

UBO

université de bretagne
occidentale

**UNIVERSITE
BRETAGNE
LOIRE**



THESE

UNIVERSITÉ DE BRETAGNE
OCCIDENTALE

sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne
pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

Mention : Biologie, santé - Spécialité : Statistiques appliquées

École Doctorale SICMA (Santé, Information,
Communication,
Mathématique, Matière)

présentée par

Estela Hernández Camarillo

Préparée au Laboratoire d'Evaluation du Risque
Chimique pour le Consommateur UFR Sciences
et Techniques, Brest, France et Laboratoire de
Génie de Procédés de l'Instituto Tecnológico de
Veracruz (au Mexique).

Évaluation probabiliste du
risque lié à la
consommation de fromage
frais et Oaxaca contaminés
par des pesticides
organochlorés et des
aflatoxines M₁ et M₂, dans
la ville de Veracruz.

Thèse soutenue le (22 /02 /2017)
devant le jury composé de :

Professeur Marco Antonio Salgado Cervantes
ITV / Examineur

**Professeur Guadalupe del Carmen Rodríguez
Jimenes**
ITV / Examineur

Professeur Alicia Guadalupe Marroquín Cardona
UANL / Rapporteur

Professeur Ángel Gil Izquierdo
CEBAS - CSIC / Rapporteur

Professeur Victor José Robles Olvera
ITV / Co-directeur de thèse

Professeur Alain-Claude Roudot
UBO / Directeur de thèse

Remerciements

Dieu: C'est de lui, par lui, et pour lui que sont toutes choses. A lui la gloire dans tous les siècles! Amen. (Romains 11:36)

Mes plus vifs remerciements vont au professeur Alain-Claude Roudot, directeur de cette thèse pour sa connaissance, sa direction, sa façon de travailler, de la patience et de la motivation, ce qui a été fondamental dans ma formation en tant que chercheur

Dr. Robles-Olvera, V., Dra. Carvajal-Moreno, M., Dr. Salgado-Cervantes, M.A., Dr. Rodriguez-Jimenes, G., merci de me donner leurs connaissances et leur expérience professionnelle et de leur soutien pour terminer cette thèse.

Mes remerciements à N. Wesolek et Dra. Martínez-Ramírez A. pour être toujours généreuses avec leur temps et disposées à m'aider comme peu d'autres, elles ont partagé leurs connaissances et leur expérience professionnelle et personnelle ce qui a été d'une grande valeur pour cette thèse.

Je tiens à remercier à tous les membres du laboratoire: A.S. Ficheux, G. Chevillotte, A. Bernard G. pour leur aide scientifique et technique.

Laurent Mattarocci, pour sa précieuse amitié, sa gentillesse et pour son soutien pendant mon séjour à Brest.

INSTITUTIONS

À la Université de Bretagne Occidentale et au laboratoire d'évaluation du risque chimique pour le consommateur, merci pour le séjour.

À ECOS, pour la collaboration du programme entre les gouvernements de la France et du Mexique à travers le Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

À l'Instituto Tecnológico de México, siège Veracruz, pour le Programme de Doctorat.

À Conacyt, pour la bourse de Doctorat 2012 - 2016.

À l'Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, pour les installations, l'équipement, le matériel et la technologie pour la quantification d'aflatoxines dans le fromage.

RÉSUMÉ

Introduction

L'industrie laitière est la troisième industrie alimentaire la plus importante de l'état de Veracruz, elle transforme en fromage 21 % (FUNPROVER, 2010) des 11,300 tonnes de lait traité à Veracruz chaque année (SIAP, 2015) tandis que 53 % est utilisé pour l'élaboration artisanale de fromage (FUNPROVER, 2010). Les principaux fromages produits de façon artisanale sont le fromage frais et le fromage appelé Oaxaca. Le fromage frais n'est pas mûri et la façon de le faire varie selon l'endroit où il est fait (Moore et al., 1983), mais en général le lait est coagulé par l'addition de la présure, le caillé ainsi obtenu est égoutté, salé et moulé sous pression. L'élaboration du fromage Oaxaca suit la même procédure décrite pour le fromage frais, mais le lait coagulé est soumis à l'eau chaude (65 °C – 70 °C) jusqu'à la formation de cordons, les cordons sont roulés sur eux mêmes et il est prêt pour la vente (De Oca-Flores et al., 2009; Hernández-Raya et al., 2005).

Malgré la haute consommation de ces fromages, la qualité du lait utilisé pour son élaboration n'est pas surveillée par les autorités. Pourtant, il a été publié la présence de pesticides organochlorés (Waliszewski et al., 1997) et d'aflatoxines M1 (Carvajal et al., 2003) dans le lait du Mexique, étant donné la nature lipophile de ces composés ils sont sensés se concentrer dans la matière grasse du lait. D'un autre côté, la procédure d'élaboration de ces fromages ne montre pas la possibilité d'élimination ou de réduction de la teneur de ces composés. Par ailleurs, aucune étude sur la teneur de ces composés dans cette sorte de fromage n'a été publiée, de la même façon, aucune étude de consommation de ces fromages menés à Veracruz n'a été trouvée dans la littérature. Compte tenu de ce manque de données, il n'est pas possible de faire une estimation du risque pour la santé des consommateurs de ces fromages, à Veracruz, d'où l'importance de cette thèse.

Généralités

Les aflatoxines (AFs) sont des métabolites secondaires fongiques (Soriano del Castillo, 2007; Turner *et al.*, 2009). Selon leur structure, les AFs sont des coumarines bis-dihydro furanes produites par des champignons tels que l'*Aspergillus flavus*, l'*A. parasiticus* et l'*A. nomius* (Prandini *et al.*, 2009; Anfossi *et al.*, 2012). Ces champignons produisent des spores qui contiennent des aflatoxines AFB1, AFB2, AFG1 et AFG2 qui peuvent contaminer les champs ou les magasins; ces toxines représentent un risque potentiel pour la santé des animaux et des humains (Prandini *et al.*, 2009). L'AFB1 peut contaminer des céréales tels que le maïs (Castillo-Urueta *et al.*, 2011), le sorgho (Abadía *et al.*, 1997), le riz (Suárez-Bonnet *et al.*, 2013), l'orge et le blé, c'est à dire, ce sont des grains qui font partie de la nutrition équilibrée des vaches laitières.

L'AFB1 est un cancérigène du groupe 1 pour les humains (IARC, 2002). Une vache qui a mangé des fourrages contaminés avec de l'AFB1 l'excrète dans la forme hydroxylade AFM1 dans son lait. Le foie métabolise l'AFB1 en additionnant un groupe hydroxyle, ce qui le fait plus hydrosoluble et facilite son excrétion dans l'urine ou dans le lait. Cette réaction diminue aussi la toxicité de l'AFB1. De façon similaire, l'AFB2 est métabolisée en AFM2 (Garrido *et al.*, 2003, Shephard, 2003, Soriano del Castillo, 2007) et elle est aussi excrétée dans le lait.

Puisque le climat chaud et humide, comme celui de Veracruz, est favorable à la croissance des champignons et à la production d'AFs (Shundo *et al.*, 2009; Soubra *et al.*, 2009), on peut trouver des AFs dans le lait de vaches alimentées avec des fourrages contaminés et en conséquence, la teneur d'AFM1 dans le fromage est plus importante que celle d'AFB1 dans le lait utilisé pour fabriquer dit fromage (Manetta *et al.*, 2009; Pietri *et al.*, 2016). Le lait et le fromage sont les véhicules pour l'introduction d'AFMs dans l'alimentation humaine (Ardic *et al.*, 2009).

On a reporté bien de cas de contamination de fromage par AFM1 au Brésil (Garrido *et al.*, 2003), Turquie (Tekinşen y Eken, 2008), Mexique (Urbán *et al.*, 2009), Koweït (Dashti *et al.*, 2009), Liban (Elkak *et al.*, 2012), Italie (Anfossi *et al.*, 2012) et Serbie (Škrbić *et al.*, 2015) ce qui confirme l'idée que la stabilité de l'AFM1 n'est pas affectée par la procédure de fabrication du fromage. Il semble que l'AFM1 est attachée à la caséine, ce qui expliquerait la teneur supérieure dans le caillé plutôt que dans le lait (Sengun *et al.*, 2008). Même si l'AFM1 est 2 à 10 % moins cancérigène que l'AFB1, elle est classée comme possible cancérigène humain dans le groupe 2B (IARC, 2002) car elle est toxique pour le foie, mutagène et cancérigène.

D'après la toxicité de l'AFM1, certains pays ont établi des niveaux maximaux de tolérance. La Commission de Regulation Européenne 1881/2006 a établie une limite maximale de 0.05 $\mu\text{g kg}^{-1}$ pour l'AFM1 dans le lait (CE, 2006), tandis que les États Unis ont établi une limite maximale de 0.5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (FAO, 2004). La limite maximale de tolérance d'AFM1 en Suisse, France, Autriche et Turquie est de 0.25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Aygun *et al.*, 2009).

En ce qui concerne l'évaluation de l'exposition, celle ci est définie comme l'évaluation qualitative et /ou quantitative de la consommation probable de produits toxiques à travers les aliments (WHO, 1997). La méthode utilisée dépend de la disponibilité de l'information, la précision demandée et de la disponibilité de budget et de temps (Kroes *et al.*, 2002). Par rapport à l'information demandée pour cette thèse, il est nécessaire de connaître le profil et le taux de consommation. La compilation de données valides sur les habitudes alimentaires d'une population est un problème difficile, parce que le profil de consommation varie entre les personnes et les groupes de personnes. Les causes de la variabilité des profils de consommation alimentaire peuvent être: le groupe ethnique, l'âge, la culture, l'économie, des aspects diététiques, sociaux et l'état de santé (WHO, 1985).

Il y a deux méthodes pour l'obtention d'information sur les profils de consommation : (i) de façon indirecte au moyen des enquêtes de consommation dans une région ou dans un foyer ; et (ii) de façon directe, ce qui implique des enquêtes de consommation individuelle ce qui permet de connaître les quantités effectives de consommation par personne ou par famille (CCA, 1989). Les mesures directes servent pour l'obtention de données quand il n'y en a pas avec antériorité, ce qui est le cas pour le Mexique et particulièrement pour Veracruz. Les mesures directes peuvent se regrouper en deux catégories: la méthode de rappel et la méthode d'enregistrement. La méthode d'enregistrement quantifie la consommation à travers un enregistrement journalier de la quantité des aliments consommés, cette quantité peut être déterminée par pesage direct de l'aliment ou bien, elle peut être estimée. La méthode de rappel enregistre la consommation du jour avant l'enregistrement (rappel de 24 h) ou la consommation habituelle d'aliments (fréquence de consommation) (WHO, 1985; Kroes *et al.*, 2002). Les données de consommation obtenues par ces deux méthodes peuvent être utilisées pour améliorer la précision et valider les enquêtes.

OBJECTIF

Evaluer le risque pour la santé des consommateurs de fromages frais et Oaxaca contaminés avec des pesticides organochlorés et des aflatoxines M1 et M2, dans la ville de Veracruz.

METHODES

Echantillonnage pour l'obtention de données de consommation de fromage. L'enquête de consommation a été menée dans la ville de Veracruz (bord du Golf du Mexique avec une superficie de 232.3 km²). Une carte de la ville de Veracruz a été capturée dans le logiciel MATLAB pour générer 150 (pour un questionnaire de fréquence d'achat) et 400 (pour un questionnaire de consommation journalière) coordonnées géographiques aléatoires. Ces coordonnées de la ville ont servi pour trouver le foyer où les questionnaires ont été proposés, afin d'obtenir des échantillons aléatoires et représentatifs de consommateurs. De ce tirage de coordonnées, on a retenu 100 endroits pour l'application du questionnaire de fréquence d'achat et 309 pour le questionnaire de consommation journalière.

Questionnaire de fréquence d'achat. Le questionnaire de fréquence d'achat a été appliqué en posant les questions à la personne chargée de faire les courses dans le foyer placé aux coordonnées données. On a demandé pour le niveau éducatif, la formation professionnelle, le niveau socio-économique, la saison de l'année dans laquelle ils achetaient plus de fromage, le repas dans laquelle ils le mangeaient plus et l'endroit où ils le gardaient à la maison. Le questionnaire montrait huit photographies des fromages vendus dans la région (manchego, américain, parmesan, mozzarella, cottage, frais, Oaxaca et fromage blanc) dont ils devaient indiquer la quantité, la fréquence d'achat, l'endroit d'achat du ou des fromages qu'ils achetaient. L'enquête a été menée entre septembre 2014 et novembre 2015.

Questionnaire de consommation journalière. Le questionnaire de consommation journalière a été appliqué pour connaître la consommation des deux fromages (Oaxaca et frais) les plus achetés, selon les résultats du questionnaire de

fréquence d'achat. Le questionnaire a été laissé à la maison pendant 7 jours pour que la personne interviewée puisse le remplir jour après jour. Dans le questionnaire il fallait remplir : l'âge, le sexe, le poids et la consommation de fromage à chaque repas (petit-déjeuner, déjeuner et dîner). Pour aider à estimer la consommation, on montrait dans le questionnaire cinq photographies avec différentes portions. Une lettre dans chaque photo était reliée à différentes quantités de fromage: (Figure 1 ; A, F: 36 g, B, G: 60 g; C, H: 92 g; D, I: 122 g et E, J: 184 g). Ces quantités ont été déterminées par des enquêtes préliminaires (n = 30). Le fromage frais apparaissait dans les photos selon les deux façons de consommation: en tranches et émincé (Fig. 1; lettres A – E) tandis que le Oaxaca se montrait émincé (Fig. 1 ; lettres F – J). Le fromage se montrait sur une assiette avec une fourchette qui aidait à identifier la taille de la portion.

Des comparaisons de paramètres obtenus avec les données de deux questionnaires ont été effectuées à l'aide de tests Mann-Whitney et Kruskal-Wallis. Avec l'objectif d'avoir une analyse statistique robuste, le nombre d'échantillons a été ajusté à travers la procédure bootstrap du logiciel @Risk.

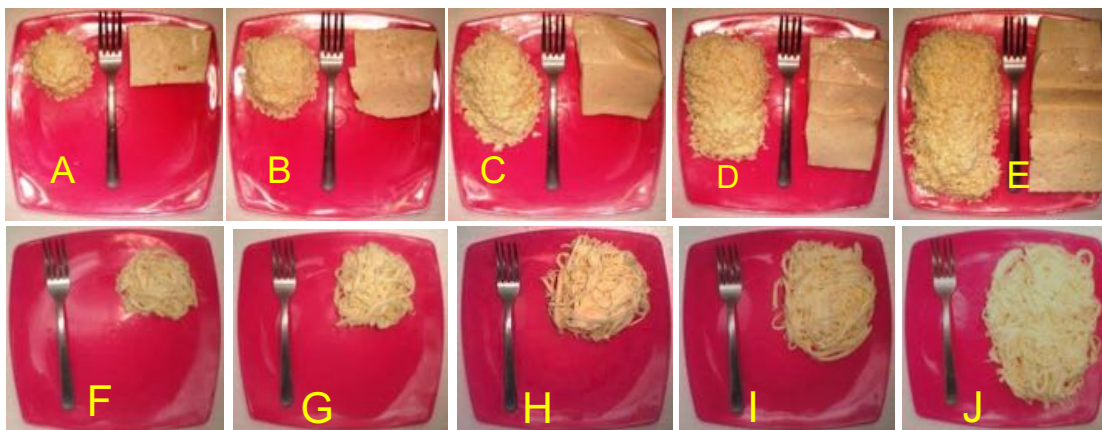


Figure 1: Portions (A, F : 36 g ; B, G : 60 g ; C, H : 92 g ; D, I : 122 g ; et E, J : 184 g) de fromage frais (A à E) et Oaxaca (F à J).

Échantillonnage de fromage. L'échantillonnage de fromage a été mené de façon aléatoire avec la génération de coordonnées aléatoires comme il a été décrit pour l'échantillonnage de la population pour l'application des questionnaires. On a prélevé des échantillons de fromage en 2014, 2015 et 2016, à chaque période d'échantillonnage, 40 coordonnées ont été générées à nouveau. Pour faire le prélèvement, on a cherché le magasin le plus proche de la coordonnée générée et on y a acheté le fromage. Dans l'échantillonnage de 2014 et 2015 (40 échantillons de 250 g à chaque année de chaque type de fromage: frais et Oaxaca) on a analysé des pesticides et des aflatoxines M1, tandis que l'échantillonnage de 2016

(30 échantillons de 750 g de fromage Oaxaca) a servi pour analyser des aflatoxines M1 et M2.

Méthodes testées pour l'extraction d'AFM1 du fromage Oaxaca. Suite à une recherche bibliographique approfondie, on a sélectionné trois méthodes, ces méthodes sont récurrentes dans la bibliographie et on les a considérées comme représentatives. Elles utilisent les mêmes solvants en quantités différentes. Les trois méthodes retenues sont les suivantes :

- 1) La méthode AOAC (2006) est similaire aux méthodes utilisées par Pietri *et al.* (1997), Battacone *et al.* (2005) et Trombete *et al.* (2014), elle utilise du chloroforme, de la terre de diatomées et du chlorure de sodium.
- 2) La méthode utilisant les colonnes Biopharm (2012) est très similaire à la méthode utilisée par Iha *et al.* (2013). Dans celle-ci, on utilise du méthanol, de l'eau et du chlorure de sodium. Il s'agit d'une méthode où on utilise une colonne d'immunoaffinité pour les AF totaux.
- 3) La méthode utilisée par Cavaliere *et al.* (2006) utilise de l'acétone, du gel de silice, des colonnes de charbon actif, du méthanol et de l'eau.

Dérivation. On a utilisé la méthode de dérivation publiée par Kok (1994) et Akiyama *et al.* (2001). Les extraits et les profils d'AFM1 ont été dissous dans 200 µL d'acétonitrile (ACN), 800 µL d'une solution dérivatisante ont été additionnées. La solution dérivatisante était composée de 5 mL d'acide trifluoroacétique (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, EE.UU.), 2,5 mL d'acide acétique glacial (Merck, Naucalpan, Estado de México, México) et 17,5 mL d'eau distillée désionisée, ceux-ci ont été agités en vortex (Vortex G - 560, Bohemia NY, EE.UU.) pendant 30 sec. La dérivation s'est effectuée dans un bain de vapeur à 65 °C pendant 10 min. Après refroidissement on a injecté en triple 60 µL dans un HPLC.

Validation de la méthode d'extraction. La validation a été réalisée comme rapporté par García et Alcántara (2002). On a comparé la linéarité des courbes de calibration, les limites de détection et de quantification et le pourcentage de récupération.

Quantification par HPLC. Les analyses ont été réalisées dans un HPLC Agilent Série 1200 (Agilent Technologies, Inc., USA) équipé avec une pompe isocratique

(Modelo G1310A), un détecteur de fluorescence (Modelo G1310A Série DE62957044, Agilent Technologies, Inc., USA.) placé à une longueur d'onde d'excitation de 360 nm et un maximum d'émission de 450 nm, un échantillonneur automatique (G1329A série DE64761666) et une colonne chromatographique VDS Optilab VDSpher 100 C18-E de 5 µm x 250 x 4,6 mm. L'analyse a été effectuée à température ambiante (22 °C). La phase mobile a été composée d'un système eau :ACN :méthanol (65 :15 :20 v/v/v) dégazifiée par filtration au vide ; elle a été pompée à un flux de 1,0 mL/min.

Analyse statistique. L'analyse statistique a été effectuée à l'aide du logiciel Minitab v. 16. Les analyses de variance ont été effectuées avec le test de Tukey à 95 % . Pour la construction des graphiques ont a utilisé le logiciel Kaleidagraph v. 3.5.

Évaluation probabiliste du risque par l'exposition à des aflatoxines AFM1 et AFM2 dans le fromage Oaxaca. Le premier pas pour réaliser l'évaluation du risque a été de connaître la consommation de fromage par groupe de population : par genre, par âge et par niveau social.

a) Exposition journalière d'aflatoxines provenant du fromage Oaxaca

$$DJE = C \times I \times P_c^{-1}$$

Où :

DJE : Dose journalière estimée d'aflatoxines (µg/g d'AFs/kg de poids corporel /jour)

C : PDF de la teneur d'AFs dans le fromage (µg/kg)

I : PDF de la consommation journalière de fromage (g/jour)

P_c : PDF du poids corporel de la population de la ville de Veracruz

La méthode Monte Carlo a été utilisée avec 10,000 itérations.

Résultats et Discussion

Caractéristiques et préférences de consommation.

Toutes les personnes invitées à répondre au questionnaire de fréquence d'achat l'ont fait. Parmi les 100 foyers enquêtés, 98 consommaient du fromage frais et de l'Oaxaca. Le questionnaire a été rempli par la personne chargée de faire la cuisine dans le foyer, 7 étaient des hommes et 91 des femmes.

Les résultats de ce questionnaire ont montré les préférences d'achat des différents fromages (Tableau 1). Le fromage frais et le fromage Oaxaca ont été les fromages les plus consommés par la population de la ville de Veracruz. Parmi les 98 familles, 24 ne consomment que le fromage frais, 6 ne consomment que le fromage Oaxaca et 68 consomment ces deux fromages. Le Tableau 1 montre le rapport du niveau éducatif, de l'occupation et de la saison avec la consommation de fromage. Les renseignements concernant le niveau social et l'heure du repas proviennent du questionnaire de préférence d'achat et ceux de la consommation journalière ont permis de valider les deux enquêtes.

La consommation moyenne de fromage frais et Oaxaca pour les hommes et les femmes a été de 53 g et 48,9 g, respectivement, tandis que la consommation unique de fromage Oaxaca pour les hommes et les femmes a été de 48 g et 45,17 g respectivement (Tableau 2). Pourtant, 5 % de la population masculine consomme plus de 164,5 g de fromage par jour de n'importe quel fromage, chez les femmes, les 5 % de grands consommateurs consomment plus de 152,6 g par jour de n'importe quel fromage.

Tableau 1. Préférence de consommation et caractéristiques des consommateurs de la ville de Veracruz (n = 98).

Types de fromage	% Achat	Types de fromage	% Achat
Frais	90	Fromage blanc mexicain	10
Oaxaca	75	Parmesan	7
Manchego	35	Mozzarella	3
Américain	12	Cottage	1
Niveau éducatif	Proportion de familles (%)	Profession du chef de famille	Proportion de familles (%)
Diplôme supérieur	5,1	Maison	42
Préparatoire	33,7	Employé	34
Secondaire	38,8	Entrepreneur	20
Primaire	7,1	Chômage	2
Technicien	14,3	Etudiant	2
Sans école	1,0		
Caractéristiques du repas et époque de consommation			
Repas	Proportion de familles (%)	Époque de consommation	Proportion de familles (%)
Petit déjeuner	24,5	Printemps	9
Déjeuner	48,9	Été	2
Dîner	7,1	Automne	0
N'importe quel repas	19,4	Hiver	4
		Toute l'année	85
Caractéristiques de l'endroit d'achat et de stockage à la maison			
Endroit d'achat	Proportion de familles (%)	Endroit de stockage	Proportion de familles (%)
Épiceries	27	Réfrigérateur	96
Marché	31	Vitrine	3
Grande surface	41	Glacière	1
Intermédiaire	1		

L'analyse statistique des données a montré des différences significatives ($p < 0,05$) entre la consommation moyenne de fromage frais des hommes et des femmes, mais il n'y en a pas ($p > 0,05$) en ce qui concerne la consommation moyenne de fromage Oaxaca entre les hommes et les femmes.

Tableau 2. Comparaison des paramètres des distributions de probabilité de la quantité de chaque type de fromage consommé par jour par genre dans la ville de Veracruz.

	Fromage frais		Fromage Oaxaca	
	Hommes* ¹	Femmes* ¹	Hommes* ²	Femmes* ²
n	430	442	381	400
Médiane (g)	36,8	30,3	32,0	28,6
Moyen (g)	53,01 ^a	48,9 ^b	50,6 ^a	45,2 ^a
Écart type	54,1	52,1	57,4	52,0
P95 (g)	164,5	157,1	186,0	152,6

Le test Mann Whitney a été utilisé pour établir différences entre les *¹colonnes de fromage frais (hommes et femmes) et les *²colonnes de fromage Oaxaca (hommes et femmes). Des lettres différentes indiquent une différence significative.

Des 309 familles enquêtées, 86 % ont signalé leur niveau social. De ce 86 %, 12 % appartient à la classe sociale haute, 76 % à la classe moyenne et 12 % à la classe basse (Tableau 3). Les fromages frais et Oaxaca sont plus consommés par la classe haute et la classe moyenne, peut-être y a-t-il une corrélation directe avec le pouvoir d'achat, plutôt qu'avec le goût pour le fromage. L'analyse statistique n'a pas montré de différence significative dans la médiane de la consommation de fromage frais des deux groupes sociaux (classe haute et classe moyenne, $p > 0,05$), mais la différence est significative ($p < 0,05$) quand on compare la médiane de la consommation de ces deux groupes versus la médiane de la consommation de la classe basse.

Tableau 3. Comparaison des paramètres des distributions de probabilité de la quantité de chaque type de fromage consommé par jour par classe sociale dans la ville de Veracruz.

	Fromage frais			Fromage Oaxaca		
	Classe haute	Classe moyenne	Classe basse	Classe haute	Classe moyenne	Classe basse
n	30	199	33	29	181	31
Médiane (g)	35,7 ^b	31,8 ^b	24,1 ^a	38,7 ^b	28,2 ^a	25,9 ^a
Moyenne (g)	48,7	49,0	28,6	56,8	42,4	35,0
Écart type	51,5	50,1	17,2	50,7	44,2	28,8
P95 (g)	107,2	179,4	60,4	165,4	131,9	88,4

Le test de Kruskal Wallis a été utilisé pour établir différences entre les *¹colonnes de fromage frais (classes haute, moyenne et basse) et les *²colonnes de fromage Oaxaca (classes haute, moyenne et basse). Des lettres différentes indiquent une différence significative.

Dans le cas du fromage Oaxaca, il y a eu une différence significative entre la médiane de la consommation de la classe haute et celles des classes moyenne et basse. Le prix du fromage Oaxaca est le double que celui du fromage frais. Le rapport entre le prix et la préférence de consommation a été reportée par Bashir (2011), qui a évalué le rapport entre le prix des produits laitiers (parmi eux le fromage) et le statut socioéconomique ainsi que l'âge, il a publié de résultats similaires à ceux de cette thèse. Kubicova et al. (2014) a aussi établi une influence directe du prix des produits laitiers tel que le fromage, sur la fréquence de consommation.

La consommation moyenne de fromage trouvé dans cette thèse est supérieure à la consommation per capita en 2013 (Tableau 4), ce qui est normal car pour calculer la consommation per capita on prend en compte toute la population : consommateurs et non consommateurs. D'un autre côté, au Mexique, pour le calcul per capita on ne prend en compte que le fromage qui a été soumis à des contrôles sanitaires, commerciaux et fiscaux, les fromages artisanaux (qui utilisent 53% de la production totale de lait) ne sont pas pris en compte car ils ne sont comptabilisés nulle part ; comme résultat, la quantité de fromage utilisé pour le calcul per capita est inférieure à la vraie quantité. Des résultats similaires ont été publiés par Rossini (2015) qui a évalué la consommation de fromage en Argentine au moyen d'enquêtes réalisées aux foyers et il a calculé la consommation mensuelle de fromage avec et sans la population non consommateur. Dans le premier cas, la consommation per capita a été 1,3 kg/personne/mois et dans le deuxième cas, elle a été 2,4 kg/personne/mois. L'enquête ENURBAL (Ávila et al., 2003; Ávila et al., 2007), avec de questionnaires de rappel de 24 h, a été appliquée à la population de la ville de Mexico (2002 et 2007) et a montré que le fromage est un des aliments les plus consommés parmi la population de la ville de Mexico avec une consommation moyenne de 15,6 et 19,9 g/personne/jour en 2002 et 2007, respectivement. Pourtant, ces données sont inférieures à la consommation trouvée dans cette thèse. Soit la population de la ville de Mexico mange moins de fromage, soit il s'agit d'un effet du type de questionnaire. Comme il a été dit avant, l'enquête ENURBAL a utilisé un questionnaire de rappel de 24 h, tandis que dans cette thèse on a utilisé un questionnaire journalier pendant 7 jours. Rosado et al., ont publié des taux de consommation de fromage Oaxaca au moyen de l'enquête ENSANUT (1974), dans leurs données, ils font état d'une consommation de 41 g par personne par jour dans la ville de Mexico, ce qui est très proche de la valeur trouvée dans cette thèse. Dans le cas de cette thèse, il a pu être estimé que 5 % de la population consomme plus de 162,6 g de fromage Oaxaca par jour.

Tabla 4. Consommation de fromage dans le monde.

Régions	Consommation globale de fromage 2013 (kg per capita)	Consommation de fromage (g/personne/jour)	Référence
Argentine	12,4	33,9	CDIC, 2015
Brésil	3,7	10,1	CDIC, 2015
Chili	8,8	24,1	CDIC, 2015
Colombie	0,9	2,5	CDIC, 2015
Uruguay	8,5	23,5	CDIC, 2015
Mexique	3,6	9,9	SAGARPA, 2015
Canada	12,2	33,4	CDIC, 2015
États Unis	15,4	42,2	CDIC, 2015
France	25,9	70,9	CDIC, 2015
Ville de Mexico		41 (Fromage Oaxaca)	Rosado et al., 1992
		51 (Fromage Américain)	
Ville de Mexico	---	15,6	ENURBAL, 2002
Ville de Mexico	---	19,9	ENURBAL 2007
Ville de Veracruz	---	50,9 (Fromage frais)	Cette étude
Ville de Veracruz	---	47,8 (Fromage Oaxaca)	Cette étude

Teneur en aflatoxine M₁ dans le fromage Oaxaca échantillonné en 2015.

Le Tableau 5 montre la teneur d'AFM₁ dans les 25 échantillons de fromage Oaxaca collectés dans la ville de Veracruz pendant la saison sèche. Ces échantillons ont été analysés dans le laboratoire Phytocontrol (Nîmes, France). Les résultats du Tableau 5 montrent que dans 32 % des échantillons l'AFM₁ n'a pas été détecté, dans 36 % l'AFM₁ a été détectée mais non quantifiée, et dans les 32 % restant, il n'y a eu que deux valeurs qui ont dépassé la limite de tolérance du Codex Alimentarius.

Teneur en aflatoxine M1 et M2 dans le fromage Oaxaca échantillonné en 2016

Les résultats de la teneur en AFM₁ et AFM₂ sont montrés dans le Tableau 6, comme on peut voir, les valeurs de contamination sont plus importantes que celles trouvées dans l'échantillonnage de 2015, c'est pour cela qu'on a choisi ces résultats pour réaliser l'évaluation du risque.

Tableau 5. Teneur ($\mu\text{g kg m.s.}^{-1}$) en AFM₁ dans le fromage Oaxaca échantillonné dans la saison sèche de 2015.

Échantillon	Origine	AFM ₁	Échantillon	Origine	AFM ₁	Échantillon	Origine	AFM ₁
13	Inconnue	ND	17	Inconnue	LOD < 0,02	11	P. Vicente	0,040
16	El Mangal		20	Joya		12	Inconnue	0,024
19	Inconnue		21	Tlalixcoyan		15	Inconnue	0,030
24	P, Negras		25	Mixtequilla		18	Mixtequilla	0,075*
29	Soledad de Doblado		26	Inconnue		22	Inconnue	0,024
31	Inconnue		30	Tejar		27	El Morro	0,025
39	La Joya		32	Tlalixcoyan		28	Acayucan	0,023
40	Inconnue		37	Inconnue		33	Inconnue	0,057*
			38	Inconnue				

ND: non détecté; LOD: Limite de détection; *Au dessus de la limite de tolérance du Codex Alimentarius

Le Tableau 6 montre aussi que l'AFM₁ a eu une fréquence de détection (16 sur 30, 53 %) plus importante que celle de l'AFM₂ (6 de 30, 20 %). La teneur en AFM₁ se trouve entre 0,01 et 44 $\mu\text{g kg}^{-1}$, tandis que celle de l'AFM₂ se trouve entre 0,01 y 3,43 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Ces deux plages dépassent les limites tolérables établis par le NAFTA (0.5 $\mu\text{g kg}^{-1}$) et par le Codex Alimentarius et l'Union Européenne (0.05 $\mu\text{g kg}^{-1}$) (EFSA 2004). Une étude publiée auparavant (Urban *et al.*, 2009) a trouvé une incidence d'AFM₁ de 27 % dans le fromage « panela » (sorte de fromage frais mexicain) du Mexique. A ce jour, aucun cas de maladie humaine au Mexique n'a été associé à la consommation de fromage contaminé malgré la haute teneur d'AFM qu'ils peuvent atteindre.

Dose Journalière Estimée (DJE)

La dose moyenne journalière estimée pour l'AFM₁ a été 1,52 et 1,5 ($\mu\text{g kg}^{-1} \text{ pc j}^{-1}$) pour les hommes et pour les femmes, respectivement, ce qui est plus haute que celle recommandée par le JECFA (1999 et 2001) de 1 $\text{ng kg}^{-1} \text{ pc j}^{-1}$. L'analyse statistique montre une différence significative entre la DJE des hommes et celle des femmes, étant les hommes ceux qui sont le plus exposés.

Tableau 6. Teneur ($\mu\text{g kg m.s.}^{-1}$) en AFM₁ et AFM₂ dans le fromage Oaxaca échantillonné en 2016.

Échantillon	Origine	Aflatoxine ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		
		AFM ₁	AFM ₂	AFMt
		Moyenne \pm ET	Moyenne \pm ET	
1	Tlalixcoyan	0,03 \pm 0,010 ^b	3,62 \pm 0,27 ^a	3,47
2	Jamapa	ND	ND	
3	Jamapa	ND	ND	
4	La Mixtequilla	0,01 \pm 0 ^a	ND	0,01
5	Soledad de Doblado	0,76 \pm 0,02 ^a	ND	0,76
6	Inconnue	ND	ND	
7	Inconnue	ND	ND	
8	Inconnue	0,44 \pm 0,03 ^a	ND	0,43
9	Inconnue	0,04 \pm 0,02 ^b	0,68 \pm 0,09 ^a	0,70
10	La Antigua	8,95 \pm 0,49 ^a	ND	8,95
11	Inconnue	ND	ND	0
12	Mixtequilla	0,97 \pm 0,06 ^a	ND	0,97
13	Soledad de Doblado	2,66 \pm 0,19 ^a	< LOD	2,66
14	Tlalixcoyan	0,05 \pm 0,01 ^a	< LOD	0,05
15	Tlalixcoyan	32,19 \pm 2,6 ^a	ND	32,19
16	Inconnue	0,10 \pm 0,01 ^a	ND	0,10
17	Inconnue	3,38 \pm 0,17 ^a	< LOD	3,37
18	Mixtequilla	ND	ND	0
19	Tierra Blanca	ND	ND	0
20	(El Morro) Boca del Río	ND	ND	0
21	Inconnue	ND	ND	0
22	Soledad de Doblado	ND	2,77 \pm 0,76 ^a	2,76
23	Inconnue	43,99 \pm 2,9 ^a	ND	43,99
24	Soledad de Doblado	0,01 \pm 0 ^a	ND	0,01
25	Inconnue	0,72 \pm 0,21 ^a	ND	0,72
26	Inconnue	ND	ND	0
27	Inconnue	ND	ND	0
28	Inconnue	ND	ND	0
29	(La Joya) Acajete	ND	ND	0
30	Inconnue	0,04 \pm 0,01 ^a	ND	0,04

ET: Écart type; ND: Non détecté; AFM_i: Aflatoxines M totales. Des lettres différentes dans la même rangée indiquent différence significative (ANOVA avec des tests de Tukey, $p < 0,05$)

Tableau 7. Paramètres de la distribution de probabilité de la dose journalière estimée d'AFM₁ pour hommes et femmes âgés de 14 ans, consommateurs de fromage Oaxaca dans la ville de Veracruz en 2016.

Paramètre	Saison sèche 2016 (AFM ₁)		
	Hommes >14 ans	Femmes >14 ans	Population générale >14 ans
Médiane ($\mu\text{g kg}^{-1} \text{pc j}^{-1}$)	2,25	2,20	2,26
Moyenne ($\mu\text{g kg}^{-1} \text{pc j}^{-1}$)	1,52	1,5	1,53
Écart type ($\mu\text{g kg}^{-1} \text{pc j}^{-1}$)	2,44	2,34	2,45
P95 ($\mu\text{g kg}^{-1} \text{pc j}^{-1}$)	6,51	6,30	6,56

CONCLUSIONS

Le fromage le plus consommé dans la ville de Veracruz est le fromage frais, suivi par le fromage Oaxaca, la consommation de ces deux fromages est plus importante que la consommation nationale moyenne de tous les fromages. La classe haute et la classe moyenne sont les classes qui consomment le plus de fromage frais, mais le fromage Oaxaca est plus consommé par la classe élevée. Les hommes dans les groupes d'âge productif consomment plus de fromage tandis que chez les femmes, la consommation semble être indépendante de leur âge. La consommation de fromage frais et Oaxaca est effectuée principalement dans le déjeuner.

Ces résultats manifestent que même si les législations mexicaines ont essayé de diminuer le niveau de contamination par AMF1 dans le fromage aux niveaux de tolérance et même s'il n'y a pas d'évidence directe des problèmes de santé à cause de la consommation de fromage contaminé avec de l'AFM1, la teneur de ce toxique chimique dans les fromages artisanaux peut mettre en péril la santé du consommateur.

Referencias

Abadía, B., Afanador, G., Céspedes A.E., and Díaz. G.J. 1997. Ocurrencia natural de aflatoxinas en sorgos híbridos cultivados en la Microregión del Alto Magdalena en Colombia. *Corpoica* 2: 22-26.

Akiyama, H., Goda, Y., Tanaka, T. and Toyoda, M. 2001. Determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in spices using a multifunctional column clean-up. *J. Chromatogr. A.* 932:153-157.

Anfossi, L., Baggiani, C., Giovannoli, C., D'Arco, G., Passini, C. and Giraudi, G. 2012. 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: 125-130.

AOAC, Association of Official Analytical Chemists. 2006. Natural toxins. In *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 18th ed, Horwitz W, Latimer GW Jr, Trucksess MW (Eds) 1-51. Gaithersburg (MD): AOAC International.

Ardic, M., Karakaya, Y., Atasever, M. and Adiguzel, G. 2009. Aflatoxin M1 levels of Turkish white brined cheese. *Food Control* 20: 196-199.

Ávila, C.A., Shamah, L.T., Chávez, V.A., Galindo, G.C. 2003. Encuesta Urbana de Alimentación y Nutrición en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México, ENURBAL-2002. *Inst Nac Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. México.*1-115.

Ávila, C.A., Galindo, G.C., Hernández, R.A., Chávez, V.A. 2007. Encuesta Urbana de Alimentación y Nutrición en la Zona Metropolitana del Estado de México, ENURBAL 2007. *Inst Nac Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. México* pp: 1-77.

Aygun, O., Essiz, D., Durmaz, H., Yarsan, E. and Altintas, L. 2009. Aflatoxin M1 levels in Surk samples, a traditional Turkish cheese from southern Turkey. *B. Environ. Contam. Tox.* 83: 164-167.

Bashir, K.A. 2011. Consumption of dairy products in the UAE: A comparison of nationals and expatriates. *J Saudi Soc Agric Sci.*10(2):121-125.

Bankole, S.A., Adenusi, A.A., Lawal, O.S. and Adesanya, O.O. 2010. Occurrence of aflatoxin B1 in food products derivable from 'egusi' melon seeds consumed in southwestern Nigeria. *Food Control* 21:974-976.

Battacone, G., Nudda, A., Palomba, M., Pascale, M., Nicolussi P. and Pulina. G. 2005. Transfer of aflatoxin B1 from feed to milk and from milk to curd and whey in dairy sheep fed artificially contaminated concentrates. *J. Dairy Sci.* 88: 3063-3069.

Carvajal, M., Bolaños, A., Rojo F. and Méndez, I. 2003. Aflatoxin M1 in pasteurized and ultrapasteurized milk with different fat content in Mexico. *J. Food Protect.* 66: 1885-1892.

Castillo-Urueta, P., Carvajal, M., Méndez, I., Meza, F. and Gálvez, A. 2011. Survey of aflatoxins in maize tortillas from Mexico City. *Food Addit. Contam. Part B: Surveillance* 4:42-51.

Cavaliere, C., Foglia, P., Guarino, C., Marzoni, F., Nazzari, M., Samperi, R. and Laganà, A. 2006. Aflatoxin M1 determination in cheese by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1135:135-141.

CCA (Comisión del Codex Alimentarius).1989. Guidelines for simple evaluation of food additive intake. Orientaciones para una evaluación sencilla de la ingesta de aditivos alimentarios.

EC, European Community. 2006. Commission regulation 1881/2006 of 19 December setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs OJEU 364: 5-24.

