



UNIVERSIDAD DE CUENCA
CENTRO DE ESTUDIOS AMBIENTALES



MAESTRÍA EN TOXICOLOGÍA INDUSTRIAL Y AMBIENTAL

DETERMINACIÓN DEL METABOLITO TÓXICO DE ORIGEN FÚNGICO EN LECHE CRUDA, PASTEURIZADA Y ULTRAPASTEURIZADA CONSUMIDAS EN LA CIUDAD DE CUENCA: AFLATOXINA AFM₁ MEDIANTE LA TÉCNICA DE ELISA.

TESIS PREVIA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MÁSTER EN TOXICOLOGÍA INDUSTRIAL Y AMBIENTAL.

TESIS GANADORA DEL VI CONCURSO UNIVERSITARIO DE TESIS DE INVESTIGACIÓN DE POSGRADO DE LA DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN DE LA UNIVERSIDAD DE CUENCA

AUTORA:

DRA. MARÍA FERNANDA UGUÑA ROSAS.

DIRECTORA:

DRA. ISABEL WILCHES ARIZÁBALA. MS.C

ASESOR:

ING. VLADIMIRO ALEXIS TOBAR SOLANO. MS. C

CUENCA – ECUADOR

2013



RESUMEN

En la actualidad existe una gran preocupación de los organismos de salud a nivel mundial por los temas de toxicología alimentaria y la contaminación que tiene los alimentos por metabolitos tóxicos como la aflatoxina AFM₁ lo cual constituye un riesgo latente de diferentes afecciones en la salud como inmunosupresores de procesos de síntesis interrumpiendo la formación de ADN y ARN causando implacables efectos mutagénicos, teratogénicos y carcinogénicos además lesiones hepáticas en los animales, y cancerígeno grupo 1 para el hombre, siendo un problema alarmante que requiere ser analizado desde el aspecto nutricional, toxicológico, socioeconómico, ambiental, científico y de control.

Este estudio se realizó con el objetivo de determinar cuantitativamente el contenido de Aflatoxina AFM₁ en tres tipos de leche cruda, pasteurizada y ultra pasteurizada consumidas en la ciudad de Cuenca, mediante la Técnica de ELISA y comparar los resultados obtenidos con los parámetros máximos referidos internacionalmente por la FDA(Food and Drug Administration de los Estados Unidos de América), la FAO(Food and Agriculture Organization) y la normativa nacional vigente INEN (Instituto Ecuatoriano de Normalización). De las muestras analizadas ninguna sobrepasó el límite de detección de la técnica (125 ppt o 0,125 ppb), el cual está por debajo de los límites máximos establecidos tanto por la normativa nacional INEN 9-10 vigente y los parámetros establecidos por la FAO y FDA (0,5ppb). Por lo tanto, la concentración de aflatoxina AFM₁ en las leches analizadas por la técnica de ELISA no contiene niveles que constituya algún riesgo de salud para la población consumidora.

PALABRAS CLAVES: Aflatoxina, micotoxina, mutagénesis, teratogénesis, carcinogénesis



ABSTRACT

At present there is great concern of health agencies worldwide for food toxicology issues and pollution that has food by toxic metabolites such as aflatoxin AFM1 which is a latent risk in different health conditions such as immunosuppressive synthesis processes interrupting the formation of DNA and RNA causing relentless mutagenic, teratogenic and carcinogenic further liver damage in animals, and group 1 carcinogen to humans , with an alarming problem that needs to be analyzed from the nutritional , toxicological , socioeconomic , environmental, scientific and control.

This study was conducted in order to determine quantitatively the content of aflatoxin AFM1 in three types of raw milk, pasteurized and ultra pasteurized consumed in the city of Cuenca, by ELISA technique and compare the results obtained with the maximum parameters referred internationally FDA (Food and Drug Administration of the United States of America) , FAO (Food and Agriculture Organization) and current national regulations INEN (Ecuadorian Standardization Institute) . Of the samples tested any exceeded the detection limit of the technique (125 ppt or 0.125 ppb) , which is below the maximum limits established by national law both INEN 9-10 force and the parameters set by FAO and FDA (0.5 ppb). Therefore, the concentration of aflatoxin AFM1 in milk analyzed by ELISA does not contain levels constituting a health risk to the consumer population .

KEY WORDS: aflatoxin , mycotoxin, mutagenicity, teratogenicity , carcinogenicity



INDICE

INTRODUCCION.....	15
1.1. GENERALIDADES.....	19
1.1.1. AFLATOXINAS:	20
1.1.2. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LAS AFLATOXINAS:.....	21
1.2. FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE LA TOXICIDAD DE LAS AFLATOXINAS:.....	22
1.3. AFLATOXINA M1 (AFM1):	26
1.4. CLASIFICACIÓN DE LAS AFLATOXINAS SEGÚN SU RIESGO CANCERÍGENO.....	27
1.5. MICOTOXICOSIS:.....	29
1.6. DOSIS DE AFLATOXINA: MORTALIDAD.....	30
1.7. METABOLISMO DE LA AFLATOXINA (AFM1), TRANSFORMACIÓN Y EFECTO:.....	31
1.8. PRESENCIA DE AFLATOXINA AFM1 EN LECHE:	33
1.8.1. ESTABILIDAD DE LA AFLATOXINA AFM1 EN PRODUCTOS LÁCTEOS: 33	
1.8.2. COMPOSICIÓN DE LA LECHE	34
1.8.2.1. ¿QUÉ ES LA LECHE?.....	34
1.8.3. CLASIFICACIÓN DE LA LECHE:	35
1.8.3.1. DISPOSICIONES GENERALES PARA LECHE CRUDA, PASTEURIZADA Y LARGA VIDA SEGÚN LA NORMATIVA INEN	36
1.8.3.2. LIMITES DE AFLATOXINA AFM1 EN LECHE CRUDA, PASTEURIZADA SEGÚN LA NORMATIVA INEN:.....	39
1.8.3.3. REQUISITOS MICROBIOLÓGICOS PARA LECHE CRUDA, PASTEURIZADA Y LARGA VIDA SEGÚN LA NORMATIVA INEN:	39
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
2.1.1. MUESTRAS DE LECHE PARA EL ANÁLISIS Y SELECCIÓN.	41
2.2. ANÁLISIS DE AFLATOXINA M1	45
2.2.1. FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA CUANTITATIVA DE ELISA (ENZIMO- INMUNO-ANÁLISIS) POR INHIBICIÓN DIRECTA.	45
2.3. REACTIVOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS AFM1.	45
2.4. Preparación de Muestras	46



ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
RESULTADOS DE LA PRUEBA DE ELISA EN LA DETERMINACIÓN DE AFLATOXINA M ₁ EN LECHE:	51
3.2 . DISCUSIÓN:.....	61
4.1. CONCLUSIONES:.....	64
5.1. RECOMENDACIONES	66
6.1. BIBLIOGRAFÍA	68



