimentos inocuos es fundamental tomar las medidas necesarias para prevenir la presencia de peligros físicos, químicos y biológicos en el momento de su consumo. Estos peligros pueden ser introducidos en cualquier parte de la cadena alimentaria, por lo que es esencial un compromiso de toda ella (productores primarios, producción de alimentos para animales que a su vez producen alimentos, producción de materiales de empaque destinados a estar en contacto con alimentos, transformadores de alimentos, transportistas, comercializadores de alimentos y consumidor final) (Instituto Uruguayo de Normalización Técnica, 2010; Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura, Organización Mundial de la Salud, 2020).

Los riesgos asociados a las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAS) debido entre otros a la presencia de bacterias son bien conocidas por parte de los consumidores. Sin embargo, el riesgo asociado a la presencia de toxinas producidas por hongos no está tan difundido.

Hongos toxicogénicos y micotoxinas

El conocimiento de que los hongos tienen la capacidad de contaminar alimentos y producir metabolitos secundarios tóxicos responsables de causar enfermedad en los consumidores, tanto humanos como animales, data de la Edad Media (Riet-Correa, Méndez y Schild, 1991). La palabra “micotoxina” proviene de la palabra griega “mykes” y la palabra latina “toxicum”, que significa hongo y veneno respectivamente, por lo que la palabra “mykes toxicum” significa toxina derivada de un hongo o micotoxina (Soriano del Castillo 2007).

El surgimiento de la micotoxicología moderna comenzó en la década de los 60 en Inglaterra, donde se aislaron hongos y detectaron aflatoxinas en raciones contaminadas provenientes de Brasil, causantes de la muerte de 100.000 pavos,

hecho histórico por el cual se conoce como “enfermedad X del pavo” (Sargeant *et al.*, 1961).

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos principalmente por los géneros *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.* y *Fusarium spp.* (Hollinger y Ekperingin, 1999). Las micotoxinas se pueden encontrar en una gran variedad de productos agrícolas, y su presencia representa una amenaza importante para la salud humana y animal, debido al poder carcinogénico, mutagénico e inmunosupresor de algunas de ellas (Food and Agriculture Organization, s.f.).

Los forrajes y granos entran en contacto de forma natural con esporas de hongos, antes, durante y después de la cosecha, incluso durante el transporte y almacenamiento (Yiannikouris y Jouany, 2002). De acuerdo con el momento de la contaminación es posible clasificar los hongos toxicogénicos en dos grupos: los de campo y los de almacenamiento. El grupo de los hongos de almacenamiento se desarrollan en granos acondicionados y almacenados con una humedad entre 13% y 18%, y está representado principalmente por especies de dos géneros: *Aspergillus spp.* y *Penicillium spp.* (Riet-Correa, Méndez y Schild, 1991).

La presencia de hongos en un alimento no es indicativa de la presencia de micotoxinas, ya que es necesario que se den las condiciones adecuadas para que éste las produzca. Sin embargo, la ausencia de hongos no representa ausencia de micotoxinas, ya que las mismas pueden estar presentes luego de la eliminación de los mismos (Carrillo, 2003; Perusia y Rodríguez, 2001).

Los factores ambientales son los que tienen mayor repercusión en el crecimiento de los hongos y juegan un rol crítico para la producción de micotoxinas. Entre estos factores ambientales encontramos humedad y humedad relativa mayor al 13% y 70% respectivamente, temperatura superior a 12,8°C, pH mayor a 5, y presencia de oxígeno. Si no existiesen condiciones favorables para su desarrollo, no habría producción de micotoxinas y, por ende, micotoxicosis (Hollinger y Ekperingin, 1999). Además, otros factores pueden facilitar la contaminación como el ataque por roedores, pájaros e insectos, causando lesiones físicas en la planta que actúan como ruta de entrada de las esporas de hongos (Yiannikouris y Jouany, 2002).

El crecimiento de los hongos puede dividirse en tres fases: fase de retraso, fase de crecimiento exponencial y fase estacionaria. En la fase de crecimiento los hongos utilizan proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos, los cuales son denominados metabolito primario. Por otra parte, los metabolitos secundarios son una serie de compuestos que no son esenciales para su crecimiento, aquí se incluyen las micotoxinas y los antibióticos, ambos producidos al final de la fase de crecimiento exponencial o principio de la fase estacionaria (Figura 2) (Soriano del Castillo, 2007).

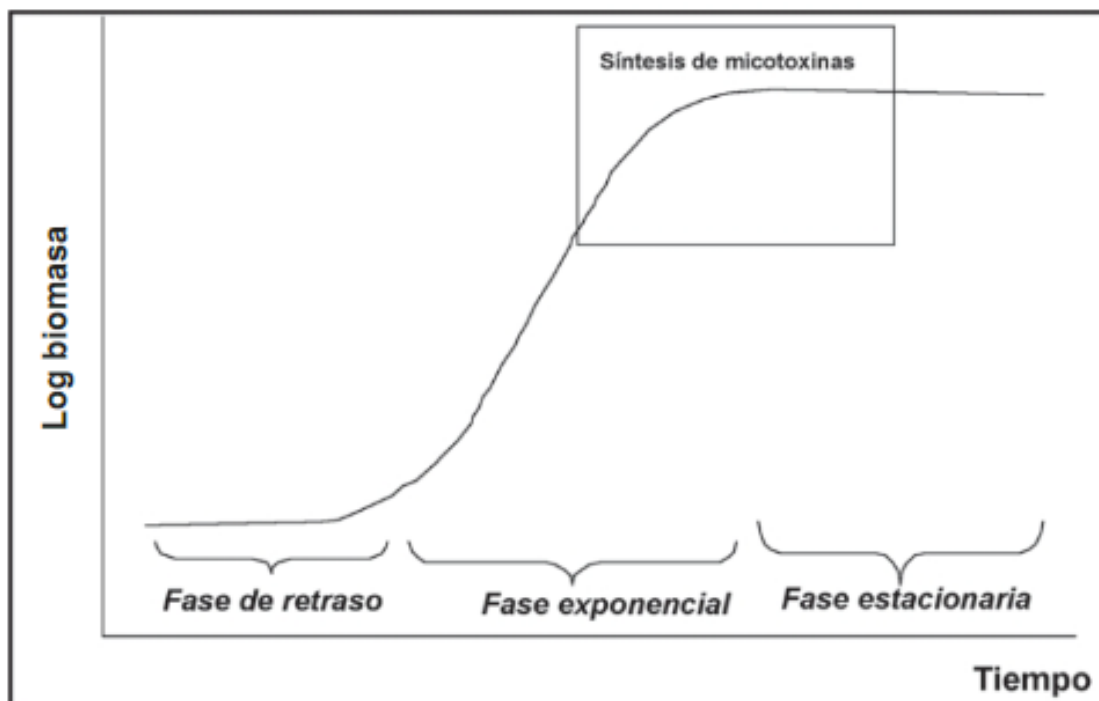


Figura 2. Fases de crecimiento micelial y fase donde se produce la síntesis de micotoxinas. Recuperado de Soriano del Castillo, 2007.

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) estima que las micotoxinas afectan el 25% de la producción agrícola anual (Peraica, Radic, Lucic y Pavlovic, 1999). En el año 2019, Eskola *et. al.* realizaron un estudio para validar este dato, concluyendo, que la prevalencia global de micotoxinas en los cultivos alimentarios varía en gran medida dependiendo de muchos factores, como la micotoxina en cuestión, los métodos analíticos utilizados y el informe de los resultados, pero indican que la prevalencia de las micotoxinas detectadas es de hasta 60 –80%.

Se han identificado hasta ahora más de 200 micotoxinas, sin embargo, las aflatoxinas (AF) se consideran las micotoxinas de mayor importancia desde el punto de vista normativo y de inocuidad alimentaria (Díaz, 2005).

Micotoxicosis

El término micotoxicosis fue introducido en la década del 60 por Forgacs y Carll, quienes lo definieron como la "intoxicación del huésped como consecuencia de la entrada al cuerpo de una sustancia tóxica de origen fúngico" (López Valladares, 1988).

Se han descrito efectos agudos y crónicos en la salud a partir de la exposición a altos niveles de aflatoxina. Los alimentos son una fuente inevitable de exposición a ciertas micotoxinas por lo que se han implementado estrategias preventivas y farmacéuticas para reducir los riesgos en poblaciones que inevitablemente tiene una exposición crónica de AF en la dieta (Sudakin, 2003).

La exposición a sus metabolitos tóxicos puede generar carcinogénesis, teratogénesis, inmunosupresión y cuadros clínicos de neurotoxicidad, nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, mielotoxicidad, toxicidad pulmonar y endocrina (Gimeno, 2011).

Los principales factores que tienen influencia en la toxicidad de las micotoxinas, sea para aumentarla o disminuirla, son la especie y raza, la concentración y la duración a la exposición, la edad y el sexo, el estado fisiológico y de salud, así como la presencia de otras micotoxinas y el sinergismo entre ellas. Cabe destacar que los jóvenes son más susceptibles debido a la variación en su metabolismo basal y que pueden no tener suficientes mecanismos para la detoxificación (Gimeno, 2011).

Aflatoxinas

Las AF son las micotoxinas más estudiadas, debido a su potente efecto carcinogénico mutagénico y teratogénico. Estas son producidas por algunas cepas de hongos como *Aspergillus flavus*, quien produce aflatoxina B₁ y *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus nominus* que producen aflatoxina B₁, B₂, G₁ y G₂ (Fallah, Jafari, y Rahnema, 2009).

Hasta el momento se conocen 18 tipos de AF, de las cuales la aflatoxina B₁, B₂, G₁, G₂ y M₁ pueden considerarse las más importantes ya que sus propiedades cancerígenas y genotóxicas son de las más potentes. La de mayor poder carcinogénico es, AFB₁ seguido de AFG₁ y AFM₁, este último es un metabolito de AFB₁. La clasificación en B₁, B₂, G₁ y G₂ está basada en la fluorescencia azul (Blue) y verde (Green) que emiten cuando son irradiadas con luz ultravioleta (Bennett y Klich, 2003; Gimeno, 2005; Hollinger y Ekperingini, 1999).

Las AF son un grupo de toxinas que comparten características estructurales, están formadas por una molécula consistente en un anillo cumarín unido a una unidad bisdihidrofurano y a una ciclopentanona (Figura 3) (Steyn, Vleggaar, y Wessels, 1980).

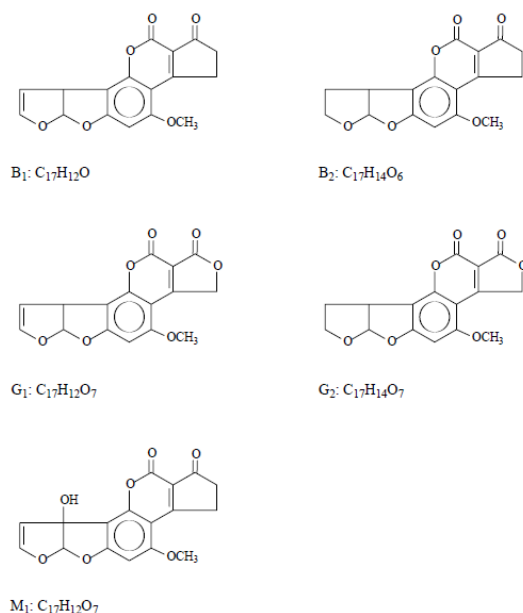


Figura 3. Estructura química de las aflatoxinas. Recuperado de IARC, 2002.

Aflatoxicosis

Las AF se consideran entre los carcinógenos más potentes que se conocen. De todas las AF, la B₁ es la que tiene mayor potencia y actividad carcinogénica a nivel hepático, en el desarrollo fetal, y es además la aflatoxina que provoca mayores cambios en los genes, relacionado directamente al desarrollo de neoplasias (Bognantes-Ledezma, Bognantes-Ledezma, Bognantes-Ledezma 2004; Carreño Venegas, Hurtado y Navas, 2014; Urrego y Díaz, 2006).

En el año 1993 la IARC ratifica en base a la existencia de suficientes estudios el poder carcinogénico de las aflatoxinas clasificado a AFB₁ como clase 1 (carcinógeno para humanos) y a AFM₁ como clase 2B (posible carcinogénico para humanos) (IARC,1993).