EFSA, European Food Safety Authority .2004. Opinion of the Scientific Panel on contamination in the Food chain on a request from the request from the commission related to aflatoxin B1 substance in animal feed (Request Nr. EFSAQ-2003-035). Adopted on 3 February 2004. *EFSA J* 39:1-27.

Dashti, B., Al-Hamli, S. Alomirah, H., Al-Zenki, S., Abbas, A.B. and Sawaya, W. 2009. Levels of aflatoxin M1 in milk, cheese consumed in Kuwait and occurrence of total aflatoxin in local and imported animal feed. *Food Control* 20: 686-690.

De Oca-Flores, E.M., Castelán-Ortega O.A., Estrada-Flores, J.G., Espinoza-Ortega, A. 2009. Oaxaca cheese: manufacture process and physicochemical characteristics. *Int J Dairy Technol* 62: 535-540.

Elkak, A., El Atatk, O., Habib, J. and Abbas, M. 2012. Occurrence of aflatoxin M1 in cheese processed and marketed in Lebanon. *Food Control* 25: 140-143.

FAO/WHO. 1999. Codex alimentarius. Norma general para los aditivos alimentarios. Roma Italia.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2004. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. Available from: <http://www.fao.org/docrep/fao/007/y5499e/y5499e00.pdf>

FUNPROVER (Fundación produce Veracruz) (2010) Colegio de Postgraduados Veracruz. Reporte Técnico de Proyecto. Estudio y análisis del mercado de los productos del sistema bovinos de doble propósito en el Estado de Veracruz [Project Technical Report. Study and Analysis of the product market of bovine system of double purpose in the State of Veracruz]. Xalapa, México.

García, M.A., and Alcántara, A. 2002. Guía de validación de métodos analíticos. Ed. Colegio Nacional de QFB, AC. México, DF, México.

Garrido, N.S., M.H. Iha, M.R. Santos Ortolani, and R.M. Duarte Fávaro. 2003. Occurrence of aflatoxins M1 and M2 in milk commercialized in Ribeirão Preto-SP, Brazil. *Food Addit, Contam*, 20: 70-73.

Hernández-Raya, J.C., Martínez-Soto, G., López-Orozco, M., Mercado-Flores, J., Alcántara-González, M.L. 2005. Evaluación de Rendimientos y costos de fabricación en: Queso Asadero, Oaxaca y Yoghurt a nivel Industrial. VII Congreso nacional de ciencia de alimentos y III Foro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Guanajuato, Gto. México.

IARC, International Agency for the Research of Cancer. 2002. Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC Expert Committee, World Health Organization. Monograph 82:171, Lyon, France.

INEGI, Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. 2008. Encuesta industrial mensual. Cantidad y valor de producción de los productos elaborados. Encuestas tradicionales en establecimientos. Accessed March 10, 2016. Available: http://www.inegi.gob.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/encuestas/establecimientos/eim/resumen/pro_v2.xls

JECFA. 1999. Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants: Forty-ninth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series No. 884. WHO, Geneva Switzerland. <http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_884.pdf> (accessed June, 2013).

JECFA. 2001. Joint Expert Committee of Food Additives. In Ochratoxin A, in "Safety evaluations of specific mycotoxins". Prepared by the fifty-sixth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 6e15 February, Geneva.

Kok, W.T. 1994. Derivatization reactions for the determination of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B.* 659: 127-137.

Kroes, R., Müller, D., Lambe, J., Löwik, M.R., van Klaveren, J, et al. 2002. Assessment of intake from the diet. *Food Chem Toxicol.* 40: 327-385.

Kubicová, L.U., Kadekova, K. y Dobák, D. 2014. Trends in consumption of milk and dairy products in Slovakia after EU accession. *Eur Policies Financ Market.* 12:90-97.

Manetta, A.C., M. Giammarco, L. Di Giuseppe, I. Fusaro, A. Gramenzi, A. Formigoni, G. Vignola, and L. Lambertini. 2009. Distribution of aflatoxin M1 during

Grana Padano cheese production from naturally contaminated milk. *Food Chem.* 113: 595-599

Moore, P.L., Richter, R.L., Dill, C.W. 1986. Composition, yield, texture, and sensory characteristics of Mexican white cheese. *J Dairy Sci* 69: 855-862.

Pietri, A., Bertuzzi, T., Bertuzzi, P., and Piva, G. 1997. Aflatoxin M1 occurrence in samples of Grana Padano cheese. *Food Addit. Contam.* 14: 341-344.

Pietri, A., A. Mulazzi, G. Piva, and T. Bertuzzi. 2016. Fate of aflatoxin M1 during production and storage of parmesan cheese. *Food Control* 60: 478-483.

Prandini, A., Fallah, A.A. Jafari, T. Fallah, A. and Rahnama, M. 2009. Determination of aflatoxin M1 levels in Iranian white and cream cheese. *Food Chem. Toxicol.* 47: 1872-1875.

R-Biopharm Rhone Ltd. 2012. Easi-extract aflatoxin. Guía de uso para el usuario. RP71RP70N/V12/28.06.12. pp 3-12. Block 10 Todd Campus, West of Scotland Science Park. Acre Road, Glasgow G20 0XA. UK.

Rosado, J.L., López, P., Morales, M., Munoz, E., Allen, L.H. 1992. Bioavailability of energy, nitrogen, fat, zinc, iron and calcium from rural and urban Mexican diets. *Br J Nutr* 68: 45-58.

Rossini, G., Vicentin, J. and Depetris, E. 2015. Household Cheese Consumption in Argentina: A Double-Hurdle Model Estimation. In 143rd Joint EAAE/AAEA Seminar, March 25-27, 2015, Naples, Italy (No. 202739). European Assoc Agric Economists. Italy

Sengun, I.Y., Yaman, D.B. and Gonul. S.A. 2008. Mycotoxins and mould contamination in cheese: a review. *World Mycotoxin J.* 1:291-298.

Shephard, G.S. 2003. Aflatoxin and food safety: recent African perspectives. *J Toxicol. Toxin Rev.* 22: 267-286.

Shundo, L., Navas, S.A., Lamardo, L.C.A., Ruvieri, V. and Sabino M. 2009. Estimate of aflatoxin M1 exposure in milk and occurrence in Brazil. *Food Control*, 20: 655-657.

SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2015. Boletín de Leche. enero-marzo de 2015.

Signorini, M.L., Gaggiotti, M., Molineri, A., Chiericatti, C.A., Zapata de Basílico, M.L. 2012. Exposure assessment of mycotoxins in cow's milk in Argentina. *Food Chem Toxicol* 50: 250-257.

Škrbić, B., Antić, I. and Živančev. J. 2015. Presence of aflatoxin M1 in white and hard cheese samples from Serbia. *Food Control*, 50: 111-117.

Soriano del Castillo J. 2007. *Mycotoxins in foods*. Díaz de Santos Editions. Valencia, Spain.

Soubra, L., Sarkis, D., Hilan, C. and Verger. P. 2009. Occurrence of total aflatoxins, ochratoxin A and deoxynivalenol in foodstuffs available on the Lebanese market and their impact on dietary exposure of children and teenagers in Beirut. *Food Addit. Contam.* 26: 189-200.

Suárez-Bonnet, E., Carvajal, M. Méndez-Ramírez, I. Castillo-Urueta, P., Cortés-Eslava, J., Gómez-Arroyo, S. and Melero-Vara. J.M. 2013. Aflatoxin (B1, B2, G1 and G2) contamination in rice of Mexico and Spain, from local sources or imported. *J. Food Sci.* 78:1822-1829.

Tekinşen, K.K., and Eken. H.S. 2008. Aflatoxin M1 levels in UHT milk and kashar cheese consumed in Turkey. *Food Chem. Toxicol.* 46: 3287-3289.

Trombete, F.M., Castro, I.M.D., Teixeira, A.D.S., Saldanha, T. and Fraga. M.E. 2014. Aflatoxin M1 contamination in grated parmesan cheese marketed in Rio de Janeiro-Brazil. *Braz. Archf. Biol. Technol.* 57:269-273.

Turner, N.W., Subrahmanyam, S. and Piletsky. S.A. 2009. Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. *Anal. Chim. Acta* 632: 168-180.

Urban, G., Pérez, J., Martínez, F., Salas, J., Díaz, G., Ramírez, M.L., Castro, G., Vega S., Gutiérrez R. and Escobar. A. 2009. Niveles de aflatoxina M1 en quesos frescos producidos en diferentes zonas de México. *Rev. Salud Anim.* 31: 115-121.

Waliszewski, S. M., Pardio, V. T., Waliszewski, K. N., Chantiri, J. N., Aguirre, A. A., Infanzon, R. M., and Rivera, J. 1997. Organochlorine pesticide residues in cow's milk and butter in Mexico. *Sci. Total Environ.* 208(1), 127-132.

WHO (World Health Organization).1985. Guidelines for the study of dietary intakes of chemical contaminants. WHO Offset Publ : 1-102.

WHO (World Health Organization).1997. Guidelines for predicting dietary intake of pesticide residues. GEMS/Food in collaboration with the codex committee on pesticide residues.

RESUMEN

Hernández-Camarillo, Estela. Doctorado en Ciencias en Alimentos. Febrero 2017. Evaluación probabilística del riesgo a la salud del consumidor de queso fresco y Oaxaca, en la ciudad de Veracruz, debido a la presencia de plaguicidas organoclorados y aflatoxinas. Asesores: Dr. Victor J. Robles Olvera, Dr. Marco Antonio Salgado Cervantes, Dra. Magda Carvajal Moreno, Dr. Alain-Claude Roudot.

El 53 % de la leche producida en Veracruz se utiliza para fabricación de quesos artesanales, sin embargo esta leche no es sometida a ningún análisis de calidad, por lo que el contenido de contaminantes como plaguicidas y micotoxinas podrían concentrarse en los quesos. Los plaguicidas, como los organoclorados (POC's), pueden aumentar la incidencia de cáncer y funcionar como disruptor endócrino; mientras que las micotoxinas, como las aflatoxinas (AFs): Aflatoxina M₁ (AFM₁) y Aflatoxina M₂ (AFM₂), son consideradas cancerígenas. El consumo de queso con estos tóxicos puede poner en riesgo la salud del consumidor, sin embargo, existen pocos reportes de la concentración de estos compuestos y el consumo de quesos por la población de Veracruz. El objetivo de este trabajo fue evaluar el riesgo a la salud por el consumo de queso (fresco y Oaxaca) contaminado con POC's, AFM₁ y AFM₂. Para alcanzar este objetivo, se muestrearon aleatoriamente quesos fresco y Oaxaca en 40 puntos de venta de la ciudad de Veracruz, en tres años diferentes (2014, 2015 y 2016), abarcando periodos de secas y de lluvias. La concentración de POC's (n = 20) se cuantificó por CG-MS y la de AFs por HPLC. Para la obtención de datos de ingesta de queso, se utilizaron dos cuestionarios: uno de frecuencia de compra (n = 100) y un diario de alimentos de 7 días (n = 309 para cada tipo de queso). La evaluación del riesgo por exposición de la población a AFM₁ se evaluó a través de la combinación de las funciones de densidad de probabilidad (PDF) de la concentración de AFs, del consumo de queso Oaxaca y del peso corporal (metodología probabilística). Sólo en el 5 % de las muestras de queso Oaxaca se detectaron POC's pero en valores inferiores al límite de cuantificación (LOQ = 0.01 mg kg⁻¹), lo que muestra que la exposición del consumidor a los POC's es baja. El consumo promedio de queso fresco y Oaxaca fue de 50.9 g persona⁻¹ d⁻¹ y 47.8 g persona⁻¹ d⁻¹, respectivamente. Sólo en el 37 % de las muestras de queso Oaxaca, la concentración de AFM₁ y en el 10 % para la AFM₂, fue mayor al valor establecido por la Comisión Europea de 0.05 µg kg⁻¹. La exposición de los niños (5.9 µg de AFM₁ kg de peso corporal⁻¹ d⁻¹ y 0.5 µg de AFM₂ kg de peso corporal⁻¹ d⁻¹) fue mayor que la encontrada en adultos (2.32 µg de AFM₁ kg de peso corporal⁻¹ d⁻¹ y 0.2 µg de AFM₂ kg de peso corporal⁻¹ d⁻¹). Teniendo en cuenta una TDI de 1 ng kg⁻¹ pc día⁻¹ los resultados indicaron que la salud del 72.8 % y el 51 % de la población infantil y adulta, respectivamente, de la ciudad de Veracruz, está en riesgo por consumir queso Oaxaca contaminado con AFM₁ y cerca del 13 % y 3 % de la población infantil y adulta respectivamente, debido al consumo de AFM₂. El presente estudio es la primera investigación sobre la exposición de la población veracruzana a quesos contaminados con AFM₁ y AFM₂.

ABSTRACT

Hernández-Camarillo Estela. Ph.D. Food Science. February 2017. Probabilistic risk assessment for organochlorine pesticides and aflatoxins exposure by consumption of contaminated cheeses (fresh and Oaxaca) in Veracruz City. Advisers: Dr. Victor J. Robles Olvera, Dr. Marco Antonio Salgado Cervantes, Dra. Magda Carvajal Moreno, Dr. Alain-Claude Roudot.

About 53 % of the milk produced in Veracruz is used for the manufacture of artisanal cheeses, however this milk is not subjected to any quality analysis, so the content of contaminants such as pesticides and mycotoxins could be found in cheeses. Pesticides, such as organochlorines (POCs), can increase the incidence of cancer and act as an endocrine disruptor; Additionally mycotoxins, such as aflatoxin M₁ (AFM₁) and aflatoxin M₂ (AFM₂), are considered carcinogenic. The consumption of cheese with these toxins can put the health of the consumer at risk; however, there are only reports on the concentration of these compounds in cheeses, and cheese data consumption by the population of Veracruz are not available. The objective of this work was to evaluate the health risk due to the consumption of contaminated cheese (fresh and Oaxaca) with POC's and AFM₁. In order to attain this objective, fresh and Oaxaca cheeses were randomly sampled at 40 groceries in Veracruz city, in three different years (2014, 2015 and 2016), covering periods of drought and rain. The concentration of POC's (n= 20) was quantified by CG-MS and that of AFs by HPLC. Cheese intake data were obtained from a purchase frequency questionnaire (n = 100) and from a 7-day food diary questionnaire (n = 309 for each type cheese). The risk assessment for exposure of the population to AFM₁ was calculated by the combination of probability density functions (PDF) of AFM₁ concentration, Oaxaca cheese consumption and body weight (probabilistic methodology). POCs were detected only in 5 % of the samples at concentrations above the quantification limit (LOQ = 0.01 mg kg⁻¹), which shows that consumer exposure is low. The average consumption of fresh and Oaxaca cheese was 50.9 g person⁻¹ d⁻¹ and 47.8 g person⁻¹ d⁻¹, respectively. Only in 37 % of Oaxaca cheese samples, the concentration of AFM₁ and in the 10 samples of AFM₂ was higher than the value established by the European Commission of 0.05 µg kg⁻¹. The exposure of children (5.9 µg AFM₁ kg body weight⁻¹ d⁻¹ and 0.5 µg AFM₂ kg body weight⁻¹ d⁻¹) was higher than found in adults (2.32 µg AFM₁ kg body weight⁻¹ d⁻¹ and 0.2 µg AFM₂ kg body weight⁻¹ d⁻¹). Taking into account a TDI of 1 ng kg⁻¹ pc d⁻¹ the results indicated that health that the 72.8 % And 51% of the adult and child population, respectively, of the population of Veracruz city is at for consuming contaminated Oaxaca cheese with AFM₁ and about 13% and 3% of the infant and adult population, respectively, due to the consumption of AFM₂. The present study is the first research on the exposure of Veracruz population concerning contaminated cheeses with AFM₁ and AFM₂.

CONTENIDO

CONTENIDO	xxiv
LISTA DE TABLAS	xxvii
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 ANTECEDENTES.....	2
2.1 Leche y quesos	2
2.1.1 Producción de leche en el Estado de Veracruz.....	3
2.1.2 Producción de queso de leche de ganado bovino.....	5
2.1.3 Producción de queso artesanal en el Estado de Veracruz.....	6
2.1.4 Etapas en la producción y procesamiento de queso.....	8
2.1.4.1 Queso Fresco	10
2.1.4.2 Quesos de pasta hilada tipo Oaxaca.....	11
2.1.5 Tipos de contaminación en leche	12
2.2 Contaminantes químicos: Plaguicidas organoclorados.....	12
2.2.1 Propiedades generales de los plaguicidas organoclorados.....	13
2.2.2 Clasificación de los plaguicidas organoclorados	13
2.2.2.1 Hexaclorociclohexano (HCH)	14
2.2.2.2 Diclorodifeniltricloroetano (DDT).....	15
2.2.3 Mecanismos de acción de los plaguicidas organoclorados.....	17
2.2.4 Toxicocinética de los plaguicidas organoclorados.....	19
2.2.5 Efecto tóxico de los plaguicidas	21
2.2.6 Legislación de plaguicidas organoclorados en alimentos para humanos	22
2.2.7 Degradación de plaguicidas organoclorados	22
2.2.8 Presencia de plaguicidas organoclorados en leche en México.....	26
2.2.9 Presencia de plaguicidas organoclorados en quesos	27
2.3 Contaminantes de origen fúngico: Micotoxinas.....	28
2.3.1 Aflatoxinas	29
2.3.2 Hongos productores de aflatoxinas	30
2.3.3 Condiciones que favorecen la presencia y la producción de aflatoxina	31
2.3.3.1 Aflatoxina B ₁ y su biotransformación a aflatoxina M ₁	33
2.3.3.1.1 Aflatoxina B₂ y su biotransformación a Aflatoxina M₂.....	34
2.3.3.2 Toxicocinética de la aflatoxina M ₁	34
2.3.3.3 Efectos tóxicos de la aflatoxina M ₁	35
2.3.3.4 Legislación de la AFM ₁ en alimentos para humanos.....	36
2.3.3.5 Presencia de aflatoxinas en leche y quesos.....	37
2.4 Evaluación del consumo de queso.....	39
2.4.1 Encuestas de tipo colectiva: balance alimentario.....	39
2.4.2 Encuestas de tipo colectiva: canasta básica.....	40
2.4.3 Encuestas individuales.....	40
2.4.3.1 Cuestionario de frecuencia alimentaria	41
2.4.3.2 Calendario alimentario o diario de alimentos.....	43

2.4.3.3	Cuestionario de recordatorio de 24 horas.	44
2.5	Evaluación de riesgo.	44
2.5.1	Evaluación determinista.	45
2.5.2	Evaluación probabilística.	46
2.5.2.1	Ingesta diaria.	47
2.5.2.2	Ingesta Diaria Aceptable (IDA).	48
2.5.2.3	Ingesta Diaria Estimada (IDE).	48
2.6	Síntesis de Antecedentes.	49
3	HIPÓTESIS	50
4	OBJETIVOS	51
4.1	Objetivo General.....	51
4.2	Objetivos específicos.....	51
5	MATERIALES Y MÉTODOS	52
5.1	Metodología general.....	52
5.2	Muestreo de la población para la aplicación de las encuestas de consumo.	53
5.2.1	Cuestionario de frecuencia de compra.	53
5.2.2	Cuestionario diario de alimentos.	54
5.2.3	Análisis estadístico.	55
5.3	Muestreo de quesos.	55
5.4	Análisis de plaguicidas organoclorados en queso.....	57
5.4.1	Extracción de plaguicidas organoclorados.	57
5.4.2	Cuantificación de plaguicidas organoclorados en queso fresco y Oaxaca. ...	57
5.5	Análisis de aflatoxina M ₁ en queso Oaxaca.	59
5.5.1	Secado de Queso Oaxaca	59
5.5.2	Efecto del método de extracción sobre la concentración de AFM ₁	60
5.5.2.1	Método Oficial 980.21 de AOAC (2006).	60
5.5.2.2	Método empleando columnas Biopharm Rhône-Ltd.	61
5.5.2.3	Método de Cavaliere.....	61
5.5.2.4	Variables para la selección del método de extracción.....	62
5.5.2.4.1	Linealidad del método (curvas de calibración).....	62
5.5.2.4.2	Límites de detección y de cuantificación.....	62
5.5.2.4.3	Porcentaje de recuperación.	63
5.5.3	Preparación del estándar de AFM ₁	63
5.5.4	Análisis estadístico de la concentración de AFM ₁ en queso Oaxaca con diferentes métodos.	64
5.6	Estimación probabilística del riesgo a la exposición de aflatoxina M ₁ en queso Oaxaca.	64
5.6.1	Función de la densidad de probabilidad (PDF) de la ingesta diaria estimada (EDI) y del peso de la población.	64
5.6.2	Función de densidad de probabilidad de contaminación por AFM ₁ y AFM ₂ ... 64	64
5.6.3	Generación de la PDF de la ingesta diaria estimada (IDE) de AFs por consumo de queso Oaxaca.....	65
5.6.4	Cálculo de exposición del riesgo por consumo de AFs en queso Oaxaca.....	66

5.6.5	Análisis estadístico de datos	66
5.6.5.1	Generación de las funciones de densidad de probabilidad	66
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	67
6.1	Características de los consumidores.....	67
6.1.1	Cuestionario de frecuencia de compra (CFC): Características y preferencias de consumo.....	67
6.1.2	Peso y patrones de consumo de la población de la Ciudad de Veracruz.	68
6.2	Plaguicidas organoclorados en queso fresco y Oaxaca.....	76
6.3	Aflatoxina M ₁ en queso Oaxaca.	77
6.3.1	Efecto del método de extracción sobre la concentración de aflatoxinas.....	77
6.3.1.1	Linealidad de las curvas de calibración de los estándares de AFM ₁ y AFM ₂	77
6.3.1.2	Límites de detección y de cuantificación.	78
6.3.1.3	Porcentaje de recuperación de los 3 métodos de extracción.	78
6.3.2	Contenido de AFM ₁ en queso Oaxaca.	79
6.3.2.1	Análisis de aflatoxina M ₁ en queso Oaxaca colectado en 2015.	79
6.3.2.2	Análisis de AFM ₁ y AFM ₂ en queso Oaxaca muestreado en 2016.....	80
6.4	Evaluación probabilística de riesgo.	82
6.4.1	Función de densidad de probabilidad del peso de los habitantes de la ciudad de Veracruz.	82
6.4.2	Función de densidad de probabilidad de la ingesta de queso Oaxaca.	84
6.4.3	PDF del contenido de aflatoxina M ₁ en queso Oaxaca.	84
6.4.4	Ingesta Diaria Estimada (IDE)	85
6.4.5	Evaluación de riesgo probabilístico	88
7	CONCLUSIONES	90
8	BIBLIOGRAFÍA.....	91
ANEXOS.....	112
ANEXO 1.	CUESTIONARIO DE FRECUENCIA DE COMPRA DE QUESO	112
ANEXO 2.	CUESTIONARIO DIARIO DE CONSUMO DE QUESO OAXACA	114
ANEXO 3.	CUESTIONARIO DIARIO DE CONSUMO DE QUESO FRESCO	115
ANEXO 4:	CURVAS DE CALIBRACIÓN	116

LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1 Composición nutrimental de la leche de vaca.....	2
Tabla 2.2 Clasificación de los plaguicidas organoclorados por su toxicidad.	14
Tabla 2.3 Concentración de plaguicidas organoclorados en leche fresca y pasteurizada.	25
Tabla 2.4 Micotoxinas en lácteos, especies de hongos productores y alimentos contaminados.....	31
Tabla 2.5 Nivel máximo aceptable ($\mu\text{g kg}^{-1}$) de AFM ₁ en leche y queso en varios países.	36
Tabla 6.1 Preferencia de consumo y características de los consumidores de la ciudad de Veracruz (n = 98).	68
Tabla 6.2 Parámetros de la distribución de probabilidad del peso (kg) de la población consumidora de queso mayor de 14 años en la ciudad de Veracruz.	69
Tabla 6.3 Comparación de los parámetros de las distribuciones de probabilidad de la compra y consumo de cada tipo de queso por semana y por familia en la ciudad de Veracruz.....	69
Tabla 6.4 Comparación de los parámetros de las distribuciones de probabilidad de la cantidad de cada tipo de queso consumido por familia, por día, en la ciudad de Veracruz.....	70
Tabla 6.5 Comparación de los parámetros de las distribuciones de probabilidad de la cantidad de cada tipo de queso consumido diariamente por niños y adolescentes, en la ciudad de Veracruz.	70
Tabla 6.6 Comparación de los parámetros de las distribuciones de probabilidad del consumo diario de queso fresco y Oaxaca por género e intervalo de edad, en la ciudad de Veracruz.	71
Tabla 6.7 Comparación de los parámetros de las distribuciones de probabilidad de la cantidad de cada tipo de queso consumido diariamente por la población mayor de 14 años en la ciudad de Veracruz.	72
Tabla 6.8 Comparación de los parámetros de las distribuciones de probabilidad de la cantidad de cada tipo de queso consumido diariamente por género, en la ciudad de Veracruz.....	73
Tabla 6.9 Comparación de los parámetros de las distribuciones de probabilidad de la cantidad de cada tipo de queso consumido diariamente por clase social, en la ciudad de Veracruz.....	74
Tabla 6.10 Comparación de los parámetros de las distribuciones de probabilidad de la cantidad de cada tipo de queso consumido diariamente en cada comida, en la ciudad de Veracruz.....	75
Tabla 6.11 Comparación de consumo de queso en el mundo.....	75
Tabla 6.12 Concentración de HCH y DDT en muestras de quesos colectados en época de secas y de época de lluvias en la ciudad de Veracruz.	77
Tabla 6.13 Límites de detección para AFM ₁ y AFM ₂	78
Tabla 6.14 Porcentaje de recuperación de los métodos de extracción de AFM ₁ en queso Oaxaca.....	78

Tabla 6.15 Contenido ($\mu\text{g kg m.s.}^{-1}$) de AFM ₁ en queso Oaxaca muestreado en época de secas en 2015.....	79
Tabla 6.16 Contenido ($\mu\text{g kg m.s.}^{-1}$) de AFM ₁ y AFM ₂ en queso Oaxaca muestreado en 2016.	81
Tabla 6.17 Parámetros de la distribución de probabilidad de la concentración de AFM ₁ y AFM ₂ en queso Oaxaca muestreado en la ciudad de Veracruz.	85
Tabla 6.18 Parámetros de la función de densidad de probabilidad de la EDI de AFM ₁ para hombres y mujeres mayores de 14 años, consumidores de queso Oaxaca en la Ciudad de Veracruz en 2015.	86
Tabla 6.19 Parámetros de la función de densidad de probabilidad de la EDI de AFM ₁ para hombres y mujeres mayores de 14 años, consumidores de queso Oaxaca en la Ciudad de Veracruz en 2016.	87
Tabla 6.20 Evaluación de la exposición en niños, adolescentes, adultos y adultos mayores, consumidores de queso Oaxaca contaminado con AFM ₁ y AFM ₂	87
Tabla 6.21 Evaluación de riesgo, utilizando de diferentes valores TDI, para la ingesta de AFM ₁ en niños, adolescentes, adultos y adultos mayores, por consumo de queso Oaxaca.....	88
Tabla 6.22 Evaluación de riesgo utilizando diferentes valores de TDI, para la ingesta de AFM ₂ en niños, adolescentes, adultos y adultos mayores, por consumo de queso Oaxaca.....	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Estructura de la cadena de bovinos de doble propósito leche (FUNPROVER, 2010).....	4
Figura 2.2 Estructura química del plaguicida hexaclorociclohexano (HCH).	15
Figura 2.3 Estructura química del diclorodifeniltricloroetano (DDT), del diclorodifenildicloroetano (DDE) y del tetraclorodifeniletano (DDD)	16
Figura 2.4 Reabsorción, distribución y eliminación de plaguicidas organoclorados (Holler, 1996; Arias Verdes <i>et al.</i> , 1990).	20
Figura 2.5 Estructura del lindano y de sus derivados 2,4,5-triclorofenol y 2,3,5-triclorofenol.	24
Figura 2.6 Reacción de degradación de lindano por hongos de pudrición blanca (Singh <i>et al.</i> , 1999).	24
Figura 2.7 Estructura química de las aflatoxinas (Juan <i>et al.</i> , 2007).	29
Figura 5.1 Metodología para evaluar el riesgo a la salud del consumidor de queso fresco y Oaxaca contaminados con plaguicidas organoclorados y aflatoxinas, en la ciudad de Veracruz.....	52
Figura 5.2 Puntos de muestreo de queso tipo Oaxaca en la ciudad de Veracruz en 2015 y 2016.	56
Figura 5.3 Origen del queso Oaxaca consumido en la ciudad de Veracruz en 2016.	56
Figura 6.1 Contenido de AFM ₁ (A) y AFM ₂ (B) en muestras de queso Oaxaca colectadas en la ciudad de Veracruz en 2016.	82
Figura 6.2 Función de densidad de probabilidad del peso de la población femenina de la ciudad de Veracruz.	83
Figura 6.3 Función de densidad de probabilidad del peso de la población masculina de la ciudad de Veracruz.	83
Figura 6.4 Función de densidad de probabilidad del consumo de queso Oaxaca en la ciudad de Veracruz, ajustada a una distribución lognormal.	85

LISTA DE ABREVIATURAS

AFM ₁	Aflatoxina M ₁
AFM ₂	Aflatoxina M ₂
AFMt	Aflatoxinas M totales
AFs	Aflatoxinas
AOAC	Association of Official
ATSDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
ATF	Ácido trifluoroacético
a _w	Actividad de agua
CFC	Cuestionario de frecuencia de compra
CG-MS	Cromatografía de gases/masas
CIA	Columna de Inmunofinidad
CIA	Cuestionario de Ingesta Alimentaria
°D	Grados Dornic
Da	Dalton (unidad de masa atómica unificada)
DDD	Diclorodifenildicloroetano
DDE	Diclorodifenildicloroetileno
DL50	Dosis Letal, 50%
EDI	Ingesta diaria estimada
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay: análisis por inmunoadsorción con enzimas ligados
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
ENURBAL	Encuesta Urbana de Salud y Nutrición
EPA	Environmental Protection Agency: Agencia de protección al medio ambiente
ESD	Extracto seco desengrasado
FDA	Food and Drug Administration: Agencia de Drogas y Alimentos
FUNPROVER	Fundación Produce Veracruz
GABA	Ácido gamma amino butírico
HCH	Hexaclorociclohexano
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IC	Intervalo de confianza
IDA	Ingesta diaria aceptable
IMR	Límite máximo de residuos
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
NAFTA	North American Free Trade Agreement: Tratado de Libre Comercio de América del Norte
PBS	Buffer de fosfatos
Pc	Peso corporal
PDF	Función de densidad de probabilidad
POCs	Plaguicidas Organoclorados
PSA	Amina primaria secundaria
P95	Percentil 95
SAGARPA	Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación.
SIAP	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
TDI	Ingesta diaria tolerable

1 INTRODUCCIÓN

La industria lechera es la tercera de la industria alimentaria más importante del estado de Veracruz. En ella se transforma el 21 % del queso (FUNPROVER, 2010) de las 11,300 ton de leche ordeñada en Veracruz cada año (SIAP, 2015) mientras que el 53 % es utilizada para la elaboración de queso artesanal (FUNPROVER, 2010). Los principales quesos producidos de forma artesanal son el queso fresco y el queso Oaxaca. El proceso de elaboración del queso fresco varía según en el lugar dónde se elabora (Moore *et al.*, 1983), pero en general, le leche es coagulada por la adición de cuajo. La cuajada obtenida es escurrida, salada y moldeada. En el caso de la elaboración del queso Oaxaca, la cuajada es sumergida en agua caliente (65 °C – 70 °C) hasta la formación de cordones, los cuales son enrollados sobre sí mismos y están listos para su venta (De Oca-Flores *et al.*, 2009; Hernández-Raya *et al.*, 2005).

A pesar del alto consumo de estos quesos, la calidad de la leche utilizada para su elaboración no es vigilada por las autoridades, aún cuando se ha publicado la presencia de pesticidas organoclorados (Waliszewski *et al.*, 1997) y de aflatoxina M1 (Carvajal *et al.*, 2003) en la leche mexicana. Debido a la naturaleza lipofílica de los pesticidas organoclorados y de la aflatoxina M₁, es normal que tiendan a concentrarse en la grasa de la leche. Además, el procedimiento de elaboración de los quesos no muestra la posibilidad de que estos compuestos puedan ser reducidos o eliminados. Por otro lado, no se han encontrado, en la literatura científica, publicaciones sobre la incidencia o el contenido de pesticidas organoclorados en estos quesos y tampoco publicaciones sobre estudios de consumo de estos quesos en la ciudad de Veracruz. Teniendo en cuenta la falta de información sobre estos temas, no es posible realizar una estimación del riesgo a la salud del consumidor de estos quesos en la ciudad de Veracruz, de donde se desprende la importancia de esta tesis

2 ANTECEDENTES

2.1 Leche y quesos

La leche es la secreción mamaria normal de animales lecheros obtenida mediante uno o más ordeñas sin ningún tipo de adición o extracción, destinada al consumo en forma de leche líquida o a su posterior procesamiento (Codex Alimentarius, 2007).

Es común reducir la leche a sus cuatro componentes más importantes: lactosa, grasa, proteínas y sales. En la Tabla 2.1 se muestra la composición típica de la leche. Algunas propiedades físicas de la leche dependen del total de los componentes: densidad, tensión superficial y calor específico; otras dependen de las sustancias disueltas: índice de refracción y punto de congelación; hay otras que sólo dependen de los iones: pH (reacción iónica) y conductibilidad, o de las sustancias reductoras: potencial redox. La densidad de la leche es variable: los valores medios se encuentran entre 1.030 y 1.033 a 15 °C. La densidad de las leches desnatadas se eleva por encima de 1.035. El punto de congelación de la leche varía muy poco: es de -0.55 °C para la leche de vaca. Como consecuencia de la presencia de caseína y de los aniones fosfóricos y cítrico, principalmente, la leche tiene una reacción débilmente ácida, con un pH comprendido entre 6.6 y 6.8. Del pH dependen, la estabilidad de la caseína. La acidez real o titulable de la leche se mide en grados Dornic (°D), que expresa el contenido en ácido láctico (Alaís, 1998).

Tabla 2.1 Composición nutrimental de la leche de vaca.

Nutrientes	Composición (%)
Agua	86.6
Grasa	4.1
Proteína	3.6
Lactosa	5.0
Cenizas	0.7

Bruner, 1981.

2.1.1 Producción de leche en el Estado de Veracruz

La población ganadera de bovinos (carne y leche) en el Estado de Veracruz del 2009 al 2010 tuvo un incremento de 3,841,488 (60,289 bovinos para leche) a 3,926,683 (60,534 bovinos para leche) cabezas de ganado (SAGARPA, 2012). De la producción nacional de leche entera fresca de vaca, el estado de Veracruz en el 2012, ocupó el sexto lugar con una producción de 715.2 millones de litros. La Industria de los lácteos es la tercera más importante dentro de la rama de los alimentos en México, existiendo alrededor de 13,000 establecimientos que elaboran queso y su producción nacional se estima en 11,150 toneladas anuales (SIAP, 2014).

En el procesamiento de la leche existen dos tipos principales: 1) el artesanal que procesa cerca del 51% de la leche y, 2) el industrial con el 21% de la leche. La industria de tipo artesanal procesa cerca de 827,120 litros y la destina principalmente para elaborar quesos y en algunos casos a producir derivados lácteos como yogurt, crema, paletas, entre otros. La finalidad de la agroindustria artesanal es conservar los sólidos de la leche en forma de un producto menos perecedero, dar valor agregado a la leche y generar empleos, (FUNPROVER, 2010). Se estima que el 79 % de la producción de leche generada en los trópicos se acopia y distribuye a través de agentes, denominados comúnmente como “coyotes” o “lecheros” mismos que la comercializan con la industria de procesamiento artesanal del queso (51 %) o para el consumo como leche bronca (28 %) (Figura 2.1).

La comercialización de la leche en el estado de Veracruz varía según la zona: norte, centro y sur (FUNPROVER, 2010). La distribución y comercialización se inicia desde el acopio de leche bronca obtenida por el productor en su unidad de producción; incluye el proceso de abastecimiento de leche como materia prima hacia la industria y culmina con la distribución en los centros de consumo de los productos elaborados por ésta. En este proceso intervienen una importante gama de actores, incluido el productor, que en el caso de la leche del sistema de doble propósito, en algunas ocasiones participa directamente llevando su producción de

leche hasta el consumidor; aunque tal práctica no es representativa de este sistema de producción ya que se caracteriza por funcionar mediante una amplia red de acopiadores locales y regionales que recolectan la leche directamente en el sitio de ordeña o en la casa del productor para después trasladarla a los centros de procesamiento (industria artesanal de quesos, principalmente) o a los centros urbanos para consumo directo como leche bronca, utilizando a su vez una red aún más amplia de distribuidores o “boteros” que hacen llegar la leche a los consumidores directamente en su domicilio.

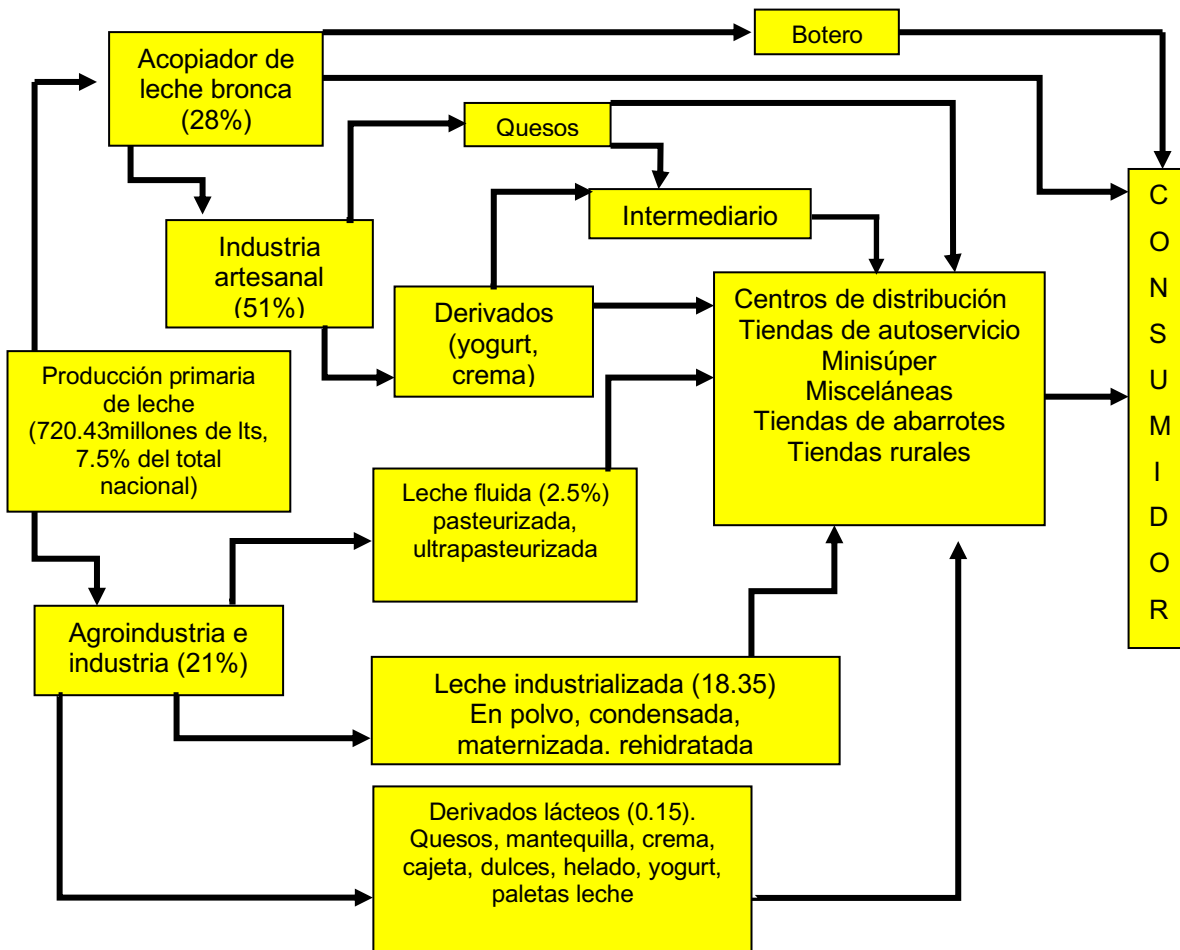


Figura 2.1. Estructura de la cadena de bovinos de doble propósito leche (FUNPROVER, 2010).