ÍNDICE DE TABLAS:	Pág.
Tabla 1: Grado de carcinogénesis de las distintas micotoxinas (Centro Internacional de Reserche contre le Cáncer en 1998).	28
Tabla 1.2: Dosis Letal Cincuenta (DI50) De Aflatoxinas (Camean et al 2008).	30
Tabla 1.3: Clasificación De La Leche Según Su Contenido Graso (INEN NTE 9-10 2012) (INEN NTE 701 2009).	35
Tabla1.4: Requisitos Físico-Químicos De La Leche Cruda-Pasteurizada Y Larga vida.	36
Tabla 1.5: Requisitos Físico-Químicos De La Leche Cruda-Pasteurizada Y Larga vida.	37
Tabla 1.6: Requisitos Físico-Químicos De La Leche Cruda-Pasteurizada Y Larga vida.	38
Tabla 1.7: Límite Máximo De Aflatoxina AFM ₁ para La Leche Cruda-Pasteurizada Y Larga vida	39
Tabla 1.8: Requisitos Microbiológicos de La Leche Cruda-Pasteuriza Y Larga Vida Larga vida	39
Tabla 2.1: Muestras de leche recolectadas según marca, tipos, tipo de tratamiento térmico, número de muestras seleccionadas, lote y lugar de recolección.	43
Tabla 2.2: Muestras de leche analizadas según series.	44
Tabla 2.3: Reactivos para Inmunoensayo enzimático Ridascreen ^{fast} Aflatoxin M ₁	46
Tabla 3. 1: Valores de la media, absorbancia, coeficiente de variación y % de absorbancia para muestra de leche Nutri leche descremada UHT (Muestreo 1).	51
Tabla 3.2: Valores de la media, absorbancia, coeficiente de variación y % de absorbancia para muestra de leche Nutri leche descremada UHT (Muestreo 2).	51
Tabla 3.3: Valores de la media, absorbancia, coeficiente de variación y % de absorbancia para muestra de leche La Lechera descremada UHT (Muestreo 1).	52



Tabla 3.4. Valores de la media, absorbancia coeficiente de variación y % de absorbancia para muestra de leche La Lechera descremada UHT (Muestreo 2).	52
Tabla 3.5: Valores de la media, absorbancia, coeficiente de variación y % de absorbancia, para muestra de leche Parmalat leche descremada UHT (Muestreo 1).	53
Tabla 3.6: Valores de la media, absorbancia, coeficiente de variación y % de absorbancia, para muestra de leche Parmalat descremada UHT (Muestreo 2).	53
Tabla 3.7: Valores de la media, absorbancia, coeficiente de variación y % de absorbancia, para muestra de leche Nutri Leche entera UHT (Muestreo 1).	54
Tabla 3.8: Valores de la media, absorbancia, coeficiente de variación y % de absorbancia, para muestra de leche Nutri Leche entera UHT (Muestreo 2).	54
Tabla 3.9: Valores de la media, absorbancia, coeficiente de variación y % de absorbancia, para muestra de leche La Lechera entera a UHT (Muestreo 1).	55
Tabla 3.10: Valores de la media, absorbancia, coeficiente de variación y % de absorbancia, para muestra de leche La Lechera entera UHT (Muestreo 2).	55
Tabla 3.11: Valores de la media, absorbancia, coeficiente de variación y % de absorbancia, para muestra de leche Parmalat descremada UHT (Muestreo 1).	56
Tabla 3.12: Valores de la media, absorbancia, coeficiente de variación y % de absorbancia, para muestra de leche Parmalat descremada UHT (Muestreo 2).	56
Tabla 3.13: Valores de la media, absorbancia, coeficiente de variación y % de absorbancia, para muestra de leche Tony entera UHT (Muestreo 1).	57
Tabla 3.14: Valores de la media, absorbancia, coeficiente de variación y % de absorbancia, para muestra de leche Tony entera UHT (Muestreo 2).	57
Tabla 3.15: Valores de la media, absorbancia, coeficiente de variación y % de absorbancia, para muestra de leche Nutri Leche entera pasteurizada (Muestreo 1).	58



Tabla 3.16 Valores de la media, absorbancia, coeficiente de variación y % de absorbancia, para muestra de leche Nutri leche entera pasteurizada (Muestreo 2). 58

Tabla 3.17 Valores de la media, absorbancia, coeficiente de variación y % de absorbancia, para muestra de leche entera cruda (Muestreo 1). 59

Tabla 3.18: Valores de la media, absorbancia, coeficiente de variación y % de absorbancia, para muestra de leche entera cruda (Muestreo 2). 59

Tabla 3.19: Valores de Aflatoxina AFM1 determinados por HPLC 60



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

Yo, DRA. MARÍA FERNANDA UGUÑA ROSAS, autora de la tesis “**DETERMINACIÓN DEL METABOLITO TÓXICO DE ORIGEN FÚNGICO EN LECHE CRUDA, PASTEURIZADA Y ULTRAPASTEURIZADA CONSUMIDAS EN LA CIUDAD DE CUENCA: AFLATOXINA AFM₁ MEDIANTE LA TÉCNICA DE ELISA.**”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 18 de noviembre del 2013

DRA. MARÍA FERNANDA UGUÑA ROSAS
C.I. 0103782280

Cuenca Patrimonio Cultural de la Humanidad. Resolución de la UNESCO del 1 de diciembre de 1999

Av. 12 de Abril, Ciudadela Universitaria, Teléfono: 405 1000, Ext.: 1311, 1312, 1316

e-mail cdjbv@ucuenca.edu.ec casilla No. 1103

Cuenca - Ecuador



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

Yo, DRA. MARÍA FERNANDA UGUÑA ROSAS, autora de la tesis **“DETERMINACIÓN DEL METABOLITO TÓXICO DE ORIGEN FÚNGICO EN LECHE CRUDA, PASTEURIZADA Y ULTRAPASTEURIZADA CONSUMIDAS EN LA CIUDAD DE CUENCA: AFLATOXINA AFM₁ MEDIANTE LA TÉCNICA DE ELISA.”**, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de **MÁSTER EN TOXICOLOGÍA INDUSTRIAL Y AMBIENTAL**. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor.

Cuenca, 18 de noviembre del 2013


DRA. MARÍA FERNANDA UGUÑA ROSAS
C.I. 0103782280

Cuenca Patrimonio Cultural de la Humanidad. Resolución de la UNESCO del 1 de diciembre de 1999

Av. 12 de Abril, Ciudadela Universitaria, Teléfono: 405 1000, Ext.: 1311, 1312, 1316

e-mail cdjbv@ucuenca.edu.ec casilla No. 1103

Cuenca - Ecuador



AGRADECIMIENTO

Expreso Mis sinceros agradecimientos para:

La Dirección de Investigación de la Universidad de Cuenca por el apoyo brindado para la ejecución del presente trabajo de investigación, la misma que resultó ganadora del VI concurso Universitario de Tesis de Investigación de Posgrado.

Dra. Isabel Wilches Arizábala, directora del presente trabajo de investigación por su motivación en la realización de este tema, su invaluable apoyo, por su paciencia, minuciosidad, pericia, ética, pertinencia y asertividad en el desarrollo del mismo, demostrando una vez más su compromiso profesional para ser un apoyo generoso al desarrollo de los profesionales en el área que su experiencia y preparación lo acreditan..

Ing. Vladimiro Tobar, asesor del presente trabajo de investigación por su colaboración desinteresada y conocimiento sobre el tema a realizarse, con su acertada asesoría clara, eficaz para culminar satisfactoriamente la investigación desarrollada.

Dra. Silvana Donoso Moscoso, por su motivación y apoyo inicial, su confianza otorgada al permitirme con el presente tema de investigación poder ser parte del equipo de desarrollo de proyectos de Investigación en Mi querida Facultad de Ciencias Químicas, como un soporte para afianzar Mi emprendimiento profesional contribuyendo con el desarrollo de la investigación en la Universidad de Cuenca.