En la intoxicación con AF se evidencian dos formas clínicas: aguda y crónica. La forma aguda, está asociada a nefrotoxicidad, cardiotoxicidad y principalmente a hepatotoxicidad, generando un cuadro caracterizado por ictericia, vómitos, dolor abdominal e insuficiencia hepática, provocando de esta manera la muerte, generalmente tiene un inicio rápido y una respuesta tóxica obvia. Mientras que la toxicidad crónica se caracteriza por una exposición a dosis bajas durante un período de tiempo prolongado. En estos casos la sintomatología se produce a largo plazo y puede ser inespecífica y confundida con otras enfermedades, encontrándose supresión del sistema inmune, aumento de infecciones y desbalances metabólicos y hormonales que enmascaran estas micotoxicosis. También podemos encontrar efectos teratogénicos, mutagénicos, carcinogénicos, estrogénicos, eméticos y alucinógenos (Yard *et al.* 2013). La principal carga para la salud humana y veterinaria de la exposición a micotoxinas está relacionada a enfermedades crónicas (Bennett y Klich, 2003).

Se ha observado en estudios epidemiológicos realizados en países de ingresos bajos y medios, principalmente de África y Asia, una asociación positiva entre el

consumo de alimentos contaminados con AFB₁ y la incidencia de cáncer hepático en humanos (IARC, 2015). La coexistencia del virus de la hepatitis B podría contribuir a la incidencia más alta de cáncer en poblaciones expuestas a AF (IARC, 2015; Urrego y Díaz, 2006). La potencia carcinogénica de la AFM₁ es significativamente inferior a la de la AFB₁, siendo la TD50 (dosis de micotoxina con la cual el 50% de los individuos pueden desarrollar tumores malignos) de 1,15 y 10,38 µg/kg de peso corporal/día respectivamente, lo que indica que la AFM₁ es aproximadamente nueve veces menos carcinogénica que la AFB₁ (Gimeno, 2005).

Dentro de los procesos tumorales del hígado, el carcinoma hepatocelular o hepatocarcinoma es el tumor maligno más frecuente (75% de todas las neoplasias hepáticas) (Ornelas-Aguirre y Fimbres-Morales, 2015). El carcinoma hepatocelular ocupa el séptimo lugar en frecuencia y ocasiona la muerte de más de 700.000 personas cada año, lo que lo convierte en la tercera causa de muerte por cáncer en todo el mundo (American Cancer Society, 2022). En nuestro país, la incidencia de tumores hepáticos es de aproximadamente 100 nuevos casos por año (Fondo Nacional de Recursos, s.f).

Aflatoxinas B₁ y M₁

La contaminación por AF en cultivos utilizados para la dieta animal se ha demostrado en muchos países, cuando AFB₁ es consumida por los animales es biotransformada a AFM₁, en el caso del ganado lechero adquiere una mayor relevancia ya que es eliminada por leche, por medio de la cual puede llegar al consumo humano (Applebaum, Brackett y Wi, 1982).

La AFB₁ luego de ser consumida por los rumiantes es escasamente degradada por los microorganismos del rumen, incluso se ha descrito un efecto inhibitor sobre la flora ruminal por AFB₁, absorbiéndose posteriormente en el tracto digestivo, alcanzando la circulación sanguínea (Yiannikouris y Jouany, 2002).

El hígado es el principal órgano donde ocurre la biotransformación de las AF por acción de enzimas de fase I y fase II (Figura 4). Las enzimas de fase I, son principalmente de la familia de citocromo P450 (CYP450), monooxigenasas, amino-oxidasas, epóxido-hidrolasas, entre otras, catalizan reacciones de reducción, oxidación e hidrolíticas, convirtiendo los metabolitos en compuestos polares, lo que facilita su excreción directa o su reacción con enzimas de fase II. Las enzimas de fase II (glutathioneS-transferasa, epóxido-hidrolasa, entre otras) catalizan reacciones de conjugación sobre las moléculas formadas en la primera fase, que le permiten disminuir su toxicidad y aumentar su solubilidad para facilitar su excreción vía urinaria y en leche, actuando como un mecanismo de protección para el animal (Navas y Uribe, 2012; Yiannikouris y Jouany, 2002).

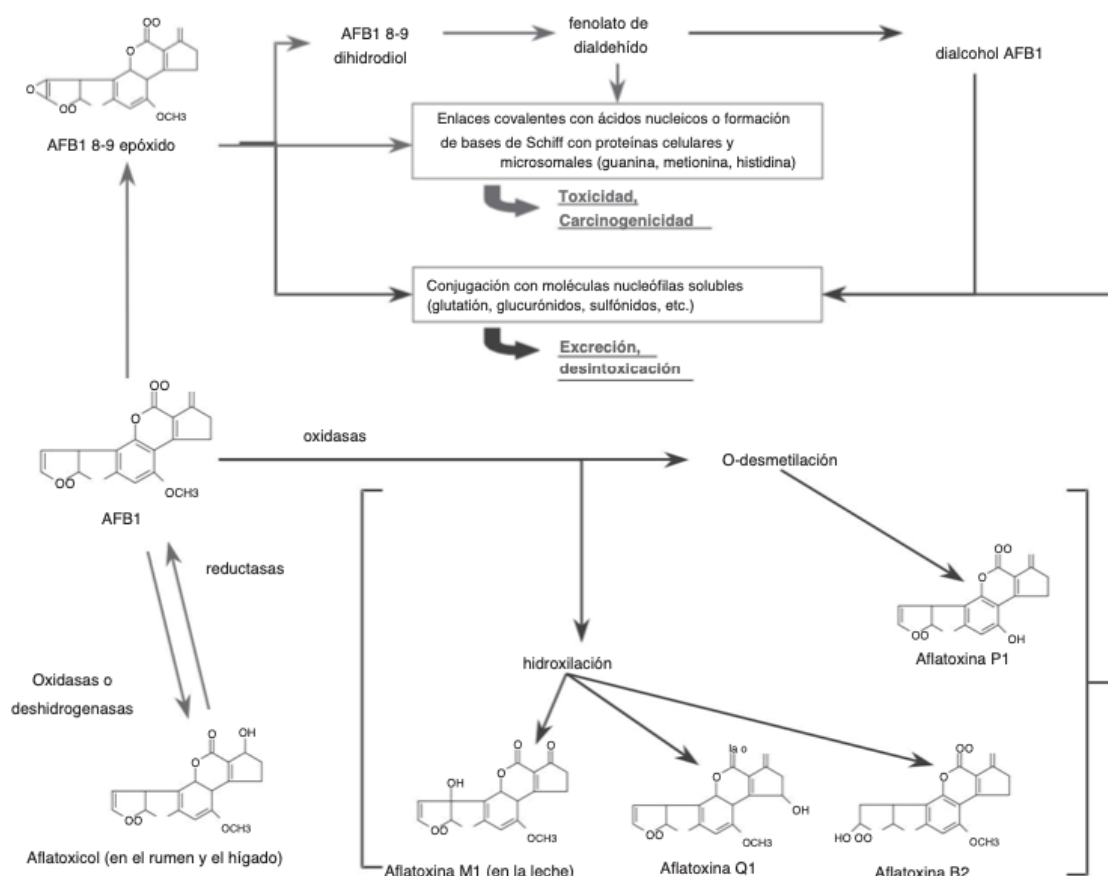


Figura 4. Metabolismo de la AFB₁ en rumiantes. Recuperado de Yiannikouris y Jouany, 2002.

La AFM₁ es el metabolito hidroxilado de AFB₁, el cual es metabolizado en el hígado de los rumiantes y excretado en la leche (Figura 5), asociado principalmente a la fracción proteica. La presencia de AFM₁ en la leche, está directamente relacionada con la cantidad de AFB₁ presente en la dieta, el 1-4% de la misma aparece como AFM₁ en la leche (Polan, Hayes, y Collin Campbell, 1974; Van Egmond, 1983). Esta proporción está influenciada por muchos factores, como la raza, la concentración de AFB₁ en la ración, disponibilidad de forraje verde y consumo de alimentos concentrados (mostrando mayor incidencia en los meses de invierno con el uso de concentrados), estado de salud del animal, capacidad de metabolización, producción láctea, por lo que varía entre diferentes animales, e incluso entre diferentes ordeñes (Becker-Algeri *et al.*, 2016; Gimeno, 2005). Cuando se detiene la ingesta, los niveles de AFM₁ en leche decrecen rápidamente (Polan, Hayes, y Collin, 1974).

Se ha demostrado que AFM₁ es una sustancia genotóxica y cancerígena, pero su potencia es un unas 10 veces inferior comparada con la de AFB₁ (Van Egmond, 1983; Yabe, *et. al*, 2012).

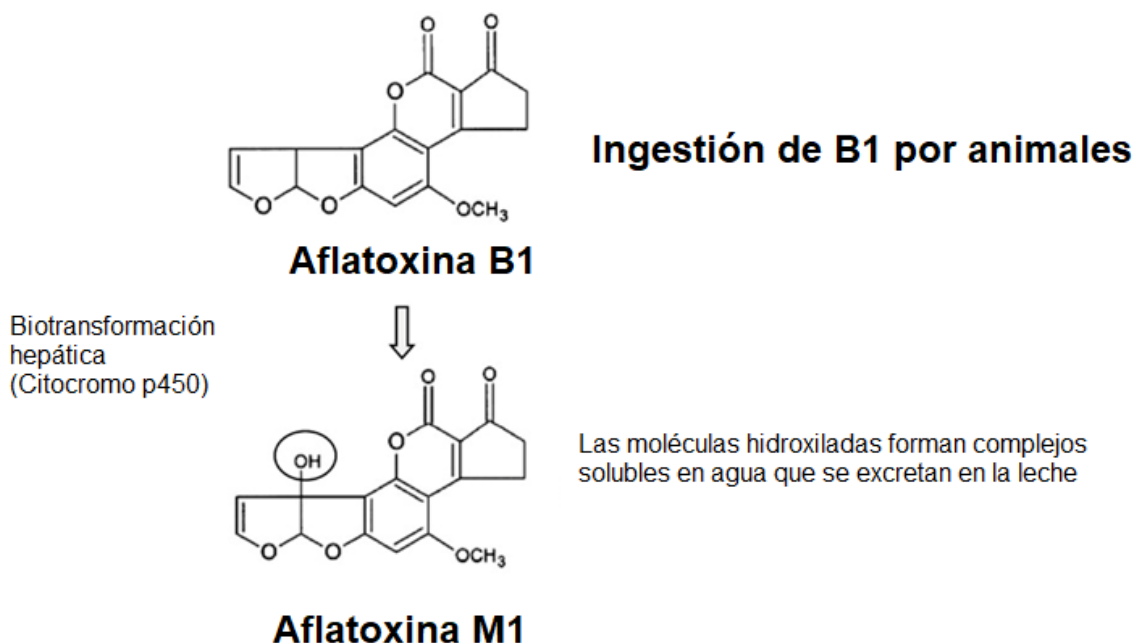


Figura 5. Biotransformación de AFB₁ a AFM₁ por la enzima citocromo p450 hepática. Recuperado de Aparecida Becker-Algeri, y otros, 2016.

La AFM₁ en leche de vaca puede detectarse dentro de las 12 - 24 horas posteriores a la ingestión de alimento contaminado con AFB₁, incluso a las 6 horas pueden encontrarse trazas (Gimeno, 2005). AFM₁ se encontró en la concentración máxima en la leche dos días después de la ingestión de AFB₁ por vacas lecheras. Asimismo, estudios confirman que AFM₁ desapareció en la leche 4 días después que se eliminó AFB₁ de la dieta (Yiannikouris y Jouany, 2002). En el comienzo de la lactancia, la presencia de AFM₁ es 3,3 a 3,5 veces superior que en la fase de lactancia avanzada (Van Edgmond, 1989).

Alfatoxina M₁ y su comportamiento durante la producción de quesos

La distribución de AF en algunos alimentos elaborados con leche contaminada es aproximadamente la siguiente: 40-60% en quesos, 10% en nata y menos de 2% en manteca (Gimeno, 2005). La variación en la concentración de AFM₁ en el queso depende del tipo de queso, la tecnología y el suero eliminado durante el proceso. La afinidad de AFM₁ por la caseína es lo que explica el aumento de su concentración en este producto (Kamkar, Karim, Aliabadi, y Khaksar, 2008).