En la zona norte, el 79 % de la leche se le vende al distribuidor o “botero”, el 15 % a las industrias lácteas (Nestlé, Liconsa, Mexylac y Lala) que están establecidas en la región norteña, un 3 % al consumidor y el otro 3 % hacen queso. En la zona centro, el 59 % vende al quesero, el 20 % al distribuidor o “botero”, 12 % hacen queso, el 7 % a las industrias lácteas y cafes (Nestlé, Liconsa y Parroquia) que están en la región central y un 2 % al consumidor. Mientras que en la zona sur, el 73 % vende al quesero, 14 % a las industrias lácteas (Nestlé), 5 % hace queso, 4 % al botero y 4 % vende directamente al consumidor. Como puede observarse, en el estado de Veracruz un porcentaje elevado de leche es destinada para la elaboración de queso (FUNPROVER, 2010).

2.1.2 Producción de queso de leche de ganado bovino

La Norma Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-1994, establece al queso como el producto de la cuajada de leche pasteurizada de vaca o de otras especies animales, con o sin adición de crema, obtenida por la coagulación de la caseína con cuajo, gérmenes lácticos, enzimas apropiadas, ácidos orgánicos comestibles y con o sin tratamiento ulterior por calentamiento, drenada, prensada o no, con o sin adición de fermentos de maduración, mohos especiales, sales fundentes e ingredientes comestibles opcionales, dando lugar a las diferentes variedades de quesos pudiendo por su proceso ser: fresco, madurado o procesado.

El queso se produce en casi todas las regiones del mundo a partir de leche de diversas especies de mamíferos. Los suministros destinados al mercado mundial provienen principalmente de la Unión Europea (720,000 toneladas), seguida de Nueva Zelanda (290,000 toneladas), Australia, Estados Unidos y Arabia Saudita. En México, la elaboración semestral de queso en el 2013, alcanzó 12.6 millones de kilos y la de queso fresco a 7.0 millones, lo que representa una significativa participación sobre la producción nacional de 23.1% y 60.9%, respectivamente. La demanda principal de queso proviene de los países con ingresos relativamente altos, tales como el Japón, México, la República de Corea

y la Federación de Rusia, donde el mercado ha estado creciendo durante algunos años (FAO/WHO, 2013).

La cantidad de queso exportado ha tenido un incremento a nivel mundial de 2,307,000 toneladas en el 2009. La Unión Europea es la principal región exportadora de queso, leche entera en polvo y descremada. Los principales países exportadores de esta Unión son: Alemania, Francia, Holanda, Irlanda y Dinamarca. Nueva Zelanda tiene el primer lugar en exportaciones de mantequilla y el segundo en las exportaciones de queso y leche entera en polvo y Australia es el tercer exportador de queso, y leche entera en polvo y el segundo en leche descremada en polvo (FAO/WHO, 2011).

En México existen 1,390 establecimientos que elaboran queso, crema y mantequilla; sin embargo, la gran mayoría son pequeñas empresas de carácter artesanal. La mayor parte de la producción la aportan grandes empresas como Nestlé, Grupo Chilchota, Evamex (Latinlac, marca Los Volcanes), Lala, Alpura, entre otras empresas. México se ubica en el noveno lugar mundial en producción de quesos con alrededor de 268 mil toneladas. Las principales zonas productoras de queso incluyen Coahuila, Durango, Chihuahua, Oaxaca, Querétaro, Aguascalientes, Jalisco, Guanajuato, San Luis Potosí, Michoacán, Puebla, Tlaxcala, Toluca y Chiapas. De acuerdo a las estadísticas de la SAGARPA, para la producción de quesos en México se destinan uno de cada cuatro litros de la leche de vaca producida, producción que alcanza un volumen estimado de 10,743,000 de litros de leche anualmente (SAGARPA, 2012).

2.1.3 Producción de queso artesanal en el Estado de Veracruz

Como la industria láctea del estado de Veracruz no tiene la capacidad para almacenar y procesar toda la leche producida, la quesería artesanal juega un papel importante ya que es la que recibe el mayor volumen de leche para producir principalmente, quesos frescos (FUNPROVER, 2010).

En el Estado no se conoce el dato exacto de cuantos queseros existen, ni el volumen que procesan en conjunto, debido a que existen queserías que procesan volúmenes de 50 litros diarios hasta las que procesan 10,000 litros diarios. El principal problema con el que se enfrenta, es el control sanitario, ya que la mayoría de estas no pasteurizan la leche y no cuentan con las medidas sanitarias para el procesamiento de los quesos, por lo que es latente algún tipo de contagio de alguna enfermedad (zoonosis). Los principales tipos de queso que se producen en el estado son el queso fresco o llamado rancho, Oaxaca, panela y Manchego (FUNPROVER, 2010).

En la parte de la comercialización los queseros han diseñado sus propios canales de comercialización, siendo el regional o el local los principales canales, en las diferentes regiones del estado. En el sur del estado existen queseros que comercializan sus productos a otros estados como son Puebla, Morelos y Guerrero, ellos elaboran principalmente queso fresco el cual es vendido en rodajas de aproximadamente 750 a 850 g para su venta por pieza.

En la región norte existe el fenómeno de cerco sanitario ya que para poder comercializar sus productos a municipios del norte de Veracruz necesitan contar con una certificación sanitaria y muchos de los queseros no cuentan con ella, por lo que para la mayoría, el mercado principal es el local y otros como la zona Metropolitana del Valle de México. Estos productores de queso no cuentan con la infraestructura necesaria para la transportación de sus productos, por lo que fletan autobuses para poder llevar sus productos y ser vendidos principalmente en tianguis de la ciudad de México.

La SAGARPA (Secretaría de Desarrollo Agropecuario, Rural, Pesca y Alimentación) reportó que en el año 2012, la producción de leche en el Estado de Veracruz fue de 2,433,000 litros de leche de los cuales el 51 % de la leche se destinó a la elaboración de queso artesanal con un estimado de producción total de 124,083 kg. Del total de litros producidos en el Estado de Veracruz el 85 % de la leche es caliente, es decir, no se industrializa y, por lo tanto, el 51 % de ésta se

vuelve queso artesanal principalmente. Sólo el 15 % se enfría y la compran Liconsa y Nestlé.

2.1.4 Etapas en la producción y procesamiento de queso.

La leche contiene grasa, proteínas (principalmente caseína, menos β -lactoglobulina y aún menos α -lactoalbúmina), lactosa, minerales y agua. Cuando se añade ácido y/o renina a la leche, la caseína coagula y retiene gran parte de la grasa, de lactosa, agua y minerales, formándose así la cuajada. El líquido restante es el suero y contiene disuelto lactosa, proteínas, minerales y otros componentes menores. De esta forma, se obtiene una cuajada con la humedad y textura deseada para su procesado posterior. La cuajada desuerada retiene aproximadamente la mitad, en peso, del conjunto de los componentes de la leche que forman el extracto seco total; para cada uno de ellos las proporciones son aproximadamente, las siguientes: materia grasa 92%, materias nitrogenadas totales 76%, caseínas 94%, lactosa 5%, cenizas totales 20%, extracto seco total (ES) 50%, Extracto seco desengrasado (ESD) 33%. Se trata de valores cuyas proporciones dependen del modo de fabricación. La caseína y la materia grasa son retenidas por la cuajada casi completamente; los otros componentes lo son en cantidad proporcional al contenido en agua de la cuajada, es decir del lactosuero que no se ha expulsado en el curso del desuerado (Alaís, 1998).

La cuajada se puede elaborar a partir de leche cruda o pasteurizada. Cuando se parte de leche cruda, la FDA exige que el queso tenga un período de maduración mayor de 60 días, como medida de protección frente a los microorganismos productores de enfermedades que podrían estar en la leche (Potter y Hotchkiss, 1999).

La fabricación de un queso comprende tres fases esenciales (Lucey *et al.*, 2003):

- a) Cuajado o coagulación de la leche. La formación del gel de caseína.

- b) Desuerado de la cuajada. La deshidratación parcial de este gel por sinéresis, es decir, por la contracción de las micelas que lo forman.
- c) Afinado o maduración de la cuajada. Es la maduración enzimática del gel deshidratado, del que es responsable, el primer lugar, la proliferación de determinados microorganismos.

En el caso del queso fresco, la fabricación termina con el desuerado.

Coagulación de la leche. En la elaboración de quesos involucra la coagulación de micelas de caseína por la vía de tres posibles métodos: proteólisis limitada (usando renina u otros coagulantes), acidificando (con cultivos iniciadores o adición de ácidos) y calentando; o la combinación de estos tres métodos (Lucey *et al.*, 2003). Las micelas de caseína se aglomeran para formar un gel compacto aprisionado el líquido de dispersión que constituye el suero. La cuajada se obtiene por acción simultánea del cuajo y del ácido láctico proveniente de la transformación de la lactosa por las bacterias lácticas. En una cuajada enzimática domina ampliamente la acción del cuajo y se disminuye al máximo la acidificación láctica. Por el contrario en la cuajada ácida, el papel del cuajo es limitado y el agente principal de la floculación es la acidificación (Dunand, 1999)

Coagulación láctica o ácida. Se lleva a cabo acidificando la leche por vía biológica, manteniendo la leche en reposo en el seno, siendo el único método que permite obtener un gel homogéneo. Al reducirse el pH de la leche se provoca la alteración de las micelas de caseína modificando su dispersabilidad. La acidificación va acompañada de una desmineralización de las micelas. Cuando el pH de la leche llega a ser 5.2 a 20°C, las micelas se desestabilizan suficientemente para aglomerarse y formar un gel láctico. Dos factores regulan el gel ácido: la temperatura y la forma de acidificación. A la temperatura de 5 °C y valor de pH de 4.6, la leche se espesa (Lucey *et al.*, 2003).

Coagulación enzimática. Es el sistema de coagulación más ampliamente empleado en quesería. El mecanismo de acción de la enzima es como sigue: la enzima provoca una proteólisis limitada de la k-caseína con lo cual pierde sus propiedades estabilizantes en presencia de calcio respecto a las caseínas α_{s1} y β .

Las micelas de caseína, cuya estructura se ha modificado, se agregan en flóculos y después en fibras que finalmente constituyen una red tridimensional cuya estructura se elabora progresivamente. La red tiene en su interior lactosuero y los glóbulos grasos de manera semejante a un líquido que impregna una esponja. La rigidez del gel está asegurada principalmente por el fosfato cálcico coloidal que constituye una verdadera armadura. La caseína se encuentra en forma del complejo fosfoparacaseinato de calcio, es decir, en una forma muy mineralizada (Veisseyre, 1988).

Coagulación mixta. Es el resultado de la acción conjunta del cuajo y la acidificación láctica. Es la base de la fabricación de numerosos quesos de pastas suaves y blandas. En la práctica industrial, la obtención de un gel mixto puede llevarse a cabo según dos técnicas: la adición de cuajo a una leche ácida o la acidificación de un gel enzimático (Gobin, 1999).

Desuerado. El gel, cualquiera que sea su modo de obtención, constituye un estado físico inestable. Según las condiciones en las que se encuentra, el líquido de dispersión (lactosuero) que lo impregna se separa más o menos rápidamente y la fase sólida restante constituye la cuajada. Este fenómeno se denomina desuerado (Silva, 2006). Cuando se dejan en reposo, los geles evolucionan según su modo de formación. Dejan escapar espontáneamente el lactosuero como consecuencia de la contracción de la red inicial. La disminución del grado de hidratación de las micelas y el estrechamiento de las mallas del gel, se producen simultáneamente pero la contribución de cada uno de los fenómenos varía con el tipo de coágulo (López, 2004).

2.1.4.1 Queso Fresco

El queso fresco (ranchero), es considerado el queso hispano más popular elaborado en Estados Unidos y en México. Es un queso de pasta blanda, producido con leche de vaca pasteurizada, acidificada y de coagulación enzimática. Prácticamente se fabrica en todo el país, tiene una vida de anaquel

máxima de 10 días y su tecnología básica es la buena calidad de la leche, porque de ella dependen el sabor, el aroma y su textura y en general sus características alimenticias. Este queso contiene cerca de 46-57 % de humedad, 18-29 % de grasa, 17-21 % de proteína, entre 1-3 % de sal y un pH mayor o igual a 6.1 (Hwang y Gunasekaran, 2001).

En general la técnica de elaboración del queso fresco implica pasteurización de la leche, coagulación enzimática, corte de la cuajada para obtener grano pequeño, desuerado total por comprensión, refrigeración de la pasta, molino fino, se moldea en aros de diferentes tamaños y grosores, y finalmente se mantiene el queso en refrigeración, previo a su empaclado.

2.1.4.2 Quesos de pasta hilada tipo Oaxaca.

El queso Oaxaca es un queso típico de pasta hilada, contiene 40-46% de humedad, 23 % de grasa y 24 % de proteína y tiene un pH de 5.0-5.5, también elaborado a partir de leche entera. En general la técnica de elaboración del queso Oaxaca implica, la adición de leche ácida a la leche fresca hasta alcanzar una acidez entre 28 y 35 °D (grados Dornic). Posteriormente se cuaja enzimáticamente. Una variante de esta fase es coagular la leche fresca (15-18 °D) y dejar reposar la leche hasta alcanzar la acidez que provoque la coagulación de la misma. La cuajada se corta manualmente, dejándola en reposo para que desuere y se acidifique hasta obtener una pasta con cierta elasticidad, la cual se funde con agua caliente. La temperatura aplicada dependerá de la humedad y la acidez de la pasta, es decir, a mayor humedad la temperatura aplicada será menor, en el caso de la acidez si ésta es menor, la temperatura requerida para fundir será mayor. Durante el fundido, la pasta se amasa constantemente y es así como se forma la “pasta hilada” con paredes lisas brillantes, características de este queso. Los parámetros más importantes para la obtención de una buena pasta son: un valor de pH de 5.2 aproximadamente, humedad de 40-46 % y para la temperatura de fundido entre 54-64 °C. La pasta entonces se va estirando

formando tiras de tamaño homogéneo, simultáneamente se agrega la sal. Posteriormente se deja enfriar y se enrolla y se empaca manteniéndolos bajo almacenamiento refrigerado entre 4 y 6 °C (Esquivel y Santos, 1996).

2.1.5 Tipos de contaminación en leche

La leche se contamina por productos biológicos, químicos y físicos. Dentro de los contaminantes biológicos están los microorganismos patógenos, las micotoxinas y dentro de los contaminantes químicos; los residuos de plaguicidas usados en la producción agrícola de forrajes y en el control de plagas que afectan los cultivos. Considerando los peligros químicos que se pueden presentar en la leche desde la ordeña hasta su proceso industrial, es posible encontrar trazas de plaguicidas (Aldrin, Dieldrin, DDT, HCH) y micotoxinas. Debido a la naturaleza lipofílica de estas sustancias, su presencia en la leche se encuentra en los glóbulos de grasa.

2.2 Contaminantes químicos: Plaguicidas organoclorados.

Plaguicida es cualquier sustancia que previene, destruye, atrae, repele o combate plagas, plantas y animales indeseados, durante la producción almacenamiento, transporte, distribución y elaboración de alimentos, o para combatir ectoparásitos de animales (FAO/WHO, 2011).

El gobierno de Estados Unidos reguló al uso del DDT en 1960, por sus pocos beneficios y su toxicidad ambiental, se clasifica como probable cancerígeno en el humano (EPA, 2013). En 1972, la Agencia de Protección el Medio Ambiente (EPA) prohibió el uso del DDT porque daña la vida silvestre y la salud humana, al afectar su reproducción, y en animales forma tumores hepáticos. El Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA), en Estocolmo (Suecia) en 2001, reunió a 90 países, que firmaron el Convenio sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes, que prohíbe la producción y uso de 12 tóxicos orgánicos como los plaguicidas organoclorados; lúndano (δ -HCH), DDT y el endosulfán. Sólo

se permite usar DDT contra el paludismo y la fiebre amarilla, pero está prohibido en el sector agrícola (EPA, 2013).

Los insecticidas derivados de hidrocarburos clorados son plaguicidas organoclorados (POCs), sintéticos, son eficaces, persistentes y se transfieren a niveles tróficos de la cadena alimentaria. Modificaron las prácticas agrícolas y crearon esperanza sobre el control de enfermedades endémicas transmitidas por vectores. Los POCs se han sustituido por plaguicidas menos tóxicos, pero como son baratos y de amplio espectro, se siguen usando en países en desarrollo. Los residuos de POCs se presentan en grasas de origen animal, carne de aves, pescado, huevos, y lácteos (Chung *et al.*, 2011).

El monitoreo de residuos de POCs en los alimentos es un análisis de rutina para el control de plaguicidas (Benbrook, 2002).

2.2.1 Propiedades generales de los plaguicidas organoclorados.

Los POCs son hidrocarburos clorados, algunos con O, S o ambos, tienen baja presión y alta estabilidad química, y son resistentes al ataque de microorganismos. Son poco solubles en agua y se disuelven en solventes orgánicos, se acumulan en las grasas del tejido celular subcutáneo, la leche y la sangre (Arias Verdes *et al.*, 1990). Los POCs se eliminan del 30 al 40 % en la leche y el DDT y su isómero DDE no se destruyen con calor (FAO/WHO, 2011).

2.2.2 Clasificación de los plaguicidas organoclorados

Los plaguicidas organoclorados se clasifican en 4 grupos (Mohammad, 2006; Ramírez y Lacasaña, 2001):

1. Aromáticos: DDT, Dicofol, Metoxicloro, Clorobencilato.
2. Cicloalcanos: Hexaclorociclohexano (HCH) y su isómero Lindano.

3. Ciclodienos: Aldrin, Dieldrin, Endrin, Heptacloro, Endosulfán y Clordano.
4. Terpenos: Canfeclor.

Su clasificación se basa en su peligrosidad y toxicidad aguda (OMS, 1990), que es su capacidad de producir un daño a la salud a través de una o múltiples exposiciones, en un período corto de tiempo (Tabla 2.2).

Tabla 2.2 Clasificación de los plaguicidas organoclorados por su toxicidad.

De mayor a menor toxicidad	Insecticidas organoclorados	De mayor a menor toxicidad	Insecticidas organoclorados
1	Andrín	9	Kepone
2	Endosulfan	10	Terpenos policlorados
3	Dieldrín	11	Clordano
4	Toxafen	12	Dicofol
5	Lindano	13	Clorobencilato
6	Hexaclorobenceno	14	Mirex
7	DDT	15	Metoxicloro
8	Heptacloro	-----	-----

2.2.2.1 Hexaclorociclohexano (HCH)

Los isómeros de HCH se producen por cloración fotoquímica del benceno, y forman al HCH técnico. El HCH técnico se compone principalmente de cinco isómeros de HCH: α -HCH (53-70%), β -HCH (3-14%), γ -HCH (11-18%), δ -HCH (6-10%) y ϵ -HCH (3-5%). La mezcla de isómeros se usó mucho como insecticida económico, el isómero gama es el único que exhibe propiedades insecticidas, se le refina a partir del HCH técnico y se llama lindano (Fig. 2.2). La toxicidad de los isómeros varía; el γ -HCH es el más tóxico, sigue α -, δ -, y β -HCH. El β -HCH tiene la exposición crónica, y es el más tóxico, seguido de α -, γ -, y δ -HCH. Con exposiciones crónicas, el aumento de la toxicidad de β -HCH se debe a su vida media biológica más larga y su acumulación en el cuerpo (ATSDR, 2005).

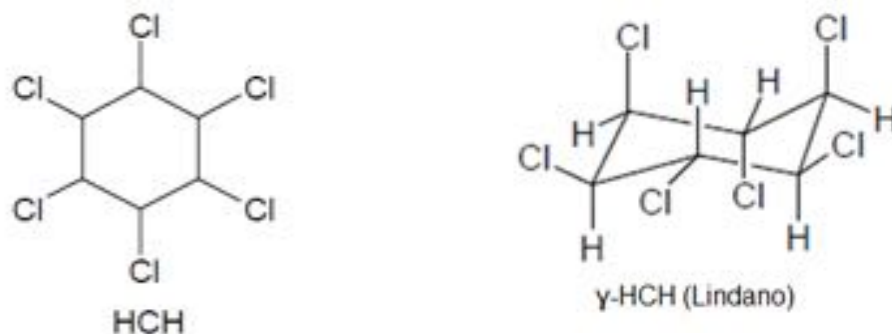


Figura 2.2 Estructura química del plaguicida hexaclorociclohexano (HCH).

El lindano puro (>99%) se concentra por tratamiento de mezclas de isómeros de HCH con metanol o ácido acético y cristalización. Aún así el producto contiene pequeñas cantidades de otros isómeros de HCH (ATSDR, 2002). El Lindano (γ -HCH) es moderadamente soluble en agua (10 mg/L) y más soluble en acetona, benceno, cloroformo y etanol. Su presión de vapor es baja (9.4×10^{-6} mmHg a 20 °C) (Arias Verdes *et al.*, 1990), su peso molecular de 290.83, con un punto de fusión de 112.5 °C, punto de ebullición de 323.4 °C y un factor de bioacumulación de 19 ± 9 en grasa de humano (Sang *et al.*, 1999). El límite máximo residual en leche es de 0.01 mg/kg. La OMS estableció una ingesta máxima admisible de 8 μ g/kg de peso corporal/día. La ingestión diaria admisible según la EPA es de 0.0035 mg/persona (ATSDR, 2008).

2.2.2.2 Diclorodifeniltricloroetano (DDT)

El 1,1,1-tricloro-2,2-bis (4-clorofenil) etano o Diclorodifeniltricloroetano (DDT) es un plaguicida sintético muy soluble en grasa y poco soluble en agua, de amplio espectro, acción prolongada y estable, aplicado en el control de plagas para todo tipo de cultivo. El DDT de calidad técnica se utiliza como insecticida y se compone de hasta 14 compuestos químicos, de los cuales el p, p'-DDT (65-85 %) es el ingrediente activo (Metcalf, 1995). El p,p'-DDT se metaboliza a DDE (diclorodifenildicloroetileno) y a DDD (diclorodifenildicloroetano) (Figura 2.3), que

son compuestos lipofílicos (sobre todo el DDE) y se acumulan en el tejido adiposo (Rendón, 1990; Elika, 2008). No es volátil; pero pasa al aire a partir del suelo, de manera continua, sobre todo en presencia de agua. En presencia de luz ultravioleta, el DDT pierde HCl y se transforma en DDE, compuesto que carece de acción insecticida (Arias Verdes *et al.*, 1990; Kelce *et al.*, 1995). El DDT mata a los insectos por contacto, afectando su sistema nervioso, su efecto tóxico y alto poder residual se conserva por años.

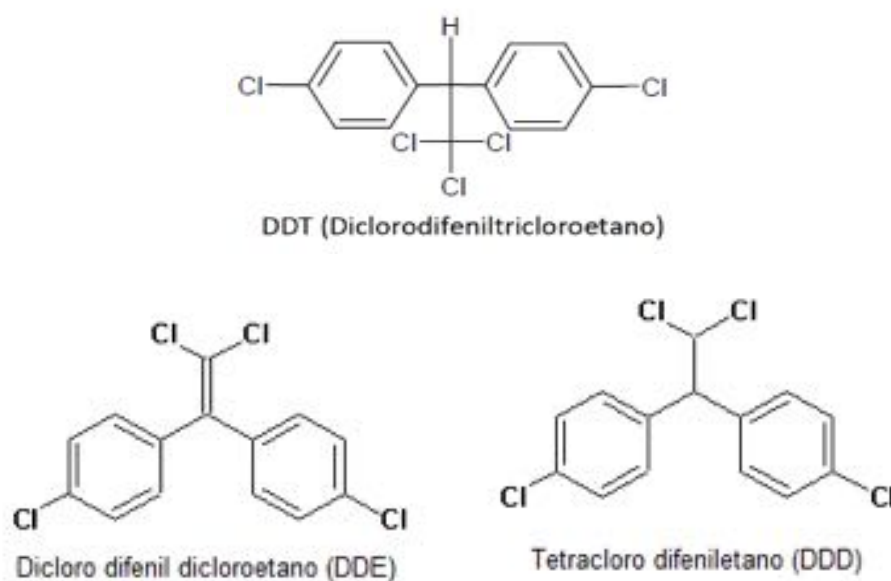


Figura 2.3 Estructura química del diclorodifeniltricloroetano (DDT), del diclorodifenildicloroetano (DDE) y del tetraclorodifeniletano (DDD)

El DDT se acumula en la cadena alimentaria debido a que casi no se metaboliza ni se excreta, esto es porque el DDT es lipofílico, muy estable y casi incapaz de ser metabolizados en el cuerpo animal. A veces los humanos pueden ser los consumidores finales.

La tasa de desaparición del DDT se detiene porque gran parte de la pérdida inicial del compuesto es debido a la volatilización, en lugar de la biodegradación

(Samuel y Pillai, 1990). El DDT migra hacia microporos de las partículas del suelo donde es secuestrado y no está disponible para los microorganismos del suelo (Alexander 1995, 1997). El arado coloca al DDT en la parte más profunda del suelo, posiblemente reduciendo la volatilización. La volatilización, el transporte aéreo y la redeposición resultaron ser las principales vías de contaminación del forraje consumido por las vacas.

La conclusión de varios estudios fue que el DDT se disipó mucho más rápidamente bajo condiciones tropicales que en condiciones templadas, (Racke *et al.*, 1997) debido en gran parte al aumento de la volatilidad en condiciones tropicales. Los principales mecanismos de disipación bajo condiciones tropicales eran volatilización, la degradación biológica y química, y en menor medida, la adsorción (Lichtenstein y Schulz 1959; Racke *et al.*, 1997; Stewart y Chisholm 1971). La vida media de DDT en los suelos de la zona templada de Estados Unidos era alrededor de 5.3 años (Racke *et al.*, 1997). El principal metabolito detectado en suelos tropicales era DDE.

2.2.3 Mecanismos de acción de los plaguicidas organoclorados

La principal acción tóxica de los organoclorados la ejercen sobre el sistema nervioso, interfiriendo con el flujo de iones a través de las membranas de las células nerviosas, aumentando de esta forma la irritabilidad de las neuronas, siendo además inductores enzimáticos (PLAGSALUD, 2008).

Los efectos crónicos de los plaguicidas organoclorados son muy sutiles y, usualmente, son producidos por la exposición prolongada a niveles bajos de concentración de estos plaguicidas. Los efectos quizá no aparezcan como toxicidad aguda, pero en cambio, podrían aparecer como dificultades reproductivas, desórdenes nerviosos, daños en algún órgano, carcinogenicidad, mutagenicidad y teratogenicidad, entre otros (Arias Verdes *et al.*, 1990). El mecanismo de la acción tóxica del DDT y demás compuestos del grupo no está

bien aclarado; se considera que el DDT interfiere en la transmisión del impulso nervioso en el axón de las células del sistema nervioso central (Arias Verdes *et al.*, 1990). El DDT al igual que otros plaguicidas organoclorados actúan como tóxico nervioso cuya actividad se debe a que interfiere con el intercambio de los iones, sodio y potasio a través de la membrana del axón, e impide que restaure la polarización después del paso del estímulo nervioso, dando como resultado una sucesión de impulsos repetitivos a lo largo de la fibra, después de uno simple; ello induce a la liberación anormal del neurotransmisor acetilcolina con la consiguiente despolarización de la membrana neural, conduciendo a la hiperexcitación de hiperconductancia de impulsos manifestada como hipersensibilidad, temores, convulsiones, taquicardia, acidosis metabólica, hipertermia y finalmente postración completa (Batten y Hutson, 1989). En condiciones normales, cuando un impulso pasa a través del axón, hay un movimiento rápido de iones sodio y potasio a través de la membrana del axón, en el que el potasio sale de la célula y el sodio entra; este movimiento despolariza la membrana por corto tiempo, pero vuelve a polarizarse al cesar el impulso y el flujo de cationes se invierte (Arias Verdes *et al.*, 1990).

Cuando el daño afecta a muchas células nerviosas, se produce una grave interrupción de las funciones del sistema nervioso. Se ha sugerido que el responsable de la alteración de la permeabilidad de la membrana del axón nervioso podría ser un complejo de transferencia de carga entre el DDT y algún constituyente de la fibra nerviosa. El DDT tiene afinidad por los lípidos de la membrana de la vaina del axón y provoca descargas repetidas en el nervio, que se manifiesta por temblores. La inestabilidad del axón nervioso se debe a la presencia del DDD, el cual altera la permeabilidad de la membrana para los iones de sodio y potasio, tal vez por la formación de un complejo transportador entre el DDT y los compuestos de la membrana. El DDD y el metoxicloro actúan del mismo modo sobre el axón nervioso (Arias Verdes *et al.*, 1990). Debido a que, en general, la DL50 de estos compuestos es alta (DDT: 113 mg/kg en rata via oral (de clase altamente peligroso) sus efectos tóxicos sobre los seres vivos ocurren principalmente a largo plazo, esto es, son crónicos; sin embargo, como ocurre con

cualquier otra sustancia química, también se llegan a presentar intoxicaciones agudas (Albert y Alpuches, 1990). El grupo de los cicloalcanos clorados como el HCH, también actúan aumentando la excitabilidad del sistema nervioso pero de otra manera: la célula nerviosa en cuya membrana se localiza un transportador de Cl que, al ser negativo e ingresar a la célula, es capaz de disminuir la polaridad positiva y recuperar el estado de reposo; este transportador de Cl es dependiente del ácido gamma amino butírico (GABA), el problema con estos compuestos es que se interponen en el sitio de acción de GABA (con dos subunidades una alfa y una beta) por lo que el canal de Cl permanece cerrado, lo que es otra vía para generar que la célula no alcance el nivel de reposo y, por lo tanto, esté en un nivel de sobreexcitación, presentando la manifestación clínica de intoxicación (Devine *et al.*, 2008).

2.2.4 Toxicocinética de los plaguicidas organoclorados.

Después de ingresar al organismo por vía dérmica u oral, o por la ingestión o inhalación, los plaguicidas como los organoclorados se reabsorben a través de la piel o de la mucosa intestinal. La sangre distribuye el compuesto o lo elimina a través de la piel o de la mucosa intestinal. La sangre distribuye el compuesto o lo elimina a través de la leche, por heces u orina, o lo biotransforma y los deposita en los tejidos. Este proceso se muestra en la Fig. 2.4 (Holler, 1986).

Una vez absorbidos, los plaguicidas organoclorados pasan a la sangre y son distribuidos por todo el organismo; se establece entonces un equilibrio de concentraciones entre los elementos grasos y proteicos constitutivos de la sangre y otros tejidos ricos en grasas, especialmente el tejido adiposo. También se pueden encontrar diferentes concentraciones en el hígado, riñones y otros órganos, dependiendo de la dosis absorbida. Los plaguicidas organoclorados son poco solubles en agua; por esto, cuando ocurre una exposición súbita a ellos, la sangre se sobresatura con los plaguicidas inalterados; el hígado metaboliza una parte de estos plaguicidas y la grasa secuestra parte de los compuestos inalterados y algunos de sus metabolitos (Arias Verdes *et al.*, 1990).

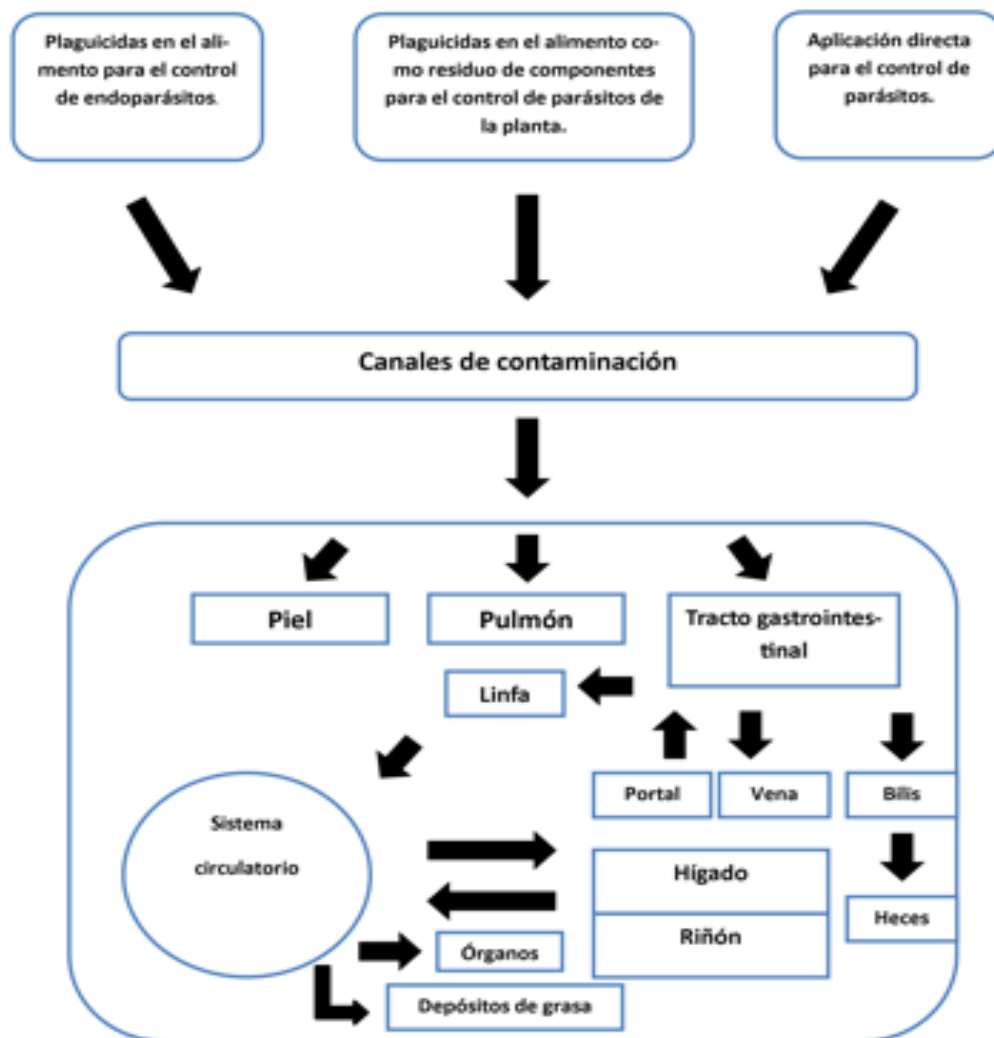


Figura 2.4 Reabsorción, distribución y eliminación de plaguicidas organoclorados (Holler, 1996; Arias Verdes *et al.*, 1990).

La absorción de grandes dosis se facilita cuando estos plaguicidas se han disuelto en grasa animal o vegetal. La penetración dérmica de los plaguicidas organoclorados varía ampliamente, desde el DDT que es poco absorbido por la

piel intacta, aún en solución aceitosa, hasta aquéllos como endrín, aldrín, dieldrín heptacloro, que penetra con mayor rapidez y proporción. En general, los efectos tóxicos de los plaguicidas organoclorados se observan con mayor rapidez después de su ingestión, que por exposición dérmica o inhalación (Arias Verdes *et al.*, 1990).

2.2.5 Efecto tóxico de los plaguicidas

Los plaguicidas han sido desarrollados para producir efectos tóxicos en las plagas y a pesar de que esos efectos pueden también llegar a producirse en organismos vivos “no blanco” de su acción, esta última posibilidad sólo tendrá lugar si la exposición de dichos organismos alcanza los niveles suficientes para que se produzca el efecto tóxico. La clasificación de las intoxicaciones es la que se basa en la duración de la exposición, distinguiéndose dos tipos: agudas y crónicas (Arias Verdes *et al.*, 1990).

- a) En la intoxicación aguda: el cuadro principal y más grave son las convulsiones, las cuales pueden determinar secuelas permanentes. Como elementos adicionales se pueden ver disminución en la hemoglobina, aumento en la urea, leucocitosis moderada y alteraciones en el electrocardiograma (Arias Verdes *et al.*, 1990).
- b) Intoxicación crónica: usualmente se produce por exposición prolongada (a largo plazo) a concentraciones bajas. La intoxicación crónica se relaciona con patologías cancerígenas, mutagénicas, teratogénicas o alteraciones de la reproducción, alteraciones del sistema inmunitario, endocrino, renal y hepático (Gento y Dominguez, 2002).

Por lo anterior, además de conocer las propiedades tóxicas de los plaguicidas, se requiere conocer o estimar en cada país las posibles exposiciones de seres humanos y de otros organismos, que pueden tener lugar en las localidades en las que se aplica o a las que llegarán al difundirse en el ambiente o a través de la cadena alimentaria.

2.2.6 Legislación de plaguicidas organoclorados en alimentos para humanos

Los residuos de plaguicidas afectan tanto a la salud pública como al comercio, ya que su presencia, además de constituir un riesgo para la salud de los consumidores, constituye también una barrera que limita la comercialización de productos en los mercados internacionales. De este modo, se han convertido en uno de los problemas ambientales y sanitarios. Como consecuencia, los organismos oficiales internacionales deben regular las concentraciones máximas admisibles de plaguicidas en los productos agroalimentarios. En este sentido, el *Codex Alimentarius* define también el límite máximo de residuos (LMR) como “*la concentración máxima de residuos de un plaguicida (expresada en mg/kg) para que se permita legalmente su uso en la superficie o en la parte interna de los productos alimenticios para consumo humano y de piensos*”. Para el HCH, el límite máximo residual en leche es de 0.01 mg/kg, en fresas de 3 mg/kg: se estableció para la mayoría de frutas y verduras el umbral de 0.5 mg/kg (ATSDR, 2005). El LMR establecido por la FAO/WHO de \sum HCH (α -HCH+ β HCH+ γ HCH) es de 0.1 mg kg⁻¹ y para la \sum DDT (pp'-DDT + pp'-DDE + pp'DDD + op'DDT) el nivel de tolerancia es de 0.05 mg kg⁻¹ (FAO/WHO 1997b).

2.2.7 Degradación de plaguicidas organoclorados

Cuando un plaguicida es liberado en el medio ambiente, los componentes bióticos y abióticos de éste, pueden inducir transformaciones en su estructura, que pueden modificar sus características físico-químicas y su acción biológica.

La cinética de degradación de plaguicidas se ve afectada por:

- 1.- Cantidad de plaguicida y accesibilidad del sistema que lo va a degradar. Por ejemplo, el plaguicida puede estar absorbido y no ser accesible a los microorganismos del suelo o por el contrario puede estar como emulsión en agua y ser muy fácilmente accesible.

- 2.- Presencia de microorganismos o sistemas enzimáticos capaces de degradar los plaguicidas
- 3.- Nivel de actividad de los microorganismos, éste a su vez está afectado por condiciones ambientales tales como el pH, T, humedad, aireación, etc.

Los organoclorados son moléculas orgánicas con cloro en varios lugares de su estructura, el número y localización de estos cloros determinan la facilidad de degradación del compuesto. Cuanto más sustituido, más degradable.

Los microorganismos transforman al DDT en DDD, mientras que mamíferos e insectos lo hacen principalmente en DDE, en virtud de sus diferentes sistemas enzimáticos. Tanto el DDD como el DDE son compuestos muy estables y de larga vida en el medio y además son muy tóxicos (Arisoy 1998; Lichtenstein y Schulz 1959; Stewart y Chisholm 1971).

La facilidad de degradación de un plaguicida depende de su estructura molecular. En general los más resistentes son los organoclorados.

La degradación del lindano se puede llevar a cabo por diversos microorganismos facultativos, estrictos anaerobios y aerobios (Guillen-Bárrangan, 2008). La compleja estructura del lindano se puede romper en dos: 2,4,5-triclorofenol o el 2,3,5- triclorofenol. Estos compuestos causan problemas de olor y sabor al agua (Figura 2.5).

Se ha reportado la biodegradación de lindano (γ -HCH) y otros isómeros de HCH por cultivos de bacterias puras (*Clostridium rectum*, *Pandoraea spp.*), mezcla de una población microbiana mixta nativa, hongos de pudrición blanca y lodos de aguas residuales en condiciones aeróbicas y anaeróbicas (Singh *et al.*, 1999; Figura 2.6).

Algunos trabajos indican que el DDT ha alcanzado valores de biodegradación de 30 y 90 %, mientras que ha presentado grados de mineralización en 5.3 y 30 %, en cultivos líquidos y del 4 % en tratamientos sobre suelo contaminado (Zhao y Yi, 2010; Arisoy, 1998; Bumpus y Aust, 1987). El DDT

es deshalogenado reductivamente a 1,1-dicloro-2,2-bis(4-clorofenil) etano (DDD) o hidroxilado a 2,2,2-tricloro-1,1-bis (4-clorofenil) etanol (Dicofol) (Hammel, 1992). Estos metabolitos intermediarios se forman y después desaparecen lo cual indica que estos productos tienden a la mineralización (Field, 2004).