Ing. Diana Moscoso, directora de la Maestría por su acertada coordinación y por haber sido quien hizo posible que como grupo de maestrantes podamos participar en el concurso Universitario de Tesis de Investigación de Posgrado, que me ha dado hoy el privilegio de ser parte de este pequeño y llenador triunfo en mi culminación de esta meta alcanzada.

Dra. Johana Ortiz por su colaboración en la determinación técnica para poder culminar el análisis comparativo del presente estudio, siendo un apoyo fundamental,



además de su tiempo para compartir sus conocimientos con generosidad y por su amistad sincera.

Y a todos Mis Maestros y amigos por impartirme sus conocimientos durante esta nueva formación profesional con aquel sello de calidad y calidez profesional y humana integral.



DEDICATORIA

Esta Tesis va dedicada con todo Mi Amor a Mi pequeña hija Doménica Valentina, quien ha sido mi principal catalizador y Mi compañera incondicional en esta travesía, gracias amada hija por sacrificar tu tiempo y con tu dulzura diaria haberme dado con tus tiernas frases “TRANQUILA MAMITA FER TODO ESTA BIEN”, la luz y el motivo que me fortaleció para alcanzar esta meta tan anhelada, hoy al retroceder el tiempo y recordar todo lo vivido puedo decir que todo valió la pena, en esta vida el milagro de ser madre es un don tangible que Dios lo hace posible con su perfecta magnificencia, mi mayor felicidad y logro es el ser madre y con humildad digo gracias a Dios una vez más por este doble triunfo en mi vida.

Sin dejar de mencionar a mi pilar incondicional Mi esposo Pepito que siempre estuvo apoyándome y siendo ese acertado concejo para seguir adelante en la meta que me trace alcanzar, por su paciencia y por siempre apoyar sin egoísmo Mi desarrollo profesional y a Mis amados Padres por su apoyo incondicional, y siempre sano concejo de que el que persevera alcanza y que la clave del éxito está en la humildad y en tener Fe en uno mismo y en lo que Dios tiene destinado para cada uno de nosotros.



Cuando entendemos que todo es un regalo

y un prestamo de DIOS, comensamos a sentir gratitud hacia DIOS la fuente de toda cosa buena y comenzamos a crecer más y más cerca de El en una manera auténtica llena de gozo y liberación eterna, por lo que este pequeño trabajo se lo dedico a Mi amado padre Dios.

TU HIJA FER.



INTRODUCCION

Las micotoxinas son sustancias tóxicas producidas en el metabolismo secundario de los hongos, que aparecen como contaminantes naturales en los alimentos cuando las condiciones climáticas son propicias y se las asocian con el desarrollo de múltiples patologías cancerígenas, mutagénicas y teratogénicas tanto en el hombre como en los animales. La contaminación de alimentos por esta aflatoxina es continuamente controlada a nivel mundial por organismos como la FDA, FAO. Sin embargo no se han reportado estudios de AFM₁ en leche en el Ecuador.

Las técnicas analíticas más empleadas en el análisis de micotoxinas son los métodos enzimáticos ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay); cuyos resultados positivos deben confirmarse mediante análisis por cromatografía líquida de alta resolución HPLC(High Performance Liquid Chromatography), por sus siglas en inglés ya que el ELISA utiliza anticuerpos policlonales que pueden dar falsos-positivos.

En el presente trabajo se investigó la presencia de aflatoxinas AFM₁ en leche por el riesgo toxicológico que representa su presencia en leche cruda, pasteurizada y ultra pasteurizada, alimentos de consumo masivo, con la finalidad de comparar las concentraciones con los valores establecidos por el INEN y conocer si este es un alimento seguro para su consumo, y aportar información para el desarrollo de la Toxicología en nuestro medio sobre todo en temas nutricionales y de salud integral permitiendo además evaluar de manera indirecta la calidad de los alimentos que ingiere el ganado vacuno además se podrá determinar indicadores de riesgo toxicológico en las distintas calidades de leche consumida para así concienciar a la población sobre los riesgos oncológicos que determina el consumo de leche contaminada con aflatoxina M₁ e impulsar criterios de prevención ambiental a nivel de haciendas ganaderas y alimentarias a nivel de la población.

El estudio realizado es una investigación experimental en la que se aplica el método científico descriptivo analítico, de acuerdo a su direccionalidad es un diseño cuantitativo, observacional, descriptivo, analítico. La presente investigación será netamente experimental y se utilizará el método inductivo, se aplicará la técnica cuantitativa de ELISA competitiva. Se consideró como variable continua



independiente la concentración en $\mu\text{g}/\text{kg}$ y su equivalente en p.p.b. de aflatoxina AFM_1 en leche cruda, pasteurizada y ultrapasteurizada, como variable dependiente la presencia del metabolito tóxico AFM_1 en leche cruda, pasteurizada y ultrapasteurizada y finalmente como variable discreta interviniente tres tipos de leche (cruda, pasteurizada y ultrapasteurizada).

Para la investigación se planteó la siguiente hipótesis:

- Se encontrará diferencias en la concentración de aflatoxinas FM_1 en la leche cruda, pasterurizada y ultrapasteurizada analizadas por técnica de ELISA. Los valores de concentración de AFM_1 en cada tipo de leche superan significativamente los valores normativos INEN, FDA y FAO, lo que supone un riesgo para la salud de los consumidores de estos productos en la localidad del estudio.

Los objetivos propuestos fueron:

- Determinar cuantitativamente el contenido de AFM_1 en tres tipos de leche cruda, pasteurizada, ultra pasteurizada consumidas en la ciudad de Cuenca, mediante la técnica de ELISA competitiva y comparar los resultados obtenidos con los parámetros máximos referidos por la F.D.A (Food and Drug Administration de los Estados Unidos de América), por la U.E (Unión Europea) y la FAO (Food and Agriculture Organization) así como también serán comparados con las normas nacionales INEN que establecen parámetros para leche cruda y pasteurizada pero no para leche ultra pasteurizada.
- Establecer un protocolo de muestreo de leche cruda, y de marcas de leche pasteurizada y ultra pasteurizada consumidas en la ciudad de Cuenca.
- Cuantificar aflatoxina AFM_1 en las distintas muestras de leche.
- Establecer los valores de micotoxinas en nuestro medio en base a los valores encontrados de concentración de aflatoxina AFM_1 en leche cruda, pasteurizada y ultrapasteurizada.



Concluida la investigación respecto a la primera parte de la hipótesis no es posible comparar las concentraciones pues la sensibilidad de la técnica no permitió la determinación de la concentración de aflatoxinas sino que se estima que los valores están por debajo del límite de sensibilidad de la misma

Con respecto a la segunda parte de la hipótesis ni se rechaza ni se acepta tan solo se la puede estimar ya que ninguna de las leches analizadas reportan concentraciones de aflatoxina que superen la normativa nacional INEN e internacionales FAO Y FDA con las que se les compara, encontrando en todas las muestras analizadas valores ($< 0,125\text{ppb}$) lo cual está por debajo de la normativa INEN NTE 9-10 ($0,5\text{ ug/L}$), e internacionales FAO ($0,5\text{ug/L}$) y FDA $0,5\text{ p.p.b.}$ de aflatoxina M_1 , siendo la leche de buena calidad y segura para el consumo como complemento nutricional.