Las aflatoxinas pueden encontrarse en quesos debido a diferentes causas: (a) presencia de AFM₁ en la leche con la que se elabora el queso, (b) contaminación del queso con hongos (*Aspergillus* spp.) y producción de aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ y G₂) y (c) presencia de AFM₁ en leche en polvo utilizada para la fabricación de quesos (Blanco et al., 1988).

Aunque existen diferentes posiciones entre los autores, el consenso general es que tanto AFB₁ como AFM₁ no se ven afectadas en gran medida por los tratamientos térmicos como la pasteurización, se consideran termoestables y tampoco varían durante el procesamiento y almacenamiento de diversos productos

lácteos (Becker-Algeri *et al.*, 2016; Gimeno, 2005; Prandini, *et al.*, 2009; Soriano del Castillo, 2007; Toral, 2010;).

En procesos de pasteurización a 63°C durante 30 minutos, pasteurización a 77°C durante 16 segundos, y esterilización, la concentración de contaminación original de la leche cruda permanece prácticamente inalterada. Por otra parte, en tratamientos térmicos a 71-120°C durante 30 minutos, se han conseguido reducir la presencia de AFM₁ en el orden del 12 al 35% y hay algunos procesos de pasteurización, esterilización, evaporación, secado *roller* y *spray*, en donde se han podido conseguir en leche disminuciones de contaminación con AFM₁ del orden del 32 al 86% (Yousef y Marth, 1989). Si bien en nuestro país algunos productores pasteurizan la leche a 65°C durante 30 minutos a tina abierta, la mayoría de los quesos artesanales del Uruguay son en base a leche cruda (LATU, 2010).

Rahimirad, Maalekininejad, Ostradi, Yeganeh, y Fahimi (2014) en su trabajo no encontraron diferencias significativas en la concentración de AFM₁ entre las muestras de leche cruda y pasteurizada, lo que indica que los procesos de pasteurización 30 minutos a 63 °C no afectan los niveles de AFM₁. Los mismos autores encontraron una concentración significativamente más alta en el queso respecto a la leche cruda y pasteurizada coincidente con el estudio realizado por Yousef y Marth (1989).

En relación con la distribución de AFM₁ durante el proceso productivo del queso, se observa que la presencia en el suero es mayor a la de la cuajada, 53-58% y 40-46% respectivamente. Sin embargo, cuando estos valores son expresados como concentración de AF por unidad de peso o volumen, la cuajada contiene un nivel más alto de micotoxinas (Blanco *et al.*, 1988; Oruc *et al.*, 2007).

La coagulación de la caseína de la leche por medio de enzimas es el procedimiento utilizado por la mayoría de los productores en la elaboración de quesos. Durante la proteólisis de la kappa caseína se obtiene el paracaseinato fosfocálcico el cual presenta una mayor hidrofobicidad, resultando en incremento de la unión a la AFM₁. Por esta razón en los quesos elaborados por medio de la coagulación enzimática se observa un aumento de la concentración de la toxina (Cravero, Juncos, y Olmedo, 2020).

La eliminación del suero durante la elaboración del queso elimina una cantidad apreciable de la micotoxina en la leche, pero el queso producido normalmente contiene una concentración más alta de AFM₁ que la que contenía la leche con la que se elaboró el queso (Fallah *et al.*, 2009; Govaris *et al.*, 2001; Kamkar *et al.*, 2008; Oruc *et al.*, 2007).

Oruc, Cibik, Yilmaz, y Gunes, (2007) observaron que la contaminación de la cuajada fue 2, 93, 3,19 y 3,37 veces más alta que la leche utilizada para su producción (Oruc *et al.*, 2007). Alineado a esto, Devicci (2006) en su trabajo “cambios en la concentración de aflatoxina M₁ durante la fabricación y almacenamiento de queso blanco escabechado” obtuvo como resultado que luego de la producción de queso blanco con leche cruda contaminada artificialmente con 1,5 µg/kg y 3,5 µg/kg de AFM₁, su presencia en el queso en promedio fue de 2,8 veces superior que en la leche cruda, un aumento esperado debido a la asociación de la AFM₁ con la caseína y al aumento de la materia seca en el proceso productivo del queso (Devicci, 2006). Govaris *et al.*, (2001) por otra parte, partieron de leche contaminada con 0,05 µg/L y

0,1 µg/L y obtuvieron que la concentración de AFM₁ era 3,9 y 4,4 veces superior para la cuajada con respecto a la leche que fue utilizada para su elaboración respectivamente (Govaris *et al.*, 2001).

Asimismo, se observa que la concentración de AFM₁ es de 2,5 a 3,3 veces mayor en muchos quesos blandos y de 3,9 a 5,8 veces mayor en los quesos duros con respecto a la leche con la cual fueron fabricados (Yousef y Marth, 1989).

Durante el proceso de maduración del queso se han encontrado algunas discrepancias respecto a la estabilidad de la AFM₁, pero en general se ha visto que no se degrada (Devicci, 2006; Govaris *et al.*, 2001; Soriano del Castillo, 2007). En estudios sobre el madurado y almacenamiento de distintas clases de quesos como el Brie, Limburger, Camembert, Tilsit, Cheddar, Gouda, Manchego, Parmesano y Mozzarella los niveles de AFM₁ no variaron (Soriano del Castillo, 2007). Blanco *et al.*, (1988), observaron que la AFM₁ es estable durante los primeros 60 días de maduración, coincidentes con los resultados obtenidos por Oruc *et al.*, 2007.

Además de la afinidad de la AFM₁ con la caseína, los queseros artesanales, por definición legal hacen uso de una sola fuente de leche, la leche es producida exclusivamente en el predio, que en ocasiones puede estar contaminada con altos niveles de AFM₁, lo que puede determinar también un pico de contaminación del queso derivado. En la producción industrial en cambio el riesgo que se produzcan picos de contaminación es menor, ya que se utilizan leches de diferente origen (Anfossi *et al.*, 2011).

Normativa quesería artesanal en Uruguay

En nuestro país se establecen las exigencias para productores de quesos artesanales, acopiadores y transformadores de quesos en el decreto Decreto N° 65/003 de 17/02/2003.

El Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP) cuenta con un manual que constituye una guía y estandarización de las inspecciones higiénico-sanitarias que realizan los inspectores oficiales para la habilitación de establecimientos productores de leche y queserías artesanales, y como apoyo técnico para la refrendación anual que realizan los veterinarios de libre ejercicio acreditados.

Los establecimientos productores de leche con destino a la elaboración de Queso Artesanal, al tratarse de establecimientos con un fin comercial, deben contar con la Habilitación y Refrendación anual vigente, además de las otras exigencias propias por ser productores de quesos artesanales. La Habilitación es realizada por la Dirección de Sanidad Animal (DSA) del MGAP a través de los Servicios Ganaderos, mientras que la Refrendación anual es realizada por los Veterinarios de Libre Ejercicio Acreditados (VLEA) y controlada por el MGAP, ambas tienen carácter obligatorio (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, 2011).

De acuerdo con la caracterización del sector realizado por el Acuerdo Interinstitucional para el Desarrollo de la Quesería Artesanal (AIDQA) en el año 2016, se informó que, de 229 queseros artesanales encuestados de los departamentos de Colonia, San José, Soriano y Flores, el 22% contaba con habilitación vigente, el 48%

nunca habilitaron su establecimiento, el 27% lo habilitó en algún momento, pero tenían la refrendación vencida y el 3% se encontraba en trámite de Habilitación.

Respecto a la aflatoxina M₁ el RBN establece los límites máximos para leche, derivados y productos lácteos en 0.5 µg/L o Kg. Por otra parte, en su apartado 6.14 establece los requisitos operativos y locativos para establecimientos elaboradores de productos lácteos, donde se incluye un apartado para queserías artesanales (Uruguay, 1994).

Normativa Internacional

En base al conocimiento sobre las aflatoxinas y los riesgos para la salud que representan, los gobiernos de diferentes países han adoptado medidas legislativas para regular su contenido en los alimentos con el fin de proteger a la población. Existen diferencias en las regulaciones que se aplican en muchos países con respecto a los límites y varían de acuerdo con el tipo de productos lácteos y subproductos, con diferentes niveles de tolerancia relacionados con las poblaciones objetivo (por ejemplo, productos para niños) (Tabla 1).

El Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) recomienda que el nivel del contaminante en los alimentos debe reducirse a un nivel tan bajo como sea razonablemente posible (ALARA, as low as reasonably achievable). El nivel ALARA se define como el nivel al cual la concentración de una sustancia ya no puede eliminarse de un alimento sin que ello signifique descartar el alimento o que comprometa severamente el abastecimiento de estos (Gimeno, 2005; Soriano del Castillo, 2007).

Con respecto a la exposición a una determinada micotoxina por la población, hay que considerar que es un factor que varía en relación con el país, hábitos alimenticios, diferencias regionales, entre otros factores. Existen dos formas de medir dicha exposición en las poblaciones, la primera determinar la presencia de micotoxinas en los alimentos y su frecuencia de consumo en la dieta de la población, y la otra, mediante la cuantificación epidemiológica de metabolitos fúngicos en fluidos corporales, como la sangre, la orina o la leche (Soriano del Castillo, 2007).

En la Unión Europea la concentración máxima permitida para leche cruda, leche destinada a la fabricación de productos y leche de consumo tratada térmicamente es de 0,05 µg/L o Kg (0,05 ppb). En el caso de preparados para lactantes, preparados de continuación y alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales dirigidos específicamente a los lactantes, la concentración máxima permitida para AFM₁ es de 0,025 µg/L o Kg (0,025 ppb). No hay legislación ni para los quesos ni para manteca, sin embargo, en otros países de Europa como Holanda, la concentración máxima permitida de AFM₁ es 0,200 ppb para quesos, mientras que, en Suiza, Austria y Turquía, la concentración máxima permitida de AFM₁ es, 0,250 ppb para este producto (Gimeno, 2005; Kaniou-Grigoriadou, Eleftheriadou, Mouratidou, y Katikou, 2004).

Estados Unidos por otra parte, permite una concentración más alta: 0,5 µg/kg (0,500 ppb) en leche y derivados. El mismo límite adoptan los países del MERCOSUR

(Argentina, Brasil, Uruguay y Paraguay) (Núñez Poblete, 2018). Se puede observar que los límites permitidos por estos países son diez veces superiores a los adoptados por la Unión Europea (0,05 µg/L o Kilos en leche y derivados) (Martínez, 2020).

Las relaciones comerciales entre los países tienen una influencia decisiva en su legislación, ya que países con vínculos comerciales cercanos suelen legislar de forma similar para evitar problemas a la hora de importar o exportar materias primas o productos. En países en vías de desarrollo, es importante que las autoridades sanitarias evalúen la importancia de las micotoxinas sobre otros problemas tales como la malnutrición de la población (Soriano del Castillo, 2007).

La presencia de micotoxinas en alimentos no solo produce daños a la salud animal y humana, también repercute en la economía debido a las trabas que implica su presencia, ocasiona pérdidas por deterioro de alimentos para animales, incrementa los costos en sanidad animal por su efecto depresor del sistema inmune y disminuye la eficiencia productiva de los animales. En la tabla 1 se resumen los límites de AFM₁ a nivel internacional.

País o Bloque Económico	Leche Cruda (µg/kg)	Derivados lácteos (µg/kg)
Unión Europea	0,05	0,05
Uruguay	0,5	0,50
Austria	0,05	0,25 (queso)
Estados Unidos	0,5	0,50
Turquía	0,05	0,25 (queso)
Suiza	0,05	0,25 (queso)
Mercosur	0,5	0,50

Tabla 1. Límites internacionales para AFM₁ en leche y derivados lácteos para consumo humano. Recuperado de Becker-Algeri, y otros, 2016

Métodos de detección de Aflatoxinas

El impacto que tienen las AF sobre la salud humana ha llevado al desarrollo de métodos rápidos y precisos de detección. De acuerdo con el *Codex Alimentarius*, los métodos analíticos deben detectar todos los residuos del analito en concentraciones inferiores al límite máximo residual, para garantizar la inocuidad alimentaria (Nuñez Poblete, 2018).