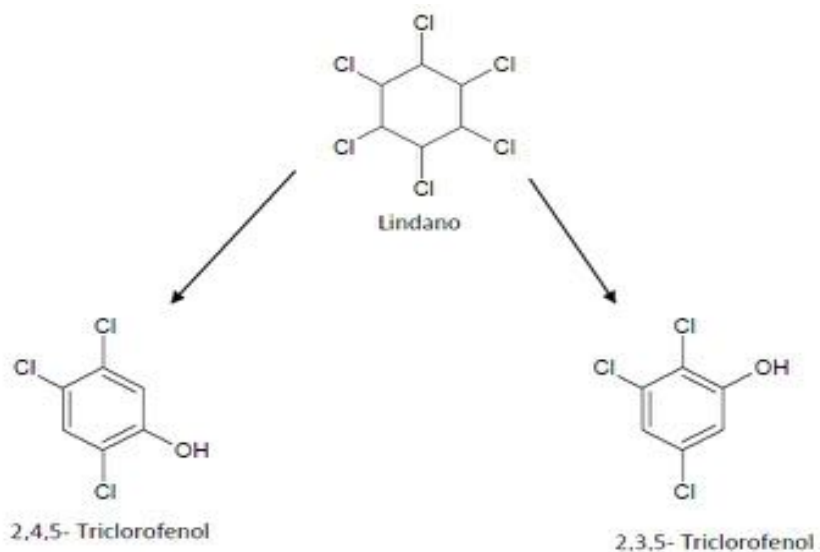


Figura 2.5 Estructura del lindano y de sus derivados 2,4,5-triclorofenol y 2,3,5-triclorofenol.

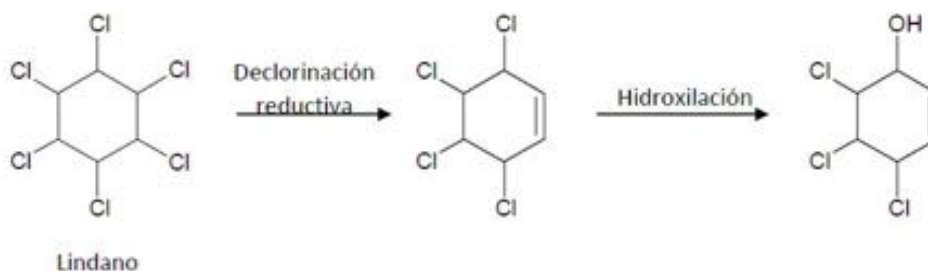


Figura 2.6 Reacción de degradación de lindano por hongos de pudrición blanca (Singh *et al.*, 1999).

La mayoría de los plaguicidas organoclorados son relativamente resistentes a las técnicas de procesamiento utilizadas para la leche y productos lácteos. Una

vez que los residuos quedan en la leche son estables y difíciles de eliminar (Liska, 1968).

Diversos estudios han señalado la presencia de POCs en muestras de leche fresca y pasteurizada. En los mercados de Kampala (Uganda) se detectaron cinco plaguicidas organoclorados: aldrín, dieldrín, endosulfán, lindano, DDT y sus metabolitos en las muestras de leche, donde la media del DDT de 0.052 mg/kg grasa de leche (Tabla 2.3) fue ligeramente superior al LMR de 0.050 mg/kg (grasa) establecidos por la Comisión del Codex Alimentarius FAO/WHO (2008). No obstante, la mayoría de los residuos detectados estuvieron por encima de los límites de residuales establecidos (Kampire *et al.*, 2011).

Tabla 2.3 Concentración de plaguicidas organoclorados en leche fresca y pasteurizada.

Plaguicida	Concentración media (mg kg de grasa ⁻¹) ± desviación estándar	
	Leche fresca (n=54)	Leche pasteurizada (n=47)
Lindano	0.026 ± 0.003	0.022 ± 0.001
p,p'- DDT	0.033 ± 0.007	0.025 ± 0.004
p,p'- DDE	0.009 ± 0.002	0.008 ± 0.003
o,p'- DDT	0.008 ± 0.001	0.007 ± 0.001
Σ DDT	0.052 ± 0.010	0.041 ± 0.005

Kampire, 2011.

Abou Donia *et al.* (2010) monitoreó residuos de plaguicidas en leche de vaca y búfala, en las cuales detectó HCB (Hexaclorociclobenceno), lindano, aldrin, heptacloro, endrin y DDT, por arriba de los LMR residuales de la FAO/WHO (2008). Alrededor del 50 y 43.30% de los residuos detectados fue lindano, con una media de 0.046 y 0.036 mg/kg base grasa, en leche de búfala y vaca respectivamente. La presencia de lindano en las muestras colectadas estaban por encima de los LMR de las organizaciones internacionales (0.01mg/kg grasa).

Maitre *et al.* (1994) analizaron 120 muestras de leche pasteurizadas en la ciudad de Santa Fé, Argentina, para determinar DDT total, encontrando un valor medio de 0.990 mg/kg, y detectándose en el 49 % de las muestras. A pesar de

que su presencia en alta concentración es esporádica, no se encontró por encima de los valores aceptables, de acuerdo al límite de tolerancia de la FAO/WHO (1992) de 1.25 mg/kg. En este estudio no se encontró una relación entre la máxima concentración de plaguicidas y la estación del año.

2.2.8 Presencia de plaguicidas organoclorados en leche en México

Pardío *et al.* (2003) realizaron un estudio para evaluar la magnitud de contaminación de la leche bovina en la región central de Veracruz. Entre los residuos de plaguicidas analizados, las muestras de leche de Tlalixcoyan mostraron un nivel medio de 0.128 mg kg⁻¹ de γ -HCH, fue significativamente mayor que los residuos en muestras de leche de Medellín (0.049 mg kg⁻¹), Paso San Juan (0.022 mg kg⁻¹) y trece veces más que los LMRs de 0.01 mg kg⁻¹ de la FAO/OMS (1997). El nivel medio de p,p'-DDE en muestras de leche de Medellín (0.039 mg kg⁻¹) fue significativamente mayor que en el Paso de San Juan (0.018 mg kg⁻¹) y Tlalixcoyan (0.024 mg kg⁻¹). El nivel medio de p,p'-DDT en la muestras de leche en Medellín (0.089 mg kg⁻¹) fue significativamente más alta que los niveles detectados en las otras dos áreas. El nivel más alto del Σ DDT detectados en muestras de Medellín (0.146 mg kg⁻¹) fue tres veces el nivel de tolerancia de la FAO/OMS (1997) de 0.05 mg kg⁻¹.

López (2005) evaluó los niveles de contaminación de DDT y sus metabolitos en leche fresca de Soledad y Jamapa en el estado de Veracruz, donde la concentración de los metabolitos p,p'-DDE, p,p'-DDD, o,p'- DDT y Σ -DDT de la leche procedente de Jamapa fue menor significativamente ($P < 0.05$). De acuerdo a los niveles de contaminación que presentaron las leches de Soledad y Jamapa, la leche de Soledad presentó los mayores niveles de contaminación, siendo los metabolitos p,p'-DDE, p,p'-DDT y o,p'-DDT los más elevados. Las sumatorias de DDT de ambos ranchos no rebasaron el LMR de 50 μ g/kg base lípidica establecido por la FAO/WHO (1997).

Prado *et al.* (2007) cuantificaron los niveles de plaguicidas organoclorados y sus metabolitos en 40 muestras de leche cruda de cabra en Querétaro, en todas las muestras se encontraron al menos uno de los POCs o sus metabolitos estudiados. Los POCs con mayor frecuencia fueron heptacloro con 95.4 % y α -HCH con 70.5% y los residuos de POCs con valores más altos fueron γ -HCH (37.75 ng/g), β -HCH (35.98 ng/g) y p,p'-DDD(31.77 ng/g). Se encontró que la sumatoria de ($\alpha,\beta,\gamma,\delta$)-HCH fue de 114.74 ng/g, y la sumatoria de DDT, DDD y DDE fue de 66.14 ng/g y la suma de ambos dió un total de 0.181 $\mu\text{g/g}$, por lo que los valores de POCs en las muestras de leche se encontraron por arriba de los límites permitidos para leche vacuna (0.15 $\mu\text{g/g}$), el parámetro de referencia es del ganado bovino porque en México no existe legislación oficial que establezca LMR de POCs en leche de cabra. Los valores encontrados muestran una contaminación basal por las corrientes de agua, el aire, el suelo los pastizales, la alimentación y el manejo de los insecticidas en las actividades agrícolas.

Gutiérrez *et al.* (2012) cuantificaron 36 muestras de leche de vaca en granjas orgánicas del estado de Chiapas. La concentración promedio para $\alpha+\beta$ HCH fue de 3.62 ng/g, γ -HCH de 0.34 ng/g, epóxido heptacloro de 0.67 ng/g, DDT y sus isómeros de 1.53 ng/g. En general los valores encontrados para la leche fresca fue más baja que los límites permisibles por la FAO/WHO/Codex Alimentarius 2007. A pesar de que la concentración de residuos de plaguicidas en leche de vaca de Chiapas se encuentra debajo de los LMRs, es imposible evitar las bajas concentraciones en los alimentos orgánicos debido a la aplicación de estos compuestos organoclorados en el pasado.

2.2.9 Presencia de plaguicidas organoclorados en quesos

Darko y Acquah (2008) determinaron las concentraciones de plaguicidas organoclorados como lindano, DDT y DDE en tres comunidades de Ghana (Tafo, Asawai y Aboabo). En la región de Asawai, la concentración de DDT y DDE fue de 42.17 $\mu\text{g/kg}$ y 31.50 $\mu\text{g/kg}$ respectivamente. La concentración promedio en la región de Tafo de DDT fue de 298.57 $\mu\text{g/kg}$ mientras que la concentración de DDE

fue de 140.14 µg/kg. La concentración más alta de DDT en todas las muestras fue de 149.07 µg/kg analizadas en queso de la región de Aboabo. Los niveles de DDT y sus metabolitos, DDE, en queso de las tres regiones monitoreadas (Aboabo, Tafo y Asawai) presentaron niveles más bajos que los recomendados por la FAO/WHO (2006) de 500 µg/kg. Aunque las concentraciones de estos plaguicidas se encontraron en niveles más bajos que los LMRs, podrían acumularse hasta niveles más altos en humanos debido a su consumo de queso.

2.3 Contaminantes de origen fúngico: Micotoxinas

El término micotoxinas es la combinación de la palabra griega *mykes*: hongo y la palabra latina *toxicum*: veneno. Se trata, en general, de moléculas relativamente pequeñas (PM < 700 Da) con estructura química y actividad biológica muy diversa, capaces de desencadenar diversas alteraciones y cuadros patológicos. Por lo general, la exposición es a través del consumo de alimentos contaminados, que causa enfermedades conocidas como micotoxicosis (Turner *et al.*, 2009).

Las principales micotoxinas son las aflatoxinas, la zearalenona, tricotecenos, fumonisinas, ocratoxina A, deoxinivalenol y patulina. Las AFs son metabolitos secundarios, tóxicos, producidos por algunas especies fúngicas, que pueden contaminar los cultivos en el campo o en el almacén y son una amenaza potencial para la salud animal y humana (Prandini *et al.*, 2009). Se considera que un 25% de las cosechas mundiales de cereales están contaminadas por micotoxinas (Soriano, 2007). Los mohos toxicogénicos se desarrollan en gran variedad de sustratos, y contaminan los alimentos cuando están en cultivo, procesados, transformados o almacenados en condiciones adecuadas que favorezcan su desarrollo.

2.3.1 Aflatoxinas

Las aflatoxinas (AFs) son compuestos sin olor, sin sabor y sin color. Químicamente, son estables en los alimentos y resistentes a la degradación bajo procedimientos de cocción normales. Es difícil eliminarlas una vez que se producen.

Las AFs son un grupo de metabolitos secundarios tóxicos pertenecientes a la familia de las difurano-cumarinas, se clasifican en dos grandes grupos de acuerdo a su estructura química; la serie 1 difuro-cumaro-ciclo-pentanonas que comprende a la aflatoxina B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂ y a la AFB_{2a}), la M₁ (AFM₁), M₂ (AFM₂ y AFM_{2a}) y aflatoxicol (AFL) y la serie 2 difuro-cumaro-lactonas con las aflatoxinas G₁ (AFG₁), G₂ (AFG₂ y AFG_{2a}), de las cuales las más frecuentes en los alimentos son las AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, AFM₁ y AFM₂ (Figura 2.7).

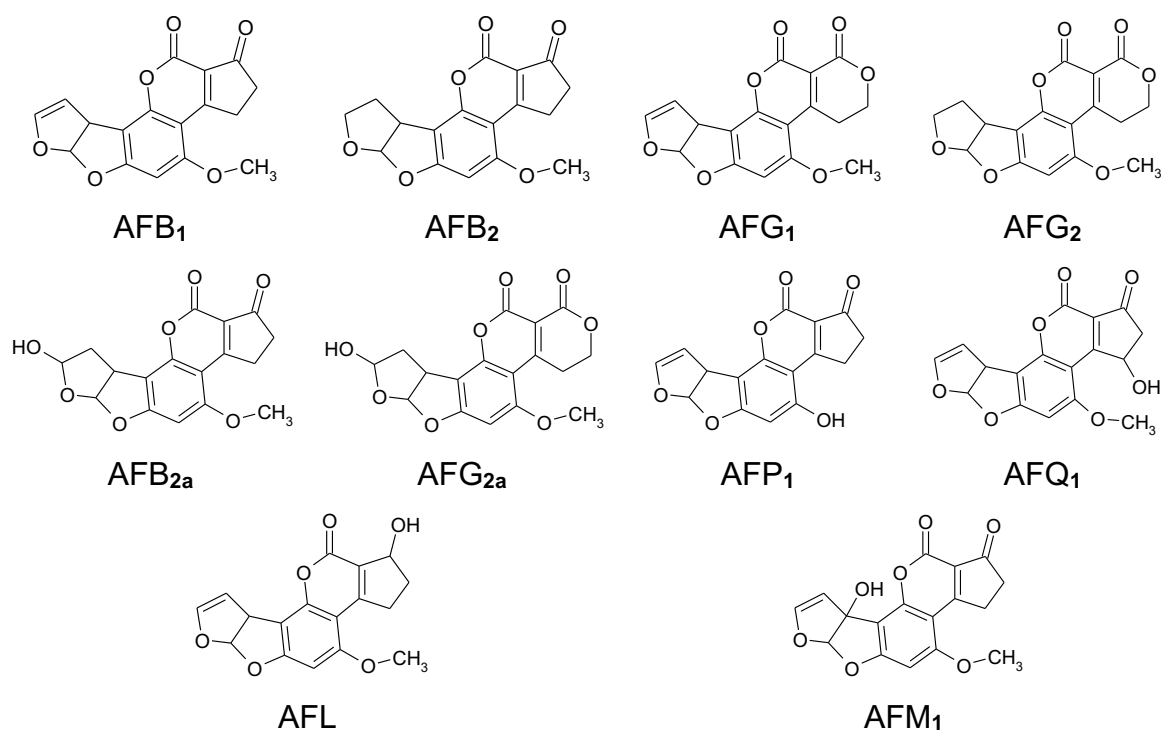


Figura 2.7 Estructura química de las aflatoxinas (Juan *et al.*, 2007).

Las dos principales especies de *Aspergillus* que producen AFs son *A. flavus* que origina únicamente a las AFB₁ y AFB₂ y *A. parasiticus* que puede producir AFs B y G. Sin embargo, las más importantes son B₁, B₂, G₁ y G₂, distinguidas por su color fluorescente bajo la luz ultravioleta (B: “blue”, azul y G: “green”, verde).

Aunque las AFs pueden encontrarse en muchos productos agrícolas, los mayores niveles de contaminación se han encontrado en semillas de algodón y maíz, cacahuates, nueces, avellanas y otros frutos secos. En cereales como el trigo, el arroz, el centeno o la cebada hay menos AFs, siendo los niveles generalmente bajos. Las condiciones climáticas de las zonas tropicales favorecen la formación de aflatoxinas, sin embargo, también pueden producirse en zonas más templadas.

Los principales géneros de hongos productores de micotoxinas son *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*. Las AFs son un grupo de micotoxinas ampliamente investigado y pueden ser producidas por tres especies de hongos: *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius*.

2.3.2 Hongos productores de aflatoxinas

Las aflatoxinas se pueden producir principalmente por tres especies de *Aspergillus*: *A. flavus*, *A. parasiticus*, y *A. nomius*, que contamina las plantas y productos vegetales, se producen ampliamente en las regiones tropicales y semitropicales en una amplia gama de productos agrícolas y matrices de alimentos. *A. flavus* y *A. parasiticus* son hongos ubicuos y muestran una afinidad particular para las semillas oleaginosas como fuente de crecimiento. *A. flavus* y *A. parasiticus* colonizan plantas en el campo, las áreas geográficas de mayor riesgo son aquellas con clima tropical o subtropical, pero pueden también colonizar productos en poscosecha, si no se encuentran adecuadamente deshidratados (Prandini *et al.*, 2009). El rango de temperatura de crecimiento de estos hongos es de 12-48 °C, pero las condiciones óptimas ocurren en 36-38°C. La producción de aflatoxina ocurre con temperaturas entre 20 y 30 °C. Las principales fuentes de aflatoxinas en los alimentos son harina de cacahuate, maíz y harina de algodón; estos hongos pueden sobrevivir en el suelo, en los residuos de los cultivos, y

cuando las condiciones son apropiadas comienzan a producir esporas que se propagan por el viento.

A. parasiticus prefiere un ambiente del suelo y es más común en cacahuates mientras que *A. flavus* se adapta mejor a un ambiente aéreo, de hecho, es la especie predominante en frutos secos, algodón y maíz, por lo tanto, *A. flavus* es el hongo de interés real para los problemas relativos a maíz. Este hongo generalmente coloniza los granos dañados, pero en algunos casos puede producir pectinasa y cutinasa, útiles enzimas que permiten penetrar de forma activa un grano dañado (Prandini *et al.*, 2009). De estas dos especies, *A. flavus* produce AFB₁ y AFB₂, mientras que *A. parasiticus* produce estas aflatoxinas B, así como la AFG₁ y AFG₂ (Tabla 2.4) (Shephard, 2008).

Tabla 2.4 Micotoxinas en lácteos, especies de hongos productores y alimentos contaminados.

Micotoxina	Hongos productores	Alimentos contaminado
Aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i>	Maíz, arroz, frutos secos
Aflatoxinas M ₁	Metabolito de AFB ₁ en mamíferos	Leche, productos lácteos

Shephard, 2008; Prandini *et al.*, 2009

2.3.3 Condiciones que favorecen la presencia y la producción de aflatoxina

Hay diversos factores que influyen en la selección de la microflora presente en los alimentos, estos factores se pueden agrupar de la siguiente manera:

1.- Factores intrínsecos, relacionados con la composición química, las propiedades físicas o biológicas del alimento. Tales como la composición del alimento, actividad del agua y el pH.

2.- Factores extrínsecos o propios del ambiente donde se conserva el alimento. Están integrados principalmente por la temperatura de almacenamiento, la

humedad ambiental, la tensión de oxígeno, la composición gaseosa ambiental o del envase, la presencia o ausencia de luz.

3.- Factores implícitos, se refiere a las relaciones de competencia y dependencia entre los diferentes microorganismos presentes en los alimentos.

Los factores intrínsecos, extrínsecos e implícitos, ejercen una presión sobre el desarrollo de los mohos toxicogénicos y por lo tanto sobre la acumulación de las micotoxinas. El conocimiento sobre estos factores permite comprender y predecir la entrada de las micotoxinas en la cadena alimentaria (Soriano, 2007).

Los mohos están adaptados a desarrollarse en un amplio intervalo de temperaturas, de manera que las condiciones de producción, en campo, de la mayoría de las materias primas para la industria alimentaria, pueden conducir a un problema de contaminación fúngico o de micotoxinas, debido a que las temperaturas de almacenamiento (temperatura ambiente) o refrigeración, no son suficiente para frenar la alteración por partes de los mohos.

Aspergillus flavus y *A. parasiticus* crecen desde 10 a 43 °C, con un óptimo entre 32 y 33°C. Las aflatoxinas se producen a temperaturas entre 12 y 40 °C. El nivel más alto de AFs producidas por *A. flavus*, en caldo de cultivo es de 25-30 °C tras dos semanas de incubación.

La actividad de agua (a_w) junto con la temperatura, son los factores más determinantes del desarrollo fúngico. La a_w se usa en microbiología como medida de la disponibilidad de agua por parte de los microorganismos. La a_w es el parámetro responsable de que las micotoxinas se acumulen en el alimento, generalmente cereales, en precosecha, postcosecha, en condiciones más bajas de humedad. La presencia de AFs en el maíz suele estar ligada a la contaminación en el campo por *A. flavus*, aunque también puede sintetizarse en cereales almacenados con bajos niveles de humedad. *A. flavus* y *A. parasiticus* crecen en condiciones óptimas a 0.99 a_w , estando la a_w mínima para su crecimiento entre 0.80-0.83. Las AFs, sin embargo, se producen en el intervalo de 0.95-0.99, aunque se ha encontrado un mínimo de 0.82 a_w para *A. flavus*

Los hongos son capaces de crecer en un intervalo de pH entre 3 y 8, aunque su óptimo es cercano a 5. A pesar de que el pH no es un condicionante tan importante para el desarrollo fúngico como lo es la a_w o temperatura, el cambio de pH de un sustrato o alimento puede alterar la respuesta fúngica al resto de factores. Por lo general la especie *A. flavus* toleran mal los valores de pH muy ácidos (2-3) y su crecimiento se ve afectado a valores de pH alcalinos. A veces el pH cambia la principal toxina sintetizada por un moho. Por ejemplo el *A. parasiticus* cuando crece en un medio de cultivo semi-sintético con un nivel de pH menor de 6.0 se favorece la síntesis de AFs del grupo B.

Otros factores que que influyen sobre la producción de micotoxinas por parte de las cepas micotoxicogénicas es el sustrato sobre el que estos mohos se desarrollan.

Interacciones entre microorganismos, tanto inter como intraespecifica, no sólo afecta el desarrollo microbiano, sino que también puede producir un efecto marcado en la síntesis de micotoxinas.

2.3.3.1 Aflatoxina B₁ y su biotransformación a aflatoxina M₁

La aflatoxina M₁ (AFM₁) es un metabolito hidroxilado de la AFB₁ que se produce en el hígado de las vacas. La AFB₁ ingerida en la dieta es biotransformada por el citocromo microsomal hepático P450 en AFM₁ (Battacone *et al.*, 2005), que luego se excreta a través de las glándulas mamarias en la leche de hembras de mamíferos (Torkar y Vengu, 2008; Skrbi *et al.*, 2015).

El 0.4% de la AFM₁ pasa a la leche de vaca de 3 a 18 horas después de ser ingerida la AFB₁; en la cabra pasa a leche el 1 %, por ejemplo; si una vaca consume 6 kg de pienso contaminado por 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁, con una producción diaria de 20 L de leche se eliminaría de 0.02 a 0.07 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFM₁.

La AFM₁ se detecta en la leche del animal de 12 a 24 horas después de la ingestión de AFB₁ alcanzando los niveles más elevados a los 2 o 3 días y desaparece totalmente 4 ó 5 días después de su consumo. El nivel de AFM₁ encontrado en la leche es proporcional a la cantidad de AFB₁ que ha sido consumido por el ganado a través del pienso. El maíz, cacahuates y las semillas de algodón son los principales responsables de la presencia de AFB₁ en la dieta de los animales.

2.3.3.1.1 Aflatoxina B₂ y su biotransformación a Aflatoxina M₂

La aflatoxina M₂ es un producto de la bioconversión de mamíferos, de AFB₂ y originalmente se aislan e identifican e a partir de leche bovina. Después de entrar en el cuerpo mamífero (humanos o animales), las aflatoxinas son metabolizadas por las enzimas hepáticas del citocromo P450 a una enzima reactiva de epóxido intermedio que se vuelve más cancerígeno, o ser hidroxilado y convertirse en el menos perjudicial de las aflatoxinas M₂. Sin embargo, estudios recientes indicaron que *A. parasiticus* produce las aflatoxinas menores M₂ (AFM₂), y GM₂ (AFGM₂), así como las principales aflatoxinas B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁) y G₂ (AFG₂) (Garrido *et al.*, 2003; Yu, 2012).

2.3.3.2 Toxicocinética de la aflatoxina M₁

Las AFs son absorbidas en el tracto gastrointestinal debido a su alta liposolubilidad (IARC, 2002), son biotransformadas en el hígado por enzimas microsomales de la superfamilia del citocromo P450 entre las que se encuentran CYP1A2, 3A4, 3A5 y 3A7 (Urrego y Díaz, 2006). Las dos enzimas más importantes son representadas por la CYP3A4 que interviene en la formación de la forma exo-epóxido y el metabolito AFQ₁. La CYP1A forma en su mayoría la forma endoepóxido y la AFM₁ (Urrego y Diaz, 2006). Los productos de degradación de la AFB₁ y metabolitos no conjugados de esta pasan al sistema circulatorio y se distribuye a la leche, huevos, músculo y tejidos comestibles. El 50% de la AFB₁, es eliminada por la bilis en su forma conjugada con glutatión, ácido glucurónico o con sulfato y el 15 al 25% es eliminada por la orina (Soriano del Castillo, 2007). La

AFM₁ se excreta en las 48 horas siguientes a la ingestión y representa entre el 1 al 4 % de la AFB₁ ingerida. La AFB₁ requiere una activación para producir mutaciones. La ruta de activación es la conversión de AFB₁ en el metabolito electrofílico AFB₁-8,9-epóxido (anteriormente denominado AFB₁-2,3 epóxido) (Ellenhorn, 1997; Fernandez de Oliveira y Leal, 1997). La formación del epóxido requiere la presencia de un doble enlace entre los carbonos C₈-C₉, por esta razón las AFs B₂ y G₂ son prácticamente atóxicas en comparación con las AFs B₁ y G₁. La AFM₁, aunque presenta el doble enlace entre los carbonos C₈ y C₉, es dos órdenes de magnitud menos tóxica que la AFB₁ en cuanto al efecto cancerígeno se refiere (Díaz, 1996).

2.3.3.3 Efectos tóxicos de la aflatoxina M₁

La AFM₁ produce efectos tóxicos agudos similares a la AFB₁, y causa lesiones hepáticas parecidas a las producidas por AFB₁ y necrosis en los túbulos renales (Purchase, 1967).

La AFM₁ y la AFB₁ tienen una TD₅₀ (dosis de micotoxina con la cual el 50 % de los individuos pueden desarrollar tumores malignos) de 10.38 y 1.15 µg kg pc⁻¹ día, por lo que se considera que la potencia cancerígenas de la AFM₁ fue clasificada por la IARC como posible carcinógeno en humanos (grupo 2B) (IARC, 1993). La AFM₁ es genotóxica y mutagénica (test de Ames) pero en menor proporción que la AFB₁ (Cullen, 1987).

La AFM₁ induce cáncer de hígado en roedores por un mecanismo similar a la AFB₁, la AFM₁ es oxidada por las oxigenasas de la función mixta del citocromo P450 del hígado, que se oxida a 8,9-epóxido, que se une a los residuos de guanina de la doble hélice de DNA, a diferencia de la AFB₁, la AFM₁ parece tener un efecto citotóxico directo en células humanas que no precisa de activación metabólica previa (Soriano del Castillo, 2007).

El metabolismo oxidativo de AFB₁ a su forma epóxido y a AFM₁ puede bloquearse *in vitro* (hepatocitos humanos) e *in vivo* (ratas) mediante un tratamiento con Oltipraz, un medicamento antiquistosomal que bloquea la formación del

epóxido e induce la formación de la enzima más importante de detoxificación de la AFB₁, la glutatión-S-transferasa. Esta sustancia se está utilizando en ensayos clínicos en China para la prevención del cáncer de hígado (Creppy, 2002).

La AFM₁ es utilizada como biomarcador de la exposición a AFB₁. Se miden los aductos AFM₁-NF-guanina en orina para evaluar exposiciones a aflatoxinas en las últimas 24 horas. Sin embargo, debido a la vida media del metabolito, los niveles de AFM₁-guanina pueden variar significativamente de un día a otro. Otro bioindicador es el complejo albúmina-AFM₁ en sangre, esta medida es más precisa y sirve para exposiciones prolongadas.

2.3.3.4 Legislación de la AFM₁ en alimentos para humanos

Se ha reportado que la AFM₁ es un cancerígeno humano, es un metabolito hidroxilado encontrado en la leche y sus productos como el queso. Por lo tanto muchos países han establecido un límite de tolerancia para AFM₁ en leche para humanos y productos lácteos, tales como el queso (Tabla 2.5), fue hasta 1998 cuando la Unión Europea, estableció un Límite Máximo Residual (LMR) de 0.05 µg/kg para AFM₁ en leche y recientemente también un LMR de 0.025 µg kg⁻¹ en alimentos para bebé (Commission European, 2006).

Tabla 2.5 Nivel máximo aceptable (µg kg⁻¹) de AFM₁ en leche y queso en varios países.

País	Leche	Queso
Suiza	0.05	0.025
Austria	0.05	0.025
Bélgica	0.10	---
Alemania	0.050	---
Países Bajos	0.050	0.020
Suecia	0.050	---
Francia	0.030	---
	0.050	---
República Checa	0.10	---
	0.50	---
Bulgaria	0.50	----
USA	0.50	---

Mannetta *et al.*, 2005

2.3.3.5 Presencia de aflatoxinas en leche y quesos

Se han encontrado en la literatura científica estudios sobre la ocurrencia de AFM₁ en la leche y los productos lácteos y los niveles permisibles propuestos.

Takavoli *et al.*, (2012) determinaron la presencia de AFM₁ en 50 muestras de queso blanco, tomadas de dos fábricas de productos lácteos en el verano de 2008 y el invierno de 2009, utilizaron el método (ELISA) para el análisis de las muestras. La aflatoxina M₁ se encontró en el 60% de las muestras del queso, que van desde 40.9 a 374 ng kg⁻¹. Los niveles de toxinas en el 6% de las muestras excedieron el límite estándar de la ciudad iraní de 200 ng kg⁻¹. Teniendo en cuenta la variabilidad estacional, la concentración media de AFM₁ en las muestras recogidas en invierno fue significativamente (P <0.03) más elevados que los recogidos en el verano. Por lo que ellos concluyen que la alta incidencia de AFM₁ en muestras de queso podría ser un peligro potencial para la salud pública.

Iha *et al.*, 2013 investigaron la incidencia y prevalencia de la AFM₁ en leche brasileña y la fórmula infantil. Determinaron también la distribución y la estabilidad de AFM₁ en queso y yogurt. Las muestras de leche y las muestras de fórmula infantil fueron adquiridas en Ribeirao Preto, Brasil. Se analizaron para AFM₁ mediante una columna de inmunoafinidad, cromatografía líquida de separación y detección de fluorescencia. La AFM₁ se detectó en el 83% de las muestras de leche (> 3 ng kg⁻¹) con los niveles que van de 8 a 437 ng kg⁻¹ para la leche líquida, y 20-760 ng kg⁻¹ para la leche en polvo. No se encontró AFM₁ la fórmula infantil. El procesamiento y almacenamiento demostró tener poco efecto sobre el contenido de AFM₁ en leche y los productos de la leche. La masa total de AFM₁ en leche se redujó en un 3.2% en el queso y en un 6% en el yogurt (pH 4.4).

Trombete *et al.* (2014) determinaron la ocurrencia de contaminación con AFM₁ en las muestras de queso parmesano rallado, comercializado en la región metropolitana de Río de Janeiro, Brasil. 30 muestras que representan 10 marcas principales comercializado en la región, las cuales analizaron mediante cromatografía líquida de alta presión, con detección por fluorescencia (HPLC-FLD) después de la purificación con la columna de inmunoafinidad. El método mostró

valores de recuperación dentro de la gama de 70 a 90%, con una DS menor que 15% y los límites de detección y cuantificación por debajo del nivel máximo permitido por la Comisión Europea para la presencia de AFM₁ en los quesos. Las micotoxinas se identificó en 18 (60%) de la muestras evaluadas de queso rallado. El valor más alto corresponde a $0.69 \pm 0.02 \mu\text{g kg}^{-1}$ y la media para toda las muestras analizadas fue de $0.16 \mu\text{g kg}^{-1}$. Todas las muestras fueron menores que el límite establecido por la legislación brasileña ($2.5 \mu\text{g kg}^{-1}$) es AFM₁ en los quesos en general. Sin embargo, ocho muestras (26.7%) presentaron niveles de AFM₁ por encima del límite de tolerancia de $0.25 \mu\text{g kg}^{-1}$ por la Comisión Europea. Estos resultados indicaron que los niveles de AFM₁ en el queso rallado que se consume en Rio de Janeiro - Brasil se encontró por arriba de los límites de tolerancia y que podría proporcionar un peligro potencial para la salud pública.

Skrbic *et al.* (2015) midieron el nivel de AFM₁ en 54 muestras de queso tipo blanco y duro producido en Serbia, utilizando cromatografía líquida de ultra-alto rendimiento junto con la espectrometría de masas en tándem (UHPLC-MS/MS). Las dos metodologías se han desarrollado para la extracción de la muestra, por separado para queso tipo blanco y duro. La primera extracción de la muestra implicó la mezcla de acetonitrilo / agua (86:14, v/v) para el queso blanco. El segundo método consistió en una extracción de la muestra con diclorometano / acetona para queso duro seguido de la extracción en fase sólida (SPE) de limpieza de cartuchos de SPE C18. Las recuperaciones promedio de AFM₁ de muestras enriquecidas en los niveles de 0.25 a $0.50 \mu\text{g kg}^{-1}$ fueron de 73-111% y la precisión (RSD) varió de 7 a 9% con el primer método, mientras que el promedio de recuperación de muestras enriquecidas en los niveles de 0.125 - 0.50 mg kg^{-1} fueron de 71-80%, con un RSD que varió de 4 a 10% para el segundo método. Debido a los diferentes efectos de la matriz, los límites de cuantificación fueron 0.125 y $0.02 \mu\text{g kg}^{-1}$ para el queso tipo blanco y duro, respectivamente.

Siete muestras (13%) excedieron el nivel máximo aceptable de $0.25 \mu\text{g kg}^{-1}$ que se estableció establecido para AFM₁ en algunos países europeos como Suiza, Francia, Austria y Turquía.

2.4 Evaluación del consumo de queso.

Para poder realizar una evaluación del riesgo alimentario primero es necesario hacer una evaluación del consumo, y es necesario hacer una recolección de datos válidos sobre los hábitos alimentarios de la población considerada. La recolección de datos es un problema complejo de resolver, ya que los patrones de consumo varían considerablemente de un individuo a otro o entre los grupos de individuos, así como de un día a otro, o en función de la estación del año (WHO, 1985).

La estimación de consumo se puede hacer en tres enfoques de acuerdo con el método de recolección de datos:

2.4.1 Encuestas de tipo colectiva: balance alimentario.

Este tipo de encuestas informa a grosso modo la disponibilidad alimentaria a nivel nacional. El nivel de consumo de cada alimento es obtenido a partir de datos de producción anual de alimentos, importaciones, exportaciones y el uso agrícola e industrial (Kroes *et al.*, 2002). Estos datos nacionales son divididos entre el número total de consumidores o algunos consumidores, con el objeto de obtener la media de consumo por persona (WHO, 1985). Estas encuestas proporcionan la disponibilidad de los datos, y los niveles de consumo reales son sobre-estimados. Este tipo de encuesta se utiliza para evaluar los cambios en las tendencias a través del tiempo y para realizar comparaciones entre diferentes países. Los datos de estas encuestas se utilizan a nivel internacional (para la FAO y para la OCDE (Organización para la cooperación y desarrollo económico) y a nivel nacional para los diferentes países (Kroes *et al.*, 2002)

2.4.2 Encuestas de tipo colectiva: canasta básica.

Este tipo de encuestas proporcionan estimaciones más precisas que los balances alimentarios. Se sitúan en el escalón de los hogares y los niveles de consumo pueden ser obtenidos por estudios de presupuesto y de consumo. Es el primer tipo de estudio que da información sobre las compras de alimentos del punto de vista financiero con el fin de deducir el volumen de consumo. Los estudios de consumo en el hogar consisten en registrar las cantidades de alimento y las bebidas utilizadas en el seno del hogar durante un período dado (diferencias entre el principio y fin de las compras realizadas en el hogar).

Los datos en términos de cantidad y/o gastos pueden ser obtenidos del seguimiento de la contabilidad o la entrevista, o ambos, por un período dado, por lo general una semana (WHO, 1985; Kroes *et al.*, 2002). Después, se divide por el número de personas en el hogar y el número de días en el estudio con el fin de obtener una estimación del consumo de alimentos por día y por persona.

Estos estudios por lo general no tienen en cuenta el consumo fuera del hogar, o de métodos de preparación culinaria (Kroes *et al.*, 2002).

2.4.3 Encuestas individuales.

A diferencia de las encuestas colectivas, los datos obtenidos por las encuestas individuales proporcionan información sobre la distribución y el promedio de consumo de un grupo de personas bien definidos. Estos datos reflejan más el consumo real de los individuos. Existen varios métodos para realizar encuestas individuales. Estos se dividen en dos categorías de acuerdo con su modo de investigación: i) Método de recordatorio ii) Método de registro. Estos métodos retrospectivos requieren recordar el consumo del día (recordatorio de 24 horas) o más tiempo (estudio de consumo habitual: cuestionario de frecuencia alimentaria y diario de alimentos) (Kroes *et al.*, 2002).

2.4.3.1 Cuestionario de frecuencia alimentaria

Para estas encuestas retrospectivas, se les pide a los participantes sus frecuencias habituales de consumo de cada alimento a partir de una lista estructurada de alimentos (por día, semana, mes, año) (Kroes *et al.*, 2002). Este cuestionario no sólo pregunta la frecuencia de consumo de alimentos, sino también otras características como el modo de cocción, la manera de cocinar los alimentos o la combinación con otros alimentos. Las cuales también puede ser cuantitativas cuando se precisa las cantidades de consumo o semi-cuantitativas cuando las cantidades son aproximadas indicadas a través de tamaños de porción. Los cuestionarios de frecuencia concisos, contiene de 15 a 30 alimentos a escoger. Estas son útiles cuando no se requieren la estimación de todo el consumo de alimentos, lo que permite centrarse en una población grande, enfocarse en las personas y ciertos alimentos de interés (Thompson *et al.*, 1994).

Las ventajas de este método es que es diseñado para estimar el consumo habitual de los participantes. Cuando ellos proporcionan los datos cuantitativos, y permite clasificar a los individuos de acuerdo a su modo de consumo. Además dada a su baja tensión para los participantes y el costo relativamente bajo, de la recolección de datos, este cuestionario se ha convertido en el más común para la evaluación del consumo de alimentos. Para su validación, se evalúa la correlación entre los resultados obtenidos por este método y el consumo de alimentos, se comparan con los obtenidos con el diario de alimentos o el cuestionario de recordatorio de 24 h. Esto demuestra que los cuestionarios de frecuencia que utilizan una lista larga de alimentos exageran el consumo, mientras que aquellos con listas cortas lo subestiman (Thompson y Byers, 1994).

La recolección de datos de consumo por medio de cuestionario de frecuencia se puede realizar de tres formas diferentes: entrevista cara a cara, por vía telefónica o enviando un cuestionario por correo o email (USEPA, 1998). Para la elección del método debe ser considerado y justificado a priori, sobre la base de su capacidad para alcanzar el objetivo fijado por la investigación (se debe tomar

en cuenta las problemáticas de la población objetivo y las especificidades regionales).

1.- La entrevista personal (cara a cara): El entrevistador pregunta al entrevistado y recibe de éste la respuesta pertinente a la hipótesis de su investigación. Las preguntas y su secuencia demuestran el grado de estructuración de la investigación. El costo de la entrevista personal es relativamente alto con respecto a la entrevista telefónica o por medio de correo, debido a que en ella se requiere una gran cantidad de personal, que tiene que trabajar en la calle en el sol, la lluvia y viajar para localizar los elementos poblacionales para la entrevista. La entrevista personal tiene mejores ventajas que con respecto a las otras dos entrevistas, debido que el entrevistador puede dirigir el comportamiento del entrevistado, lo cual permite tener mejores entrevistas que con la otras dos formas de entrevista (correo y vía telefónica).

2.- Las entrevistas por correo. Son menos costosas, se requieren preguntas menos elaboradas, menor sesgo; seleccionar personas inadecuadas para la entrevista. Algunas de sus desventajas es que no se pueden aclarar las preguntas ambiguas, no hay control de quienes llenan el cuestionario, la tasa de respuestas incompletas o abandonadas para el estudio es más importante que cuando se hacen las preguntas de primera mano. La tasa de entrevistados es relativamente baja. Además, este método sólo se puede utilizar cuando hay bases de datos de la población objetivo (USEPA, 1998). En el caso del consumo de queso no hay bases de datos nacionales, ni estatales por instituciones reconocidas.

3.- Vía telefónica. La recopilación de datos vía telefónica es lo más práctico, común y fácil de controlar; se puede monitorear la entrevista, y su calidad. Proporciona la tranquilidad de que el entrevistador no corre peligro en la calle recopilando datos, como en el caso de entrevistas personales. La principal desventaja es que los autores mencionan que existen un gran sesgo muestral en este tipo de entrevista, debido a que hay un gran % de población que no tiene teléfono y que la muestra sólo representará a los que puedan pagar un teléfono,

también la información puede ser difícil de obtener debido a que no se puede verificar, es imprecisa, por lo que su fiabilidad es limitada (Namakforoosh, 2000).