PARTE TEÓRICA



I

1. MICOTOXINAS

1.1. GENERALIDADES

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

Según Camean las micotoxinas son metabolitos fúngicos secundarios producidos por algunas cepas de hongos, solo unas pocas especies de hongos especialmente del género *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* son capaces de sintetizar micotoxinas e incluso dentro de una misma especie de hongo solo ciertas cepas tienen esta capacidad, el hongo se desarrolla a rangos de temperatura entre 40°C y 45°C, mientras que la toxina puede ser producida desde 11°C hasta 35°C, siendo las condiciones óptimas de producción 22°C y 80 - 90% de humedad relativa.

Flores(2006) señala que las micotoxinas son moléculas relativamente pequeñas de bajo peso molecular con una estructura química policetónica que tienen lugar cuando en determinadas condiciones físicas, químicas y biológicas se interrumpe la reducción de los grupos cetónicos en la biosíntesis de los ácidos grasos realizada por los hongos y una actividad biológica muy diversa. Aunque suelen ser genótipicamente específicas para un grupo de especies, el mismo compuesto puede también ser elaborado por hongos pertenecientes a géneros distintos. Estos ácidos grasos son metabolitos primarios utilizados por los hongos como fuente de energía. Las micotoxinas se suelen formar al final de la fase exponencial o al principio de la fase estacionaria del crecimiento de los hongos toxicogénicos.

Las micotoxinas poseen un efecto tóxico inmediato pero además actúan como inmunosupresores, mutagénicos, teratogénicos y carcinogénicos; el principal órgano diana de los efectos tóxicos y carcinogénicos es el hígado, representan un peligro latente tanto para la salud humana como animal. Se pueden encontrar de modo natural en un gran número de productos agrícolas, utilizados como materias primas



para la preparación de alimentos balanceados para animales o como contaminantes o residuos tóxicos de los productos de las explotaciones zootécnicas (leche, huevos carnes). La contaminación del producto puede ocurrir en cualquier punto de la cadena alimenticia, desde la cosecha, pasando por la recolección, almacenaje, transporte, elaboración y conservación (Peraica, 2000).

Se conocen actualmente entre 300 y 400 clases de micotoxinas, aquellas que son más importantes por su ocurrencia y toxicidad son: Aflatoxinas (AF), Ocratoxina A (OTA), Citrinina (CIT), Deoxinivalenol (DON), Zearalenona (ZEA), Toxina T2 (T2).

1.1.1. AFLATOXINAS:

Según Camean, las aflatoxinas son un grupo de toxinas naturales producidas por hongos como el *Aspergillus flavus*. Cuando las vacas ingieren la aflatoxina AFB1 que se encuentran en piensos o balanceados contaminados luego de un período de tiempo de treinta días se metaboliza principalmente a la aflatoxina M1 (AFM1) y se excreta en la leche.

Las Aflatoxinas AFM₁ son metabolitos termoresistentes por lo que no son destruidas por la esterilización, demostrándose experimentalmente su hepatotoxicidad, mutagenicidad y poder cancerígeno (FAO / OMS 1999). Estas fuentes de contaminación pueden contener sustancias altamente tóxicas para la especie bovina deteriorando su función homeostática, afectando sus órganos blancos como hígado y riñón y causando la muerte del animal. En la especie humana cuando son ingeridas a través de los productos alimenticios contaminados los efectos tóxicos son también importantes porque generan cáncer, hepatotoxicidad y mutagénesis, siendo mayor el riesgo para niños y jóvenes por el consumo importante de leche en esta etapa de desarrollo(Camean, 2008).

Las AFM1 son inmunosupresoras que inhiben la fagocitosis y la síntesis proteica interrumpiendo la formación del ADN, ARN y proteínas en el ribosoma (Camean, 2008).



Lazo (2008) fundamenta que la toxicidad aguda de las aflatoxinas se manifiesta principalmente como lesiones hepáticas, en la forma subaguda, los animales jóvenes pueden presentar retardo en el crecimiento, pérdida del apetito, se compromete el sistema inmunitario por su acción degenerativa sobre el timo y la bolsa de Fabricio, aumenta la fragilidad capilar afectando el tiempo de coagulación sanguínea y de allí, la presencia de hematomas, postración y muerte.

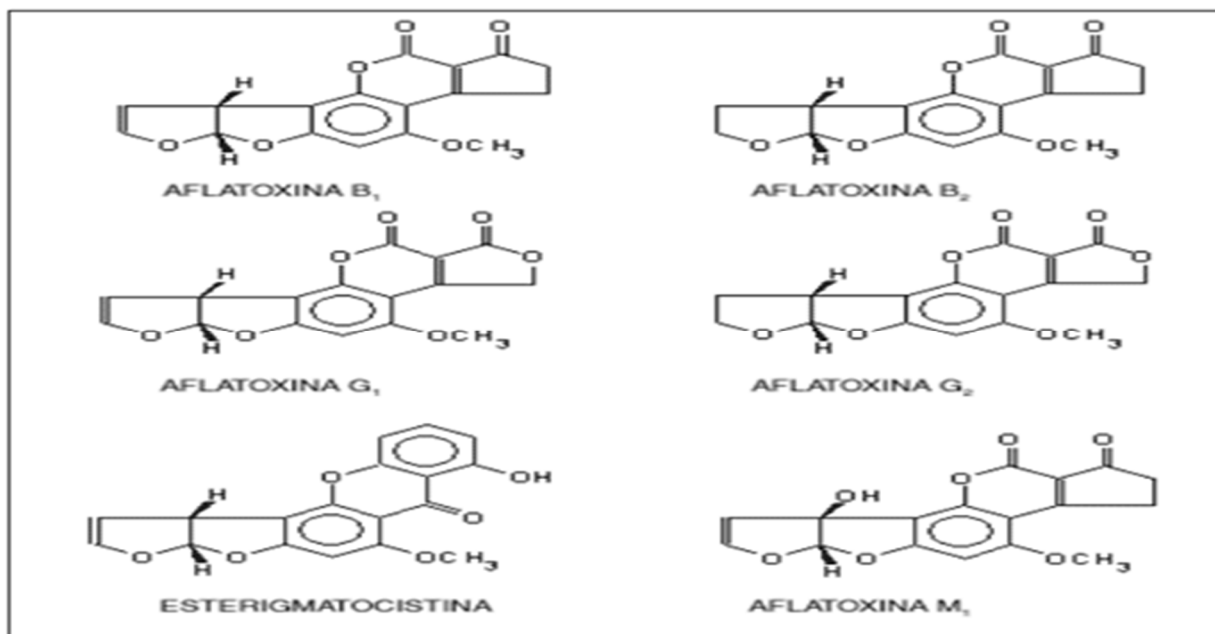
1.1.2. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LAS AFLATOXINAS:

Químicamente las aflatoxinas contienen en su molécula una mitad dihidrofurano o tetrahidrofurano unida a un anillo de cumarina. Las aflatoxinas más importantes son AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, AFM1, AFM2.

La estructura química de las aflatoxinas B1 y G1, está constituida por la fusión de un núcleo cumarínico y otro bifurano a los que se añaden una ciclo pentanona en el caso de la AFB1 y un anillo ciclohexanoico en la AFG1. La AFB2 y AFG2 son dihidroderivados de la AFB1 y AFG1 respectivamente.

La mayoría de las restantes aflatoxinas descritas proceden también de la hidroxilación en diferentes puntos de la estructura molecular de las cuatro aflatoxinas principales. Tal es el caso de la AF M1 y de la AF M2, derivados 4-hidroxilados de la AF B1 y AF B2 respectivamente (Figura 1).