Para detectar, cuantificar e identificar micotoxinas el método de referencia es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), al mismo tiempo se implementan otros métodos como la cromatografía líquida (LC), cromatografía en capa fina (TLC), la espectrometría de masas (MS) y el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). La metodología de ELISA se ha utilizado durante más de una década para el análisis AFM₁ en leche y productos lácteos siendo el método más utilizado con fines de detección, ya que se considera rápido, fácil de implementar y de bajo costo (Christoforidou, Malissiova, Gortzi, y Hajichristodoulou, 2015).

Esta prueba inmunoenzimática detecta el enlace específico antígeno-anticuerpo y los cuantifica mediante un marcador enzimático que actúa como sustrato

cromógeno. El grado en que este marcador es coloreado es cuantificado por espectrofotometría (Rosi *et al.*, 2007). Los mismos autores llegaron a la conclusión de que este ensayo además de ser fiable y preciso para la detección de AFM₁ en leche, es un método de bajo costo, fácil manejo y que permite analizar gran número de muestras en corto tiempo, lo cual es una ventaja a la hora de asegurar una prevención efectiva de los riesgos relacionados con la contaminación de alimentos por micotoxinas.

En otro trabajo realizado por Rodríguez, Calonge, y Odóñez (2003) con un kit comercial de ELISA determinaron concentraciones de AFM₁ en el rango de 0.01 - 0.08 microgramos/kilo. Las muestras negativas por ELISA o con concentraciones de AFM₁ > 0,01 microgramos/kilo se analizaron mediante HPLC con detección fluorimétrica para detectar posibles falsos negativos. Todas estas muestras dieron negativo en las pruebas de HPLC, confirmando que ELISA es un método de detección muy eficaz cuando se trata de una gran cantidad de muestras (Rodríguez *et al.*, 2003).

Métodos de control de Aflatoxina B₁

Debido a la estabilidad térmica de la AFM₁, los procesos de fabricación de los productos lácteos no disminuyen su concentración de forma significativa, por lo que el método eficaz para controlar la presencia de AFM₁ en leche es reducir la contaminación de AFB₁ presente en la alimentación del ganado, aplicando buenas prácticas agrícolas y de almacenamiento (Becker-Algeri *et al.*, 2016).

Como mencionamos anteriormente, el mayor riesgo se presenta en la elaboración de ensilados, ya que su mal manejo puede propiciar condiciones para el crecimiento fúngico y la posible formación de micotoxinas. Es fundamental que para su elaboración la materia prima a ensilar esté bien empacada, con la menor cámara de aire posible para conseguir una atmósfera anaerobia, ya que la mayor parte de los hongos son aerobios (Gimeno, 2005).

La eliminación total de los hongos y sus toxinas debe considerarse imposible. La aplicación de herramientas físicas, químicas y biotecnológicas para mejorar la producción de semillas, el cultivo, la cosecha y el almacenamiento de forrajes y cereales es primordial para reducir y prevenir la contaminación de los piensos (Yiannikouris y Jouany, 2002).

Existen procesos químicos que tienen como fin degradar AFB₁ en el pienso de los animales, están basados en el uso de agentes de oxidación, aldehídos, ácidos y bases. El amonio como vapor anhídrico o solución acuosa es muy utilizado para la detoxificación química, no obstante, su utilización no está permitida por la Unión Europea ni la Administración de Alimentos y Medicamentos (Food and Drugs Administration), debido a controversias acerca de su seguridad. El uso de otros tratamientos químicos muchas veces resulta inviables a gran escala, y se conoce poco acerca de cómo afecta el valor nutricional de los productos tratados y sus efectos en la salud animal (Soriano del Castillo, 2007).

Asimismo, se han desarrollado otras estrategias que tienen como objetivo reducir la absorción de las micotoxinas en el tracto digestivo. Es el caso de los agentes adsorbentes o secuestrantes, que se unen a las micotoxinas presentes en los

alimentos, sin disociarse en el tracto digestivo del animal, disminuyendo la exposición de los animales a las micotoxinas al limitar su biodisponibilidad, eliminando el complejo micotoxina-adsorbente a través de las heces. Estos agentes se clasifican en dos subgrupos: compuestos inorgánicos (carbón activado, tierra de diatomeas, aluminosilicatos de calcio y sodio hidratados) y adsorbentes orgánicos como fibras de plantas, extractos de paredes celulares de levadura y bacterias (Gimeno 2002; Ramos, Marín, Molino, Vila, y Sanchis, 2020; Toso, Ardoino, Toribio, y Diesser, 2015;).

Por otra parte, los agentes biotransformadores son bacterias, levaduras, hongos y enzimas que añadidas al alimento contaminado degradan las micotoxinas en metabolitos menos tóxicos. Muchas veces se utilizan mezclas de compuestos secuestrantes y agentes biotransformadores asociados con la intención de lograr una mejor protección (Ramos et al., 2020; Toso et al., 2015).

Hasta el momento, no existen estudios sobre la presencia de AFM₁ en quesos artesanales de nuestro país. Debido a la importancia que tiene la quesería artesanal, al volumen de quesos que se consume, y a como la AFM₁ se comporta en la elaboración de los mismos, es de interés conocer los niveles a los que la población podría estar expuesta al consumir este tipo de alimento.

HIPÓTESIS

El proceso de elaboración de quesos artesanales conduce a una concentración de la fracción proteica lo que puede favorecer la aparición de niveles elevados de aflatoxina.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la presencia de aflatoxina M₁ en los quesos artesanales y analizar su relación con los parámetros fisicoquímicos.

Objetivos específicos

Determinar los parámetros físico-químicos y caracterizar los quesos artesanales elaborados en la zona suroeste de Uruguay. Cuantificar los niveles de aflatoxina M₁ en quesos artesanales de la zona suroeste de Uruguay.

Relacionar los parámetros físico-químicos con el nivel de aflatoxinas M₁ encontrados.

Analizar la coincidencia entre la denominación de los quesos por parte de los productores y la clasificación establecida por el Reglamento Bromatológico Nacional.

Comparar los niveles detectados de AFM₁ en quesos artesanales con la normativa nacional e internacional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este ensayo se realizó en 69 muestras de quesos tomadas de 34 establecimientos de los departamentos de San José y Colonia.

Las determinaciones de aflatoxina M₁ se realizaron en el Laboratorio de Toxicología mediante la técnica de ELISA, la determinación de pH y materia grasa se realizaron en el laboratorio de Ciencia y Tecnología de la Leche. Los parámetros humedad y cloruros fueron realizados en el Laboratorio de COLAVECO, mientras que la actividad del agua fue realizada en la Universidad Tecnológica del Uruguay (UTEC).

Obtención de las muestras

Las muestras de quesos artesanales se obtuvieron en establecimientos de San José y Colonia, zona en la que se encuentran más del 80% de los productores de quesos artesanales de nuestro país. Se colectaron un total de 69 muestras de diferentes tipos de quesos. De cada queso se tomaron aproximadamente 500 g en forma aséptica, las muestras se envasaron y se mantuvieron en conservadora refrigerada hasta la llegada al laboratorio donde se conservaron a -18°C hasta el momento del análisis.

El muestreo fue por conveniencia y se realizó en dos etapas: desde agosto a diciembre de 2018 y de abril a agosto de 2019. Los predios y las muestras fueron codificados para mantener la confidencialidad.

Determinación y procedimiento

Análisis Fisicoquímicos

En las muestras de quesos se determinaron los siguientes parámetros fisicoquímicos: pH, humedad, actividad de agua (aw), contenido de cloruro de sodio (NaCl) y materia grasa.

Medición de pH

El pH en queso se midió por potenciometría según el estándar BS770:1976, con un potenciómetro HANNA Instruments HI 8424, previamente calibrado a pH 4 y pH 7.

Para los quesos blandos la determinación del pH se realizó directamente sobre la masa, en quesos duros se mezclaron 10 g de la muestra con 6 ml de agua destilada formando una suspensión a la que se le determina el pH.

Determinación de la Humedad

El análisis de sólidos totales (humedad) se realizó por el método de referencia gravimétrico según ISO 5534-IDF 4: 2004 Cheese and processed cheese-Determination of total solids content Rango: 87 a 44 %.

La determinación de sólidos totales fue realizada por diferencia de masa inicial y final de las muestras al ser mezcladas con una masa constante de arena, luego de ser sometidas a una temperatura de 102 grados en estufa de secado. La humedad fue calculada como 100 - % de sólidos totales.

Medición de la Actividad de agua

La medida de actividad de agua (aw) se llevó a cabo con un hidrómetro automático basado en condensación de vapor de agua (punto de rocío), Aqualab CX-2 (Decagon Devices), verificado con estándares de aw 0.920 y 0.984.

Mediante el instrumento Aqualab se midió la aw de las muestras siguiendo la metodología de los sensores de punto de rocío. En este tipo de instrumentos la muestra se equilibra dentro de una cámara sellada que contiene un espejo que permite detectar la condensación en él. La actividad agua es la humedad relativa del aire en equilibrio con una muestra en una cámara sellada (Meter Group, 2019).

Determinación de Cloruro de sodio

El porcentaje de Cloruro de Sodio total (NaCl) en el queso se determinó usando la técnica argentométrica descrita en el Método AOAC 935.43 – Chloride (total) in cheese. Volhard method.

El principio del ensayo es la titulación por exceso de nitrato de plata agregado, se produce la reacción del nitrato de plata con el cloruro de sodio presente en la matriz, lo cual da un precipitado blanco. A continuación, se realizó la valoración del exceso de nitrato de plata en presencia de alumbre férrico como indicador.

Determinación de la Materia grasa

El análisis de materia grasa de los quesos, se realizó por la técnica de ácido butirométrico según ISO 3433: 2008-- Queso: Determinación del contenido de grasa - Método Van Gulik.

En este procedimiento la proteína de la muestra es disuelta en ácido sulfúrico con densidad de 1522 y luego la grasa del queso es separada en un butirómetro de Van Gulik por centrifugado, siendo la separación, asistida por la adición de una pequeña cantidad de alcohol iso-amílico. El contenido de grasa fue leído directamente de la escala del butirómetro.

Determinación de Aflatoxina M₁

La detección y cuantificación de aflatoxina M₁ en las muestras se realizó mediante técnica de inmunoabsorbancia ligada a una enzima (ELISA) competitiva directa, utilizando el kit para micotoxina M₁ de Helica biosystems inc. (Cat. No. 961AFLM01M-96). Los resultados fueron leídos utilizando un espectrofotómetro Bio-Tek® Instruments.Inc. Modelo EL301 a una longitud de onda de 450 nm y analizados con el software RIDASOFT Win®.

Principios del ensayo

El ensayo Helica para AFM₁ es un inmunoensayo competitivo. Un anticuerpo con alta afinidad por la AFM₁ es unido a micropocillos de poliestireno. Los estándares o muestras problema son agregados a un pocillo correspondiente y si la AFM₁ se encuentra presente se unirá al anticuerpo que recubre al pocillo. Posteriormente, se agrega la aflatoxina ligada a peroxidasa de remolacha (HRP), que se une al anticuerpo que no fue ocupado por la AFM₁ presente en la muestra o en los

estándares. Pasado un período de incubación, el contenido de los pocillos decanta, se lava y se agrega el sustrato de la HRP que desarrollará un color azul en presencia de la enzima. La intensidad del color es directamente proporcional a la cantidad de conjugado unido e inversamente proporcional a la cantidad de aflatoxina en la muestra o estándares. Por lo tanto, a medida que la concentración de aflatoxina aumenta en las muestras o estándares, la intensidad del color azul disminuye.

Por último, se agrega la solución ácida “stop”, que provoca un cambio de color del cromógeno del azul al amarillo. La densidad óptica en los micropocillos es medida mediante un lector de microplacas con un filtro de absorbancia de 450 nm (OD450). Los valores obtenidos para las muestras son comparados a los especificados en el kit y el resultado es determinado por interpolación a partir de la curva estándar.