2.4.3.2 Calendario alimentario o diario de alimentos.

El calendario de alimentos toma en cuenta en los participantes los tipos de comida, el horario de comida, y la cantidad, así como las bebidas. Se requiere precisar detalles como la cantidad de comida. Las cantidades se pueden medir con una taza, una cuchara, a esto se le llama calendario de comida por pesadas. También se pueden utilizar imágenes de las comidas con porciones o algún recipiente en especial. En este caso, se trata de una declaración de la estimación del consumo de alimentos (Thomposon *et al.*, 1994). Los registros de consumo se realizan sobre una hoja o un formulario que contienen una lista del grupo de alimentos a investigar, y precisar que consume o no y en qué cantidad.

A pesar de que se debe registrar todo lo que se consume de alimentos, estos estudios requieren una fuerte implicación por parte de los participantes. Es por eso que realizan en período cortos, tres o cuatro días consecutivos. Un diario de alimentos de siete días, se considera un método más preciso para la evaluación del consumo (Kroes *et al.*, 2002). Sin embargo, más allá de siete días consecutivos su validez disminuye debido que la respuesta de los participantes es menos rigurosa, debido a la fatiga.

El aspecto prospectivo de este método reduce en gran medida el riesgo de omisión y obtener tanto los datos detallados y precisos cuantitativamente, durante un período determinado. Por lo tanto, a menudo se considera este método para evaluar el consumo alimentario.

De acuerdo a la validación de cuestionario; varios estudios indican que el consumo habitual se subestima. Esto se puede atribuirse a las respuestas incompletas y al impacto en la elección de alimentos de los participantes. Sin embargo, el hecho de que se tenga que anotar todo lo que se consume, puede

causar un cambio en el régimen, especialmente en mujeres obesas (Thompson *et al.*, 1994).

2.4.3.3 Cuestionario de recordatorio de 24 horas.

Esta encuesta retrospectiva, se registra todo lo que consumió el participante en 24 horas. Se pide a los participantes recordar y anotar todo lo que se consumió (comida y bebida) dentro de las 24 horas o 48 horas precedentes. Las entrevistas pueden llevarse a cabo por teléfono o en persona y las cantidades se calculan utilizando las medidas utilizadas en el hogar o por fotografías.

Dado que el investigador o el entrevistador reporta el consumo, el método se puede utilizar para las personas que no pueden escribir. Debido, a que el tiempo para registrar el consumo de alimentos es bajo, los entrevistados son capaces de recordar la mayor parte de su consumo.

Otro punto fuerte de este estudio es que se lleva a cabo en 20 minutos, lo cual no es una restricción fuerte para los participantes. Así el reclutamiento es más simple y por lo tanto más representativo para la población. Por último, a diferencia del diario de alimentos, anotar lo que se ha comido en 24 horas, la investigación no interfiere con su conducta alimentaria. Sin embargo, tomando en cuenta que el poder está sujeto a la variabilidad dependiendo del día, un solo cuestionario de recordatorio de 24 h no es apropiado para caracterizar la dieta habitual de un individuo. Su uso principal es describir el consumo medio de un grupo de individuos.

2.5 Evaluación de riesgo.

Uno de los aspectos fundamentales de la vigilancia de la seguridad química de los alimentos es la estimación de las ingestas de contaminantes y nutrientes a través de la dieta, para lograr un doble objetivo: (Almeida-González *et al.*, 2012).

1. Mantener las ingestas de los contaminantes por debajo de los valores considerados como seguros.
2. Conservar la ingesta de los nutrientes en los niveles recomendados

La estimación de la ingesta es una herramienta básica de control de la inocuidad alimentaria. La evaluación a la exposición por AFM₁ se realiza a través del consumo de queso Oaxaca de la Ciudad de Veracruz. En general, la exposición a AFM₁ representa la cantidad de AFM₁ ingerida, multiplicada por el consumo de queso Oaxaca.

2.5.1 Evaluación determinista.

Este es un método en el que un solo valor de consumo se multiplica por un valor único de la contaminación (las medias de la población). Normalmente se utiliza la mediana o un valor más alto (Percentil 95), o el umbral de regulación (para la tasa de contaminación). Estos valores se pueden derivar de datos reales o teóricos. Esta evaluación supone un consumo diario del contaminante con la dosis más alta permitida a lo largo de la vida de un individuo. Uno de los inconvenientes inherentes en el método de cálculo determinista es la suposición de que todos los individuos consumen la misma cantidad de alimento que contiene el mismo contenido de contaminante. El uso de medias en la evaluación de la exposición permite tener suficientes datos robustos, así como también es más económico obtener datos, sobre el consumo del alimento y el contaminante.

La ventaja es que permite hacer comparaciones internacionales y permitir la extrapolación con los fuertes consumidores, multiplicando los resultados de la media por un factor de aproximadamente tres (Leblanc, 2002).

Su único inconveniente, sin embargo, es que sobreestima el riesgo para el consumidor medio, ya que se supone un promedio de consumo de alimentos contaminados, a lo largo de su vida y que subestima el riesgo para un grupo particular de alimentos, que pueden no estar reflejados en los datos de consumo

(Kroes *et al.*, 2002; Leblanc, 2002). De manera general, este tipo de cálculo es muy conservador (ya que tiende a subestimar las cantidades ingeridas) y requiere de pocos datos.

Regularmente se utiliza en la primera etapa en la cuantificación de la exposición o en caso de una crisis sanitaria, con el fin de juzgar la pertinencia de llevar a cabo una evaluación más sofisticada. Sin embargo la combinación de consumo y los niveles de contaminación, lleva a una exposición muy por debajo de las dosis de referencia toxicológica (Kroes *et al.*, 2002)

2.5.2 Evaluación probabilística.

Este tipo de evaluación se utiliza en el campo de la evaluación de la exposición. En este enfoque, las dos variables (cantidad de consumo y cantidad de toxina) se describen por las distribuciones de probabilidad para describir la variabilidad y / o la incertidumbre de los datos. Debido a que una persona que consume Queso Oaxaca, no consume la misma cantidad todos los días y no siempre contiene el mismo nivel de toxina, esta metodología tiene la ventaja de tener en cuenta todas las combinaciones posibles de los datos de consumo y la contaminación. Principalmente: a) Ajustar los parámetros usuales para que se aproxime a las distribuciones de consumo y contaminación, b) combinar los valores, c) Asegurar la aleatoriedad y la interacción, un gran número de veces (en función del número de datos y la exactitud esperada).

Esto permite generar una distribución de la exposición, obteniendo así la información adicional de los enfoques analizados anteriormente. Puede calcularse incluyendo la media, desviación estándar, mediana, mínimo, máximo y todos los percentiles. Aunque los parámetros más utilizados son la media y el percentil 95, los cuales permiten resumir la distribución.

La confiabilidad de los resultados probabilísticos depende de la validez del modelo, la aplicación software y la calidad de los modelos de entrada (que depende de dos parámetros: la calidad de los datos y la selección de las

distribuciones de ajuste adecuados a los datos (Kroes *et al.*, 2002; Tressou *et al.*, 2004; Counil *et al.*, 2005).

La exposición a Aflatoxinas se evalúa en base a los datos de consumo y la contaminación provenientes del mismo estudio, centrándose en la misma población (Veracruz) e incluso el área de estudio (Ciudad de Veracruz). Esto tiene la ventaja de obtener los datos de consumo y la contaminación a la vez, y así evaluar las cantidades de toxinas de Queso Oaxaca ingeridos lo más cerca posible a lo que realmente ingerió la población de interés. Además, la exposición a la AFM₁ de queso Oaxaca puede ser aguda o crónica. La exposición crónica puede ser evaluada debido a la obtención de datos i) de consumo a largo plazo a través del cuestionario de frecuencia y ii) los datos de contaminación «de rutina», y no únicamente en periodos de riesgo. En el enfoque probabilístico los datos de entrada (Contenido de AFM₁ y consumo) son distribuciones. Esto permite tener en cuenta la variabilidad de estos datos. La combinación se realiza mediante el uso de un tipo de modelo de técnicas de simulación de Monte Carlo.

El modelo tiene una gran cantidad de valores aleatorios en cada una de las distribuciones y después las combina. En la salida, esta simulación genera una distribución de la exposición (cuantifica la AFM₁ ingerida) para el conjunto de la población de estudio. A partir de las distribuciones de la salida pueden ser determinados todos los descriptores comunes (media, mediana, percentiles, etc.)

Además, un análisis de sensibilidad de todos los parámetros de entrada también se puede realizar para determinar la influencia de cada uno en la exposición final.

2.5.2.1 Ingesta diaria.

La Ingesta Diaria Aceptable (IDA) se ha establecido como una medida de seguridad a la salud pública para la leche, sus derivados y otros alimentos. La (IDA) se utiliza con sustancias susceptibles de encontrarse en los alimentos y, por

lo tanto, se emplea al referirse a aditivos, residuos de plaguicidas y drogas veterinarias que se encuentran en los alimentos. La determinación de las ingestas de cada sustancia se puede obtener por un conjunto de datos obtenidos a través de aplicación de encuestas sobre consumo alimentario. Pueden incluirse estimaciones de ingestas medias de la población general, de diversos grupos clasificados por edad y/o sexo, por consumo extremo de un determinado alimento, o por pertenecer a sectores especiales de población de mayor riesgo (por ej. niños, mujeres embarazadas, etc.).

2.5.2.2 Ingesta Diaria Aceptable (IDA).

Es una estimación efectuada por el JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) acerca de la cantidad de un aditivo alimentario, expresada en relación al peso corporal, que una persona puede ingerir diariamente durante toda su vida sin correr riesgos apreciables para su salud (hombre medio = 60 kg). La IDA se expresa en $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal/día (Codex Alimentarius, 1999).

2.5.2.3 Ingesta Diaria Estimada (IDE).

La ingesta diaria estimada de un aditivo alimentario es la cantidad de un aditivo alimentario ingerida por el consumidor del alimento y se calcula a partir del uso efectivo que del aditivo hace la industria conforme a las buenas prácticas de fabricación (BPF) o de la mejor aproximación posible de tal uso efectivo.

Las ingestas pueden calcularse por una gran variedad de métodos cuyos resultados se aproximan mucho a la ingesta efectiva. El método para calcularlo en este trabajo se describe en el apartado 5.6.3 (Codex alimentarius, 1999)

2.6 Síntesis de Antecedentes

Se han identificado y cuantificado pesticidas organoclorados en leche en el Estado de Veracruz, pero no existen reportes hasta el momento de que se haya evaluado su presencia en quesos artesanales elaborados en Veracruz. Aún cuando se ha evaluado la concentración de Aflatoxina M₁ en leche y en queso panela en México, no se han encontrado reportes que evalúen la concentración de Aflatoxina M₁ en quesos artesanales producidos en Veracruz. En México hay una falta de conocimiento con respecto al riesgo por exposición a contaminantes químicos y biológicos en quesos artesanales, debido a que no se han realizado investigaciones que evalúen el riesgo probabilístico a la salud del consumidor por Aflatoxina M₁ en queso Oaxaca.

3 HIPÓTESIS

Los quesos frescos y Oaxaca en la Ciudad de Veracruz están contaminados con plaguicidas organoclorados y Aflatoxinas M₁ y M₂.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Evaluación de la probabilidad de riesgo por el consumo de quesos artesanales (fresco y oaxaca) en la ciudad de Veracruz con relación a la presencia de plaguicidas organoclorados y aflatoxinas

4.2 Objetivos específicos

1. Estimar la ingesta diaria de queso fresco y Oaxaca en la ciudad de Veracruz.
2. Evaluar el efecto estacional, durante un ciclo anual, sobre la concentración residual de DDT y HCH en quesos fresco y Oaxaca.
3. Evaluar la eficiencia del método de extracción sobre la concentración de aflatoxina M₁ en queso Oaxaca.
4. Evaluar la incidencia de aflatoxina M₁ en queso Oaxaca.
5. Evaluar el riesgo por la exposición a aflatoxinas M₁ y M₂ a través del consumo de queso Oaxaca

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Metodología general

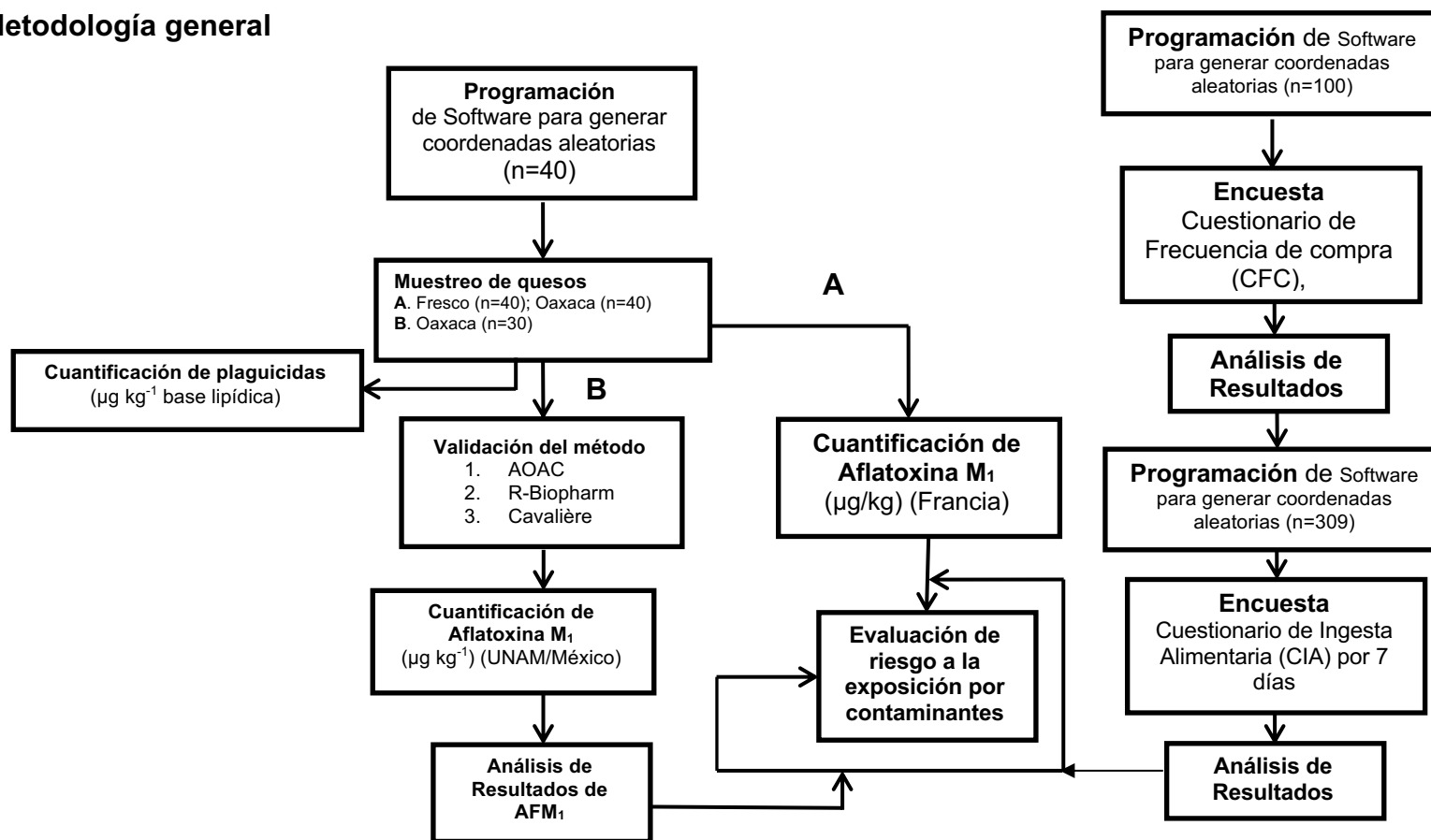


Figura 5.1 Metodología para evaluar el riesgo a la salud del consumidor de queso fresco y Oaxaca contaminados con plaguicidas organoclorados y aflatoxinas, en la ciudad de Veracruz.

5.2 Muestreo de la población para la aplicación de las encuestas de consumo.

La población de interés fue la población de la ciudad de Veracruz con 232.3 km², con el fin de estudiar la frecuencia de compra de ambos quesos, así como la variabilidad de los patrones de consumo de Oaxaca y quesos frescos (clase social, edad y sexo), se utilizó el mapa de la ciudad de Veracruz. Las dimensiones del mapa de la ciudad de Veracruz se introdujeron en un algoritmo en el software MATLAB para generar 150 y 400 coordenadas geográficas aleatorias para el cuestionario de frecuencia de compra y el Cuestionario del diario de alimentos, respectivamente. Estas coordenadas se localizaron en el mapa. En el caso del cuestionario de frecuencia de compra, cien puntos fueron suficientes para cubrir todo tipo de personas en la ciudad en proporciones similares a la población total. En el caso del diario de alimentos, 309 de los 400 puntos de muestreo al azar permitidos para cubrir todo tipo de personas en la ciudad.

Una vez que las coordenadas geográficas se fijaron, el entrevistador se dirigió al lugar ubicado e invitó a un miembro de la familia para llenar la encuesta. Si el miembro de la familia no se encontraba de acuerdo en participar, el entrevistador seleccionaría otra casa en la zona, hasta que se encontró con un miembro de una familia que aceptó llenar la encuesta. Se siguió la misma metodología para el cuestionario de frecuencia de compra de queso y el diario de alimentos. Se llevaron a cabo estudios preliminares para evaluar la claridad de las instrucciones y el formato de los cuestionarios para evaluar el consumo.

5.2.1 Cuestionario de frecuencia de compra.

El cuestionario de frecuencia de compra (CFC) se aplicó a través de entrevistas cara a cara en los puntos de muestreo (100 puntos de muestreo). Las entrevistas se llevaron a cabo entre septiembre de 2014 y noviembre de 2015 con la persona que normalmente realiza las compras en el hogar, con una duración de 5-10 min. Se pidió a los encuestados que indicaran su nivel educativo, profesión, situación económica, la comida y la época del año en la que consumen queso y el lugar y tiempo de almacenamiento del queso comprado. La encuesta incluyó ocho

fotos con quesos comunes que se consumen en Veracruz (Manchego, americano, queso parmesano, mozzarella, cottage, fresco, Oaxaca y requesón). Debajo de cada foto, los encuestados indicaban la cantidad, la frecuencia y el lugar de compra del queso o quesos que generalmente consumen. En esta investigación, este cuestionario se utilizó para evaluar la frecuencia de compra de quesos en lugar de la frecuencia de consumo (Anexo 1).

5.2.2 Cuestionario diario de alimentos.

El cuestionario diario de alimentos se aplicó para los dos tipos de queso (Oaxaca y fresco) más consumidos, entre noviembre de 2014 y octubre de 2015, con el fin de observar cualquier posible variabilidad estacional. En el punto de muestreo, se preguntó por la persona que prepara habitualmente las comidas y se le dio una explicación durante 5-10 min. El cuestionario se dejó en el punto de muestreo durante siete días con el fin de ser llenado por el entrevistado, a quien también se le pidió que indicara la edad, el sexo y el peso de cada miembro de su hogar, así como su consumo en cada comida (desayuno, almuerzo y cena). Con el fin de ayudar a los participantes para estimar su consumo propio y el de su familia el cuestionario incluyó cinco fotos que muestran diferentes porciones. Cada foto representado diferentes porciones que varían desde una pequeña a una porción grande (Anexos 2 y 3).

Una letra diferente se le asignó a cada foto para ayudar al entrevistado a rellenar el cuestionario (A (36 g), B (60 g), C (92 g), D (122 g) y E (184 g)). Estas porciones se determinaron a partir de 30 estudios preliminares. El queso Oaxaca se mostró en forma deshebrada, porque esta es la forma en que se consume comúnmente. El queso fresco se presentó en las dos formas en las que se consume: en rebanadas y rallado. En todas las fotos se incluyó un plato y un tenedor. El tenedor ayudó a la gente a identificar el tamaño de la porción.

5.2.3 Análisis estadístico.

Las tasas de consumo se calcularon para cada tipo de queso. Las tasas de consumo también se calcularon de forma individual (como la suma para cada individuo), para una casa (como la suma para cada individuo de la misma familia), y para diferentes categorías (edad, sexo, clase social y horario de comidas). Los resultados de consumo estarán representados en la forma de una función de distribución de probabilidad (PDF).

La estadística descriptiva tuvo como fin resumir el porcentaje de familias que no comen queso fresco, pero comen queso Oaxaca, el porcentaje de familias que no comen queso Oaxaca, pero consumen el queso fresco y el porcentaje de familias que consumen ambos tipos de queso.

Los datos del cuestionario de frecuencia de compra y el cuestionario del diario de alimentos se introdujeron en el software estadístico (@Risk). La tasa de consumo de media y el percentil 95 se calcularon para cada tipo de queso y para cada categoría.

Las comparaciones se realizaron entre los datos de los dos cuestionarios (de frecuencia de compra y el cuestionario diario de alimentos). Para detectar diferencias significativas entre la media, la mediana y la desviación estándar de la distribución, se utilizaron las pruebas de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis. Con el fin de obtener un análisis estadístico robusto, cuando el número de muestras fue muy diferente entre los grupos, se realizó un remuestreo para equilibrar su tamaño. Esto se llevó a cabo con el software @Risk usando un procedimiento de arranque.

5.3 Muestreo de quesos.

El muestreo de quesos se realizó de manera aleatoria, generando puntos de muestreo como se describió para la aplicación de los cuestionarios de consumo. Se realizaron muestreos en 2014, 2015 y 2016, para cada muestreo, se generaron 40 puntos de muestreo (Figura 5.2). En las coordenadas correspondientes al punto de muestreo, se buscó la tienda de abarrotes más

próxima y ahí se adquirió el queso. En los muestreos de 2014 y 2015 (40 muestras en cada año de 250 g de cada tipo de queso: fresco y Oaxaca) se analizaron plaguicidas y aflatoxinas y en el de 2016 (30 muestras de 750 g de queso Oaxaca) sólo aflatoxinas. El origen de los quesos muestreados en 2016 puede observarse en la Figura 5.3.

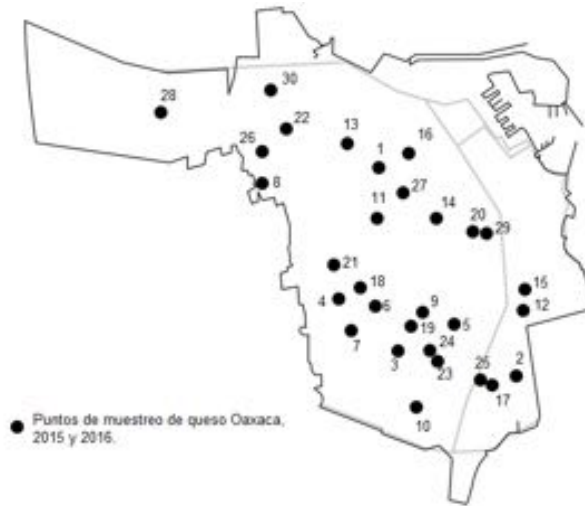


Figura 5.2 Puntos de muestreo de queso tipo Oaxaca en la ciudad de Veracruz en 2015 y 2016.

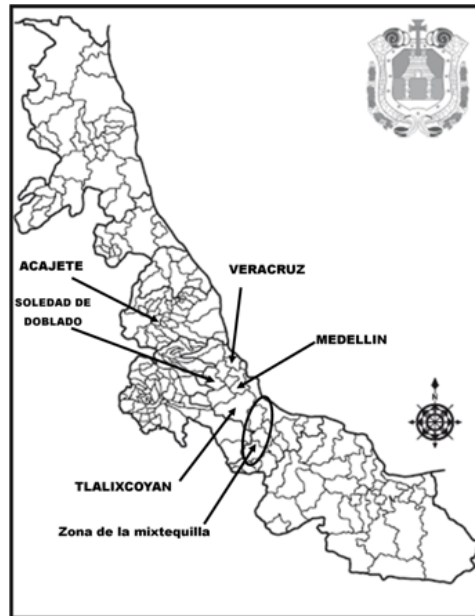


Figura 5.3 Origen del queso Oaxaca consumido en la ciudad de Veracruz en 2016.

5.4 Análisis de plaguicidas organoclorados en queso.

El análisis de plaguicidas organoclorados se realizó en el laboratorio Phytocontrol, el cual es un laboratorio de análisis fitosanitarios, en Nîmes, Francia, siguiendo la norma Norma Oficial Francesa NF EN 15662 (2009): Determinación del contenido de residuos de pesticidas en productos grasos de origen vegetal y animal por GC-MS: método interno.

5.4.1 Extracción de plaguicidas organoclorados.

Se pesaron 10 g de queso en un tubo centrífuga de Teflon de 40 mL. Se le adicionaron 10 mL de acetonitrilo y se agitó la muestra vigorosamente durante 1 min utilizando un mezclador de vórtice a la máxima velocidad. Después se adicionaron 4 g de MgSO_4 anhidro y 1 g de NaCl, se centrifugo el extracto por 1 minuto. Posteriormente se transfirió una alícuota de 1 mL de la capa superior de acetonitrilo en un vial de micro-centrífuga que contiene 25 mg de sorbente PSA y 150 MgSO_4 anhidro y se tapó herméticamente, se agitó con el mezclador de vórtice durante 30 segundos y el extracto de la centrifugación (o un lote de extractos) por alrededor de 1 min. Posteriormente se adicionó ácido fórmico al 5 % previo a la cuantificación por cromatografía de gases acoplada a detector de masas.

5.4.2 Cuantificación de plaguicidas organoclorados en queso fresco y Oaxaca.

La determinación de plaguicidas organoclorados (HCH y DDT) de las muestras colectadas en el 2014 y 2015 se realizó en el laboratorio Phytocontrol de Nîmes, Francia, siguiendo el método de la Norma Oficial Francesa NF EN 15662 (2009). Las muestras se analizaron en un equipo Bruker Scion 456, como fase estacionaria, se utilizó una columna B5-5M (30 x 0.25 x 0.25) empleando helio como gas acarreador a un flujo de 1.5 ml min^{-1} . Se inyectó 1 μl de muestra en el

CG-MS en modo split-less con un tiempo de inyección de 2 minutos a 300°C y sostenida por 3 min. La temperatura de inyección fue de 250°C y la temperatura de interface de 280 °C. El programa de temperatura del CG-MS fue el siguiente: la temperatura de inicio a 70 °C, permaneció así durante 2 min y posteriormente la temperatura se incrementó a 10 °C min⁻¹ hasta alcanzar 280°C y se mantuvo así por 10 min. Como estándar externo se utilizo el tributil-fostato. Las muestras fueron analizadas en modo monitoreo ión selectivo (SIM) con un detector de 1.5 kV y un *full scan* en un intervalo 50-500 m/z.

5.5 Análisis de aflatoxina M₁ en queso Oaxaca.

El análisis de aflatoxina M₁ en las muestras colectadas en 2014 y 2015 se realizó en el laboratorio Phytocontrol de Nîmes, Francia, siguiendo el método de la Norma Oficial Francesa NF en ISO 14501 (2007). A una muestra de 10 g de queso se le adicionaron 40 mL de metanol: agua 60:40 (v:v) y se homogenizó durante 5 min. El homogenizado fue centrifugado a 4000 rpm durante 10 min, al sobrenadante se le añadió un volumen igual de una solución de tween 20 (1:1) y se eluyó a través de una columna de inmunoafinidad (previamente acondicionada con solución de tween 20 (1:1) a razón de 5 mL min⁻¹) con un flujo de 2 mL min⁻¹. Las aflatoxinas fueron eluidas con acetonitrilo (ACN) a un flujo de 1 gota s⁻¹, llevadas a sequedad en rotaevaporador con atmósfera de nitrógeno a 60 °C y resuspendidas en agua:ACN (80:20, v:v), 50 µl fue inyectado en un cromatógrafo de líquidos equipado (Shimadzu Instruments, Kyoto, Japan) con un detector de espectrofluorimetría. La fase móvil fue una mezcla de agua: acetonitrilo (6: 4, v/v) con un caudal de 0,8 ml / min. El detector de fluorescencia, se ajustó a una longitud de onda de excitación de 360 nm y de emisión a 460 nm. El volumen de inyección fue de 50 µl.

El análisis de aflatoxina M₁ de los quesos muestreados en 2016 fue realizado en el laboratorio de micotoxinas del departamento de botánica del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México de la siguiente manera: la muestra fue extraída con metanol:agua (80:20 v:v) y centrifugada para obtener el sobrenadante, del cual se tomó el equivalente a 1 g de muestra disuelta en buffer de fosfatos (PBS) para ser eluido en una columna de inmunoafinidad Easi-Extract para AFM₁, previamente equilibrada con 20 mL de PBS. Las aflatoxinas fueron eluidas con hexano y agua, secadas y derivatizadas con solución derivatizante.

5.5.1 Secado de Queso Oaxaca

Para secar el queso Oaxaca, se utilizó un secador de charolas marca Apex modelo A39854-14. El proceso de secado, se realizó a una velocidad y temperatura de aire de 1.5 m/s y 60 °C, respectivamente, manteniendo estas

condiciones de operación constantes durante el proceso. La muestra consistía en 700 g de queso Oaxaca deshebrado (53% de humedad en base húmeda), fueron alimentadas en la cámara de secado, se tomaron muestras a diferentes intervalos de tiempo, para registrar la pérdida de peso y detener el secado al obtener un contenido final de agua de 10% base seca (aproximadamente 5-7 h a 80% de humedad relativa del aire de secado. El queso Oaxaca deshebrado secó se molió en una licuadora (Marca Oster modelo 6640) durante 1 min, el producto molido se empaco al vacío en bolsas trilaminadas y almacenas a 5 ± 1 °C, para realizar posteriormente la extracción de Aflatoxinas.

5.5.2 Efecto del método de extracción sobre la concentración de AFM₁.

La búsqueda bibliográfica sobre los métodos de extracción de aflatoxina M₁ en alimentos lácteos mostró que varios autores empleaban los mismos solventes en diferente proporción, esta información se resumió en los tres métodos que se describen a continuación.

- 1) El método 980.21 de la **AOAC** (2006), utilizado por Pietri *et al.* (1997); Battacone, (2005); Rubio *et al.* (2011) y Trombete (2014); todos a base de cloroformo, celita y NaCl.
- 2) La metodología de **R-Biopharm** (2016), empleado por Iha (2012), que emplea metanol, agua y NaCl, recomendado para usar con las columnas de inmunoafinidad (IAC) Easi-Extract. Este método fue el usado en los análisis de AFM₁ en Nîmes, Francia.
- 3) El utilizado por **Cavaliere et al.**, (2006), con acetona, columnas de sílica gel con carbón activado, metanol y agua.
- 4) Además, se estableció un método **Testigo** a base de metanol:agua (80:20 v:v) y NaCl.

5.5.2.1 Método Oficial 980.21 de AOAC (2006).

Se homogenizaron 15 g queso molido seco con 5 g de celita, 100 mL de cloroformo y 2 g de NaCl por 1 min. El homogenizado fue centrifugado a 4500 rpm

por 15 min. Tres porciones de 6.7 mL del sobrenadante (equivalente a 1 g de muestra) se disolvieron en 20 mL de PBS, se adicionaron 5, 20 y 40 ng de estándar de AFM₁ en cada porción y se colocaron en columnas de inmunoafinidad, se eluyó con MeOH grado HPLC. Al eluido seco se le adicionaron 200 µL de acetonitrilo y 800 µL de solución derivatizante (5 mL de ácido trifluoroacético (ATF), 2.5 mL de ácido acético glacial y 17.5 mL de agua desionizada). La derivatización se realizó por triplicado. De este medio se inyectaron, por triplicado, 60 µL al HPLC.

5.5.2.2 Método empleando columnas Biopharm Rhône-Ltd.

Una muestra de 15 g de queso Oaxaca molido seco se homogenizó (Waring Commercial Laboratory Blender, Modelo WF2211214, Torrington Connecticut 06790 USA) durante 1 min con 100 mL de MeOH:agua (80:20 v:v) y 2 g de NaCl. El homogenizado fue centrifugado (Genesys 10 UV Thermo Electron Corp. Madison, WI 53711 USA) a 4500 rpm durante 15 min. Tres porciones de 6.7 mL del sobrenadante (equivalente a 1 g de muestra) se disolvieron en 24 mL de PBS, se adicionaron 5, 20 y 40 ng de estándar de AFM₁ en cada porción y se colocaron en columnas de inmunoafinidad (previamente equilibradas con PBS a un flujo de 5 mL min⁻¹), se eluyó con 1.5 mL de MeOH grado HPLC y posteriormente 1.5 mL de agua destilada a un flujo de 2 mL min⁻¹. Los 3 mL de eluido fueron secados en un horno (Novatech BTC-9100) a 40 °C. Al eluido seco se le adicionaron 200 µL de acetonitrilo y 800 µL de solución derivatizante (5 mL de ATF, 2.5 mL de ácido acético glacial y 17.5 mL de agua desionizada). La derivatización se realizó por triplicado. De este medio se inyectaron, por triplicado, 60 µL al HPLC (Agilent Technologies Series 1200 bomba DE6295-7044).

5.5.2.3 Método de Cavaliere.

Para fines de esta tesis se ha designado método de Cavalier al utilizado por Cavaliere *et al.* (2006), el cual se describe a continuación. Se licuaron 15 g queso

tipo Oaxaca molido seco con 150 mL de acetona, se centrifugó a 4500 rpm por 15 min y a 3 porciones de 6.7 mL del sobrenadante (1 g de muestra) se le adicionaron 5, 20 y 40 ng g⁻¹ de estándar de AFM₁ y se pasaron por cada uno de los 3 tubos de 10 mL rellenos con 3 g sílica gel y 250 mg carbón activado (Supelco LC-18) contenido entre 2 frits. Se eluyó con MeOH: agua (80:20 v/v), el eluido seco se derivatizó y se inyectó al HPLC.

5.5.2.4 Variables para la selección del método de extracción.

Para la selección del método analítico se siguió el procedimiento descrito por García y Alcántara (2002). A continuación se describen las variables de selección evaluadas con cada método de extracción.

5.5.2.4.1 Linealidad del método (curvas de calibración).

Se inyectaron cada una de las 10 concentraciones de AFM₁ y 6 para AFM₂ y se graficó la respuesta de la señal analítica (área bajo la curva de cada pico cromatográfico) contra la concentración del analito, se obtuvo la ecuación de la curva y se calcularon el valor de la pendiente (b_1), la ordenada al origen (b_0), el coeficiente de correlación (R^2), el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$) y la desviación estándar.

5.5.2.4.2 Límites de detección y de cuantificación.

Los límites de detección y de cuantificación se determinaron con base en la curva de calibración y en la desviación estándar de regresión. Para tal fin, se midió la respuesta analítica a las 3 concentraciones descritas anteriormente (5, 20 y 40 $\mu\text{g kg}^{-1}$) y se calcularon los siguientes parámetros: el valor de la pendiente (b_1), el coeficiente de correlación (R^2), la desviación estándar de regresión ($S_{y/x}$) y el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$).

En el caso del límite de detección se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{LOD} = 3.3 \times S_{(y \ x^{-1})} b_1^{-1} \quad (1)$$

Donde: $S_{y/x}$ es la desviación estándar de regresión y b_1 es el valor de la pendiente.

Y en caso del límite de cuantificación se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{LOQ} = 10 \times S_{(y \ x^{-1})} b_1^{-1} \quad (2)$$

Donde: $S_{y/x}$ es la desviación estándar de regresión y b_1 es el valor de la pendiente.

5.5.2.4.3 Porcentaje de recuperación.

Se utilizaron muestras de 15 g de queso Oaxaca seco y molido, se tomaron alícuotas de 1 g de queso para añadirle 5, 20 y 40 ng g⁻¹ de estándar de AFM₁ en forma individual. Cada método se usó para ver su eficiencia y obtener el porcentaje de recuperación de la AFM₁. Se utilizó una alícuota a la cual no se añadió estándar como testigo para conocer la contaminación basal.

5.5.3 Preparación del estándar de AFM₁.

La solución estándar se preparó disolviendo 0.25 mg de estándar de AFM₁ (Sigma-Aldrich N° Cat. A-6428, Toluca, México; producido por *Aspergillus flavus*) en benceno:acetonitrilo (98:2 v:v). Ésta es la solución patrón de concentración desconocida, la metodología (AOAC, 2005) es la siguiente:

La absorbancia de la solución estándar de AFM₁ se midió a 357 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10 UV Thermo). La concentración de AFM₁ se calculó con la siguiente fórmula:

$$X = (A) \times (328 \text{ PM AFM}_1) / (\text{Coeficiente de extinción } 21,250).$$

Se calculó el inverso de la concentración de AFM_1 ($1/x$) y se restó de 1000 μL para dar el volumen de MeOH para obtener una solución de 1000 ng de AFM_1 .

5.5.4 Análisis estadístico de la concentración de AFM_1 en queso Oaxaca con diferentes métodos.

El análisis estadístico se realizó mediante el programa Minitab versión 16; se hizo un análisis de varianza con prueba de Tukey al 95%, las extracciones y los análisis se realizaron por triplicado considerando un queso como unidad experimental. Las gráficas se realizaron con el programa Kaleidagraph versión 3.5.

5.6 Estimación probabilística del riesgo a la exposición de aflatoxina M_1 en queso Oaxaca.

5.6.1 Función de la densidad de probabilidad (PDF) de la ingesta diaria estimada (EDI) y del peso de la población.

A partir de los datos del cuestionario diario de alimentos se elaboró una función de densidad de probabilidad del consumo de queso (g) por día por persona y del peso de los habitantes de la ciudad de Veracruz.

5.6.2 Función de densidad de probabilidad de contaminación por AFM_1 y AFM_2 .

De los datos de contaminación por Aflatoxinas (AFM_1 y AFM_2), se generaron funciones de densidad de probabilidad para cada una de las aflatoxinas. Cuando el valor de contaminación en la muestra está por debajo del límite de detección del equipo, se utilizan dos principios; el límite inferior (LI) y el límite superior (LS). Cuando el valor de la muestra es menor que el límite de detección, en el límite inferior se pone el valor de "0" y en el límite superior el valor del "LOD" (LOD= limit of detection). Cuando el valor de la muestra es mayor que el límite de detección, en el límite inferior se pone el valor de "LOD" y en el límite superior el valor del "LOQ" (LOQ= Limit of quantification).

5.6.3 Generación de la PDF de la ingesta diaria estimada (IDE) de AFs por consumo de queso Oaxaca.

Con el fin de estimar el consumo de queso Oaxaca en la ciudad de Veracruz y posteriormente evaluar la exposición por consumo de AFM₁ y AFM₂, la población fue clasificada en grupos, de acuerdo a su género, edad, clase social.

La estimación de la ingesta diaria (IDE) de AFM₁ y AFM₂ fue reportada en $\mu\text{g AFs/kg pc / día}$ (FAO/WHO, 1999):

$$\text{IDE} = C * I / P_c \quad (3)$$

Donde:

C = PDF de la contaminación de AFs en queso Oaxaca ($\mu\text{g/kg}$)

I = PDF de la ingesta diaria de queso Oaxaca por día (g/día)

P_c: PDF del peso corporal de la población de la Ciudad de Veracruz (kg pc).

La evaluación de la exposición se realizó usando un método probabilístico; las PDFs fueron generadas para cada uno de los parámetros de la ecuación (3).

La ingesta alimentaria se ajustó a una función de densidad de probabilidad para los sectores estudiados y para la población consumidora total mediante el método de Monte Carlo con 10,000 iteraciones. El valor de la exposición se obtuvo a través del Método de Monte-Carlo en el cual se realizan diversas iteraciones de las PDFs generadas. Tanto las PDFs como las simulaciones para el cálculo de la exposición se realizaron con el software @Risk 6 (Palisade Corp.) Se utilizaron 10,000 iteraciones en cada simulación. Todos los valores de exposición se realizaron en la población consumidora de Oaxaca.

En el caso de los datos de contaminación por Aflatoxinas (AFM₁ y AFM₂), se generaron funciones de densidad de probabilidad para cada una de las Aflatoxinas siguiendo dos hipótesis:

- Cuando el valor de contaminación en la muestra está por debajo del límite de detección del equipo, se utilizan dos principios; el límite inferior (LI) y el límite superior (LS).
- Cuando el valor de la muestra es menor que el límite de detección, en el límite inferior se pone el valor de “0” y en el límite superior el valor del “LOD”. Cuando el valor de la muestra es menor que el límite de detección, en el límite inferior se pone el valor de “LOD” y en el límite superior el valor del “LOQ”.

5.6.4 Cálculo de exposición del riesgo por consumo de AFs en queso Oaxaca

El porcentaje de la población en riesgo se determinó mediante el área bajo la curva de la IDE a la derecha la ingesta diaria tolerada (TDI) ó ingesta diaria aceptada (IDA).