Camean et-al (2008) cita que la parte más reactiva de la estructura de las aflatoxinas es el anillo lactónico. Por otro lado, la existencia de un núcleo bifurano confiere a las moléculas de aflatoxina una gran rigidez, lo que favorece la interacción con algunos componentes celulares



**Figura 1: ESTRUCTURA QUIMICA DE LAS PRINCIPALES AFLATOXINAS
(Cameán 2008)**

1.2. FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE LA TOXICIDAD DE LAS AFLATOXINAS:

El tipo y cantidad de aflatoxinas producidas no solo depende de las características de la cepa individual, sino también de las condiciones medioambientales (nutrientes, parámetros físico-químicos, etc.). Las condiciones de crecimiento que permiten la toxigénesis son más limitadas que aquellas que posibilitan el crecimiento del hongo.

Entre los factores que conducen a la presencia de micotoxinas en los alimentos hay dos categorías principales: intrínsecos y extrínsecos.

a. Factores intrínsecos:

La producción de una determinada micotoxina no está asociada con una especie en particular sino con una cepa en concreto y en algunos casos incluso depende del sustrato en que la cepa es aislada.



Los parámetros que afectan al nivel de residuos de micotoxinas en animales son:

1. Especies y raza de los animales.
2. Concentración de micotoxina, cantidad y duración del consumo de alimento contaminado
3. Estado de salud del animal.
4. La biodisponibilidad y toxicidad de la micotoxina, así como los sinergismos entre ellas.
5. La cantidad de micotoxinas ingerida diariamente en función de la concentración de micotoxina y de la cantidad de alimento ingerido.
6. La continuidad o intermitencia de ingestión del alimento contaminado.
7. El peso del animal, el estado fisiológico y de salud de éste.
8. La edad del animal.
9. Período que transcurre desde la retirada del alimento contaminado a la toma de muestras para el análisis de residuos.

La presencia de estos residuos no solo implica que el animal se vea afectado por la contaminación de la micotoxina original, sino también riesgo de que los humanos ingieran alimentos de origen animal como leche, huevos, carne extremadamente afectados.

b. Factores extrínsecos:

García (2012), cita que los principales factores extrínsecos que influyen en la toxicogénesis son:

1. **Actividad del agua:** el agua influye considerablemente en la producción de toxinas, particularmente en los productos poco hidratados. La mayor parte de los hongos que contaminan los cereales por ejemplo, necesitan valores superiores a 0,7 de agua para actuar. La actividad del agua nos indica cual es la cantidad de agua disponible para el desarrollo de los microorganismos una vez que se ha alcanzado el equilibrio hídrico en el sistema - alimento/medio ambiente. La actividad del agua se expresa en tanto por uno. Si la humedad del alimento está en equilibrio con la humedad relativa de equilibrio (HRE) de



la atmósfera que lo rodea, la actividad del agua en el alimento es numéricamente equivalente a esta, ($a_w = HRE/100$).

Tengamos en cuenta que la Humedad Relativa de Equilibrio (HRE) se refiere a la atmósfera en equilibrio con el producto y la a_w se refiere al propio producto. El agua pura tiene una actividad de 1 y está en equilibrio con una atmósfera de 100% de HRE. La actividad del agua de un alimento es siempre menor que 1.

En general, con una actividad de agua a 25°C del 0,85 que aproximadamente puede corresponder a un 15-16% de humedad o agua libre en el sustrato, las esporas fúngicas germinan en 5 a 12 días. En cambio con una actividad de agua de 0,75 (que correspondería aproximadamente al 13-14% de humedad en el sustrato) a la misma temperatura, las esporas fúngicas tardan en germinar de 4 a 12 semanas. Sin embargo, las cosas pueden variar significativamente a depender del tipo de sustrato (amiláceo o bien oleaginoso) y tal como hemos visto anteriormente.

Cualquier alimento almacenado en estado de equilibrio con una HRE por debajo de 65% ($a_w = 0,65$), está muy seguro de no ser invadido por hongos que después tendrán oportunidad de crecer y proliferar.

La cantidad de agua existente en el ambiente y en los sustratos es uno de los factores importantes para el desarrollo de los hongos y para la producción de micotoxinas. Sin embargo no sólo influye la cantidad de agua sino también la forma de presentación de la misma, así pues, el agua se encuentra en forma libre y en forma combinada.

- **El agua libre** existe dentro y alrededor de los tejidos vegetales o de las células y puede ser eliminada sin interferir seriamente con los procesos vitales.
- **La forma combinada** está presente en los tejidos vegetales y animales, formando parte integrante de las células que los componen y en unión con las proteínas y glúcidos.



Para la germinación de las esporas de hongos, es necesario que el agua se encuentre en forma libre. Al agua libre se le llama comúnmente, humedad.

- **Humedad relativa de equilibrio (HRE):** es la cantidad de agua de la que disponen los microorganismos una vez alcanzado el equilibrio entre el agua libre del sustrato y el vapor de agua existente en el medio ambiente que lo rodea. La HRE se expresa en tanto por cien y varía de unos alimentos a otros conforme su riqueza en glúcidos o en materia grasa. (Gimeno 2011)
- **Descenso de la presión parcial de oxígeno:** el descenso de la presión parcial de oxígeno y especialmente el incremento del nivel de CO₂ reducen la toxicogénesis y el desarrollo de los hongos.
- **La temperatura:** la temperatura óptima para la toxicogénesis a la cual el ritmo de producción de toxinas es máximo es 20-21 °C la que permite el crecimiento del hongo.

c. Factores Químicos:

1. **Composición del sustrato:** Gimeno, A. Martins, M., et-al. (2011) menciona que los sustratos pueden ser sintéticos o naturales, líquidos o sólidos y de diferente naturaleza química. Esta última puede desempeñar una función importante, ya que hay productos más susceptibles que otros a ser contaminados por un moho determinado; sin embargo, la mayor parte de los mohos pueden invadir numerosos sustratos pues, en general, tienen pocas exigencias nutricionales. Sus necesidades se limitan al carbono, nitrógeno y sales. Los carbohidratos y ácidos grasos, en los medios de cultivo, aumentan la producción de toxina. La producción de aflatoxinas es mínima en productos de origen animal (embutidos por ejemplo) y en otros productos como el té y especias y muy alta en cereales y semillas oleaginosas, y dentro de estas, la soya es un mal sustrato ya que se demostró que posee una cierta resistencia a la producción de aflatoxinas.
2. **Nutrientes:** Gimeno, A. Martins, M., et-al. (2011) cita que sustratos ricos en carbohidratos y ácidos grasos aumentaban la producción de toxinas, sin embargo, todos no influyen de la misma manera: la glucosa, fructosa y sacarosa son adecuados para la producción de aflatoxinas cuando se emplea ***A.flavus***,



mientras la manosa y xilosa se usan con éxito con ***A.parasiticus***. Existen otros nutrientes tales como aminoácidos (glicina, glutamato, aspartato, prolina y alanina) y cationes bivalentes (cadmio, magnesio y cinc) que en forma de sales incrementan la producción de aflatoxinas.