Preparación de la muestra y extracción

Las muestras fueron retiradas del congelador a -18°C y llevadas a temperatura ambiente. Se mezcló un gramo de queso finamente rallado con metanol absoluto en un tubo tapado, se agitó con vortex durante 5 minutos y luego se llevó a centrifugado a 5000g durante 5 minutos. Transferimos 0.5mL del sobrenadante de cada muestra a tubos de vidrios y evaporamos el metanol con corriente de flujo de nitrógeno obteniendo un material viscoso en el tubo. Agregamos a este material 0.5 mL de leche descremada estabilizada libre de AFM₁ y agitamos en vortex durante 1 minuto. Dejamos reposar los tubos durante 5 minutos y tomamos muestras del extracto de 200 µL por duplicado.

Procedimiento

Para el ensayo utilizamos el kit para micotoxina M₁ de Helica biosystems inc. (Cat. No. 961AFLM01M-96) que era conservado en refrigeración en el laboratorio de toxicología de Facultad de Veterinaria. Retiramos el kit de refrigeración y esperamos que alcanzara temperatura ambiente para comenzar el procedimiento. Para el lavado de pocillos utilizamos el buffer PBS-Tween que reconstituimos en un litro de agua destilada.

Por cada muestra y estándar utilizamos dos pocillos cubiertos de anticuerpos. Con micropipeta automática y cambiando de tips entre las diferentes muestras, tomamos los 200 µL de la extracción y colocamos en los pocillos. Cubrimos con placa film los pocillos para evitar evaporación o exposición a la luz e incubamos a temperatura ambiente (19 a 25°C) durante dos horas. A las dos horas descartamos el contenido de los pocillos y realizamos tres lavados llenando los pocillos de buffer con el uso de micropipeta multicanal, descartando el contenido y golpeando sobre papel absorbente para eliminar por completo líquido.

Con el uso de micropipeta automática multicanal agregamos 100 µL del conjugado a cada pocillo, sellamos con el papel film nuevamente e incubamos durante 15 minutos y pasado el tiempo volvimos a repetir el lavado.

Con el uso de la micropipeta multicanal colocamos 100 µL del sustrato enzimático e incubamos nuevamente durante 15 minutos protegiendo los pocillos de la luz directa.

Luego de 15 minutos colocamos en el mismo orden y velocidad 100 μL de la solución “stop” y posteriormente realizamos la lectura de los pocillos en el espectrofotómetro modelo EL301 de Bio-Tek® Instruments.Inca, a una longitud de onda de 450 nm y registramos las densidades ópticas de cada muestra y estándar por duplicado.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo de las variables cualitativas tipo de queso de acuerdo con la denominación del productor y tipo de queso de acuerdo a lo establecido en el Reglamento Bromatológico Nacional en función de la cantidad de quesos muestreados. Se estudió el grado de correlación entre las distintas variables numéricas evaluadas (pH, Cloruros, humedad, materia grasa, aw) con la cantidad de aflatoxina M_1 , aplicando el modelo de correlación lineal de Pearson. Se utilizó el programa R (versión 4.2.1, R Core Team, 2022) considerando como significativo un valor de $p < 0.05$. Los valores de los parámetros físico químicos evaluados se presentan como media más menos el desvío estándar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inicialmente realizamos el análisis descriptivo de las muestras clasificándolas por tipo de queso de acuerdo con la información brindada por los productores (Tabla 2). Observándose que de un total de 69 muestras cerca de la mitad eran quesos Semiduros (43,48%), los quesos Colonia y Cuajada representaban un 21,74% y los quesos Dambo y Muzarella un 4,35% y 8,7% respectivamente.

Tabla 2. Descripción de los tipos de quesos muestreados

Tipo de quesos	Cantidad de muestras (n)	Porcentaje
Semiduro	30	43,48%
Colonia	15	21,74%
Cuajada	15	21,74%
Muzarella	6	8,70%
Dambo	3	4,35%
Total	69	100,00%

Los parámetros fisicoquímicos de humedad, cloruros, actividad agua, pH y materia grasa analizados se pueden observar en el Anexo 1. En la siguiente tabla (Tabla 3) se presenta el promedio $\pm$ el desvío estándar de los diferentes parámetros agrupados según el tipo de queso.

Tabla 3. Media $\pm$ desvío estándar de los parámetros fisicoquímicos analizados agrupados según tipo de queso

Tipo de Queso	Humedad (%)	Cloruros	Actividad Agua	pH	Materia grasa (%)
Colonia	42,4 $\pm$ 3,5	1,8 $\pm$ 0,5	0,959 $\pm$ 0,010	5,5 $\pm$ 0,3	28,2 $\pm$ 2,7
Cuajada	48,7 $\pm$ 5,0	1,6 $\pm$ 1,1	0,968 $\pm$ 0,023	5,4 $\pm$ 0,2	26,6 $\pm$ 3,8
Dambo	41,1 $\pm$ 1,6	1,6 $\pm$ 0,9	0,969 $\pm$ 0,009	5,3 $\pm$ 0,1	29,3 $\pm$ 2,1
Muzarella	45,9 $\pm$ 1,4	1,7 $\pm$ 0,5	0,964 $\pm$ 0,008	5,5 $\pm$ 0,1	24,5 $\pm$ 2,3
Semiduro	39,6 $\pm$ 3,5	2,2 $\pm$ 0,7	0,950 $\pm$ 0,019	5,5 $\pm$ 0,5	30,4 $\pm$ 2,1

Luego de obtener estos datos realizamos un análisis comparativo entre la denominación de los quesos por parte de los productores y la clasificación establecida por el decreto 315/994 Reglamento Bromatológico Nacional (Cuadro 6). Esta normativa clasifica a los quesos por su humedad, estableciendo cuatro categorías:

A) quesos de baja humedad o de pasta dura, los que presentan una humedad, máxima de 35.9%; están comprendidos los siguientes tipos: Parmesano, Sbrinz, Sardo, Provolone, Parrillero

b) quesos de mediana humedad o quesos de pasta semidura, los que contienen, entre 36.0% y 45.9%; están comprendidos los tipos: Gruyere, Colonia, Holanda, Dambo

c) quesos de alta humedad o de pasta blanda o macios, los que contienen, entre 46.0% y 54.9%; comprende: Muzzarella, Cuartirolo, Cremoso, Criollo, Cottage, Petit Suisse, Magro, Roquefort, Camembert

d) quesos de muy alta humedad, o de pasta muy blanda o mole, con una humedad mínima de 55%; comprende queso Blanco, Requesón y otros.

Tabla 4. Clasificación de los quesos artesanales (QA) (n=69) en base a la humedad conforme al Reglamento Bromatológico Nacional (Uruguay, 1994)

Tipo de queso	N de muestras	Humedad RBN	Humedad de las muestras			
			BH	MH	AH	MAH
Semiduro	30	BH	6	23	1	0
Colonia	15	MH	0	12	3	0
Cuajada	15	MAH	0	3	11	1
Muzarella	6	AH	0	4	2	0
Dambo	3	MH	0	3	0	0

Notas. BH: quesos de baja humedad. MH: quesos de media humedad. AH: quesos de alta humedad. MAH: quesos de muy alta humedad.

En este análisis observamos que existe diferencia entre ambas denominaciones, expresadas en la tabla 5 como porcentaje de coincidencia. La mayor diferencia fue observada en la Cuajada, donde solo una de las muestras coincide con lo establecido en el Reglamento Bromatológico Nacional, seguida por el queso Semiduro donde solo el 20% coincidió con lo establecido en dicha normativa. Podemos observar que tanto los quesos con muy alta humedad y los quesos con baja humedad son los que menor relación tienen entre las dos denominaciones.

Tabla 5. Coincidencias entre la denominación de los quesos por el productor y clasificación del Reglamento Bromatológico Nacional conforme a la humedad

Tipo de queso	Denominación del productor	Clasificación RBN	% de coincidencia
Dambo	3	3	100,00%
Colonia	15	12	80,00%
Muzarella	6	2	33,33%
Semiduro	30	6	20,00%
Cuajada	15	1	6,67%

En cuanto al análisis de aflatoxina M₁ en los quesos, encontramos que la totalidad de las muestras presentaba trazas observando un promedio de 0,018 µg/kg y un desvío estándar de 0,004 µg/kg (Figura 6). De todas formas, ninguna de las muestras sobrepasó el nivel máximo permitido por nuestro reglamento (0,5 µg/kg).

En nuestro país no existen estudios previos que determinen los niveles de AFM₁ en quesos artesanales, sin embargo, en un estudio realizado por Capelli (2014) se observó la presencia de AFM₁ en leche en el 100% de las 18 muestras de leche analizadas, con una concentración 0,005 µg/L a 0,008 µg/L. Al igual que en nuestro

trabajo, ninguna de estas muestras superó los límites establecidos por nuestra normativa y la del MERCOSUR, pero si el 11% (2/18) se encontraba superando los límites establecidos por la Unión Europea para leche entera (Capelli, 2014)

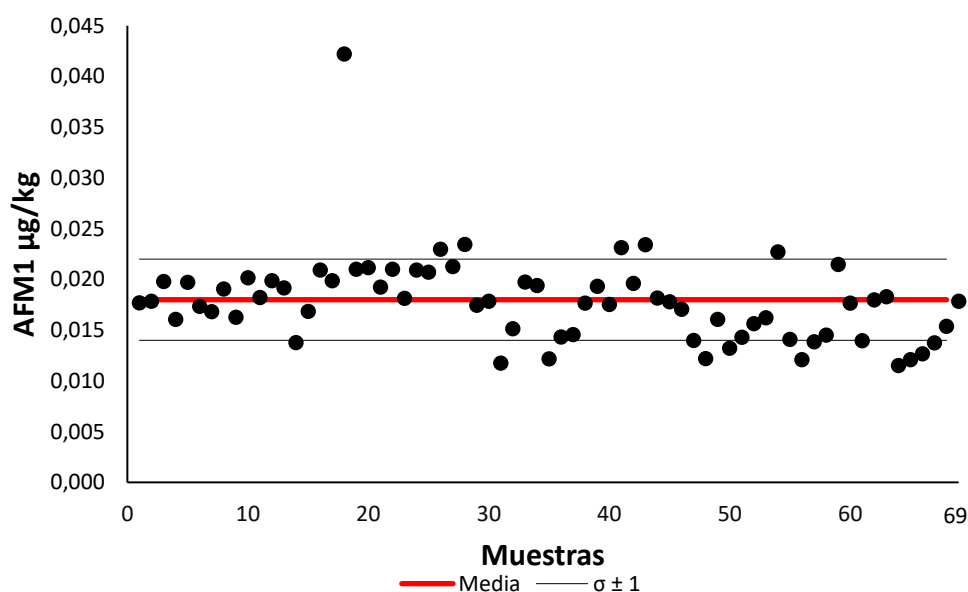


Figura 6. Concentración, media y desvío estándar de los niveles de AFM_1 obtenidos en las muestras de quesos

Nota. En anexo 1 se observa la identificación de cada muestra con sus características fisicoquímicas.

Como se observa en la figura 6, existe una muestra que sobresale correspondiente a un queso Colonia con niveles de AFM_1 de 0,042 $\mu\text{g/kg}$. Los parámetros fisicoquímicos de esta muestra se ajustaban al promedio de los quesos Colonia, por lo que deducimos que la concentración de AFM_1 hallada en este queso no estaría relacionada a estos parámetros, sino que estaría vinculada a la concentración de AFM_1 en la leche utilizada para su producción.

Por otra parte, al comparar con la normativa internacional, si bien los niveles de AFM_1 hallados en las muestras analizadas no superaron los límites establecidos por la Unión Europea (0,050 $\mu\text{g/kg}$), existe 1 muestra (1,4%) que se encuentra por fuera de los niveles aceptados por países más estrictos como Suiza, Austria y Turquía (0,025 $\mu\text{g/kg}$) y 21 muestras (30,4%) que sobrepasan el límite establecido por Holanda (0,020 $\mu\text{g/kg}$) (Figura 7). Aunque actualmente los quesos artesanales son destinados únicamente al mercado interno, es un factor para tener en cuenta ante un posible desarrollo de la quesería, ya que sería un factor limitante para acceder a mercados exigentes.