5.6.5 Análisis estadístico de datos

En este apartado se describen las pruebas utilizadas para el análisis estadístico de los datos utilizados para la evaluación probabilística de riesgo.

5.6.5.1 Generación de las funciones de densidad de probabilidad

Los estadísticos descriptivos y funciones de densidad de probabilidad (PDF) fueron estimados utilizando @Risk6 (Palisade, Inc). Los estadísticos descriptivos incluyeron media, mediana, moda, desviación estándar y el 95 percentil. Todos los cálculos fueron realizados bajo un enfoque probabilístico.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados se presentarán en el siguiente orden, primero los resultados de los cuestionarios, tanto del cuestionario de frecuencia de compra como del cuestionario diario de consumo; posteriormente se presentarán los resultados del contenido de pesticidas organoclorados, los resultados de la selección del método de extracción de aflatoxinas, y los del contenido de aflatoxinas en quesos. En una última sección, se presenta los resultados concernientes a la evaluación del riesgo.

6.1 Características de los consumidores.

6.1.1 Cuestionario de frecuencia de compra (CFC): Características y preferencias de consumo.

En el cuestionario de frecuencia de compra (CFC), todos los habitantes invitados a participar, acordaron llenar la encuesta. De los 100 hogares entrevistados, 98 consumieron queso fresco y Oaxaca. Esta encuesta fue completada por el habitante que suele preparar la comida dentro del hogar. Entre los habitantes encuestados los cuales mencionaron que la familia consumía queso, 7 eran hombres y 91 eran mujeres.

Los resultados de este cuestionario también mostraron las preferencias de compra de los diferentes tipos de quesos (Tabla 5.1). El queso fresco y el queso Oaxaca fueron los quesos de mayor consumo entre la población de la ciudad de Veracruz. Por otra parte, de las 98 familias encuestadas, 24 sólo consumen queso fresco, 6 consumen únicamente queso Oaxaca y 68 consumen ambos tipos de quesos.

La Tabla 6.1 muestra el nivel de educación, la ocupación, y la temporada preferencial para el consumo de queso. Se solicitó información relacionada con la clase social y el horario de comidas en este cuestionario y en el diario de

alimentos. Esto, junto con la información sobre el consumo de quesos frescos y Oaxaca obtenidos a partir del diario de alimentos, permitió validar a ambas encuestas.

Tabla 6.1 Preferencia de consumo y características de los consumidores de la ciudad de Veracruz (n = 98).

Tipos de quesos	% Compra	Tipo de Queso	% Compra
Fresco	90%	Requeson	10%
Oaxaca	75%	Parmesano	7%
Manchego	35%	Mozzarella	3%
Americano	12%	Cottage	1%
Nivel de educación	Proporción de familias (%)	Ocupación del jefe de familia	Proporción de familia (%)
Grado Escolar	5.1	Hogar	42
Preparatoria	33.7	Empleado	34
Secundara	38.8	Negocio propio	20
Primaria	7.1	Desempleado	2
Tecnico	14.3	Estudiante	2
Sin educación	1.0		
Características de lugar y tiempo de consumo			
Horario de comida	Proporción de familia (%)	Época del año	Proporción de familia (%)
Desayuno	24.5	Primavera	9
Comida	48.9	Verano	2
Cena	7.1	Otoño	0
Todo el día	19.4	Invierno	4
		Todo el año	85
Características de lugar de compra y almacenamiento			
Lugar de compra	Proporción de familia (%)	Lugar de almacenamiento	Proporción de familia (%)
Abarrotes	27	Refrigerator	96
Mercado	31	Vitrina	3
Supermercado	41	Hielera	1
Detallistas	1		

6.1.2 Peso y patrones de consumo de la población de la Ciudad de Veracruz.

Los resultados obtenidos en el Cuestionario de Ingesta Alimentaria (CIA) son similares al peso del hombre y la mujer mexicana publicado por la (CANAIVE 2012) que reporta que el peso para las mujeres es de 68.7 kg y para los hombres de 74.8 kg (Tabla 6.2).

Tabla 6.2 Parámetros de la distribución de probabilidad del peso (kg) de la población consumidora de queso mayor de 14 años en la ciudad de Veracruz.

Género	Queso fresco		Queso Oaxaca	
	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres
Media(kg)	73.8	65.5	73.9	65.7
Mediana (kg)	75.0	65.0	75.00	65.0
Desviación estándar	13.7	11.8	14.1	11.7
P95 (g)	96.0	85.0	97.0	85.0

El cuestionario de ingesta alimentaria (diario de alimentos) también mostró que hay diferencia significativa entre el consumo de queso fresco y queso Oaxaca ($p < 0.05$), siendo el consumo de queso fresco más alto. Estos resultados confirman lo que se observó en el Cuestionario de Frecuencia de Compra (CFC), por ejemplo; que el 90% y el 75 % de las familias compran queso fresco y Oaxaca, respectivamente (Tabla 6.3). La media de consumo de ambos tipos de queso fresco y Oaxaca, obtenida del diario de alimentos es más grande que la mediana de consumo por el mismo método. Esto no se observa con la media y la mediana de consumo obtenida por el CFC (Tabla 6.3).

Tabla 6.3 Comparación de los parámetros de las distribuciones de probabilidad de la compra y consumo de cada tipo de queso por semana y por familia en la ciudad de Veracruz.

	Queso Fresco		Queso Oaxaca	
	Cantidad de compra	Cantidad de consumo	Cantidad de compra	Cantidad de consumo
n	92	299	74	279
Media (g)	994.6 ^a	1,174.9 ^b	819.3 ^a	1040.2 ^b
Mediana (g)	1,000.0	788.0	750.0	656.0
Desviación estándar	676.7	1,422.9	553.2	1,342.0
P95 (g)	2,000.0	3,726.0	2,000.0	3270.0

El test ^{**}Mann Whitney se aplicó para determinar diferencias significativas entre las columnas (1 y 2) y (3 y 4). Las diferentes letras representan diferencia significativa.

Esto se podría explicar por el hecho de que una gran proporción de familias compran queso dos veces al mes (quincenalmente) o más esporádicamente. Así, el consumo promedio se eleva. Un patrón similar de consumo se observó para las

familias que consumen queso fresco y queso Oaxaca juntos o separadamente (Tabla 6.4)

Tabla 6.4 Comparación de los parámetros de las distribuciones de probabilidad de la cantidad de cada tipo de queso consumido por familia, por día, en la ciudad de Veracruz.

	^{*1} Queso fresco	^{*1} Queso Oaxaca c	^{*2} Sólo queso fresco	^{*2} Sólo queso Oaxaca
n	299	279	28	9
Media(g)	167.5 ^a	152.1 ^b	143.4 ^{a*}	196.1 ^{b*}
Mediana (g)	112.0	93.7	111.0	133.7
Desviación estándar	197.6	198.3	109.8	214.9
P95 (g)	532.3	494.0	365.1	672.3

Se aplicó la prueba ^{*1}Mann Whitney para determinar diferencias significativas entre las columnas. Las diferentes letras representan una diferencia significativa, * no hay diferencia estadística para los consumidores de un solo queso

El consumo de queso fresco y queso Oaxaca de 0-8 años de edad es significativamente menor que el medido para el grupo de 14 a 17 años, mientras que no hubo diferencias significativas entre los niños de entre 0-8 años de edad y 9 a 13 años de edad (Tabla 6.5). Esto podría significar que los niños tienden a comer una cantidad similar de queso durante su transición de niños a adolescentes.

Tabla 6.5 Comparación de los parámetros de las distribuciones de probabilidad de la cantidad de cada tipo de queso consumido diariamente por niños y adolescentes, en la ciudad de Veracruz.

Rango de Edad	⁺¹ Queso fresco			⁺² Queso Oaxaca		
	0-8	9-13	14-17	0-8	9-13	14-17
n	69	66	81	65	62	76
Media (g)	39.9 ^a	49.7 ^a	63.9 ^b	40.1 ^a	42.9 ^a	62.4 ^b
Mediana (g)	24	30.9	40	27.4	27.4	37.1
Desviación estándar	37.8	58.8	62.0	42.9	54.6	55.8
P95 (g)	130.6	205.4	190	135.4	107.4	182.0

El test de Kruskal Wallis se aplicó para determinar si hay diferencia significativa entre ⁺¹las columnas de Queso fresco (0-8, 9-13 y 14-17) y ⁺² Queso Oaxaca (0-8, 9-13 y 14-17).

El consumo de queso fresco y queso Oaxaca en adultos está influenciado por los grupos de edad. El queso fresco es más consumido por hombres en los grupos de edad entre 18-40 años y 41-59 años, que en los hombres de 60 años (Tabla 6.6). Sin embargo, si hay diferencias significativas en el consumo de las mujeres de entre 18 a 40 años y 41 a 59 años. Las mujeres son más susceptibles a la pérdida de calcio, por lo que es posible que consuman más queso. En cuanto al queso Oaxaca, se observó que no hay diferencia significativa en el consumo de queso en hombres en el grupo de edad de 18 y 40 años y 41 a 59 años de edad. Esto podría ser porque realizan más actividad física, por lo tanto, requieren una mayor ingesta de alimentos en comparación con los hombres mayores de 60 años de edad. Estos resultados sugieren que el consumo de ambos tipos de queso puede estar influenciado por la actividad física en hombres, en las mujeres en los requerimientos nutricionales para cada grupo de edades, y la demanda de energía requerida por los adultos en edad productiva. Sin embargo, también puede estar influenciada por las preferencias de los tipos de queso y por el poder adquisitivo de compra de los individuos (Tabla 6.6).

Tabla 6.6 Comparación de los parámetros de las distribuciones de probabilidad del consumo diario de queso fresco y Oaxaca por género e intervalo de edad, en la ciudad de Veracruz.

Parámetros	Queso Fresco					
	*1Hombres			*2Mujeres		
n	221	122	44	223	144	37
Edad	18-40	41-59	>60	18-40	41-59	>60
Media(g)	51.9 ^a	57.2 ^b	38.7 ^b	48.8 ^a	44.8 ^a	46.4 ^a
Mediana (g)	34.9	36	30.9	30.3	29.1	27.4
Desviación estándar	58.4	63.9	34.8	55.8	39.9	45.1
P95 (g)	184.3	243.7	122.0	179.4	121.7	164.0
Parámetros	Queso Oaxaca					
	Hombres			Mujeres		
n	197	110	33	205	130	30
Edad	18-40	41-59	>60	18-40	41-59	>60
Media (g)	49.9 ^a	51.7 ^a	34.9 ^b	45.8 ^a	40.4 ^a	42.7 ^a
Mediana (g)	32.0	32.0	18.9	29.1	27.4	27.4
Desviación estándar	56.1	62.3	43.2	58.2	41.7	42.9
P95 (g)	142.0	204.6	186.9	152.6	130.3	137.4

El test Kruskal Wallis se aplicó para determinar si hay diferencia significativa entre *1la columna de hombres(18-40, 41-59 and >60) y *2Mujeres (18-40, 41-59 and >60)

En el presente estudio, la tasa de consumo de la población adulta de queso fresco y Oaxaca, corresponde a 50.9 g person⁻¹ día⁻¹ y 47.8 g persona⁻¹ d⁻¹ respectivamente (Tabla 6.7). Estos valores son más altos que los publicados por la CDIC (2015) y lo reportado en la encuesta ENURBAL (Ávila *et al.*, 2002; Ávila *et al.*, 2007), en la ciudad de México (2002, 2007), las cuales coinciden con el consumo de queso Oaxaca reportado por Rosado *et al.*, 1992.

Tabla 6.7 Comparación de los parámetros de las distribuciones de probabilidad de la cantidad de cada tipo de queso consumido diariamente por la población mayor de 14 años en la ciudad de Veracruz.

Tipo de Queso	Queso fresco	Queso Oaxaca	Sólo queso fresco	Sólo queso Oaxaca
n	872	781	140	49
Media (g)	50.9 ^a	47.8 ^b	41.1 ^a	60.7 ^b
Mediana (g)	34.3	30.6	29.1	44.6
Desviación estándar	55.4	54.7	34.5	73.9
P95 (g)	170.6	162.6	102.0	135.7

El test Mann Whitney se aplicó para determinar diferencias significativas entre las columnas. Las diferentes letras representan diferencias significativas. Si hay diferencia significativa entre los consumidores de un solo tipo de queso

El consumo promedio de queso fresco y Oaxaca para hombres y mujeres fue de 53 g y 48.9 g respectivamente, mientras que el consumo promedio para queso Oaxaca para hombres y mujeres es de 48 g y 45.17 g respectivamente (Tabla 6.8). Sin embargo, sólo el 5% de la población masculina consume más de 164.5 g de queso/día de algún tipo de queso, y solo el 5 % de las mujeres entrevistadas consumen más de 152.6 g/día de cualquiera de los dos quesos. Hay diferencia significativa entre el consumo promedio de queso fresco entre hombres y mujeres ($p < 0.05$), que no no hay diferencia significativa entre el consumo promedio de queso Oaxaca entre hombres y mujeres ($p > 0.05$).

Tabla 6.8 Comparación de los parámetros de las distribuciones de probabilidad de la cantidad de cada tipo de queso consumido diariamente por género, en la ciudad de Veracruz.

	Queso fresco		Queso Oaxaca	
	Hombres ^{1§}	Mujeres ^{1§}	Hombres ^{2§}	Mujeres ^{2§}
n	430	442	381	400
Media (g)	53.01 ^a	48.9 ^b	50.6 ^a	45.2 ^a
Mediana (g)	36.8	30.3	32.0	28.6
Desviación estandar	54.1	52.1	57.4	52.0
P95 (g)	164.5	157.1	186.0	152.6

El test Mann Whitney se aplicó para determinar diferencias entre ¹las columnas §¹ de queso fresco (Hombres y mujeres) y ²§² las columnas de queso Oaxaca (Hombres y mujeres). Las diferentes letras representan si existe diferencia significativa, * si hay diferencia significativa entre los consumidores de un solo queso.

De las 309 familias entrevistadas, sólo el 86 % indicó la clase social a la que pertenecen. De este número el 12 % reportó que pertenecen a la clase alta, el 76 % a la clase media, y el 12 % a la clase baja (Tabla 6.9). El queso fresco es más consumido entre la clase alta y la clase media. La mediana para esta clase social es de 35.7 g y 31.8 g, respectivamente, mientras que la mediana de consumo para la clase baja es de 24.1 g. Sin embargo, no hay diferencia significativa. No hay diferencia de consumo entre los de clase alta y los de clase media ($p > 0.05$) pero sí hay diferencia significativa entre el valor de la mediana de consumo de la clase alta y la clase media, con respecto a la clase baja ($p < 0.05$).

El queso Oaxaca es preferentemente consumido por la clase alta, si hay diferencia significativa entre el valor de la mediana de consumo entre la clase alta, con respecto a la clase media y la clase baja. Esto podría ser debido a que la clase baja tiene menos ingresos para comprarlo, porque el queso Oaxaca tiene el doble de precio que el queso fresco. Esto puede estar argumentado debido a que el estatus socioeconómico puede influir en el consumo de queso (Tabla 5.9). Un comportamiento similar se reportó por Bashir (2011) quien evaluó el precio de los productos lácteos (incluyendo el queso), con respecto a los indicadores tales como el estatus socioeconómico y la edad. El precio de los productos lácteos tales como

el queso, influencia directamente la frecuencia de consumo de este producto (Kubicova *et al.*, 2014).

Tabla 6.9 Comparación de los parámetros de las distribuciones de probabilidad de la cantidad de cada tipo de queso consumido diariamente por clase social, en la ciudad de Veracruz.

	Queso fresco			Queso Oaxaca		
	Clase alta	Clase media	Clase baja	Clase alta	Clase media	Clase baja
n	30	199	33	29	181	31
Media (g)	48.7	49.0	28.6	56.8	42.4	35.0
Mediana (g)	35.7 ^b	31.8 ^b	24.1 ^a	38.7 ^b	28.2 ^a	25.9 ^a
Desviación estándar	51.5	50.1	17.2	50.7	44.2	28.8
P95 (g)	107.2	179.4	60.4	165.4	131.9	88.4

El test Kruskal Wallis test se aplicó para determinar diferencias entre ^{*1} las columnas de queso fresco (clase alta, clase media y clase baja) y ^{*2} las columnas de queso Oaxaca (clase alta, clase media y clase baja).

Los datos muestran (Tabla 6.10) que durante la comida se consumen cantidades similares de ambos tipos de queso, esto podría deberse a que la comida (almuerzo) es la principal comida de la población de Veracruz, porque durante el día las personas realizan la mayor parte de sus actividades y por lo tanto requieren más ingesta de alimentos nutritivos. Esto coincide con lo encontrado por Smith (2010), quien argumentó que en la población Mexicana el almuerzo es la principal comida del día.

Los datos de consumo de queso per cápita a nivel nacional se obtienen sumando las importaciones a la producción nacional, restando las exportaciones y dividiendo el resultado entre la población total (dentro de la población total se incluyen los no consumidores de queso). El valor del consumo de queso por persona por día en este estudio es superior a la reportada para el consumo per cápita en 2013, como se muestra en la Tabla 6.11.

Tabla 6.10 Comparación de los parámetros de las distribuciones de probabilidad de la cantidad de cada tipo de queso consumido diariamente en cada comida, en la ciudad de Veracruz.

	Queso fresco ^{*1}			Queso Oaxaca ^{*2}		
	Desayuno	Comida	cena	Desayuno	Comida	cena
n	783	742	572	649	563	578
Media (g)	163.3 ^{ab}	175.0 ^b	160.4 ^a	155.1 ^a	183.3 ^b	158.8 ^a
Mediana (g)	128.0	131.3	116.5	108.0	131.2	113.5
Desviación estandar	146.9	164.2	149.1	145.6	171.3	147.4
P95 (g)	420	454.9	436.1	458.0	475.5	442.7

El test Kruskal Wallis se aplicó para determinar diferencias significativas entre ^{*1}las columnas de queso fresco (Desayuno, comida y cena) y ^{*2}queso Oaxaca (Desayuno, comida y cena).

Tabla 6.11 Comparación de consumo de queso en el mundo.

Regiones	Consumo global de queso 2013 (kg per capita)	Consumo de Queso (g/persona/día)
Argentina	12.4	33.9
Brasil	3.7	10.1
Chile	8.8	24.1
Colombia	0.9	2.5
Uruguay	8.5	23.5
México [*]	3.6	9.9
Canada	12.2	33.4
Estados Unidos	15.4	42.2
Francia	25.9	70.9
Ciudad de México		41 (Queso Oaxaca)**
		51 (Queso Americano)**
Ciudad de México	---	15.6 ⁺⁺
Ciudad de México	---	19.9 [*]
Veracruz (Este estudio)	---	50.9 ⁺
Veracruz (Este estudio)	---	47.8 ^x

CDIC, 2015; *SAGARPA, 2015; ^{*}queso fresco; ^xqueso Oaxaca; ^{**}Rosado *et al.*, 1992; ⁺⁺ENURBAL 2002; ^{*}ENURBAL 2007.

El mayor consumo de queso por persona por día en este estudio comparado con el consumo per cápita en 2013, puede ser debido a la inclusión de los no consumidores en el cálculo nacional per cápita, el cual reduce en gran medida la proporción resultante. Por otra parte, el cálculo per cápita sólo incluye información sobre la fabricación y venta de quesos sometidos a controles sanitarios, comerciales y fiscales, no incluye la comercialización de queso

artesanal (que representa el 53% de la producción total de leche), por lo tanto la cantidad de queso utilizado en el cálculo oficial per cápita es inferior al real. Un fenómeno similar se informó de Rossini (2015) que evaluó el consumo de queso en Argentina a través de entrevistas en los hogares y revisó el cálculo del consumo mensual de queso con y sin la población no consumidora. En el primer caso, el consumo per cápita fue de 1.3 kg/persona/mes y en el segundo caso fue de 2.4 kg/persona/mes. La encuesta ENURBAL (Ávila *et al.*, 2003, Ávila *et al.*, 2007), que se llevó a cabo con la población de la Ciudad de México (2002, 2007), a través de encuestas de recordatorio de 24 h, revelaron que el queso es uno de los alimentos más consumidos, con un consumo de 15.6 y 19.9 g/persona/día en 2002 y 2007, respectivamente. Los datos de ENURBAL resultaron estar por debajo a los resultados obtenidos en esta investigación, el cual podría deberse al hecho de que la encuesta realizada se basa en un método de recordatorio de 24 h, mientras que nuestro trabajo utiliza un diario de alimentos durante 7 días, por lo tanto cubren un período más largo de tiempo, registrando el consumo de queso en una proporción mayor. Rosado *et al.*, (1992) reportó los valores obtenidos por la encuesta ENSANUT (1974) para el consumo de queso Oaxaca. Esta encuesta fue llevada a cabo a lo largo del país y se estudia el consumo urbano y rural por separado. A pesar de que el consumo de queso fresco no se reportó, el consumo de queso fresco obtenido en el presente estudio es similar a la de queso americano reportado por Rosado *et al.*, (1972) (Tabla 6.11). Esto sugiere que la tasa de consumo de queso Oaxaca no ha variado entre los adultos desde 1974, lo cual soporta el consumo crónico de queso.

6.2 Plaguicidas organoclorados en queso fresco y Oaxaca

Con respecto a la contaminación de plaguicidas en quesos fresco y queso Oaxaca, se decidió muestrear tanto en la época de secas como la de lluvias. En la Tabla 6.12 se puede observar que, bajo las condiciones de análisis, no se detectó la presencia de HCH y DDT.

Tabla 6.12 Concentración de HCH y DDT en muestras de quesos colectados en época de secas y de época de lluvias en la ciudad de Veracruz.

Queso fresco				Queso Oaxaca			
No.	Muestra	∑DDT	∑HCH	No.	Muestra	∑DDT	∑HCH
1	2 ES	ND	ND	11	4 ES	ND	ND
2	4 ES	ND	ND	12	5 ES	ND	ND
3	5 ES	ND	ND	13	8 ES	ND	ND
4	8 ES	ND	ND	14	10 ES	ND	ND
5	10 ES	ND	ND	15	2 ES	ND	ND
6	33 EP	ND	ND	16	1 EP	LOD<0.01	ND
7	1 EP	ND	ND	17	2 EP	ND	ND
8	2 EP	ND	ND	18	3 EP	ND	ND
9	4 EP	ND	ND	19	4 EP	ND	ND
10	5 EP	ND	ND	20	5 EP	ND	ND

ES: Época de secas; EP: Época de Lluvias; ND: No detectado

6.3 Aflatoxina M₁ en queso Oaxaca.

6.3.1 Efecto del método de extracción sobre la concentración de aflatoxinas.

A continuación se presentan los resultados de las variables que se analizaron para seleccionar el método de extracción de AFM₁ en queso Oaxaca.

6.3.1.1 Linealidad de las curvas de calibración de los estándares de AFM₁ y AFM₂.

A partir de los resultados obtenidos en los cromatogramas para cada concentración de AF, se realizaron las curvas de calibración que se muestran en el Anexo A4. La linealidad de cada recta se evaluó con el coeficiente de regresión lineal (R²). En el Anexo 4, se observan las concentraciones con su respectiva área y tiempo de retención para cada AF.

6.3.1.2 Límites de detección y de cuantificación.

Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) se determinaron con la desviación estándar de la regresión lineal de cada curva de calibración de AFMs. En la Tabla 6.13 se presentan las ecuaciones de la curva de calibración, LOQ, LOD y el coeficiente de correlación.

Tabla 6.13 Límites de detección para AFM₁ y AFM₂.

Aflatoxina	Ecuación de regresión	LOD (ng g ⁻¹)	LOQ (ng g ⁻¹)	R ²
AFM ₁	y = 1.1718x-4.18	0.1	0.5	0.9834
AFM ₂	y = 0.7111x-1.0247	0.05	0.2	0.9946

6.3.1.3 Porcentaje de recuperación de los 3 métodos de extracción.

En la Tabla 6.14 se presenta el porcentaje de recuperación de los tres métodos de extracción para queso Oaxaca. A partir de estos tres resultados (linealidad, límites de detección y cuantificación y porcentaje de recuperación) se eligió el método de extracción.

Tabla 6.14 Porcentaje de recuperación de los métodos de extracción de AFM₁ en queso Oaxaca.

Método	Porcentaje de recuperación de los tres métodos de extracción para Queso Oaxaca.				
	AFM ₁ Total	AFM ₁ (ng g ⁻¹) inyectada	AFM ₁ Total	AFM ₁ Recuperada	Porcentaje de recuperación
AOAC (5 ng g ⁻¹)		5	11.82	4.86 ± 0.88	41.1
AOAC (20 ng g ⁻¹)		20	26.82	26.37 ± 3.70	98.3
AOAC (40 ng g ⁻¹)		40	46.82	42.70 ± 1.54	91.2
Testigo de AOAC	6.82±0.94				77 %
Biopharm (5 ng g ⁻¹)		5	9.71	8.98 ± 0.14	92.5
Biopharm (20 ng g ⁻¹)		20	24.71	24.51 ± 0.85	99.2
Biopharm (40 ng g ⁻¹)		40	44.71	42.26 ± 1.32	94.5
Testigo de Biopharm	4.71±0.58				95 %
Cavaliere (5 ng g ⁻¹)		5	9.04	6.0 ± 0.75	66.4
Cavaliere (20 ng g ⁻¹)		20	24.04	16.86 ± 0.64	70.1
Cavaliere (40 ng g ⁻¹)		40	44.04	41.38 ± 1.72	94.0
Testigo de Cavaliere	4.04±0.15				85 %

AFM₁ = Aflatoxina M₁; AFM₂ = Aflatoxina M₂; AFMt = Total de Aflatoxinas M₁; DS = Desviación estándar.

Se seleccionó el método de R-Biopharm, que presentó 95 % de recuperación, en comparación del método de AOAC que presentó 77 % y el método de Cavaliere 85 %. El método de la AOAC utiliza un solvente tóxico, volátil, cancerígeno humano potencial y sus productos de descomposición son potencialmente corrosivos, dañó el material plástico del homogenizador y los tubos de polipropileno

6.3.2 Contenido de AFM₁ en queso Oaxaca.

A continuación se presentarán los resultados del contenido de AFM₁ en queso Oaxaca de los diferentes muestreos.

6.3.2.1 Análisis de aflatoxina M₁ en queso Oaxaca colectado en 2015.

La Tabla 6.15 muestra los resultados de AFM₁ en 25 muestras de queso Oaxaca muestreado en la Ciudad de Veracruz en época de secas analizadas en Phytocontrol.

Tabla 6.15 Contenido ($\mu\text{g kg m.s.}^{-1}$) de AFM₁ en queso Oaxaca muestreado en época de secas en 2015.

Muestra	Origen	AFM ₁	Muestra	Origen	AFM ₁	Muestra	Origen	AFM ₁
13	Cd. de Veracruz	ND	17	Cd. de Veracruz	LOD< 0.02	11	P. Vicente	0.040
16	El Mangal		20	Joya		12	Cd. de Veracruz	0.024
19	Cd. de Veracruz		21	Tlalixcoyan		15	Cd. de Veracruz	0.030
24	P. Negras		25	Mixtequilla		18	Mixtequilla	0.075*
29	Soledad de Doblado		26	Cd. de Veracruz		22	Cd. de Veracruz	0.024
31	Cd. de Veracruz		30	Tejar		27	El Morro	0.025
39	La Joya		32	Tlalixcoyan		28	Acayucan	0.023
40	Cd. De Veracruz		37	Cd. de Veracruz		33	Cd. de Veracruz	0.057*
		38	Cd. de Veracruz					

ND: no detectado; LOD: Límite de detección; * Mayor al límite de tolerancia de Codex Alimentarius

En la Tabla 6.15 se aprecia que en el 32 % de las muestras la aflatoxina no fue detectada, en el 36 % se detectó por debajo del límite de cuantificación y en el 32 % restante sólo dos valores sobrepasaron el límite de tolerancia del Codex Alimentarius.

6.3.2.2 Análisis de AFM₁ y AFM₂ en queso Oaxaca muestreado en 2016.

Los resultados del contenido de AFM₁ y AFM₂ se presentan en la Tabla 5.18, como se puede observar en ella, los valores de contaminación fueron mayores a los encontrados en el muestreo de 2015, por ello, se utilizaron para realizar la evaluación de riesgo.

También se puede observar en la Tabla 6.16 que la AFM₁ está presente en más muestras (16 de 30, 53 %) que la AFM₂ (6 de 30, 20 %). Los niveles de AFM₁ son entre 0.01 y 44 µg kg⁻¹, y las concentraciones de AFM₂ entre 0.01 y 3.43 µg kg⁻¹. Estos dos rangos superan los límites tolerables establecidos por la NAFTA (de 0.5 µg kg⁻¹) y por el Codex Alimentarius y la Unión Europea (0.05 µg kg⁻¹) (EFSA 2004). Un estudio anterior (Urban *et al.*, 2009) reportó niveles de AFM₁ en 27 % de las muestras de queso panela fresco de México. Hasta la fecha, ningún caso humano de intoxicación alimentaria se ha asociado con el consumo de queso contaminado, a pesar de que se pueden encontrar altos niveles de cancerígenos en el queso.

En la Figura 6.1 se puede observar la presencia de AFM₁ y AFM₂; el 37 % de las muestras están contaminadas con AFM₁ por arriba de los límites máximos residuales de 0.05 µg kg⁻¹ y el 20 % de la muestras están contaminadas con AFM₂. Las muestras mas contaminadas con AFM₁ en queso Oaxaca son la 23, 15 y 10 con concentraciones de 43.99 µg kg⁻¹, 32.19 µg kg⁻¹ y 8.95 µg kg⁻¹, respectivamente. Mientras que la muestra 1 y 22 contienen AFM₂ a una concentración de 3.43 µg kg⁻¹ y 2.76 µg kg⁻¹, respectivamente.

Tabla 6.16 Contenido ($\mu\text{g kg m.s.}^{-1}$) de AFM₁ y AFM₂ en queso Oaxaca muestreado en 2016.

Punto de muestreo	Origen	Aflatoxina ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		
		AFM ₁	AFM ₂	AFMt
		Media \pm DE	Media \pm DE	
1	Tlalixcoyan	0.03 \pm 0.010 ^b	3.62 \pm 0.27 ^a	3.47
2	Jamapa	ND	ND	
3	Jamapa	ND	ND	
4	La Mixtequilla	0.01 \pm 0 ^a	ND	0.01
5	Soledad de Doblado	0.76 \pm 0.02 ^a	ND	0.76
6	Cd. de Veracruz	ND	ND	
7	Cd. de Veracruz	ND	ND	
8	Cd. de Veracruz	0.44 \pm 0.03 ^a	ND	0.43
9	Cd. de Veracruz	0.04 \pm 0.02 ^b	0.68 \pm 0.09 ^a	0.70
10	La Antigua	8.95 \pm 0.49 ^a	ND	8.95
11	Cd. de Veracruz	ND	ND	0
12	Mixtequilla	0.97 \pm 0.06 ^a	ND	0.97
13	Soledad de Doblado	2.66 \pm 0.19 ^a	< LOD	2.66
14	Tlalixcoyan	0.05 \pm 0.01 ^a	< LOD	0.05
15	Tlalixcoyan	32.19 \pm 2.6 ^a	ND	32.19
16	Cd. de Veracruz	0.10 \pm 0.01 ^a	ND	0.10
17	Cd. de Veracruz	3.38 \pm 0.17 ^a	< LOD	3.37
18	Mixtequilla	ND	ND	0
19	Tierra Blanca	ND	ND	0
20	(El Morro) Boca del Río	ND	ND	0
21	Cd. de Veracruz	ND	ND	0
22	Soledad de Doblado	ND	2.77 \pm 0.76 ^a	2.76
23	Cd. de Veracruz	43.99 \pm 2.9 ^a	ND	43.99
24	Soledad de Doblado	0.01 \pm 0 ^a	ND	0.01
25	Cd. de Veracruz	0.72 \pm 0.21 ^a	ND	0.72
26	Cd. de Veracruz	ND	ND	0
27	Cd. de Veracruz	ND	ND	0
28	Cd. de Veracruz	ND	ND	0
29	(La Joya) Acajete	ND	ND	0
30	Cd. de Veracruz	0.04 \pm 0.01 ^a	ND	0.04

DE: desviación estándar; ND: No detectado; AFMt: Aflatoxinas M totales. Diferentes letras en la misma fila representan diferencia significativa (ANOVAA con pruebas de Tukey, P < 0.05)

La cantidad de AFM₁ formado depende del organismo de cada vaca y su excreción en la leche disminuye conforme el consumo de alimento contaminado con AFB₁ cesa, aunque se pueden encontrar rastros durante dos o tres días más. La relación de conversión de AFB₁ a AFM₁ varía de 1:100 a 1:300 (O'Brien y O'Connor, 2004).

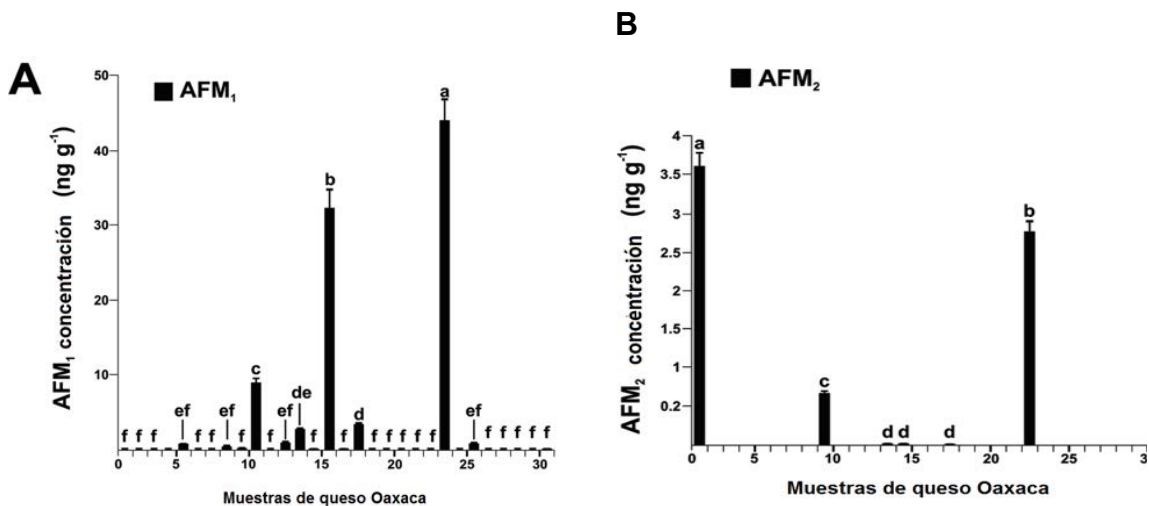


Figura 6.1 Contenido de AFM₁ (A) y AFM₂ (B) en muestras de queso Oaxaca colectadas en la ciudad de Veracruz en 2016.

6.4 Evaluación probabilística de riesgo.

6.4.1 Función de densidad de probabilidad del peso de los habitantes de la ciudad de Veracruz.

La Figura 6.2 y 6.3 muestra la PDF del peso de la población femenina y masculina consumidora de queso Oaxaca mayor de 14 años, ajustada a una distribución lognormal. El peso promedio de la población femenina y masculina consumidora de queso Oaxaca de la ciudad de Veracruz fue de 65.7 kg y 74 kg, respectivamente.

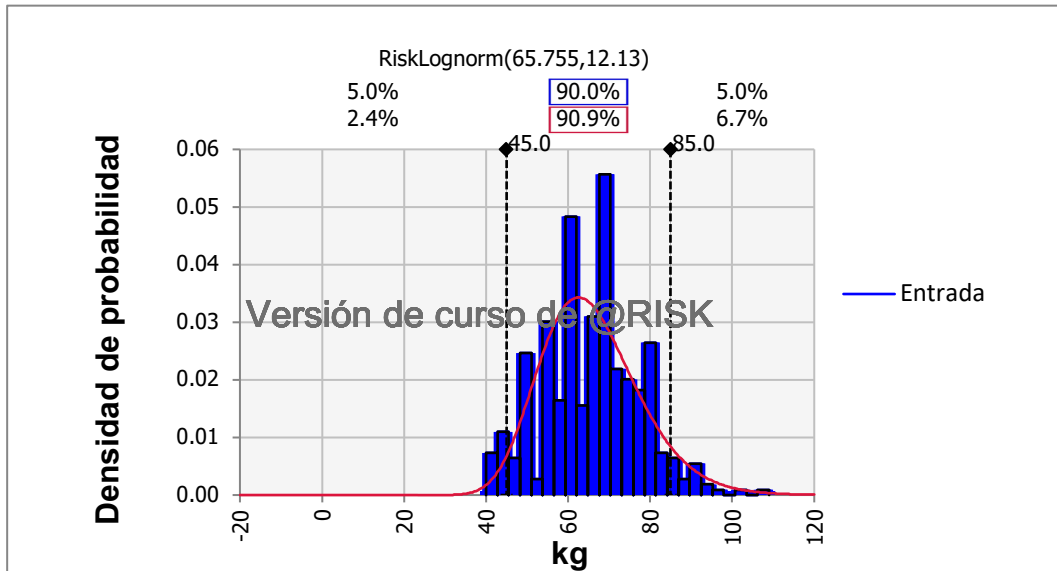


Figura 6.2 Función de densidad de probabilidad del peso de la población femenina de la ciudad de Veracruz.

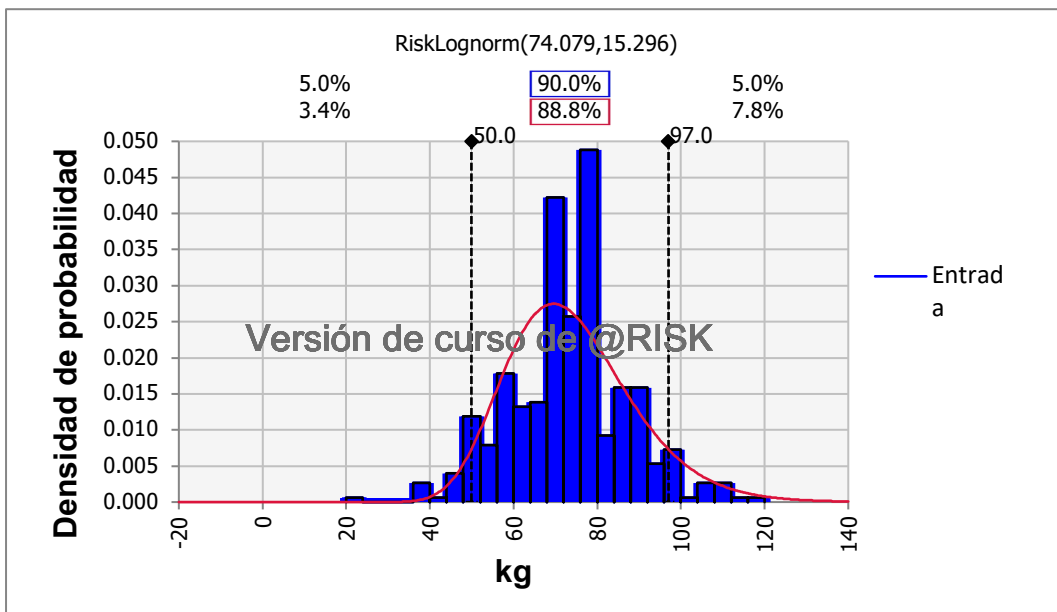


Figura 6.3 Función de densidad de probabilidad del peso de la población masculina de la ciudad de Veracruz.

En paralelo a esta tesis, se realizó, un muestreo aleatorio para determinar la ingesta de tortillas de maíz en la Ciudad de Veracruz, mostrando resultados similares: 65.83 kg para las mujeres y 73.31 kg para los hombres. Datos semejantes fueron reportados por la cámara nacional de la industria del vestido (CANAIVE, 2012), de 74.8 kg para hombres y 68.7 kg para mujeres, con un tamaño de muestra de más de 5000 habitantes.

6.4.2 Función de densidad de probabilidad de la ingesta de queso Oaxaca.

La Figura 6.4 muestra la función de densidad de probabilidad del consumo de queso Oaxaca de la población de la ciudad de Veracruz. Los datos fueron ajustados a una distribución lognormal para construir la PDF. En la PDF se puede observar que el 5 % de la población consume más de 162.6 g de queso Oaxaca por día y que el consumo medio en la población es de 47.8 g de queso d⁻¹. Para incluir la variabilidad de la porción de consumo, dependiendo del lugar de la ubicación del hogar y los integrantes de la familia, se utilizó el método de Monte Carlo con 10,000 iteraciones en la PDF.