3. **pH:** Gimeno, A. Martins, M., et.al. (2011) cita que durante el crecimiento de los hongos los valores de pH del medio pueden variar entre 4 y 5, como resultado de su metabolismo. El máximo crecimiento de ***A.flavus*** y ***A. parasiticus*** ocurre entre los pH 5-8.
4. **Gases atmosféricos:** Gimeno, A. Martins, M., et.al. (2011) cita que la oxigenación constituye otro aspecto a tener en consideración en el crecimiento fúngico, puesto que los hongos micotoxigénicos son organismos aeróbicos. Se ha comprobado que bajas concentraciones de oxígeno y/o altas concentraciones de dióxido de carbono pueden deprimir el crecimiento fúngico y la consecuente formación de micotoxinas obtuvieron altas concentraciones de aflatoxinas con un 21% de oxígeno y 0.033% de dióxido de carbono.
5. **Zonas de microflora:** Son pequeñas zonas del alimento con alto contenido en humedad.
6. **Integridad física del grano o del alimento:** las micotoxinas que afectan negativamente a la salud del hombre y de los animales se encuentran principalmente en los granos de cereales y forrajes recolectados. Estas toxinas son producidas por hongos saprofitos durante el almacenaje, o por hongos endofíticos durante el crecimiento de la planta.

1.3. AFLATOXINA M1 (AFM1):

La AFM1 es el primer producto conocido procedente de la metabolización de la AFB1 en las vacas, por lo que se la encuentra en los productos alimenticios procedentes del ganado vacuno, por ello es muy importante el control sanitario de los animales productores de carne y de leche, así como también de los alimentos derivados de ellos que son de consumo masivo para evitar los efectos tóxicos graves que pueden producirse.



Peraica señala que las aflatoxinas M1 y M2 son metabolitos oxidativos de las aflatoxinas B1 y B2 producidos por los animales tras la ingestión de éstas, aparecen en la leche materna (tanto animal como humana), la orina y las heces.

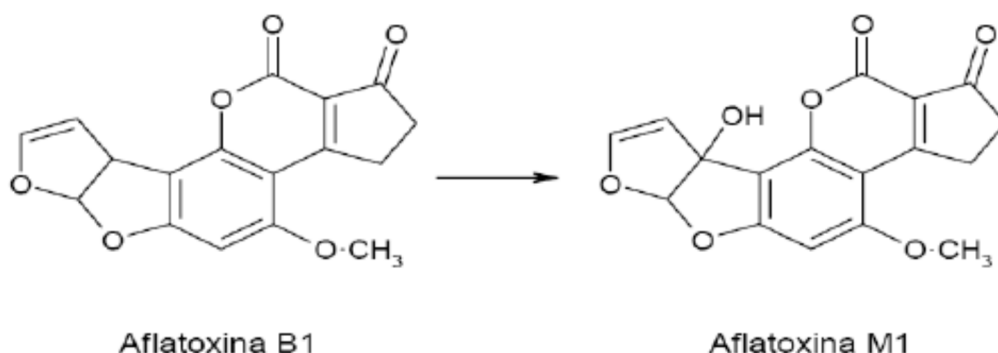


Figura 2: BIOTRANSFORMACIÓN DE LA AFLATOXINA B 1 EN AFLATOXINA M1 (Gimeno, 2001)

La estructura química de las AFM1 es el derivado 4-hidroxi de la aflatoxina B1 (figura 2). La aflatoxina M1 tiene una masa molecular relativa de 328 Da y su fórmula molecular es $C_{17}H_{12}O_7$ (ver figura N° 1). La existencia de un núcleo bifurano confiere a las moléculas de aflatoxina una gran rigidez lo que favorece la interacción con algunos componentes celulares.

En vacas lecheras, el paso de aflatoxina B1 a la leche en forma de aflatoxina M1 está relacionado de manera lineal con la producción de leche y se calcula que el porcentaje de aflatoxina B1 de la dieta excretada en la leche en forma de aflatoxina M1 corresponde al 0,09% - 2% de la dosis consumida.

1.4. CLASIFICACIÓN DE LAS AFLATOXINAS SEGÚN SU RIESGO CANCERÍGENO

Respecto a la toxicología de las aflatoxinas, el Comité científico de la alimentación humana de la Comunidad Europea emitió el 23 de septiembre de 1994 un dictamen sobre las aflatoxinas (y sobre la ocratoxina A y la patulina) (Informes del Comité científico de la alimentación humana, serie trigésima quinta). El Comité llegó a conclusiones como las del siguiente párrafo:



Las aflatoxinas son carcinógenos genotóxicos. Sobre este tipo de carcinógenos se piensa generalmente que no hay una dosis umbral por debajo de la cual no se produzca formación de tumores.

Los múltiples informes de evaluación del riesgo permiten deducir que incluso niveles bajísimos de exposición a las aflatoxinas (p. ej., 1 ng/kg p.c. /día o menos) contribuyen al riesgo de cáncer de hígado. Respecto a la aflatoxina M₁, el Comité científico de la alimentación humana aceptó que hay suficientes pruebas de que la aflatoxina M₁ es un carcinógeno genotóxico; se calcula que su potencia carcinogénica es unas diez veces menor que la de la aflatoxina B₁.

Sin embargo, como la ingesta de leche y productos lácteos por el hombre puede ser considerable, especialmente entre lactantes y niños pequeños, es necesario valorar cuidadosamente los riesgos derivados de la exposición a las aflatoxinas.

Según el Centro Internacional de Investigación sobre el Cáncer (CIIC) en 1998, determinó que existen suficientes datos demostrativos del efecto carcinógeno de mezclas naturales de aflatoxinas en el ser humano, las cuales se clasifican por ello como carcinógeno del grupo 1, salvo en el caso de la aflatoxina M₁ que se considera posible carcinógena para el hombre grupo 2B.

PRODUCTO	GRADO DE EVIDENCIA DEL RIESGO CANCERÍGENO		EVALUACIÓN GLOBAL
	Hombre	Animal	
Aflatoxinas	S	S	1
Aflatoxina B1	S	S	
Aflatoxina B2		L	
Aflatoxina G1		S	
Aflatoxina G2		I	
Aflatoxina M1	I	S	2B
Citrinina	ADS	L	3
Ocratoxina A	I	S	2B
Patulina	ADS	I	3
Esterigmatocistina	ADS	S	2B

Tabla 1.1 : Grado de carcinogénesis de las distintas micotoxinas (Centro Internacional de Reserche contre le Cáncer en 1998)

ADS: Ausencia de datos suficientes

S: Prueba suficiente

L: Prueba

I: Prueba insuficiente

Grupo 1(1): El producto es cancerígeno para el hombre.

Grupo 2A (2A): El producto es probablemente cancerígeno para el hombre

Grupo 2B (2B): El producto es un posible cancerígeno para el hombre

Grupo 3 (3): No se puede pronunciar en cuanto al riesgo cancerígeno para el hombre.



1.5. MICOTOXICOSIS:

Camean(2008) cita que en la micotoxicosis la cantidad de hongo consumida es mínima si se comparan con otros tóxicos, por lo que el trastorno en el hombre o en los animales es causado casi exclusivamente por la toxina liberada en el sustrato utilizado como alimento, la micotoxicosis puede incluir las siguientes formas de intoxicación:

- *Micotoxicosis primarias agudas:* Se producen cuando se consumen concentraciones de altas a moderadas de micotoxinas y causan manifestaciones específicas tales como síndrome de enfermedad aguda o muerte. La información en humanos es limitada.
- *Micotoxicosis primaria crónica:* Derivadas de la ingesta de niveles de micotoxinas bajas a moderados y son causantes de enfermedades crónicas específicas. En la intoxicación crónica el efecto más grave se ve en el ADN.
- *Micotoxicosis indirectas:* Producidas por la ingesta de concentraciones de micotoxinas muy bajas y suelen causar un aumento de la susceptibilidad a otras enfermedades e infecciones.