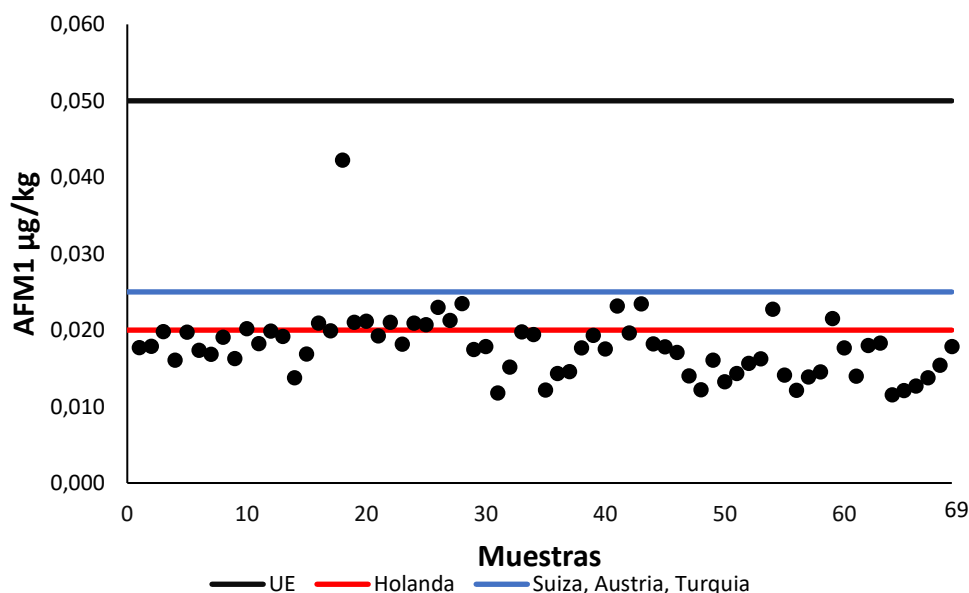


Figura 7. Niveles de AFM₁ en quesos y límite establecido por la Unión Europea y por países más exigentes, Suiza, Austria, Turquía y Holanda

En un trabajo realizado por Costamagna et al (2019) en Santa Fé, Argentina, donde monitorearon mediante la técnica de ELISA la presencia de AFM₁ en 36 muestras de queso cremoso producido durante un año, elaborados con leche de vacas alimentadas a pasto (excepto en invierno) y concentrados durante todo el año detectaron presencia de AFM₁ en el 52,8% de las muestras, a diferencia de nuestro trabajo, donde encontramos presencia de AFM₁ en el 100% de las muestras. Por otra parte, al igual que en nuestro estudio, ninguna muestra superó los límites establecidos por el MERCOSUR (0,5 µg/kg).

Respecto a trabajos realizados en otros países resulta complejo compararlos con nuestros resultados, debido a la variabilidad de factores que influyen en la presencia de micotoxinas en quesos, como las condiciones climáticas, tipo de alimentación de los animales, diferencias en la definición de quesos artesanales, procedimientos productivos y métodos de análisis de muestras.

El coeficiente de correlación (r) entre los parámetros fisicoquímicos y los niveles de AFM₁ fue analizado por el modelo de correlación lineal de Pearson, obteniendo para la humedad un $r=0,08$ (Figura 8), para la actividad agua $r=-0,06$ (Figura 9), materia grasa $r=-0,02$ (Figura 10), pH $r=0,13$ (Figura 11) y cloruros $r=0,08$ (Figura 12), lo que indica que no existe correlación lineal ente ellos y los niveles de AFM₁.

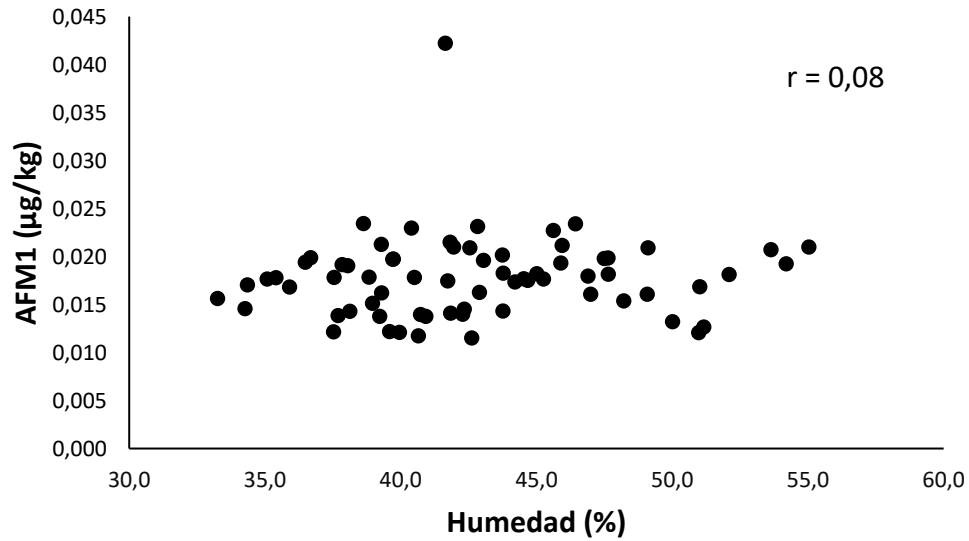


Figura 8. Correlación entre los niveles de aflatoxina M_1 y porcentaje de humedad en las muestras de quesos.

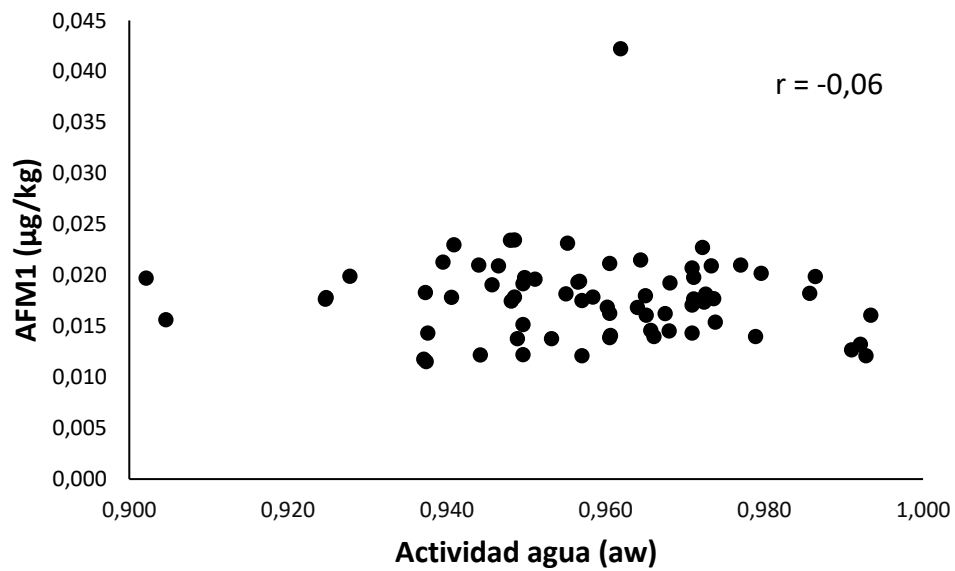


Figura 9. Correlación entre los niveles de aflatoxina M_1 y actividad del agua en las muestras de quesos.

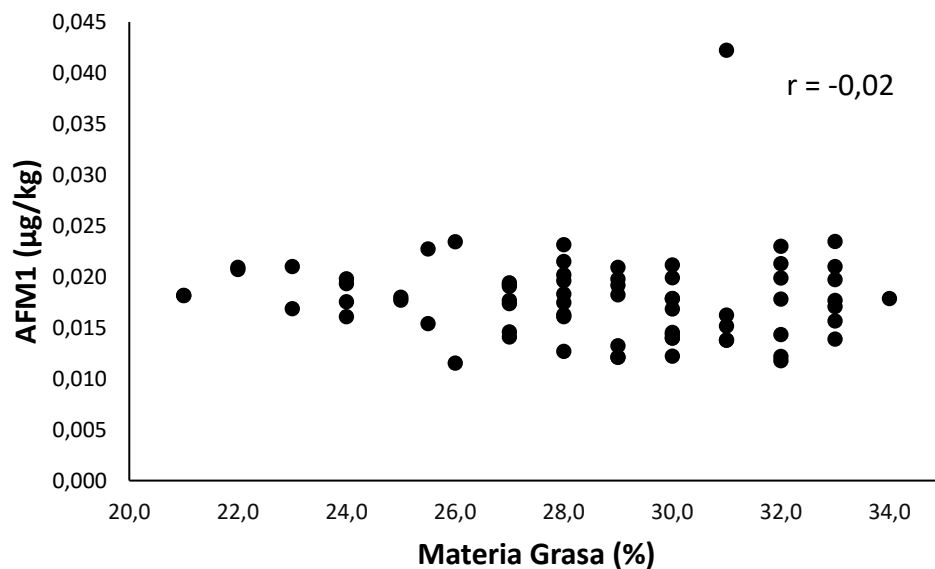


Figura 10. Correlación entre los niveles de aflatoxina M_1 y porcentaje materia grasa en las muestras de quesos.

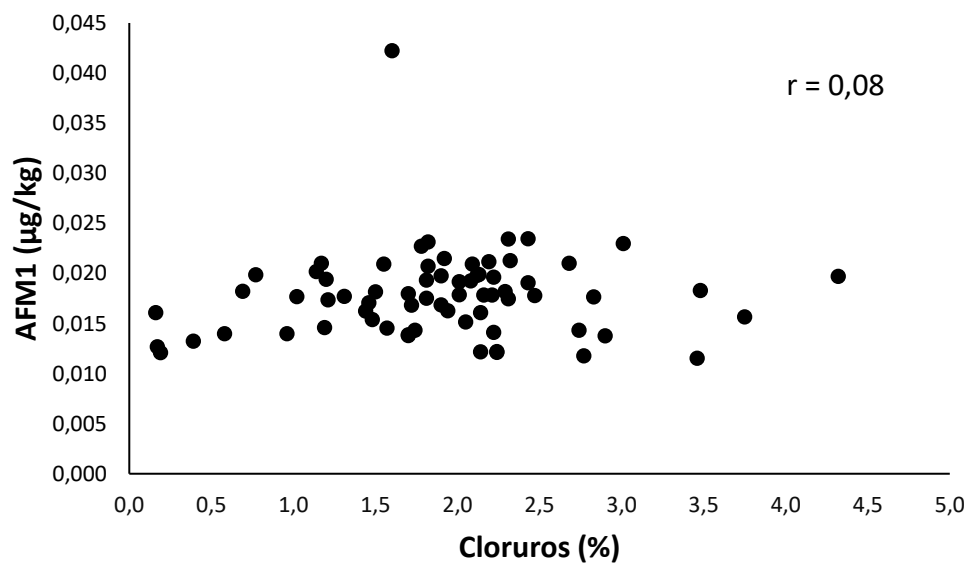


Figura 11. Correlación entre los niveles de aflatoxina y porcentaje de cloruros en las muestras de quesos.

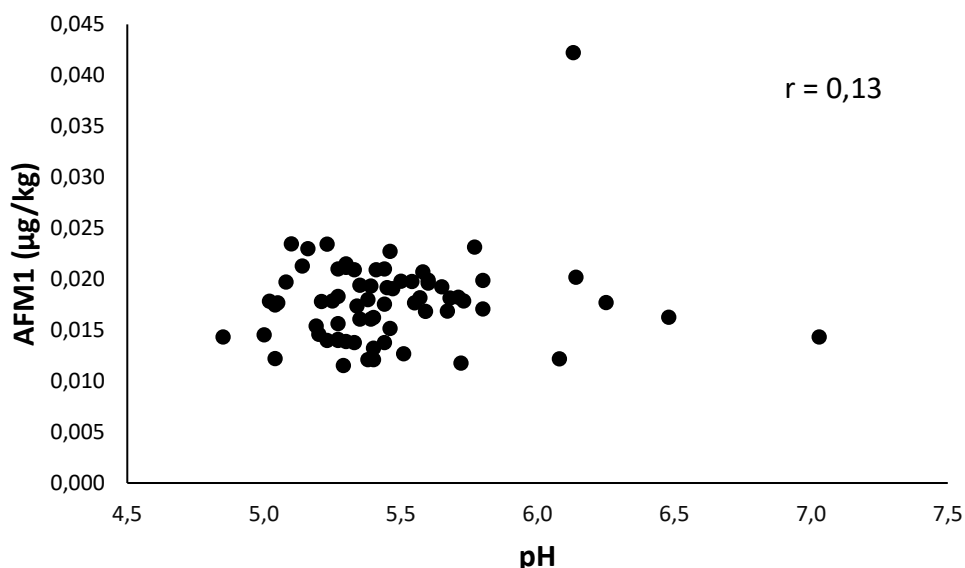


Figura 12. Correlación entre los niveles de aflatoxina M_1 y pH en las muestras de quesos.