6.4.3 PDF del contenido de aflatoxina M₁ en queso Oaxaca.

La Tabla 6.17 muestra los parámetros de la densidad de probabilidad de la contaminación de AFM₁ en queso Oaxaca de la ciudad de Veracruz muestreado en 2015; la AFM₁ y la AFM₂ del queso Oaxaca muestreado en 2016. La PDF se construyó a partir de los datos de la cota superior por ser la condición más protectora. La contaminación de AFM₁ en queso Oaxaca fue evaluada en época de secas del 2014 y 2015, se muestra la diferencia observada en las dos temporadas, siendo la época de secas del 2014 la que presenta menor contaminación, solo el 8 % presentó una contaminación mayor a lo establecido por la Comisión Europea.

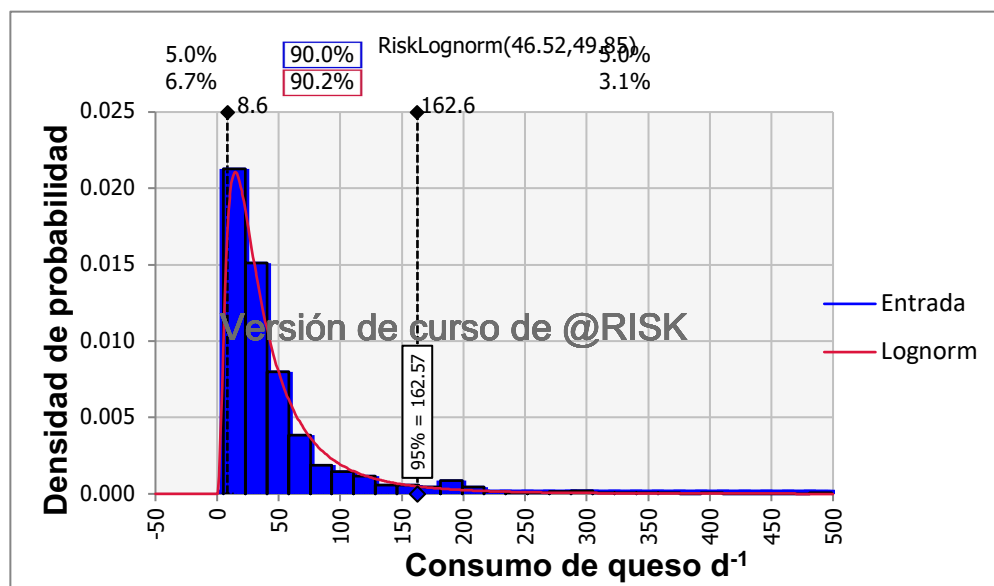


Figura 6.4 Función de densidad de probabilidad del consumo de queso Oaxaca en la ciudad de Veracruz, ajustada a una distribución lognormal.

Las muestras analizadas en el 2016 presentaron mayor contaminación, el 37 % presentan contaminación por arriba de lo establecido por la Comisión Europea (CE) de $0.05 \mu\text{g kg}^{-1}$. Por lo tanto es importante realizar una evaluación de riesgo, debido al alto consumo de queso Oaxaca en la Ciudad de Veracruz, 50.6 g d^{-1} para hombres y 45.2 g d^{-1} para mujeres y alta incidencia de muestras contaminadas.

Tabla 6.17 Parámetros de la distribución de probabilidad de la concentración de AFM₁ y AFM₂ en queso Oaxaca muestreado en la ciudad de Veracruz.

Parámetro	Abril 2015		Abril 2016
	AFM ₁	AFM ₁	AFM ₂
n	25	30	30
Media ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	0.022	3.312	0.281
Mediana ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	0.020	2.296	0.195
DS ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	0.015	3.311	0.281
P95 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	0.057	9.923	0.841

6.4.4 Ingesta Diaria Estimada (IDE)

La ingesta diaria de AFM₁ se estimó para los consumidores de queso Oaxaca en la Ciudad de Veracruz. Se realizó una comparación por género, y

edades. La estimación de la ingesta diaria fue calculada utilizando el método Monte Carlo con 10,000 iteraciones. Los parámetros son mostrados en la Tabla 6.18 y 6.19.

Tabla 6.18 Parámetros de la función de densidad de probabilidad de la IDE de AFM₁ para hombres y mujeres mayores de 14 años, consumidores de queso Oaxaca en la Ciudad de Veracruz en 2015.

Parámetro	Época de secas 2015 (AFM ₁)		
	Hombres >14 años	Mujeres >14 años	Población general >14 años
n	25	30	30
Media (ng kg⁻¹ pc d⁻¹)	0.015	0.015	0.015
Mediana (ng kg⁻¹ pc d⁻¹)	0.009	0.009	0.009
DS (ng kg⁻¹ pc d⁻¹)	0.021	0.021	0.020
Percentil 95 (ng kg⁻¹ pc d⁻¹)	0.048	0.048	0.048

La ingesta media estimada para AFM₁ fue de 2.25 y 2.20 (ng / kg de peso corporal / día) para hombres y mujeres respectivamente, la cual es la más alta que la recomendación de la JECFA, 1999 y 2001 de 1 ng kg⁻¹ pc d⁻¹. El análisis estadístico muestra diferencia significativa entre los hombres y las mujeres, siendo los hombres los que presentaron mayor riesgo para la población, ya que se puede estimar que un 5 % de la población consume mas de 162.6 g de queso Oaxaca por día. Al ser mayores del 5 % se puede decir que la población podría estar en riesgo por consumo de aflatoxinas presentes en queso.

Tabla 6.19 Parámetros de la función de densidad de probabilidad de la IDE de AFM₁ para hombres y mujeres mayores de 14 años, consumidores de queso Oaxaca en la Ciudad de Veracruz en 2016.

Parámetro	Época de secas 2016 (AFM ₁)		
	Hombres >14 años	Mujeres >14 años	Población general >14 años
Media (ng kg ⁻¹ pc d ⁻¹)	2.25	2.20	2.26
Mediana (ng kg ⁻¹ pc d ⁻¹)	1.52	1.5	1.53
DS (ng kg ⁻¹ pc d ⁻¹)	2.44	2.34	2.45
Percentil 95 (ng kg ⁻¹ pc d ⁻¹)	6.51	6.30	6.56
Población en riesgo (%)	1.5 %	1.7 %	0 %

Tabla 6.20 Evaluación de la exposición en niños, adolescentes, adultos y adultos mayores, consumidores de queso Oaxaca contaminado con AFM₁ y AFM₂

	0-8 years		9-13 years		14-59 years		≥ 60 years	
	AFM ₁	AFM ₂	AFM ₁	AFM ₂	AFM ₁	AFM ₂	AFM ₁	AFM ₂
Media (µg/kg pc/día)	5.9	0.51	4.46	0.37	2.32	0.20	1.81	0.15
Mediana (µg/kg pc/día)	2.5	0.21	1.46	0.12	1.02	0.09	0.72	0.06
DS	11.5	1.00	32.1	2.14	4.13	0.36	3.68	0.31
P95 (µg/kg pc/día)	22.49	1.90	14.6	1.21	8.76	0.75	6.94	0.59

La población que presenta mayor exposición y en consecuencia, riesgo tanto por consumo de AFM₁ y AFM₂ vía el queso Oaxaca son los niños (Tabla 6.20). Este comportamiento se debe principalmente a su bajo peso comparado con los otros grupos estudiados (adolescentes, adultos y adultos mayores).

6.4.5 Evaluación de riesgo probabilístico

Las aflatoxinas se encuentran entre los más potentes mutágenos y sustancias cancerígenas conocidas (IARC, 2002). En 1997, la JECFA realizó una evaluación de esta toxina y no pudo establecer una TDI numérica, sino más bien estimaciones calculadas para el cáncer de hígado humano como resultado de la exposición a la aflatoxina B₁. Y llegó a la conclusión de que la exposición diaria, incluso <1 ng/ kg⁻¹ pc /día, contribuyó al riesgo de cáncer de hígado. Por consiguiente, se recomienda que los niveles deban ser reducidos a ser tan bajo como sea razonablemente posible (Leblanc, 2005).

Existen tres valores de referencia (TDIs) para la AFM₁: el establecido en 1994 por la SCF (1 ng kg⁻¹ pc día⁻¹); en 1998, en Francia (0.2 ng kg⁻¹ pc día⁻¹) y en el 2001 por la JECFA, y la OMS (10 ng kg⁻¹ pc día⁻¹). La Tabla 6.21 y 6.22 muestran los resultados de la población en riesgo por el consumo de AFM₁ y AFM₂ presentes en queso Oaxaca. Se utilizaron los TDIs anteriormente citados para ambas toxinas, debido a que no cuenta con un valor particular para AFM₂.

Tabla 6.21 Evaluación de riesgo, utilizando de diferentes valores TDI, para la ingesta de AFM₁ en niños, adolescentes, adultos y adultos mayores, por consumo de queso Oaxaca.

años		TDI (AFM ₁)		
		10 ng/kg pc/día	1 ng/kg pc/día	0.2 ng/kg pc/día
0-8	UB	15.6 %	72.8 %	93.3 %
9-13	UB	8.1 %	60.1 %	89 %
≥ 14-59	UB	3.9 %	50.6 %	84.3 %
≥ 60	UB	2.7 %	41.4 %	78.5 %

En la Tabla 6.21 se puede observar que la población que se encuentra más en riesgo, es la población infantil, que va desde un 15.6 % de riesgo hasta un 93.3 % de riesgo, dependiente del TDI utilizado, también se pueden observar que para una TDI de 10 ng/kg pc/día el riesgo por consumir queso contaminado con AFM₁ disminuye conforme la población va envejeciendo. Sin embargo utilizando la TDI de 1 ng/kg pc/día, la población a cualquier edad presenta una probabilidad de riesgo mayor al 41.4 %.

Tabla 6.22 Evaluación de riesgo utilizando diferentes valores de TDI, para la ingesta de AFM₂ en niños, adolescentes, adultos y adultos mayores, por consumo de queso Oaxaca.

años	UB	TDI (AFM ₂)		
		10 ng/kg pc/día	1 ng/kg pc/día	0.2 ng/kg pc/día
0-8	UB	0.1 %	12.8 %	52 %
9-13	UB	0.2 %	6.6 %	36.6 %
≥ 14-59	UB	0 %	2.9 %	27.2 %
≥ 60	UB	0 %	1.9 %	20.5 %

Estos datos deben ser interpretados con precaución, particularmente para la AFM₂ ya que no existe una TDI establecida. A pesar de lo anterior, los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que deben ponerse una mayor atención a la presencia y exposición tanto de AFM₁ como de AFM₂ en productos lácteos.

7 CONCLUSIONES

En la ciudad de Veracruz, el principal queso consumido, es el queso fresco, seguido por el queso Oaxaca y el consumo es mayor que el valor nacional medio de todos los quesos.

La clase alta y la clase media son los principales consumidores de queso fresco, mientras que el queso Oaxaca es consumido principalmente por la clase alta.

Los hombres de 41-59 años consumen más quesos frescos y de 18-59 años consumen más queso Oaxaca, mientras que entre las mujeres el consumo de queso es similar para todas las edades.

Sólo en el 5 % de las muestras de queso Oaxaca se detectaron POC's a valores inferiores al límite de cuantificación ($LOQ = 0.01 \text{ mg kg}^{-1}$), lo que muestra que la exposición del consumidor a los POC's es baja.

La exposición de los niños ($5.9 \times 10^{-6} \text{ g AFM}_1 \text{ kg de peso corporal}^{-1} \text{ d}^{-1}$) fue mayor que la encontrada en adultos ($2.3 \times 10^{-6} \text{ g AFM}_1 \text{ kg de peso corporal}^{-1} \text{ d}^{-1}$).

El análisis de riesgo reveló que el 93 % de la población infantil de la ciudad de Veracruz está en riesgo por consumir queso Oaxaca contaminado con AFM_1 y el 52 % debido al consumo con AFM_2 (considerando una TDI de $0.02 \text{ ng kg}^{-1} \text{ pc día}^{-1}$).

8 BIBLIOGRAFÍA

- Abou Donia, M.A., Abou-Arab, A.A.K., Enb, A., El-Senaity, M.H. y Abd Rabou, N.S. 2010. Chemical composition of raw milk and the accumulation of pesticide residues in milk products. *Global Veterinaria*. 4 (1): 6–14.
- Abou-Arab, A.A.K., Soliman Kawther, M., El Tantawy, M.E., Badeaa, R.I. y Khayria, N. 1999. Quantity estimation of some contaminants in commonly used medicinal plants in the Egyptian market. *Food Chem*. 67(4): 357-363.
- Abou-Arab, A.A.K. 2002. Degradation of organochlorine pesticides by meat starter in liquid media and fermented sausage. *Food Chem. Toxicol*. 40(1):33-41.
- AFSSA. 2009. Évaluation des risques liés à la presence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. Rapport final. Marzo 2009. pp 21-22.
- Ahmed, M.M.M., Hafez, E.E., Mona, A.M., Abdelrassoul, H.A. y Mabrouk, Y.M. 2014. Detection of Baby Milk Powder Contamination by Microorganisms. *World Appl. Sci. J*. 30: 93-98.
- Aigner, E., Leone, A. y Falconer, R. 1998. Concentrations and enantiomeric ratios of organochlorine pesticides in soils from the U.S. corbel. *Environ. Sci. Technol*. 32:1162-1168
- Aislabie, J.M., Richards, N.K. y Boul, H.L. 1997. Microbial degradation of DDT and its residues a review. *N Z J Agric. Res*. 40:269-282
- Alaís, C. 1998. Ciencias de la Leche. Principios de Técnica Lechera. Décima segunda reimpression. Editorial Continental. México, pp 550-560.
- Albert, L.A. y Alpuche, L. 1990. Riesgos de los plaguicidas para el ambiente. En los plaguicidas y sus efectos en el ambiente y la Salud. Lilia Albert (Coord.) Centro de Ecodesarrollo. México, D.F. pp 58, 121-138.
- Alexander, M. 1995. How toxic are toxic chemicals in soil. *Environ. Sci. Technol*. 28(11): 2713-2717.
- Alexander, M. 1997. Sequestration and bioavailability of organic compounds in soil. En: Environmentally acceptable endpoints in soil. (Ed. Linz DG, Nakles DU). Annapolis, MD: American Academy of Environmental Engineers, 43-136.
- Aliverdieva, D. A., Malygin, A. G., Lagutina, L. S. y Sholtz, K. F. 2004. Isolation of Cell Membranes from *Saccharomyces cerevisiae* for Evaluation of Their Protein Composition. *Appl. Biochem. Micro.* 40(3):296-299.

Almeida González, M., Luzardo, O.P., Zumbado, M., Rodríguez-Hernández, A., Ruiz-Suárez, N., Sangil, M., Camacho, M., Henríquez-Hernández, L.A. y Boada, L.A. 2012. Levels of organochlorine contaminants in organic and conventional cheeses and their impact on the health of consumers: An independent study in the Canary Islands (Spain). *Food and Chem. Tox.* 50:4325-4332.

Angerer, J., Maass, R. y Heinrich, R. 1983. Occupational exposure to hexachlorocyclohexane: VI. Metabolism of γ -hexachlorocyclohexane in man. *Int Arch. Occup Environ Health.* 52:59-67.

AOAC. 2005. Association of Official Analytical Chemists: Natural toxins in Official Methods of Analysis of AOAC international. Horwitz, W (Ed.). 17th edition. Trucksess, M.W. Chapter Editor. Chapter 49: Natural Toxins. Vol. II Food Composition Additives; Natural contaminants. Washington, D.C. USA. pp 1-42.

AOAC. 2006. Association of Official Analytical Chemists: Natural toxins. In Official Methods of Analysis of AOAC International, 18th ed, Horwitz W, Latimer GW Jr, Trucksess MW (Eds) 1-51. Gaithersburg (MD): AOAC International.

Arias Verdes, J.A., Rojas y C.D. Dierkmeier, C.G., Riera, B.C. 1990. Plaguicidas Organoclorados. Serie Vigilancia 9. Organización Mundial de la Salud. Ed. Eco. México. pp 7- 43.

Arisoy, M. 1998. Biodegradation of chlorinated organic compounds by white-rot fungi. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 60:872-876.

Atlas, E., Foster, R., Glam, C. 1982. Air-sea exchange of high molecular weight organic pollutants: Laboratory studies. *Environ. Sci. Technol.* 16:283-286.

ATSDR. 2002. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for DDT, DDE, and DDD. Atlanta: Agency for Toxic Substances and Disease Registry. pp 497.

ATSDR. 2005. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for alpha-, beta-, gamma-, and delta-hexachlorocyclohexane. U.S. department of health and human services. Atlanta, Georgia U.S.A. pp 215-219.

ATSDR. 2008. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. DDT, DDE, and DDD. Chemical And Physical Information. U.S. department of health and human services. Atlanta, Georgia U.S.A Pp. 215-219.

Ávila, C.A., Shamah, L.T., Chávez, V.A., Galindo, G.C. 2003. Encuesta Urbana de Alimentación y Nutrición en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México, ENURBAL-2002. Inst Nac Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. México. pp 1-115. http://www.nutricionemexico.org.mx/encuestas/Enurbal_2002_Final.pdf

Ávila, C.A., Galindo, G.C., Hernández, R.A., Chávez, V.A. 2007. Encuesta Urbana de Alimentación y Nutrición en la Zona Metropolitana del Estado de México,

ENURBAL 2007. Inst Nac Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. México. pp 1-77.

http://www.nutricionemexico.org.mx/encuestas/Enurbal_PDF.pdf

Axelsson, L., 2004. Lactic Acid Bacteria: Classification and physiology. pp: 1-66. En: Lactic Acid Bacteria, Microbiological and Functional Aspects. (Eds. Salminen, A.V. y Wright A.O.) ouwehand. Marcel Dekker, New York.

Bachmann, A., Walet, P., Wijnen, P., De Bruin, W., Huntjens, J.L., Roelofsen, W. y Zehnder A.J. 1988. Biodegradation of alpha- and beta-hexachlorocyclohexane in soil slurry under different redox conditions. *Appl Environ Microbiol.* 54 (1): 143–149.

Baduí-Dergal, S. 2006. Química de los Alimentos. 4ª Ed. Pearson Adisson Wesley. Pearson Educación. México. pp 565-598.

Baker, R.D. Applegate. H.G. 1970. Effect of temperature and ultraviolet radiation on the persistence of methyl parathion and DDT in soils. *Agron. J.* 62:509-512.

Bard, S.M. 1999. Global transport of anthropogenic contaminants and the consequences for the arctic marine ecosystem. *Mar. Pollut. Bull.* 38(5):356-379.

Bashir, K.A. 2011. Consumption of dairy products in the UAE: A comparison of nationals and expatriates. *J. Saudi Soc. Agric. Sci.* 10(2):121-125.

Battacone, G., Nudda, A., Palomba, M., Pascale, M., Nicolussi, P. y Pulina G. 2005. Transfer of aflatoxin B1 from feed to milk and from milk to curd and whey in dairy sheep fed artificially contaminated concentrates. *J. Dairy Sci.* 88(9): 3063-3069.

Battern, P.L. y Hutson, D.H. 1989. The mammalian metabolism of agrochemicals. New York, EUA. John Wiley & Sons.

Benbrook, C.M. 2002. Organochlorine residues pose surprisingly high dietary risks. *J. Epidemiol. Community Health.* 56: 822-823.

Benimeli, C. S., Fuentes, M. S., Abate, C. M., y Amoroso, M. J. 2008. Bioremediation of lindane-contaminated soil by *Streptomyces* sp. M7 and its effects on *Zea mays* growth. *Int Biodeterior.* 61(3): 233-239.

Bentabol, A. y Jodral, M. 1999. Ocurrance of organochlorine agrochemical residues in Spanish Cheese. *Pestic. Sci.* 44: 177-182.

Bidleman, T.F., Walla, M.D., Roura, R., Carrs, E. y Schmidt, S. 1993. Organochlorine pesticides in the atmosphere of the southern ocean and Antarctica, January-March, 1990. *Mar. Pollut. Bull.* 26(5):258-262.

Bierska, J., Smoczynski, S. y Borejszo, Z. 1984. Changes in chlorinated hydrocarbon levels during processed cheese manufacture. *Roczniki Instytutu Przemysłu Mleczarskiego.* 26: 39-40.

- Binder, E.M., Tan, L.M., Chin, L.J., Handl, J. y Richard, J. 2007. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities feeds and feed ingredients. *Anim. Feed Sci. Tech.* 137:265–282
- Brunner, J.R. 1981. Cow milk proteins: Twenty-five years of progress. *J. Dairy Sci.* 64: 1038-1054.
- Bumpus, J. A. y Aust, S. D. 1987. Biodegradation of DDT [1, 1, 1-trichloro-2, 2-bis (4-chlorophenyl) ethane] by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53(9): 2001-2008.
- Buser, H.R. y Muller, M.D. 1995. Isomer and enantio selective degradation of hexachlorocyclohexane isomers in sewage sludge under anaerobic conditions. *Environ. Sci. Technol.* 29 (3): 664–672.
- CANAIVE 2012. Cámara Nacional de la Industria del Vestido. ¿Cuánto mide México?. México.
- Cavaliere, C., Foglia, P., Guarino, C., Marzoni, F., Nazzari, M., Samperi, R., Laganà, A. (2006). Aflatoxin M1 determination in cheese by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr. A.* 1135(2):135-141.
http://www.chilecodex.cl/wp-content/uploads/2013/04/cxg_003s.pdf
- CDIC. 2015. Canadian Dairy Information Centre: Global cheese consumption (Kg per capita). Available from website: <http://www.dairyinfo.gc.ca>. (accessed September 2015).
- Centeno, J.A., Cepeda, A. y Rodriguez-Otero, J.L. 1996. Lactic acid bacteria isolated from Arzúa cows' milk cheese. *Int. Dairy J.* 6: 65-78.
- Chacko, C. I. y Lockwood, J. L. 1967. Accumulation of DDT and dieldrin by microorganisms. *Can. J. Microbiol.* 13(8): 1123-1126.
- Champomier-Vergès, M. C., Maguin, E., Mistou, M.Y., Anglade, P. y Chich, J. F. 2002. Lactic acid bacteria and proteomics: current knowledge and perspectives. *J. Chromatogr. B.* 771(1): 329-342.
- Chávez, A. 1974. Encuestas nutricionales en México. Estudios de 1958 a 1962. México DF. Editorial División de Nutrición del Instituto Nacional de la Nutrición 1: 1-342.
- Chung, S.W.C. y Cheng, B.L.S. 2011. Determination of organochlorine pesticide residues in fatty foods: A critical review on the analytical methods and their testing capabilities. *J. Chromatogr. A.* 1218: 5555– 5567.
- Chung, S.W.C., Kwong, K.P. y Yau, J.C.W. 2008. Dietary exposure to DDT of secondary school students in Hong Kong. *Chemosphere.* 73:65-69.

Codex Alimentarius. 1989. Comisión del Codex Alimentarius: [Guidelines for simple evaluation of food additive intake] Orientaciones para una evaluación sencilla de la ingesta de aditivos alimentarios. Accessed in Nov 15, 2015.

Codex Alimentarius. 2007. Norma general del Codex para el uso de términos lecheros. 206-1999. Roma, Italia. p 194. http://www.codexalimentarius.org/input/download/standards/196/CXS_270s.pdf. Consultado el 17 de Noviembre del 2014.

Codex Alimentarius. 2014. Orientaciones para una evaluación sencilla de la exposición alimentaria a aditivos alimentarios. CAG/GL 3-1989. pp 1-12. Consultado el 15 de Septiembre del 2014

Commission Regulation. 2006. (CE). No. 1881/2006 of 19 December 2006, setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Official Journal of the European Union. Consultado el 23 de marzo de 2015. Disponible en:

Copolla, S., Partene, E., Dumontet, S. y La Peccerella, A. 1988. The microflora of natural whey cultures utilized as starters in the manufacture of Mozzarella cheese from water-buffalo milk. *Lait*. 68: 295-310.

Cortes, J.A., Gómez, C.A., Cuervo, S.I. y Leal, A.L. 2007. Implicaciones en salud pública de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente adquirido en la comunidad en Bogotá, Colombia. *Rev. Salud Pública*. 9(3):448-454.

Counil, E., Verger, P. y Volatier, J.L. 2005. Handling of contamination variability in exposure assesment: A case study with ochratoxin A. *Food Chem. Toxicol*. 43:1541-1555.

Cuenca, P., V. Ramírez, R. Castro y K. Schosinsky. 1997. Efecto genotóxico de los plaguicidas en una población ocupacionalmente expuesta. Evaluación por medio de micronúcleos de linfocitos y del epitelio bucal, aberraciones cromosómicas, mecanismos de reparación y electroforesis de células únicas, controlando paralelamente los niveles de colinesterasa sérica y eritrocítica. Proyecto PLAGSALUD/ MASICA, San José, Costa Rica. p.

Cullen, J.M., Ruebner, B.H., Hsieh, L.S., Hyde, D.M. y Hsieh, D.P.H. 1987. Carcinogenicity of dietary aflatoxin M1 in male Fisher rats compared to aflatoxin B1. *Cancer Res*. 47:1913-1917.

Creppy, E.E. 2002. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol. Lett*. 127:19-28

Darko, G. y Acquaa, O.S. 2008. Levels of organochlorine pesticides residues in dairy products in Kumasi, Ghana. *Chemosphere*. 71: 294-298.

- Deeth, H.C., Fitz-Gerald, C.H. y Wood, A.F. 1975. A convenient method for determining the extent of lipolysis in milk. *Aust. J. Dairy Technol.* 30: 109-111.
- Díaz, G.J. 1996. Micotoxinas y micotoxicosis en salud humana y animal. Primera parte. *Veterinaria al Día.* 2:28-34.
- De Oca-Flores, E.M., Castelán-Ortega, O.A., Estrada-Flores, J.G., Espinoza-Ortega, A. 2009. Oaxaca cheese: manufacture process and physicochemical characteristics. *Int. J. Dairy Technol.* 62: 535-540.
- Delgado, F.J., González, C.J., Ladero, L., Cava, R. y Ramírez, R., 2009. Free fatty acids and oxidative changes of a Spanish soft cheese (PDO "Torta del Casar") during ripening. *Food Sci. Technol. Int.* 44(9): 1721-1728.
- Devine, G.J., Eza, D., Ogusuku, E., Michael, J. y Furlong, M.J. 2008. Uso de insecticidas: contexto y consecuencias ecológicas. *Perú Med. Exp. Salud Pública.* 25(1):74-100.
- Dimond, J.B. y Owen, R.B. 1996. Long-term residue of DDT compounds in forest soils in Maine. *Environ. Pollut.* 92:227-230.
- Ding, J-Y. y Wu, S. 1997. Transport of organochlorine pesticides in soil columns enhanced by dissolved organic carbon. *Water Sci. Technol.* 35(7):139-145.
- Dunand, C. 1999. *La Flore des Laites Crus*. Apuntes distribuido por la Ecole Nationale d'Industries Agro-Alimentaries.
- Durham, W.F. 1963. Pesticides residues in foods in relation to human health. *Pestic. Rev.* 4:33-81.
- EFSA. 2004. European Food Safety Authority: Opinion of the Scientific Panel on contamination in the Food chain on a request from the request from the commission related to aflatoxin B1 substance in animal feed (Request Nr. EFSAQ-2003-035). Adopted on 3 February 2004. *EFSA J.* 39:1-27.
- Elika. 2008. Fundación Vasca para la Seguridad Alimentaria: Fichas sustancias indeseables alimentación animal. *Bull. DDT.* Fundación Vasca para la Seguridad Alimentaria Arcaute, Álava, España.
- Elortondo, F.J.P., Echobarria, P.A., Albisu, M. y Barcina, Y. 1998. Indigenous lactic acid bacteria in Idiazábal ewe's milk cheese. *Int. Dairy J.* 8: 725-732.
- Ellenhorn, M.J. 1997. Natural Toxins. p. 1876-80. In: *Medical Toxicology: Diagnosis and Treatment of Human Poisoning.* (Ed.) Ellenhorn M.J. 2nd ed. Baltimore; Williams & Wilkins.
- Engst, R., Macholz, R.H. y Kujawa, H. 1979. Metabolism of lindane in microbial organisms, warmblooded animals and humans. *Gig. Sanit.* 10:64-65.

EPA. 2013. Environmental Protection Agency: Environmental Protection Agency. Pesticides: Topical & Chemical Fact Sheets. Evaluación de riesgos para la salud presentados por pesticidas. Consultado el 15 mayo de 2014. <http://www.epa.gov/pesticides/factsheets/riskassess-sp.html>.

EPA. 1979. Water-related environmental fate of 129 priority pollutants: Volume I: Introduction and technical background, metals and inorganics, pesticides and PCBs. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency. EPA-440/4-79-029b, 1-1 - 1-4, 2-1 - 2-16.

Esquivel, T.A. y Santos, M.A. 1996. Los quesos típicos mexicanos: Queso asadero. Lácteos y cárnicos mexicanos. Jun-Jul. 8-11 pp.

Estepar, J., Del mar Sánchez, M. y Alonso, I. y Mayo, B. 1999. Biochemical and microbiological characterization of artisanal 'Peñamellera' cheese: análisis of its indigenous lactic bacteria. *Int. Dairy J.* 9: 737-746.

Evans, M.S., Noguchi, G.E. y Rice, C.P. 1991. The biomagnification of polychlorinated biphenyls, toxaphene and DDT compounds in a Lake Michigan offshore food web. *Archiv Environ Con Tox.* 20(1):87-93.

FAO/WHO. 1992. Codex Alimentarius. Pesticide residues in food: Maximum residue limits Rome Italy.

FAO/WHO. 1997. Guidelines for Predicting Dietary Intake of Pesticide Residues. Global Environment Monitoring System Food Contamination Monitoring and Assessment Programme.

FAO/WHO. 1997b. Codex Maximum Limits for Pesticide Residues, 2nd edn. Roma, Italia.

FAO/WHO. 1999. Codex alimentarius. Norma general para los aditivos alimentarios. Roma Italia.

FAO/WHO. 1999. La aplicación de plaguicidas sin la debida seguridad provoca daños a la salud y al medioambiente. Bull. PR 97/20. Roma, Italia.

FAO/WHO, 2006. Codex Alimentarius, maximum limits for pesticides residues. Rome Italy.

FAO/WHO, 2008. Food Standards Program, vol. 11. Codex Alimentarius Commission. Pesticide Residues in Food. Rome Italy

FAO/WHO. 2011. Codex alimentarius. Leche y Productos Lácteos. 2a edición en español. p 265. Roma Italia.

FAO/WHO. 2013. Comisión del codex alimentarius. Definiciones de los términos de riesgos relativos a la inocuidad de los alimentos. 21ª edición en español. Roma Italia.

Fernández de Oliveira, C.A., Leal, P.M. 1997. Aflatoxinas: conceitos sobre mecanismos de toxicidade e seu envolvimento na etiologia do câncer hepático celular. *Re. Saúde Pública.* 31:417-24.

Ferrandini, B. E. 2006. Elaboración de queso de Murcia al vino con cuajo natural en pasta. Tesis de Doctorado. Universidad de Murcia. Murcia, España.

Field, J.A. 2004. Biodegradation of chlorinated compounds by white rot fungi. pp. 159-204. In: Häggblom M. and I.D. Bossert (eds.). *Dehalogenation: Microbial processes and environmental applications.* Springer, New York. p 481.

Fishbein, L. 1973. Mutagens and potential mutagens in the biosphere I. DDT and its metabolites, polychlorinated biphenyls, chlorodioxins, polycyclic aromatic hydrocarbons, haloethers. *Sci. Total. Environ.* 4:305-340.

Fitzloff, J.F., Portig, J. y Stein, K. 1982. Lindane metabolism by human and rat liver microsomes. *Xenobiotica* 12:197-202.

Fung, D.Y.C. 1997. Overview of Rapid Methods of Microbiological Analysis. En: *Food Microbiological Analysis New Technologies.* (Ed: Tortorello, M.L., Gendel, S.M.). Marcel Dekker, Inc. New York. pp 1-25.

FUNPROVER. 2010. Fundación produce Veracruz. Colegio de Postgraduados Veracruz. Reporte Técnico de Proyecto. Estudio y análisis del mercado de los productos del sistema bovinos de doble propósito en el Estado de Veracruz [Project Technical Report. Study and analysis of market products dual purpose cattle in the State of Veracruz]. Xalapa, México.

Gallardo-Díaz, E. G., Borja-Aburto, V. H., Méndez-Galván, J. F., Sánchez-Tejeda, G., Olguin- Bernal, H., y Ramierez -Hernández, J. A. 2000. Situación actual de la malaria y el uso de DDT en México, Centro Nacional de Salud Ambiental, Centro de Vigilancia Epidemiológica. Report 01-0206-HEQ.

García, M.A. y Alcántara, A. 2002. Guía de validación de métodos analíticos. Colegio Nacional de Químicos Farmacos Biológicos, A.C. México, D.F. pp 1-122.

García, C., Antona, C., Robert, B. y López, Ch. 2013. The size and interfacial composition of milk fat globules are key factors controlling triglycerides bioavailability in simulated human gastro-duodenal digestion. *Food Hydrocolloid.* 35: 494-504.

García-Amezquita, L.E., Primo-Mora, A.R., Barbosa-Canovas, G.V. y Sepulveda, D.R. 2009. Effect of nonthermal technologies on the native size distribution of fat globules in bovine cheese-making milk. *Food Sci. and Emer. Tech.* 10 (4): 491-494.

Garrido, N. S., Iha, M. H., Santos Ortolani, M. R. y Duarte Fávoro, R. M. 2003. Occurrence of aflatoxins M₁ and M₂ in milk commercialized in Ribeirão Preto-SP, Brazil. *Food Addit. Contam.* 20(1): 70-73.

Gento, A. y Domínguez, P. 2012. Asociación por el desenvolviment de l'agricultura ecológica-la Ribera. Consultado el 6 de enero de 2013. Disponible en: <http://eco-salta.blogspot.mx/2012/10/residuos-la-carta.html>.

- Gobin, F. 1999. La preparation du Lait, Coagulation et Égouttage. Apuntes distribuido por la Ecole Nationale d'Industrie Latière des Industries Agroalimentaries.
- Goldberg, E.D. 1975. Synthetic organohalides in the sea. Proc. R. Soc. Lond. B. 189:277-289
- Guillen, J.F y Bárrgan, H. B. 2008. Lindano. Rev Sist Amb. 2(1):35-43.
- Gutiérrez, R., Ruíz, J.L., Ortíz, R., Vega, S., Schettino, B., Yamasaki, A. y Ramírez, M. L. 2012 Organochlorine Pesticide Residues in Bovine Milk from Organic Farms in Chiapas, México. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 89: 882-887.
- Hammel, K.E. 1992. Oxidation of aromatic pollutants by lignin-degrading fungi and their extracellular peroxidases. pp. 41- 60. In: H. Sigel and A. Sigel (eds.). Degradation of environmental pollutants by microorganisms and their metalloenzymes. Institute of Inorganic Chemistry, University of Basel, Switzerland. 557 p.
- Hammel, K. E. 1992. Oxidation of aromatic pollutants by lignin-degrading fungi and their extracellular peroxidases. *Metal ions in biological systems*. 28: 41-60.
- Hassan, A.N. y Frank, J.F. 2001. Starter cultures and their use. En H.E. Marth y L.Steele; Applied dairy microbiology. Second edition. Revised and expanded. Ed. Marcel Dekker, Inc. New York, EEUU.
- Heberer, T. y Dünbnier, U. 1999. DDT metabolite bis(chlorophenyl)acetic acid: The neglected environmental contaminant. Environ. Sci. Technol. 33(4):2346-2351.
- Hemme, D., Bouillane, C., Metro, F. y Desmazeau, M.J. 1982. Microbial Catabolism Of Amino Acids During Cheese Ripening. Sci. Aliment. 2:113-123.
- Hernández-Raya, J.C., Martínez-Soto, G., López-Orozco, M., Mercado-Flores, J., Alcántara-González, M.L. 2005. Evaluación de Rendimientos y costos de fabricación en: Queso Asadero, Oaxaca y Yoghurt a nivel Industrial. VII Congreso nacional de ciencia de alimentos y III Foro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Guanajuato, Gto. México.
- Hitch, R.K. y Daym, H.R. 1992. Unusual persistence of DDT in some western USA soils. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 48:259-264.
- Hoff, R.M., Strachan, W.M.J., Sweet, C.W., Chan, C.H., Shackleton, M., Bidleman, T.F., Brice, K.A., Burniston, D.A., Cussion, S., Gatz, D.F., Harlin, K. y Schroeder, W.H. 1996. Atmospheric deposition of toxic chemicals to the Great Lakes: A review of data through 1994. Atmos. Environ. 30(20):3505-3527.
- Holler, H.H. 1996. Biology and eradication of Vectors of animal diseases in the tropics. pp. 102-103. En: Tropical Animal Health, 2nd ed., (Ed. Seifert, H.S.H.) Kluwer Academic Publisher., The Netherlands: Dordrecht.
- Howard, P. y Meylan, W. 1997. Handbook of physical properties of organic chemicals.: CRC Press, Lewis Publishers, Boca Raton, Fl. pp. 3, 18, 49,518,723. <http://ohioline.osu.edu/hyg-fact/5000/pdf/5255.pdf>. 2010

- Hugunin, A.G y Bradley, R.L. 1971. Distribution of Organochlorine Pesticides Among Some Milk Components. *J. Dairy Sci.* 54(3):355-359.
- Hwang, C.H. y Gunasekaran, S. 2001. Measuring crumbliness of some commercial Queso Fresco-type Latin American cheeses. *Milchwissenschaft.* 56: 446-450.
- IARC.1993. International Agency for the Research of Cancer: Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic amines and mycotoxins. IARC monographs on evaluation of carcinogenic risk to humans (Vol.56). Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
- IARC. 2002. International Agency for the Research of Cancer: Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC Expert Committee, World Health Organization. Monograph 82:171, Lyon, France. <https://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol82/mono82.pdf>
- Iha, M.H., Barbosa, C.B., Okada, I. A. y Trucksess, M.W. 2013. Aflatoxin M₁ in milk and distribution and stability of aflatoxin M₁ during production and storage of yoghurt and cheese. *Food Control.* 29(1): 1-6.
- INE.2004. Instituto Nacional de Ecología: El Lindano en México. p 56. México D.F.
- INECC. 1996. Instituto Nacional de Ecología y Cambio climático: ¿Porqué, para qué y cómo se evalúan los riesgos para la salud y el ambiente de los plaguicidas? Serie Plaguicidas, Bull. num. 2. SEMARNAP. Instituto Nacional de Ecología. México DF. pp 20.
- Janssen, D.B., Oppentocht, J.E., y Poelarends, G.J. 2001. Microbial dehalogenation. *Curr. Opin. Biotech.* 12(3): 254-258.
- Jiang, Q.T., Lee, T.K.M., Chen, K., Wong, H.L., Zheng, J.S., Giesy, J.P., Lo, K.K.W. y Yamashita, P.K.S. 2005. Human health risk assesmenth organochlorine associated with fish consumption in a coastal city in China. *Environ. Pollut.* 136:155-165.
- Johnson, E.A., Nelson, J.H. y Johnson, M. 1990. Microbial safety of cheese made from heat-treated milk, part II. *Microbiology. J. Food Protect.* 53:519- 540.
- Kale, S.P., Murthy, N.B., Raghu, K., Sherkhane, P.D. y Carvalho, F.P. 1999. Studies on degradation of 14C-DDT in the marine environment. *Chemosphere* 39:959-968.
- Kampire, E., Bernard, T., Kiremire, B.T., Nyanzi, S.A. y Kishimba M. 2011. Organochlorine pesticide in fresh and pasteurized cow's milk from Kampala markets. *Chemosphere.* 84:923-927.
- Kelce, W.R., Stone, C.R., Laws, S.C., Gray, L.E., Kemppainen, J.A. y Wilson E.M. 1995. Persisten DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature.* 375: 581-585.
- Khaniki, G.R. 2007. Chemical contaminants in milk and public health concerns: a review. *Int. J. Dairy Sci.* 2: 104-115.