Bioquímicamente se considera que las aflatoxinas en especial la AFB₁ pueden pasar en el hígado por dos fases en su:

- La fase I: Por acción del complejo citocromo p450 monooxigenasa que produce en el organismo una gran variedad de derivados reducidos y oxidados que supuestamente no presentan actividad carcinogénica como la aflatoxina AFM₁. pero también puede producir productos como la aflatoxina AFB₁, 8,9 epóxidos (AFBO), que es un producto inestable y que forma aducciones con el ADN, el cual puede llevar a mutaciones en genes supresores de tumores.
- La Fase II: La AFBO, puede llegar a conjugarse con proteínas o sufrir hidroxilación o conjugarse con el glutatión -s- transferasa (GSH) en el hígado y ser excretado en la orina o en las heces como ácido mercaptúrico combinándose con proteínas a los diferentes tejidos y provocando las diferentes clase de intoxicación.



1.6. DOSIS DE AFLATOXINA: MORTALIDAD

En el siguiente cuadro reflejan los datos relativos a la toxicidad de las aflatoxinas más nocivas en orden decreciente de toxicidad:

AFLATOXINA	DL50mg/kg peso vivo
M1(Derivado metabólico de la B1 en algunos animales, principalmente vacas)	0,320
B1	0,364
G1	0,784
M2(Derivado metabólico de la B2 en algunos animales)	1,228
B2	1,696
G2	3,450

Tabla 1.2 : DOSIS LETAL CINCUENTA (DL50) DE AFLATOXINAS (Camean et al 2008)

En el hombre no se tienen suficientes datos de los efectos de las aflatoxinas, debido a la dificultad para exponerlo en forma experimental al riesgo de ingerir alimentos que contengan la sustancia tóxica. No obstante se ha comprobado que en los países donde se acostumbra consumir alimentos enmohecidos, en muchos de los cuales se ha registrado la presencia de aflatoxinas, la incidencia de cáncer de hígado es muy alta. Esto sucede por ejemplo en algunas regiones del África, la India, y del Sureste de Asia. (Peraica et- al 1999).



1.7. METABOLISMO DE LA AFLATOXINA (AFM1), TRANSFORMACIÓN Y EFECTO:

El metabolismo desempeña un papel muy importante en el modo de acción de las aflatoxinas. Las aflatoxinas ingeridas son activadas por la enzima del sistema oxidativo microsomal, primero en el hígado y probablemente después en otros órganos. (Camean 2008).

La actividad de la enzima citocromo P450, desempeña un importante papel en el metabolismo de la aflatoxina B1 ocasionando su transformación en aflatoxina M1.

Si bien este sistema enzimático es capaz de detoxificar una gran variedad de compuestos mediante hidroxilación y favorecer su excreción al exterior, otras sustancias se convierten en más reactivas, más electrolíticas y se unen a su vez a distintas macromoléculas alterando sus funciones, como es el caso de la Aflatoxina B1 que requiere ser activada para producir mutaciones.

La principal ruta de activación es la conversión de la AFB1 en el metabolito electrolítico AFB1-8-9 epóxido.

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

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

Después de la formación de la AFB1-epóxido pueden formarse dihidrodioles (8,9-dihidro-8,9- dihidroxi aflatoxina B1) metabolitos de la AFB1 que se unen a proteínas celulares mediante la formación de bases de Schiff induciendo a daño celular y eventualmente a muerte celular, es importante resaltar que la AFB1 epóxido puede formar aductos con los residuos de lisina de la albúmina y otras proteínas celulares, cerca del 5% de la dosis ingerida de AFB1 se une a la albúmina.

La AFB1- epóxido puede también reaccionar con glutatión mediante un mecanismo mediado por la glutatión γ - transferasa , esta conjugación de tipo competitivo representa el paso de detoxificación más importante con respecto a otros tipos de biotransformación en la obtención de metabolitos menos tóxicos de AFB1.



La comparación entre la activación y la detoxificación de la AFB1-epóxido en diferentes especies animales provee la base para entender porque las especies varían en su sensibilidad a los efectos tóxicos y carcinogénicos inducidos por la AFB1 y dependen de diferentes factores propios de la individualidad de cada organismo como la diferente absorción a través del tracto digestivo, la distribución en el organismo y los mecanismos de metabolismo y excreción usado por las distintas especies animales.

Los efectos principales que conllevan a la unión de aflatoxinas a macromoléculas son la alteración en la síntesis de ADN, ARN y proteínas (enzimas, inmunoglobulinas), esto conlleva a la aparición de cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial, disgregación temporal de los ribosomas disminución en la respiración celular por desacoplamiento en el mecanismo de fosforilación oxidativa e interrupción del transporte de electrones, alteración de la glicólisis y gluconeogénesis, así como la disminución de ciertas hormonas al establecerse una competencia por los receptores específicos (la AFB1 en cantidades muy baja compete con el estradiol por los receptores localizados en el útero).

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

La primera de estas lesiones se origina tras la eliminación de forma espontánea o la reparación enzimática de las posiciones con conjugados epóxido-N-7 guanina, dando lugar a sitiosapurínicos donde la adenina tiene una gran afinidad por insertarse en la posición correspondiente de la cadena opuesta del ADN, pudiendo dar lugar a una mutación por sustitución de un par de bases Guanina-Citosina por un par Timina-Adenina.

La segunda lesión premutacional se produce al originarse un derivado formamidopirimidinico resistente a los procesos de reparación enzimática del ADN,



que puede dar lugar a mutaciones si esta presente en la fase de replicación del ADN(Wogan, 1992).

1.8. PRESENCIA DE AFLATOXINA AFM1 EN LECHE:

La presencia de aflatoxina M1 en la leche puede deberse a dos posibles formas de contaminación:

- **Directa:** Debido al crecimiento en el producto de hongos toxicogénicos y producción de toxinas en la leche, el mismo que no suele representar un problema ya que en el crecimiento de hongos aflatoxigénicos en un alimento da a lugar en numerosos casos a alteraciones organolépticas del mismo y a su rechazo para el consumo.
- **Indirecta:** Debido al consumo por parte de los animales en el período de lactación de alimentos contaminados con aflatoxinas dando lugar a la aparición en la leche de estos animales diversos metabolitos tóxicos AFM2, AFGM1, AFGM2, AFB1 y AFM4.

Un aspecto muy importante a tener en cuenta es que la leche y sus derivados son productos con un alto nivel de consumo y representan una parte esencial en la elaboración de alimentos infantiles, con el riesgo tóxico que esto conlleva

1.8.1. ESTABILIDAD DE LA AFLATOXINA AFM1 EN PRODUCTOS LÁCTEOS:

Existe un gran número de estudios acerca del efecto sobre la AFM1 de los procedimientos empleados en la elaboración y conservación de la leche.

Con respecto a los tratamientos térmicos la mayoría de los autores están de acuerdo al afirmar que el tratamiento térmico de la leche (pasteurización o ultra pasteurización) no afecta significativamente a la AFM1.



Las diferencias observadas en los resultados se han atribuido a la variabilidad en los parámetros analizados, al empleo de distintas técnicas de detección y a la forma de contaminación de las muestras de la leche.