Yousef y Marth (1989) determinaron que la concentración de AFM₁ es 2,5 a 3,3 veces mayor en quesos blandos y de 3,9 a 5,8 veces mayor en quesos duros con respecto a la leche con la cual fueron fabricados. Si bien en nuestro trabajo no tenemos datos de concentración inicial de la leche con la cual se elaboraron los quesos, no se observó una correlación lineal entre la humedad del queso y los niveles de AFM₁ ($r=0,08$).

Cabe destacar que los quesos muestreados fueron producidos en diferentes momentos, en diferentes establecimientos lecheros, sin conocer el alimento que estaban consumiendo los animales, ni los niveles de contaminación inicial de la leche para la producción de quesos.

Para poder observar la influencia de las características fisicoquímicas de los quesos en la concentración de AFM₁ sería necesario realizar un ensayo experimental que parta de leches contaminadas con una concentración inicial conocida de estas micotoxinas.

CONCLUSIÓN

En nuestro estudio observamos que el 100% de los quesos muestreados presentaron trazas de AFM₁, asimismo, ninguno superó los límites permitidos por la normativa nacional.

Determinamos que en las muestras analizadas no existió correlación lineal entre los parámetros fisicoquímicos evaluados y la concentración de AFM₁.

Debido al volumen de quesos artesanales consumidos en nuestro país es recomendable realizar un monitoreo de los niveles AFM₁ en estos productos y realizar un análisis de riesgo para la salud de la población de nuestro país. Asimismo, sería necesario un mayor control para que los quesos artesanales logren entrar en mercados más exigentes.

BIBLIOGRAFÍA

- Acuerdo Interinstitucional para el Desarrollo de la Quesería Artesanal. (2016). *Primer avance del análisis de caracterización de 229 queseros del AIDQA*. San José. Recuperado de [https://www.inale.org/wp-content/uploads/2018/09/Avance de 229 06102016.pdf](https://www.inale.org/wp-content/uploads/2018/09/Avance_de_229_06102016.pdf)
- Acuerdo Interinstitucional para el Desarrollo de la Quesería Artesanal, Asociación del Queso Artesanal, Facultad de Ingeniería, Instituto Nacional de la Leche, Laboratorio Tecnológico del Uruguay, Ministerio de Industria Energía y Minería. (2017). *Desarrollo de la quesería artesanal en Uruguay: proyecto de reconversión de los generadores de vapor irregulares*. Montevideo: Latu. Recuperado de <https://www.latu.org.uy/publicaciones/desarrollo-de-la-queseria-artesanal-en-uruguay-proyecto-de-reconversion-de-los-generadores-de-vapor-irregulares-a-calderas-de-agua-caliente>
- American Cancer Society. (2022). *Acerca del cáncer de hígado*. Recuperado de <https://www.cancer.org/content/dam/CRC/PDF/Public/8953.00.pdf>
- Anfossi, L., Baggiani, C., Giovannoli, C., D'Arco, G., Passini, C., y Giraudi, G. (2011). Occurrence of aflatoxin M1 in Italian cheese: Results of a survey conducted in 2010 and correlation with manufacturing, production season, milking animals, and maturation of cheese. *Food Control*, 25(1),125-130.
- Applebaum, R. S., Brackett, R. E., y WI, D. W. (1982). Aflatoxin: Toxicity to Dairy Cattle and Occurrence in Milk and Milk Products: A Review. *Journal of food protection*, 45(8),752-777.
- Bagnato, D. E. (2004). *Quesería artesanal, situación actual y perspectivas para el Uruguay*. Recuperado de <https://docplayer.es/18820477-Queseria-artesanal-situacion-actual-y-perspectivas-para-el-uruguay.html>
- Bennett, J. W., y Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiologic Reviews*, 16(3),497-516.
- Becker-Algeri, T., Castagnaro, D., de Bortoli, K., de Souza, C., Alessandra Drunkler, D., y Badiale-Furlong, E. (2016). Mycotoxins in Bovine Milk and Dairy Products: A Review. *Journal Food Science*, 81(3), R544 - R552.
- Blanco, J. L., Dominguez, L., Gomez-Lucia, E., Garyzabal, J. F., Goyache, J., y Suarez, G. (1988). Behavior of Aflatoxin during the Manufacture, Ripening and Storage of Manchego-type Cheese. *Journal of Food Science*, 53(5),1373-1376.
- Bognantes-Ledezma, P., Bognantes-Ledezma, D., y Bognantes-Ledezma, S. (2004). Aflatoxinas. *Acta Médica Costarricense*, 46(4), 174-178.
- Borbonet, S. (2001). *Historia de la quesería en Uruguay*. Montevideo: Laboratorio Tecnológico del Uruguay.
- Borbonet, S., Urrestarazu, P., y Pelaggio, R. (2011). *Quesos artesanales: conceptos generales y recomendaciones prácticas y productivas*. Montevideo: Laboratorio Tecnológico del Uruguay.

- Capelli, A. (2014). *Determinación de aflatoxinas totales en alimentos destinados al consumo de vacas lecheras y aflatoxina M1 en leche* (Tesis de grado). Facultad de Veterinaria, UdelaR, Montevideo.
- Carreño, A., Hurtado, J. J., y Navas, M. C. (2014). Exposición a aflatoxina: un problema de salud pública. *Iatrería*, 27, 42-52.
- Carrillo, L. (2003). *Los hongos de los alimentos y forrajes*. Salta: Universidad Nacional de Salta.
- Chalking, D., y Brasesco, R. (2003). *Ensilaje de grano húmedo: una alternativa promisorio*. Recuperado de https://www.produccion-animal.com.ar/produccion_y_manejo_reservas/reservas_silos/28-ensilaje_grano_humedo.pdf
- Chilibroste, P. (2015). *Carga o Productividad Individual?. Pasto o concentrado?: mitos y realidades en la intensificación de los sistemas de producción de leche en Uruguay*. Paysandú: Universidad de la República de Uruguay.
- Christoforidou, S., Malissiova, E., Gortzi, O., y Hajichristodoulou, C. (2015). Comparative evaluation of ELISA kits' reliability for the aflatoxin M1 determination in goat milk. *European Food Research and Technology*, 240(4), 701 - 706.
- Costamagna, D., Gaggiottia, M., Chiericatti, C., Costabel, L., Audero, G., Taverna, M., y Signorini, M. (2019). Quantification of aflatoxin M1 carry-over rate from feed to soft cheese. *Toxicology Reports*, 6, 782-787.
- Cravero, C., Juncos, N., y Olmedo, R. (2020). Aflatoxina M1 en quesos y su importancia en la actualidad. *Nexo Agropecuario*, 8(1), 37-42.
- Devicci, O. (2006). Changes in the concentration of aflatoxin M1 during manufacture and storage of White Pickled cheese. *Food control*, 18, 1103–1107.
- Díaz, G. J. (2005). *Micotoxinas y micotoxicosis de importancia*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Diverio, G., y Bilinski, N. (2019). *Análisis de competitividad y factibilidad de inserción internacional de queso Colonia* (Tesis de grado). Facultad de Ciencias Empresariales, Universidad Católica del Uruguay, Montevideo.
- Dunier, L., Sindou, J., Chaucheryras-Durand, F., Chevallier, I., y Thevenot, D. (2013). Silage processing and strategies to prevent persistence of undesirable microorganisms. *Animal Feed Science and Technology*, 182, 1-15.
- Eskola, M., Kos, G., T. Elliott, C., Hajšlová, J., Mayar, S., y Krska, R. (2019). Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited 'FAO estimate' of 25%. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60, 2773-2789.
- Fallah, A., Jafari, T., y Rahnema, M. (2009). Determination of aflatoxin M1 levels in Iranian white and cream cheese. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 1872-1875.
- Fondo Nacional de Recursos. (s.f.). Información Cáncer de Hígado. Recuperado de http://www.fnr.gub.uy/tratamiento_c_higado#:~:text=En%20nuestro%20pa%C3%ADs%2C%20la%20incidencia,de%20hepatitis%20B%20y%20C.

- Food and Agriculture Organization. (2003). *Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003*. Recuperado de <https://www.fao.org/3/y5499e/y5499e07.htm#bm07.4>
- Food and Agriculture Organization. (s.f.). *Micotoxinas*. Recuperado de <https://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/mycotoxins/es/>
- Food and Agriculture Organization. (s.f.). *Preguntas y respuestas sobre inocuidad alimentaria*. Recuperado de <https://www.fao.org/food-safety/background/preguntas-y-respuestas-sobre-inocuidad-alimentaria/es/>
- Gallop, N., Zakin, V., y Weinberg, Z. G. (2005). Antibacterial activity of lactic acid bacteria included in inoculants for silage and in silage treated with these inoculants. *Journal of applied microbiology*, 98, 662-666.
- Gimeno, A. (2002). *Detoxificación de las micotoxinas*. Recuperado de <https://www.engormix.com/micotoxinas/articulos/detoxificacion-micotoxinas-t26080.htm>
- Gimeno, A. (2005). *Aflatoxina M1 en la Leche. Riesgos para la Salud Pública, Prevención y Control*. Recuperado de <https://www.engormix.com/micotoxinas/articulos/aflatoxina-leche-riesgos-salud-t26093.htm>
- Gimeno, A., y Martins, M. L. (2011). *Micotoxinas y Micotoxicosis en Animales y Humanos*. Miami: Special Nutrients.
- Govaris, A., Roussi, V., Koidis, P., y Botsoglu, N. (2001). Distribution and stability of aflatoxin M1 during processing, ripening and storage of Telmes cheese. *Food Additives and Contaminants*, 18, 437 - 443.
- Hollinger, K., y Ekperingin, H. (1999). Mycotoxicosis in food producing animals. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 15, 133-165.
- Instituto Nacional de la Leche. (2019). *Encuesta Lechera 2019: Resultados definitivos*. Recuperado de <https://www.inale.org/estadisticas/encuesta-lechera-2019-resultados-definitivos/>
- Instituto Uruguayo de Normalización Técnica. (2010). *Buenas prácticas de manufactura en las empresas alimentarias – Requisitos (Norma UNIT n° 1117:2010)*. Recuperado de <https://www.unit.org.uy/normalizacion/norma/100000376/>
- International Agency for Research on Cancer. (2002). *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. Lyon. International Agency for Research on Cancer.
- International Agency for Research on Cancer. (1993). *Monograph on the evaluation of carcinogenic risk to humans*. Lyon, World Health Organization N°56.
- Kamkar, A., Karim, G., Aliabadi, F., y Khaksar, R. (2008). Fate of aflatoxin M1 in Iranian white cheese processing. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 2236–2238.
- Kaniou-Grigoriadou, I., Eleftheriadou, A., Mouratidou, T., y Katikou, P. (2004). Determination of aflatoxin M1 in ewe's milk samples and the produced curd and Feta cheese. *Food Control*, 16, 257 - 261.