- Kim, S. C., y Harmon, L. G. 1970. Relationship between some chlorinated hydrocarbon insecticides and lactic culture organisms in milk. *J. Dairy Sci.* 53(2):155-160.
- Klein, W. y Korte, F. 1970. Review: Metabolism of organochlorine compounds. En: Wegler, R. The chemistry of plant protection and pest control agents. Volume 1, pp. 199-218. Berlin-Heidelberg-New York, Springer Verlag (in German).
- Köhler, A., Jäger, A., Willershausen, H. y Graf, H. 1988. Extracellular ligninase of *Phanerochaete chrysosporium* Burdsall has no role in the degradation of DDT. *Appl Microbiol Biotech.* 29(6): 618-620.
- Kroes, R., Müller, D., Lambe, J., Löwik, M.R.H., Van Klaveren, J., Kleiner, J y Visconti, A. 2002. Assessment of intake from the diet. *Food Chem Toxicol.* 40(2): 327-385.
- Kubicová, L.U., Kadekova, K. y Dobák, D. 2014. Trends in consumption of milk and dairy products in Slovakia after EU accession. *Eur Policies Financ Market.*12:90-97.
- Kuritz, T. y Wolk, C. P. 1995. Use of filamentous cyanobacteria for biodegradation of organic pollutants. *Appl Environ Microbiol.* 61(1): 234-238.
- Langlois, B.E., Liska, B.J. y Hill, D.L. 1964. The effect of processing and storage of dairy products on chlorinated insecticide residues.I. DDT and lindane. *J. Milk and Food Technol.* 27: 264.
- LeBlanc, G. 1995. Trophic-level differences in the bioconcentration of chemicals: Implications in assessing environmental biomagnification. *Environ. Sci. Technol.* 29:154-160.
- Leblanc, J.C. 2002. De l'évaluation de l'exposition à l'appréciation du risque pour l'homme. Évaluation du risque toxicologique des OGM Commission du génie biomoléculaire. Septiembre, 2002. París, France. pp 14-22.
- Leblanc, J. C., Tard, A., Volatier, J. L. and Verger, P. 2005. Estimated dietary exposure to principal food mycotoxins from the first French Total Diet Study. *Food Addit Contam.* 22(7): 652-672.
- LeDoux, M. 2011. Analytical methods applied to the determination of pesticide residues in foods of animal origin. A review of the past two decades. *J. Chromatogr. A.* 1218(8):1021-1036.
- Lichtenstein, E. y Schulz, K. 1959. Persistence of some chlorinated hydrocarbon insecticides as influenced by soil types, rate of application and temperature. *J. Econ. Entomol.* 52(1):124-131.
- Liska, B.J. 1968. Effects of Processing on Pesticide Residues in Milk. *J. Anim Sci.* 27: 827-830.
- Litopoulou-Tzanetaki, E. y Tzanetakis, N. 1992. Microbiology study of whitebrined cheese made from raw goat milk. *Food Microbiol.* 9:13-19.

- Little, C.L., Rhoades, J. R., Sagoo, S. K., Harris, J., Greenwood, M., Mithani, V., Grant, K. y McLauchlin, J. 2008. Microbiological quality of retail cheeses made from raw, thermized or pasteurized milk in the UK. *Food Microbiol.* 25(2): 304-312.
- Liu, C., Li, S., Gao, R., Dang, J., Wang, W. y Zhang, Q. 2014. Mechanism and kinetic properties of NO₃-initiated atmospheric degradation of DDT. *J. Environ. Sci.* 26(3): 601-607.
- Lodha, B., Bhat, P., Kumar, M. S., Vaidya, A. N., Mudliar, S., Killedar, D. J., y Chakrabarti, T. 2007. Bioisomerization kinetics of γ -HCH and biokinetics of *Pseudomonas aeruginosa* degrading technical HCH. *Biochem. Eng. J.* 35(1):12-19.
- López, O.M., 2004. Mejoramiento de vida de anaquel en queso tradicional ranchero y queso de pasta hilada. Tesis de maestría en ciencia y tecnología de los alimentos. Universidad Iberoamericana, México D.F. pp 36-37.
- López, Hernández, K.M. 2005. Efecto de la pasteurización en los niveles de 1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano (DDT), hexaclorociclohexano (HCH) y sus metabolitos en leche de ganado vacuno. Tesis de Licenciatura en Química Clínica. Universidad Veracruzana. Veracruz, México.
- Lucey, J.A., Johnson, M.E. y Horne, D.S. 2003. Invited Review: Perspectives on the Basis of the Rheology and Texture Properties of Cheese. *J. Dairy Sci.* 86: 272-273.
- Macaulay, D.M., Hawirko, R.Z., y James, N. 1963. Effect of pasteurization on survival of certain psychrophilic bacteria. *Appl. Microbiol.* 11(2): 90-92.
- Maitre, M.I., De la Sierra, P., Lenardon, A. Enríque, S. y Marino, F. 1994. Pesticide residue levels in Argentina. *Sci. Total Environ.* 155(2):105-108.
- Mallatou, H., Pappas, C.P. y Albanis, T.A. 2002. Behavior of pesticides lindane and methyl parathion during manufacture, ripening and storage of feta cheese. *Int. J. Dairy Tech.* 55(4): 211-216.
- Manetta, A.C., Di Giuseppe, L., Giammarco, M., Fusaro, I., Simonella, A., Gramenzi, A. y Formigoni, A. 2005. High-performance liquid chromatography with post-column derivatisation and fluorescence detection for sensitive determination of aflatoxin M 1 in milk and cheese. *J. Chromatogr. A.* 1083: 219-222.
- Manickam, N., Misra, R., y Mayilraj, S. 2007. A novel pathway for the biodegradation of γ -hexachlorocyclohexane by a *Xanthomonas* sp. strain ICH12. *J Appl Microbiol.* 102(6): 1468-1478.
- Manickam, N., Reddy, M. K., Saini, H. S., y Shanker, R. 2008. Isolation of hexachlorocyclohexane-degrading *Sphingomonas* sp. by dehalogenase assay and characterization of genes involved in γ -HCH degradation. *J. Appl. Microbiol.* 104(4): 952-960.

- Marth, He y Steele, L. 2001. Applied dairy microbiology. Second edition. Ed. Marcel Dekker, Inc. New York, EEUU.
- Martínez, C.J., Cotera, J., Kido, M.T. 2013. Marketing and margins in channels of dairy products in Dobladero, Veracruz, Mexico. Rev Mex Agroneg XVII: 283-286.
- Mas, M. y González-Crespo, J. 1992. Bacterias lácticas en el queso de los Inores. Alimentaria. 28:41-43.
- Masotti, F. Johanes, A., Hogenboom, J.A., Rosi, V., De Noni, I., y Pellegrino, L. 2010. Proteolysis indices related to cheese ripening and typicalness in PDO Grana. Int. Dairy J. 20: 352-359.
- Mc Kellar, R.C. 1981. Development of off-flavors in ultrahigh temperature and pasteurized milk as a function of proteolysis. J. Dairy Sci. 64:2138-2145.
- McConnell, L.L., Bidleman, T.F., Cotham, W.E. y Walla, M.D.. 1998. Air concentrations of organochlorine insecticides and polychlorinated biphenyls over Green Bay, WI, and the four lower Great Lakes. Environ. Pollut. 101:391-399.
- Meironyté, D., Norén, K. y Bergman, A. 1999. Analysis of polybrominated diphenyl ethers in Swedish human milk. A time-related trend study, 1972-1997. J Toxicol Environ Health Part A. 58: 329-341
- Metcalf, R.L. 1995. Insect control technology. In: Kroschwitz J, Howe-Grant M (Eds). Kirk-Othemer encyclopedia of chemical technology. New York, NY: John Wiley and Sons, Inc. (14):524-602.
- Menzie, C. 1980. Reaction types in the environment. Pp. 247-302. En: Reactions and processes (Ed. Hutzinger O). New York, NY: Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. Metcalf RL. Insect control technology. In: Kroschwitz J, Howe-Grant M (Eds). Kirk-Othemer
- Meylan, W., Howard, P. y Boethling, R. 1992. Molecular topology/fragment contribution method for predicting soil sorption coefficients. Environ. Sci. Technol. 26(8):1560-1567.
- Miller, G. y Zepp, R. 1979. Photoreactivity of aquatic pollutants sorbed on suspended sediments. Environ. Sci. Toxicol. 13(7): 860-863.
- Mohamad, B., Garza, Almanza, V. y Landeros J. 2006. Efectos de los plaguicidas en la fauna silvestre. CULCyT. 3:14-44.
- Namakforoosh, M. N. (2000). *Metodología de la investigación*. Editorial Limusa.
- Moore, P.L., Richter, R.L. y Dill, C.W. 1986. Composition, yield, texture, and sensory characteristics of Mexican white cheese. J Dairy Sci 69: 855-862.
- Moorman, P.G. y Terry, D.T. 2004. Consumption of dairy products and the risk of breast cancer: a review of the literature. Am. J. Clin. Nutr. 80: 5-14.
- Morita, R. Y. 1975. Psychrophilic bacteria. Bacteriologic. Rev. 39(2): 144.

- Mougin, C., Pericaud, C., Dubroca, J., & Asther, M. 1997. Enhanced mineralization of lindane in soils supplemented with the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Soil Biol. Biochem.* 29(9): 1321-1324.
- Murphy, P.G. 1972. Sulfuric acid cleanup of animal tissues for analysis of acid-stable chlorinated hydrocarbon residues. *J. AOAC Int.* 55(6):1360-1362.
- Mozaffarian, D., Benjamin, E.J., Go, A.S., Arnett, D.K., Blaha, M.J., Cushman, M. y Huffman, M.D.I. 2015. Heart Disease and Stroke Statistics—2015 Update. *Circulation (Amer Health Assoc)*.131:29-322.
- Nagata, Y., Endo, R., Ito, M., Ohtsubo, Y. y Tsuda, M. 2007. Aerobic degradation of lindane (γ -hexachlorocyclohexane) in bacteria and its biochemical and molecular basis. *Appl. Microbiol Biot.* 76(4): 741-752.
- Naudé, Y y Rohwer, E.R. 2012. Two multidimensional chromatographic methods for enantiomeric analysis of o.p'-DDT, o.p'-DDD in contaminated soil and air in a malaria área of South Africa. *Analytica chimica acta.* 730: 120-126
- Norma Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-1994. Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias. Bienes y Servicios . Secretaría de Salud.
- Norma Oficial Francesa NF en ISO 14501 (2007). Milk and Milk powder-Determination of aflatoxin M₁ Content-Clean-up by immunoaffinity chromatography and determination by high-performance liquid chromatography. Francia
- Núñez, M. 1978. Microflora of Cabrales cheese: changes during maturation. *J. Dairy Res.* 45:501-508.
- Núñez, M. y Martínez-Moreno, J.L. 1976. Flora microbiana del queso Manchego. I. Evolución de la flora microbiana de quesos Manchegos artesanos. *Anales del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias.* Madrid, España. 4:11-31.
- O'Brien, N.M., and P.T. O'Connor. 2004. Toxins in Cheese. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology.* Third Ed. Vol 1: Great Aspects. Elsevier Ltd.
- Ocampo-Camberos, L., Rosiles-Martínez, R., Tapia-Pérez, G. y Sumano-López, H. 2010. Cinética De Eliminación De Lindano En Grasa De Leche De Vacas Tratadas Con Tres Dosis De Lindano. *Agrociencia.* 44:461-469.
- Ordóñez, J.A. y Burgos, J. 1977. Étude de la variété de fromage 'Ulloa'. I. Évolution de flore microbienne et des composants azotés au cours de la maturation. *Le lait.* 57:150-163.
- Organización mundial de la salud (OMS). 1990. Plaguicidas organoclorados.). 1990. Serie Vigilancia, Bull. 9. Organización panamericana de la salud (OPS). Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. México, D.F. pp 70-91.
- Ottar, B. 1981. The transfer of airborne pollutants to the Arctic region. *Atmos. Environ.* 15:1439-1445

- Oyugi, E. y Buys, E. M. 2007. Microbiological quality of shredded cheddar cheese Packaged in modified atmospheres. *Int. J. Dairy Tech.* 60(2): 89-95.
- Panizzolo, L. A., Araújo, A. C., Taroco, L. V., Rodríguez, A. y Schöpf, G. 2011. Evolución de la proteólisis durante la maduración de quesos Danbo elaborados con distintos cultivos iniciadores. *Tecnología Alimentaria.* 1(6):24-28.
- Pardío, V.T., Waliszewski, K.N., Landín, I. A., y Bautista, R.G. 2003. Organochlorine pesticide residues in cow's milk from a tropical region of México. *Food Addit. Contam.* 20(3):259-269.
- Pereyra, C.M., Alonso, V.A., Rosa, C.A.R, Chiacchiera S.M., Dalcerro AM, Cavaglieri, L. 2008. Glitoxin natural incidence and toxigenicity of *Aspergillus fumigates* isolated from corn silage and ready dairy cattle feed. *World Mycot J* 1: 463-467
- Pietri A, Bertuzzi T, Bertuzzi P. y Piva, G. 1997. Aflatoxin M1 occurrence in samples of Grana Padano cheese. *Food Addit Contam.* 14(4): 341-344.
- PLAGSALUD. 2008. Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud, Area de Desarrollo Sostenible y Salud Ambiental, Agencia Danesa para el Desarrollo Internacional. Proyecto Aspectos Ocupacionales y Ambientales de la Exposición a Plaguicidas en el Istmo Centroamericano (PLAGSALUD). Fecha de consulta: enero de 2008. Disponible en: <http://www2.ops.org/sv/plagsalud/index.htm>
- Potter, N.N. y Hotchkiss, J.H. 1999. Ciencia de los alimentos, 5ta Edición. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
- Pouillet, Blanca, Huertas, M., Sanchez, A., Cáceres, P. y Larriba, G. 1993. Main lactic acid bacteria isolated during ripening of César de Cáceres cheese. *J. Dairy Res.* 60:123-127.
- Prado, F.G., Díaz, G., Gutiérrez, T.R., Vega y León, S., Noa, P.M. y Chávez, G. E. 2007. Residuos de organoclorados en leche de cabra de Querétaro, Querétaro, México. *Vet. Méx.* 38(3):291-301.
- Prandini, A., Sigolo, S., Filippi, L., Battilani, P., and Piva, G. 2009. Review of predictive models for *Fusarium* head blight and related mycotoxin contamination in wheat. *Food Chem. Toxicol.* 47(5): 927-931.
- Prandini, A., Tansini, G., Sigolo, S., Filippi, L., Laporta, M., y Piva, G. 2009. On the occurrence of aflatoxin M 1 in milk and dairy products. *Food Chem. Toxicol.* 47(5): 984-991.
- Purchase, I. F. H. 1967. Acute toxicity of aflatoxins M₁ and M₂ in one-day-old ducklings. *Food Cosmet. Toxicol.* 5:339-342.
- Purchase, IF; Steyn, M; Rinsma, R; Tustin, RC. 1972. Reduction of the aflatoxin M content of milk by processing. *Food Cosmet. Toxicol.* 10: 383-387

- Prats, G., Mirelis, B (1998). Género *Shigella*: aspectos prácticos para el laboratorio de microbiología. *Boletín de Control de Calidad SEIMC* 10:15-23. Madrid España.
- Quensen, J.F., Tiedje, J.M., Jain, M.K. y Mueller, S.A. 2001. Factors controlling the rate of DDE dechlorination to DDMU in Palos Verdes margin sediments under anaerobic conditions. *Environ. Sci. Technol.* 35:286-291.
- R-Biopharm Rhone Ltd (2012) Easi-extract aflatoxin. Guía de uso para el usuario. RP71RP70N/V12/28.06.12. pp 3-12. Block 10 Todd Campus, West of Scotland Science Park. Acre Road, Glasgow G20 0XA. UK.
- Racke, K., Skidmore, M. y Hamilton, D. 1997. Pesticide fate in tropical soils. *Pure Appl. Chem.* 69(6):1349-1371.
- Ramírez, J. A y Lacasaña, M. 2001. Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Arch. Prev. Riesgos Labor.* 4(2): 67-75
- Rapaport, R.A., Urban, N.R., Capel, P.D., Baker, J.E., Looney, B.B., Eisenreich, S.J. y Gorham, E. 1985. "New" DDT inputs to North America: atmospheric deposition. *Chemosphere.* 14(9): 1167-1174.
- Rendon, J. 1990. Los insecticidas organoclorados. En: *Los plaguicidas y sus Efectos en el Ambiente y la Salud*. Centro de Ecodesarrollo. México, D.F. pp 100-110.
- Richter, E.D. 2002. Acute human poisonings. En: Encyclopedia of Pest Management (Ed. Pimentel, D). Dekker, New York, pp 3–6.
- Rosado, J.L., López, P., Morales, M., Muñoz, E. y Allen, L.H.1992. Bioavailability of energy, nitrogen, fat, zinc, iron and calcium from rural and urban Mexican diets. *Brit. J. Nutr.* 68: 45-58.
- Rose, G. y Shipley, M. 1986. Plasma cholesterol concentration and death from coronary heart disease: 10 year results of the Whitehall study. *Brit. Med. J.* 293:306-307.
- Rossini, G., Vicentin, J. y Depetris, E. 2015. Household Cheese Consumption in Argentina: A Double-Hurdle Model Estimation. In 143rd Joint EAAE/AAEA Seminar, March 25-27, 2015, Naples, Italy (No. 202739). European Assoc Agric Economists. Italy
- Rubio, R., Licon, C.C., Berruga, M.I., Molina, M.P., Molina, A. 2011. Short communication: Occurrence of aflatoxin M1 in the Manchego cheese supply chain. *J dairy Sci.* 94(6): 2775-2778.
- Sabljić, A. 1984. Predictions of the nature and strength of soil sorption of organic pollutants by molecular topology. *J Agric. Food Chem.* 32: 243-246.
- SAGARPA. 2012. Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera. (SIAP).

- Sahu, S. K., Patnaik, K. K. y Sethunathan, N. 1992. Dehydrochlorination of δ -isomer of hexachlorocyclohexane by a soil bacterium, *Pseudomonas* sp. *B Environ Cont Tox.* 48(2): 265-268.
- Salem, N.M., Ahmad, R. y Estaitieh, H. 2009. Organochlorine pesticide residues in dairy products in Jordan. *Chemosphere.* 77: 673–678
- Samuel, T. y Pillai, M.K.K. 1990. Effect of temperature and solar radiations on volatilisation, mineralisation and degradation of [14 C] DDT in soil. *Environ. Pollut.* 57:63-77.
- Sánchez-García, R., Reyes-Morales, H., González-Unzaga, M.A. 2014. Food preferences and nutritional status in school-age children living in Mexico. *Bol Med Hosp Infant Mex* 71: 358-366.
- Sánchez-Ponte, M.D. 2004. Estudio sobre los ácidos grasos libres en queso blanco Venezolano. *Revista de la Facultad de Farmacia.* 46(2):29-32.
- Sang, S., Petrovic, S. y Cuddeford V. 1999. Lindane a review of toxicity and environmental fate. *World Wildlife Fund Canada.* pp 9.
- Schettino, B.B.S., Díaz, G.G., Ortíz, S. R., Gutiérrez, T. R., Vega, S. y Martínez, F.I. 2008. Niveles de Residuos de Plaguicidas Organoclorados en leche pasteurizada orgánica y convencional comercializada en Ciudad de México. X Simposio y V Congreso Nacional de Agricultura Sostenible. Tuxtla Gutierrez, Chiapas. pp 63- 70.
- Seglar, W.J. 2003. Fermentation analysis and silage quality testing. In: *Proceedings of the Minnesota Dairy Health Conference.* May, Minneapolis MN. College of Veterinary Medicine, University of Minnesota, USA.
- Serhan, M., Linder, M., Hosri, Ch., and Fanni, J. 2010. Changes in proteolysis and volatile fraction during ripening of Darfiyeh, a Lebanese artisanal raw goat's milk cheese. *Small Ruminant Res.* 90:75-82.
- Shahani, K.M. y Whalen, P.J. 1986. Significance of antibiotics in food and feeds. In *WA Moats (ed.), Agricultural uses of antibiotics.* (pp. 88–99). 190th Meeting of the American Chemical Society, Washington, D.C.
- Shan, Z.J. 1997. Status of pesticide pollution and management of China. *Environ. Protec.* 7:40-43.
- Shephard, G.S. 2003. Aflatoxin and food safety: recent African perspectives. *J Toxicol.Toxin Rev.* 22: 267-286.
- Shephard, G.S. 2009. Aflatoxin analysis at the beginning of the twenty-first century. *Anal. Bioanal. Chem.* 395:1215-1224. SIAP-SAGARPA. 2014. Panorama de la carne y leche de bovino. *Boletín Mayo* 2014.
- Signorini, M.L., Gaggiotti, M., Molineri, A., Chiericatti, C.A., de Basílico, M.Z., Pisani, M. 2012. Exposure assessment of mycotoxins in cow's milk in Argentina. *Food Chem. Toxicol.* 50: 250-257.
- Silva, G. 2006. Manual de elaboración de quesos. CEDELE. Hidalgo, México.

- SIAP. 2015. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera: Boletín de Leche. Marzo de 2015. Accessed 13 Dec 2015.
- Singh, B.K., Kuhad, R.C., Singh, A., Lal, R., y Tripathi, K.K. 1999. Biochemical and molecular basis of pesticide degradation by microorganisms. *Crit. Rev. Biotechnol.* 19(3): 197-225.
- Smith, K.L. 2010. Cultural diversity: Eating in American-Mexican-American. Ohio State University Extension. Fact sheet: HYG-5255-95. Accessed 15, Sep 2015
- Smoczynski, S., Jaworski, J., Borejszo, Z. y Kleppin, R. 1974. Chlorinated hydrocarbons in ripening cheeses. 2. Romadur, Brie and Camembert cheeses. *Roczniki Instytutu Przemysłu Mleczarskiego.* 16(2): 55-61.
- Sørhaug, T. y Stepaniak, L. 1997. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. *Trends. Food Sci. Tech.* 8(2): 35-41.
- Soriano del Castillo, J. 2007. Micotoxinas en alimentos. Edic Díaz de Santos. Valencia, España.
- Škrbić, B.I. Antić, I. y Živančev J: 2015. Presence of aflatoxin M₁ in white and hard cheese samples from Serbia. *Food Control*, 50: 111-117.
- Stanley, C., Barney, J., Helton, M. y Yobs, A. 1971. Measurement of atmospheric levels of pesticides. *Environ. Sci. Technol.* 5(5):430-435.
- Stewart, D. y Chisholm, D. 1971. Long-term persistence of BHC, DDT and chlordane in a sandy loam soil. *Can. J. Soil Sci.* 51:379-383.
- Strompl, C. y Thiele, J. 1997. Comparative fate of 1,1-diphenylethylene(DPE), 1,1-dichloro-2,2-bis(4chlorophenyl)-ethylene(DDE), and pentachlorophenol(PCP) under alternating aerobic and anaerobic conditions. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 33: 350-356.
- Swann, R.L., McCall, P.J., Laskowski, D.A. y Dishburger, H.J.1981. Estimation of soil sorption constants of organic chemicals by high-performance liquid chromatography. *ASTM Spec. Tech. Pub.* 737:43-48.
- Thomas, R.G. 1990. Volatilization from soil. pp. 16-25 to16-28. En: *Handbook of chemical property estimation methods: environmental behavior of organic compounds.* (Ed. Lyman, W.J., Reehl, W.F., Rosenblatt, D.H.). American chemical society. Washington, Dc .
- Thompson, F.E., Byers, T. y Kohlmeier, L. 1994. Dietary assessment resource manual. pp 2245-2317.
- Torres-Vitela, M.R., Mendoza-Bernardo, M., Castro-Rosas, J., Gómez-Aldapa, C.A. y Garay-Martínez, L.E. Navarro-Hidalgo, V. y Villarruel-López, A. 2012. Incidence of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157: H7, and staphylococcal enterotoxin in two types of Mexican fresh cheeses. *J. Food Protect.* 75: 79-84.

- Torkar, K. G. y Vengušt, A. 2008. The presence of yeasts, moulds and aflatoxin M₁ in raw milk and cheese in Slovenia. *Food Control*. 19(6):570-577.
- Tornadijo, M.E., Fresno, J.M., Bernardo, A., Martín.Sarmiento, R. y Carballo, J. 1995. Microbiological changes throughout the manufacturing and ripening of a Spanish goat's raw milk cheese (Armada variety). *Lait*. 75:551-570.
- Torres-Llanez, M.J., Vallejo-Córdoba, B., Díaz-Cinco, M.E., Mazorra-Manzano, M.A. y González-Córdova, A.F. 2006. Characterization of the natural microflora of artisanal Mexican Fresco cheese. *Food Control*. 17: 683-690.
- Tressou, J., Crépet, A., Bertail, P., Feinberg, M. y Leblanc, J.C. 2004. Probabilistic exposure assessment to food chemicals based on extreme value theory. Application to heavy metals from fish and sea products. *Food chem. toxicol.* 42: 1349-1358.
- Trombete, F.M., Castro I.M.D., Teixeira, A.D.S., Saldanha. T. y Fraga, M.E. 2014. Aflatoxin M₁ contamination in grated parmesan cheese marketed in Rio de Janeiro-Brazil. *Braz. Archf. Biol. Technol.* 57(2):269-273.
- Trudgill, P.W. y Bowering, S.R.H. 1972. Accumulation of [14C] Aldrin by Organochlorine Insecticide Sensitive and Resistant Bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 73(3): 577-580.
- Turner, N.W., Subrahmanyam, S. y Piletsky, S.A. 2009. Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. *Anal. Chim. Acta.* 632 (2): 168-180.
- UNEP. 2005. United Nations Environment Programme: Ridding the world of pops: a guide to the stockholm convention on persistent organic pollutants. Disponible en: Stockholm, Sweeden. www.pops.int, consultado el 14 mayo del 2014.
- Urban, G., J. Pérez, F. Martínez, J. Salas, G. Díaz, M.L. Ramírez, G. Castro, S. Vega, R. Gutiérrez y A. Escobar. 2009. Niveles de aflatoxina M₁ en quesos frescos producidos en diferentes zonas de México. *Rev. Salud Anim.* 31: 115-121.
- Urrego Novoa, J. R. y Díaz, G. J. 2006. Aflatoxinas: mecanismos de toxicidad en la etiología de cáncer hepático celular. *Revista de la Facultad de Medicina.* 54(2): 108-116.
- USEPA. 1998. United States Enviromental Protection Agency: Guidance for Conducting Fish and Wildlife Consumption Surveys. United States Environmental Protection Agency. EPA-823-B-98-007. Office of Water, Whashington. 57p
- USEPA. 2000. Guidance for Assessing Chemical Contaminant, Data for Use in Fish Advisories: Fish Sampling and Analysis. Volúmen I. Third Ed. Office Water. Whashington. EPA 823-R-95-007.
- Van, Metre, P., Callender, E. y Fuller, C. 1997. Historical trends in organochlorine compounds in river basins identified using sediment cores from reservoirs. *Environ. Sci. Technol.* 31:2339-2344.

- Vargas, T.M., Peláez, J.I. y Sánchez, C.S. 2014. Overweight, obesity and socio-cultural conditions in school children between seven and eleven years old in the city of Orizaba, Veracruz. *An. Inst. Nac. Antropol. Hist.* 48: 273-299.
- Veisseyre, R. 1988. *Lactología Técnica*. 2da Edición. Editorial Acribia. España
- Verma, A. y Pillai, M.K.K. 1991. Bioavailability of soil-bound residues of DDT and HCH to earthworms. *Curr. Sci.* 61(12):840-843.
- Verwer, R. W. y Nanninga, N. 1976. Electron microscopy of isolated cell walls of *Bacillus subtilis* var. *niger*. *Arch Microbiol.* 109(1-2): 195-197.
- Vollner, L., Klotz, D. 1994. Behaviour of DDT under laboratory and outdoor conditions in Germany. *J. Environ. Sci. Health B* 29(1):161-167.
- Waliszewski, S.M., Aguirre, A.A., Infanzon, R.M. y Siliceo, J. 2000. Variación de los niveles de plaguicidas organoclorados durante el tratamiento térmico de la leche de vaca. *Int. Contam. Ambient.* 16(2): 61-66.
- Wang, W., Li, X.H. y Lu, H. 2008. Residual and potential risk of organochlorine pesticides in urban soils of Yinchuan. *J. Wenzhou University. Natural Sciences.* 29(2): 32-37.
- Wania, F. y MacKay, D. 1993. Global fractionation and cold condensation of low volatility organochlorine compounds in polar regions. *Ambio.* 22:10-18.
- Ware, G. 1980. Effects of pesticides on non target organisms. *Residue Rev.* 76:173-201.
- WHO. 1997. World Health Organization: Guidelines for predicting dietary intake of pesticide residues. GEMS/Food in collaboration with the codex committee on pesticide residues. Document WHO/FSF/FOS/97.7. Geneva.
- WHO. 1985. World Health Organization: Guidelines for the study of dietary intakes of chemical contaminants. WHO Off set Publication no. 87. Geneva.
- http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/39255/1/WHO_OFFSET_87.pdf
- www.codexalimentarius.org/input/download/standards/6/cxg_003s.pdf
- Yu, J. 2012. Current understanding on aflatoxin biosynthesis and future perspective in reducing aflatoxin contamination. *Toxins.* 4(11): 1024-1057.
- Zamora, R. y Lucero, M. 2003. Aislamiento, Identificación y Conservación de Cultivos de Bacterias Lácticas Antagonistas de Microbiota Contaminante de Sangre de Matadero. Tesis para obtener el grado de doctor. Universidad de Girona. Girona España.
- Zárate, V., Belda, F., Pérez, C. y Cardell, E. 1997. Changes in the microbial flora of Tenerife goat's milk cheese during ripening. *Intern. Dairy J.* 7:635-641.

Zhang, W.J., Jiang, F.B. y Ou, J.F. 2011. Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus. *Ecol. and Environ. Sci.* 1(2):125-144.

Zhao, Y. y Yi, X. 2010. Effects of soil oxygen conditions and soil pH on remediation of DDT-contaminated soil by laccase from white rot fungi. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 7(4):1612-1621.

Zook, C., Feng, J. 1999. 1,1,1-trichloro-2,2-bis-(4'-chlorophenyl)ethane (DDT) pathway map. http://dwb4.unl.edu/chem/chem869p/chem869plinks/www.labmed.umn.edu/umbbd/ddt2/ddt2_map.html. Fecha de consulta: 1 agosto 2014.



ANEXOS

ANEXO 1. CUESTIONARIO DE FRECUENCIA DE COMPRA DE QUESO

Investigación del consumo de Queso en la zona de Veracruz

Muchas gracias por tomarse el tiempo para completar esta encuesta de Investigación científica. Su participación es de gran importancia para llevar a cabo este estudio. Esta encuesta requiere sólo 5 minutos de su tiempo.

Fecha: d/ ___ m/ ___ a/ ___

Folio: _____

Nombre: _____ Género: M F

Edad: _____ Peso: _____ Embarazada: _____ Colonia: _____ Ciudad: _____

1. ¿Cuál es su ocupación?

- a) Estudiante b) Empleado c) Trabajador independiente d) Hogar e) Desempleado

2.- Último grado de estudios con reconocimiento:

- a) Primaria b) Secundaria c) Técnico d) Bachillerato e) Licenciatura
e) Especialidad f) Postgrado g) sin estudios

Clase alta	C. Media alta	Clase Media	C. Media Baja	Clase Baja	C. Más Baja
------------	---------------	-------------	---------------	------------	-------------

3.- Indique en qué nivel socioeconómico cree usted que pertenece

4.- ¿Cuántas personas conforman su grupo familiar?

No. de Personas	Género	Edad	Peso
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			

5.- ¿En qué época del año consume con mayor frecuencia Queso?

- a) primavera b) verano c) otoño d) inviernos e) Todo el año f) Otra, especifique: _____

6.- ¿Cada cuánto compra regularmente queso?

- a) Diario b) tres veces por semana c) 1 vez a la semana d) 1 vez a la quincena e) otra: _____

7. ¿Cuánto compra de queso, las veces que usted va a comprarlo?

 <p>a) Fresco _____</p>	 <p>b) Requesón _____</p>	 <p>c) Americano _____</p>	 <p>d) Cottage _____</p>
 <p>e) Oaxaca o Hebra _____</p>	 <p>f) Manchego _____</p>	 <p>g) Parmesano _____</p>	 <p>h) Mozzarella _____</p>

8.- ¿Cuántas veces comió usted fuera de casa, la semana que acaba de pasar?

	Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Sábado	Domingo
Desayuno							
Comida							
Cena							

9.- ¿En qué parte del día consume usted más Queso?

- a) Desayuno b) Comida o almuerzo c) Cena d) Todo el día

“Ha finalizado la encuesta. Muchas gracias por su tiempo”



ANEXO 2. CUESTIONARIO DIARIO DE CONSUMO DE QUESO OAXACA

Muchas gracias por tomarse el tiempo para completar esta encuesta para cada persona, por familia, por 7 días. Su participación es de gran importancia para llevar a cabo este estudio.

Fecha: d/ ___ m/ ___ a/ ___

Folio: _____

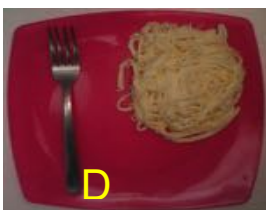
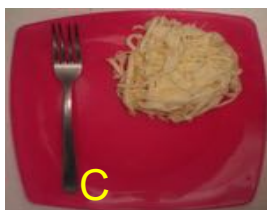
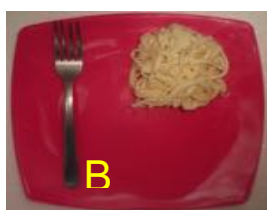
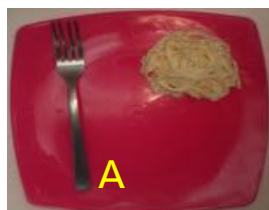
1.- Indique a qué nivel socioeconómico cree usted que pertenece

Clase alta	C. Media alta	Clase Media	C. Media Baja	Clase Baja	C. Más Baja
------------	---------------	-------------	---------------	------------	-------------

2.- Escriba la edad, el género y el peso, de cada uno de los miembros de su familia

Persona	1	2	3	4	5	6	7	8
Edad(años)								
Género (F/M)								
Peso (kg)								

3.- Seleccione la(s) porción(es) que usted y cada uno de los integrantes de su familia consume por día y por cada comida, en los próximos 7 días



	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
Persona 1	¿Cuál porción?	¿Cuál porción?	¿Cuál porción?	¿Cuál porción?	¿Cuál porción?	¿Cuál porción?	¿Cuál porción?
Desayuno							
Comida							
Cena							
Persona 2							
Desayuno							
Comida							
Cena							
Persona 3							
Desayuno							
Comida							
Cena							
Persona 4							
Desayuno							
Comida							
Cena							
Persona 5							
Desayuno							
Comida							
Cena							
Persona 6							
Desayuno							
Comida							
Cena							
Persona 7							
Desayuno							
Comida							
Cena							
Persona 8							
Desayuno							
Comida							
Cena							



ANEXO 3. CUESTIONARIO DIARIO DE CONSUMO DE QUESO FRESCO

Muchas gracias por tomarse el tiempo para completar esta encuesta para cada persona, por familia, por 7 días. Su participación es de gran importancia para llevar a cabo este estudio.

Fecha: d/ ___ m/ ___ a/ ___

Folio: _____

1.- Indique a qué nivel socioeconómico cree usted que pertenece

Clase alta	C. Media alta	Clase Media	C. Media Baja	Clase Baja	C. Más Baja
------------	---------------	-------------	---------------	------------	-------------

2.- Escriba la edad, el género y el peso, de cada uno de los miembros de su familia

Persona	1	2	3	4	5	6	7	8
Edad(años)								
Género (F/M)								
Peso (kg)								

3.- Seleccione la(s) porción(es) que usted y cada uno de los integrantes de su familia consume por día y por cada comida, en los próximos 7 días



	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
Persona 1	¿Cuál porción?	¿Cuál porción?	¿Cuál porción?	¿Cuál porción?	¿Cuál porción?	¿Cuál porción?	¿Cuál porción?
Desayuno							
Comida							
Cena							
Persona 2							
Desayuno							
Comida							
Cena							
Persona 3							
Desayuno							
Comida							
Cena							
Persona 4							
Desayuno							
Comida							
Cena							
Persona 5							
Desayuno							
Comida							
Cena							
Persona 6							
Desayuno							
Comida							
Cena							
Persona 7							
Desayuno							
Comida							
Cena							
Persona 8							
Desayuno							
Comida							

ANEXO 4: CURVAS DE CALIBRACIÓN

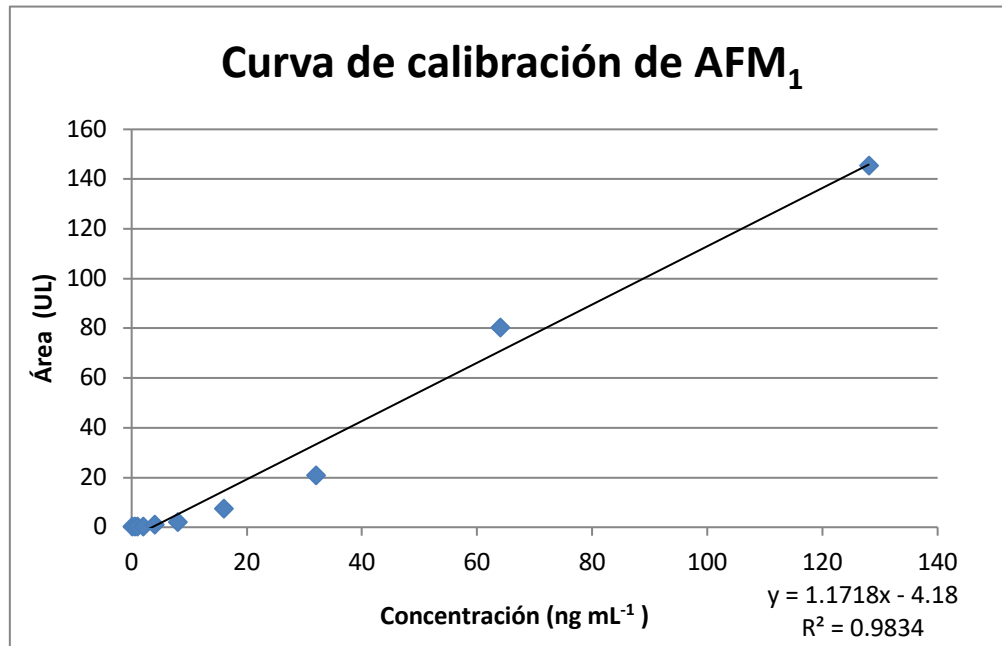
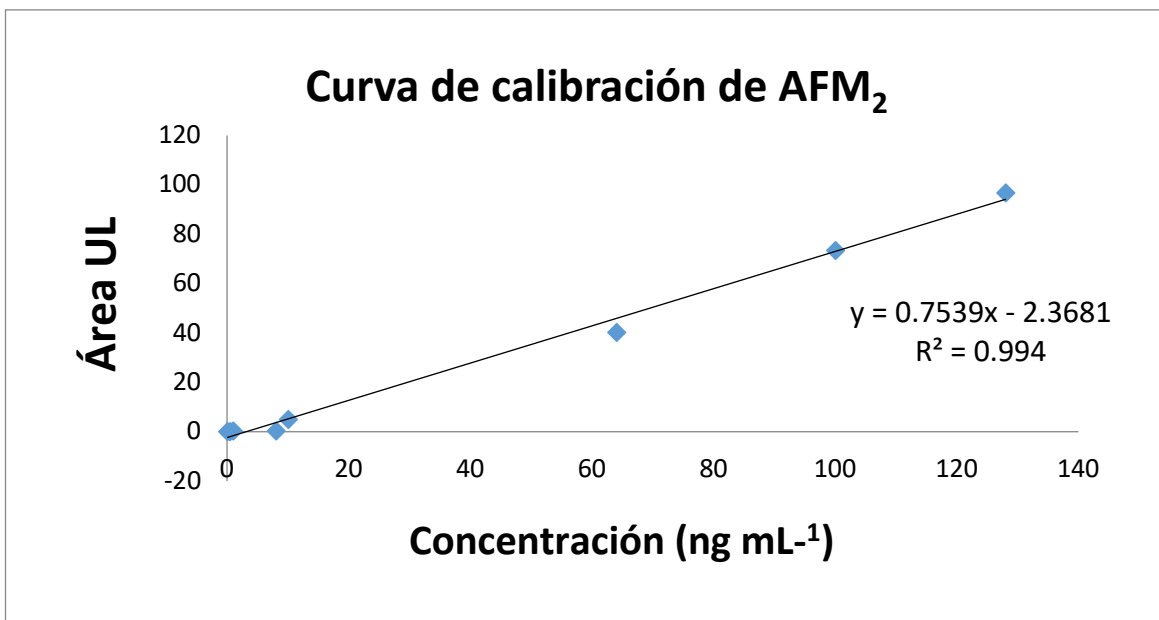
Figura A4.1. Curva de calibración de AFM₁.Figura. A4.2. Curva de calibración AFM₂.

Tabla A4.1 Datos de la curva de calibración de AFM₁

Concentración (ng mL⁻¹)	Área (UL)	Tiempo de retención (min)
0.1	0.225	8.514
0.5	0.247	8.556
1	0.245	8.525
2	0.300	8.563
4	1.004	8.638
8	2.105	8.691
16	7.387	8.745
32	20.748	8.769
64	80.184	8.757
128	145.265	8.685

Tabla A4.2 Datos de la curva de calibración de AFM₂.

Concentración (ng mL⁻¹)	Área (UL)	Tiempo de Retención (min)
0.05	0.146	20.208
0.5	0.16	22.447
2	0.5	20.544
64	38.9	20.966
100	73.412	20.905
128	90.17	20.844