- Lancibidad Trenchi, M., y Loza Acosta, C. (2011). *Caracterización de productores de queso artesanal del litoral sur: las prácticas de manejo y su efecto sobre la calidad de la leche* (Tesis de grado) . Facultad de Agronomía, UdelaR, Montevideo.
- Martínez, I. (2022). *Evaluación de la exposición a Listeria monocytogenes y caracterización del riesgo de listeriosis por consumo de quesos artesanales semiduros y colonia en Uruguay* (Tesis de maestría). Facultad de Veterinaria, UdelaR, Montevideo.
- Methol, M., y Gorga, L. (2021). *Oferta y demanda de productos concentrados para alimentación animal por cadena productiva*. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Montevideo
- Meter Group. (2019). *Aqualab series 4*. Recuperado de http://library.metergroup.com/Manuals/20115_AQUALAB4_Manual_Web.pdf
- Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca(2021). Dirección de estadísticas Agropecuarias (DIEA). *Anuario Estadístico Agropecuario*. Recuperado de <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/noticias/diea-presento-anuario-estadistico-agropecuario-2021#:~:text=En%20el%20Anuario%20Estad%C3%ADstico%20Agropecuario,el%20Banco%20Central%20del%20Uruguay.>
- Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. (2011). *Manual para la habilitación y refrendación de establecimientos productores de leche y queserías artesanales*. Recuperado de https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/sites/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/files/documentos/publicaciones/DGSG_N%C2%BA_27_21_02_2011_Manual_V01_0.pdf
- Mioneto, A. (2017). *Hongos toxicogénicos y producción de micotoxinas en silos de sorgo húmedo* (Tesis de maestría). Facultad de Ciencias, UdelaR, Montevideo.
- Navas, M. C., y Uribe, D. F. (2012). Mecanismos moleculares involucrados en la mutagenicidad inducida por aflatoxina B1. *Revista Ciencias de la Salud*, 10, 403-409.
- Núñez, C. A. (2018). *Determinación de Aflatoxina M1 en Lecherías de La Región Metropolitana y de Valparaíso de Chile* (Tesis de maestría). Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, Santiago de Chile.
- Organizacion de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura; Organización Mundial de la Salud. (2020). *Inocuidad de los Alimentos, un asunto de todos*. Recuperado de <https://www.who.int/docs/default-source/food-safety/campaign-guide-es.pdf?sfvrsn=37873dd9>
- Oruc, H., Cibik, R., Yilmaz, E., y Gunes, E. (2007). Fate of aflatoxin M1 in kashar cheese. *Journal of Food Safety*, 27, 82–90.
- Palau, H., y Mesa, A. (2007). *Cluster de quesería artesanal de San José y Colonia*. Montevideo: PACPYMES.

- Perusia, O. R., y Rodríguez, R. (2001). Micotoxicosis. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 12, 87-116
- Polan, C. E., Hayes, J. R., y Collin Campbell, T. (1974). Consumption and Fate of Aflatoxin B1 by Lactating Cows. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 22, 635-638.
- Prandini, A., Tansini, G., Sigolo, S., Filippi, L., Laporta, M., y Piva, G. (2009). On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 984–991.
- Rahimirad, A., Malekinejad, H., Ostadi, A., Yeganeh, S., y Fahimi, S. (2014). Aflatoxin M1 concentration in various dairy products: evidence for biologically reduced amount of AFM1 in yoghurt. *Iran Journal of Public Health*, 43(8).
- Ramos, A., Marín, S., Molino, F., Vila, P., y Sanchis Almenar, V. (2020). Las Micotoxinas: El enemigo silencioso. *Arbor*. 196 (795)
<https://doi.org/10.3989/arbor.2020.795n1004>
- Riet-Correa, F., Méndez, M., y Schild, A. L. (1991). *Intoxicações por plantas y micotóxicos em animais domésticos*. Pelotas: Hemisfério Sul do Brasil.
- Rodriguez, M. L., Calonge, M. M., y Odóñez, D. (2003). ELISA and HPLC determination of the occurrence of aflatoxin M1 in raw cow's milk. *Food Additives and Contaminants*, 20, 276-280.
- Sargeant, K., Sheridan, A., O'Kelly, J., y Carnaghan, R.B.A. (1961). Toxicity associated with certain samples of groundnuts. *Nature* 192:1096-1097.
- Soriano del Castillo, J. M. (2007). Micotoxinas en alimentos. En *Micotoxinas en alimentos* (p. 3). Barcelona: Díaz de Santos.
- Steyn, P. S., Vleggaar, R., y Wessels, P. L. (1980). The Biosynthesis of Aflatoxin and Its Congeners. En P. S. Steyn, *The Biosynthesis of Mycotoxins* (págs. 105-155). Nueva York. Academic Press.
- Sudakin, D. L. (2003). Dietary Aflatoxin Exposure and Chemoprevention of Cancer: A Clinical Review. *Toxicología Clínica*, 41, 195 - 204.
- Toral, A. M. (2010). *Evaluación de la contaminación por aflatoxinas en alimentos para bovinos y aflatoxina M1 en leche cruda y quesos producidos en la región de Altos y Ciénaga, Jalisco*. (Tesis de Maestría) Universidad de Guadalajara, Jalisco.
- Toso, R., Ardoino, S., Toribio, M., y Diesser, M. (2015). Presencia de micotoxinas en alimentos balanceados para ponedoras. Relevamiento realizado en General Pico La Pampa, Argentina. *Ciencia Veterinaria*, 17, 35-44.
- Urrego, J. R., y Díaz, G. J. (2006). Aflatoxinas: mecanismos de toxicidad en la etiología del cancer hepatico celular. *Revista Facultad de Medicina Universidad Nacional de Colombia*, 54, 108-116.
- Uruguay. (1994, julio 5). Decreto N° 315/994: Reglamento Bromatológico Nacional. Recuperado de <https://www.impo.com.uy/bases/decretos-reglamento/315-1994>
- Uruguay. (2003, febrero 17). Decreto N° 65/003 Reglamentación de las exigencias para productores de quesos artesanales, acopiadores y transformadores de

quesos. Recuperado de <https://www.impo.com.uy/bases/decretos-reglamento/65-2003>

- Van Edgmond, H. (1989). Aflatoxin M1: Occurrence, Toxicity, Regulation. En *Mycotoxins in Dairy Products* (pp. 11-55). Londres: Elsevier Applied Science.
- Van Egmond, H. P. (1983). Mycotoxins in Dairy Products. *Food Chemistry*, 11, 289-307.
- Williams, J. H., Phillips, T. D., Jolly, P. E., Stiles, J. K., Jolly, C. M., y Aggarwal, D. (2004). Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 82, 1106-1122.
- Yabe, K., Chihaya, N., Hatabayashi, H., Kito, M., Hoshino, S., Zeng, H., ... Nakajima, H. (2012). Production of M-/GM-group aflatoxins catalyzed by the OrfA enzyme in aflatoxin biosynthesis. *Fungal Genetics and Biology*, 744-754.
- Yard, E. E., Daniel, J. H., Lewis, L. S., Rybak, M. E., Paliakov, E. M., Kim, A. A., Sharif, S. K. (2013). Human aflatoxin exposure in Kenya, 2007: a cross-sectional study. *Food Additives & Contaminants*, 30, 1322-1331.
- Yiannikouris, A., y Jouany, J. P. (2002). Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. *Animal research*, 51, 81 - 99.
- Yousef, A. E., y Marth, E. H. (1989). Stability and Degradation of Aflatoxin M1. En H. Van Edgmond, *Mycotoxins in Dairy Products* (p. 127-161). Londres: Elsevier Applied Science.

ANEXO

Anexo 1. Resultados de parámetros fisicoquímicos analizados y niveles de AFM1 obtenidos en las muestras de quesos artesanales.

N°	Tipo de queso	Humedad (%)	Cloruros (%)	pH	MG (%)	aw	AFM1 (µg/kg)
1	Colonia	44,5	1,3	6,3	25,0	0,974	0,018
2	Semiduro	38,8	2,0	5,7	30,0	0,958	0,018
3	Muzarella	47,5	2,1	5,5	24,0	0,971	0,020
4	Cuajada	47,0	2,1	5,4	24,0	0,965	0,016
5	Cuajada	39,7	4,3	5,1	33,0	0,902	0,020
6	Muzarella	44,2	1,2	5,3	27,0	0,972	0,017
7	Semiduro	35,9	1,7	5,6	30,0	0,964	0,017
8	Colonia	38,0	2,4	5,5	27,0	0,946	0,019
9	Semiduro	42,9	1,9	6,5	28,0	0,961	0,016
10	Semiduro	43,7	1,1	6,1	28,0	0,980	0,020
11	Semiduro	45,0	0,7	5,7	29,0	0,986	0,018
12	Semiduro	47,6	0,8	5,8	32,0	0,986	0,020
13	Semiduro	37,8	2,0	5,5	29,0	0,950	0,019
14	Semiduro	39,2	1,7	5,4	31,0	0,953	0,014
15	Cuajada	51,0	1,9	5,7	23,0	0,960	0,017
16	Semiduro	42,5	2,1	5,4	29,0	0,947	0,021
17	Semiduro	36,7	2,1	5,6	30,0	0,928	0,020
18	Colonia	41,6	1,6	6,1	31,0	0,962	0,042
19	Colonia	41,9	2,7	5,3	33,0	0,944	0,021
20	Cuajada	45,9	2,2	5,3	30,0	0,961	0,021
21	Cuajada	54,2	2,1	5,7	27,0	0,968	0,019
22	Cuajada	55,0	1,2	5,4	23,0	0,977	0,021
23	Cuajada	52,1	1,5	5,7	21,0	0,973	0,018
24	Cuajada	49,1	1,6	5,3	22,0	0,973	0,021
25	Cuajada	53,6	1,8	5,6	22,0	0,971	0,021
26	Semiduro	40,4	3,0	5,2	32,0	0,941	0,023
27	Semiduro	39,3	2,3	5,1	32,0	0,940	0,021
28	Semiduro	38,6	2,4	5,1	33,0	0,949	0,023
29	Semiduro	41,7	2,3	5,0	28,0	0,948	0,017
30	Semiduro	40,5	2,2	5,3	34,0	0,949	0,018
31	Semiduro	40,7	2,8	5,7	32,0	0,937	0,012
32	Semiduro	39,0	2,1	5,5	31,0	0,950	0,015
33	Colonia	39,7	1,9	5,5	29,0	0,950	0,020
34	Colonia	36,5	1,2	5,4	27,0	0,957	0,019
35	Semiduro	37,5	2,1	6,1	32,0	0,944	0,012
36	Semiduro	43,8	1,7	7,0	30,0	0,971	0,014

37	Semiduro	34,3	1,2	5,2	27,0	0,966	0,015
38	Muzarella	45,3	1,0	5,6	27,0	0,971	0,018
39	Muzarella	45,9	1,8	5,4	24,0	0,957	0,019
40	Muzarella	44,7	1,8	5,4	24,0	0,957	0,018
41	Colonia	42,8	1,8	5,8	28,0	0,955	0,023
42	Colonia	43,0	2,2	5,6	28,0	0,951	0,020
43	Colonia	46,4	2,3	5,2	26,0	0,948	0,023
44	Muzarella	47,6	2,3	5,6	21,0	0,955	0,018
45	Semiduro	35,4	2,5	5,2	32,0	0,925	0,018
46	Semiduro	34,4	1,5	5,8	33,0	0,971	0,017
47	Dambo	42,3	1,0	5,3	30,0	0,979	0,014
48	Semiduro	39,6	2,2	5,0	30,0	0,950	0,012
49	Cuajada	49,1	0,2	5,4	28,0	0,993	0,016
50	Cuajada	50,0	0,4	5,4	29,0	0,992	0,013
51	Semiduro	38,1	2,7	4,9	32,0	0,938	0,014
52	Semiduro	33,3	3,8	5,3	33,0	0,905	0,016
53	Dambo	39,3	1,4	5,4	31,0	0,968	0,016
54	Colonia	45,6	1,8	5,5	25,5	0,972	0,023
55	Dambo	41,8	2,2	5,3	27,0	0,961	0,014
56	Cuajada	40,0	2,2	5,4	29,0	0,957	0,012
57	Colonia	37,7	1,7	5,3	33,0	0,961	0,014
58	Colonia	42,3	1,6	5,0	30,0	0,968	0,015
59	Semiduro	41,8	1,9	5,3	28,0	0,964	0,021
60	Semiduro	35,1	2,8	5,1	33,0	0,925	0,018
61	Colonia	40,7	0,6	5,2	30,0	0,966	0,014
62	Colonia	46,9	1,7	5,4	25,0	0,965	0,018
63	Semiduro	43,8	3,5	5,3	28,0	0,937	0,018
64	Semiduro	42,6	3,5	5,3	26,0	0,937	0,012
65	Cuajada	51,0	0,2	5,4	29,0	0,993	0,012
66	Cuajada	51,2	0,2	5,5	28,0	0,991	0,013
67	Cuajada	40,9	2,9	5,3	31,0	0,949	0,014
68	Colonia	48,2	1,5	5,2	25,5	0,974	0,015
69	Semiduro	37,5	2,2	5,0	30,0	0,941	0,018