1.8.2. COMPOSICIÓN DE LA LECHE

1.8.2.1. ¿QUÉ ES LA LECHE?

Podemos definir la leche considerando distintos puntos de vista:

- *Biológico*: Es una sustancia segregada por la hembra de los mamíferos con la finalidad de nutrir al crío.
- *Legal*: Producto de la ordeña de un hato sano y que no representa un peligro para el consumo humano.
- *Fisicoquímico*: Desde este punto de vista, la leche es una mezcla homogénea de un gran número de sustancias (lactosa, glicéridos, proteínas, sales, vitaminas, enzimas, etc.) que están unas en emulsión (la grasa y sustancias asociadas), algunas en suspensión (las caseínas ligadas a sales minerales) y otras en disolución verdadera (lactosa, vitaminas hidrosolubles, proteínas del suero, sales, etc.).

Para efectos de este proyecto se considerará la definición de la leche desde estos tres puntos de vista.

- **Leche cruda.** El INEN NTE 9 (2012) define la leche como el producto de la secreción normal de la glándula mamaria obtenida a partir del ordeño íntegro e higiénico de vacas sanas, sin adición ni sustracción alguna, exento de calostro y libre de materias extrañas a su naturaleza, destinado al consumo en su forma natural o a elaboración ulterior.

La denominación de leche cruda se aplica para la leche que no ha sufrido tratamiento térmico, salvo el de los enfriamientos para su conservación, ni ha tenido modificación alguna en su composición.

- **Leche pasteurizada:** Según la Norma INEN NTE 10 (2012) para la leche cruda homogenizada o no, que ha sido sometida a un proceso térmico que garantice la destrucción total de los microorganismos patógenos y la casi



totalidad de los microorganismos banales (saprófitos) sin alterar sensiblemente las características fisicoquímicas, nutricionales y organolépticas de la misma.

- **Leche Modificada Larga Vida:** Según la norma INEN NTE 701(2009) define la leche larga vida como la leche que ha sido reducida total o parcialmente de algunos de sus componentes naturales o modificada en cualquiera de sus elementos constitutivos, sometida posteriormente a los procesos de esterilización o UHT (Temperatura ultra elevada).

1.8.3. CLASIFICACIÓN DE LA LECHE:

Según las normativas nacionales (INEN NTE 9-10 2012) (INEN NTE 701 2009), establecen de acuerdo a su contenido graso la siguiente clasificación de las leches como se puede observar en la tabla 1.3

CLASIFICACIÓN DE LA LECHE SEGÚN LA NORMATIVA INEN		
LECHE CRUDA	LECHE PASTEURIZADA	LECHE LARGA VIDA
<ul style="list-style-type: none">• Según el recuento estándar en placa fc/cm³ de microorganismos aerobios mesófilos, determinado de acuerdo a la NTE INEN 1529-5, la leche cruda se clasifica en las siguientes categorías: Categoría A (buena) Categoría B (regular) Categoría C (mala)	<ul style="list-style-type: none">• NO APLICA CLASIFICACIÓN	NO APLICA CLASIFICACIÓN
<ul style="list-style-type: none">• NO APLICA CLASIFICACIÓN	<ul style="list-style-type: none">• De acuerdo a la NTE INEN 10: 2012, la leche pasteurizada desde su contenido de grasa se clasifica en tres clases: A. Entera B. Semidescremada (parcialmente descremada) C. Descremada.• De acuerdo a la NTE INEN 10: 2012, la leche pasteurizada desde su contenido de grasa se clasifica en tres clases: A. Entera B. Semidescremada (parcialmente descremada)	<ul style="list-style-type: none">• De acuerdo a la NTE INEN 701: 2009, la leche larga vida desde su contenido de grasa se clasifica en tres clases: A. Entera B. Semidescremada (parcialmente descremada) C. Descremada
<ul style="list-style-type: none">• NO APLICA CLASIFICACIÓN	<ul style="list-style-type: none">• NO APLICA CLASIFICACIÓN	<ul style="list-style-type: none">• De acuerdo a la NTE INEN 701: 2009, la leche larga por su proceso de tratamiento térmico la leche larga vida se clasifica en: Leche UHT Leche esterilizada

Tabla 1.3 : CLASIFICACIÓN DE LA LECHE SEGÚN SU CONTENIDO GRASO (INEN NTE 9-10 2012) (INEN NTE 701 2009)



1.8.3.1. DISPOSICIONES GENERALES PARA LECHE CRUDA, PASTEURIZADA Y LARGA VIDA SEGÚN LA NORMATIVA INEN

Las leches cruda, pasteurizada y larga vida deben cumplir con los siguientes requisitos físicos y químicos de acuerdo con las normas de ensayo correspondiente (INEN NTE 9-10 2012) (INEN NTE 701 2009) deben cumplir con las especificaciones que se indican a continuación:

REQUISITOS FÍSICOS-QUÍMICOS DE LA LECHE-CRUDA PASTEURIZADA Y LARGA VIDA SEGÚN LA NORMATIVA INEN												
REQUISITOS	LECHE CRUDA				LECHE PASTEURIZADA entera				LECHE LARGA VIDA DESCREMADA			
	UNIDAD	MÍNIMO	MÁXIMO	MÉTODO DE ENSAYO	UNIDAD	MÍNIMO	MÁXIMO	MÉTODO DE ENSAYO	UNIDAD	MÍNIMO	MÁXIMO	MÉTODO DE ENSAYO
Densidad relativa: 15°C 20°C	- -	1,029 1,028	1,033 1,032	NTE INEN 11	- -	1,029 1,028	1,033 1,032	NTE INEN 11	- -	1,028 1,029	1,031 1,032	NTE INEN 11
Materia grasa	% fracción de masa) ^d	3	-	NTE INEN 12	%(fracción de masa)	3	-	NTE INEN 12	%m/m	3	-	NTE INEN 12
Acidez titulable como ácido láctico	% (fracción de masa)	0,13	0,17	NTE INEN 13	% (fracción de masa)	0,13	0,18	NTE INEN 13	%m/v	0,13	0,16	NTE INEN 13
Sólidos totales	% (fracción de masa)	11,2	-	NTE INEN 14	% (fracción de masa)	11,3	-	NTE INEN 14	%m/m	11,3	-	NTE INEN 14
Sólidos no grasos	% (fracción de masa)	8,2	-	*	% (fracción de masa)	8,3	-	*	%m/m	8,3	-	*
Cenizas	% (fracción de masa)	0,65	-	NTE INEN 14	% (fracción de masa)	0,65	0,8	NTE INEN 14	%m/m	0,65	0,8	NTE INEN 14
Proteínas	% (fracción de masa)	2,9	-	NTE INEN 16	% (fracción de masa)	2,9	-	NTE INEN 16	%m/m	2,9	-	NTE INEN 16
Punto de congelación	°C °H	-0,536 -0,555	-0,512 -0,53	NTE INEN 15	°C °H	-0,536 -0,555	-0,512 -0,53	NTE INEN 15	°C °H	-0,54 -0,56	-0,512 -0,53	NTE INEN 15
Presencia de conservantes	-	negativo		NTE 1500	-	negativo		NTE 1500	-	negativo		NTE 1500
Presencia de neutralizantes	-	negativo		NTE 1500	-	negativo		NTE 1500	-	negativo		NTE 1500
Presencia de adulterantes	-	negativo		NTE 1500	-	negativo		NTE 1500	-	negativo		NTE 1500
Grasas vegetales	-	negativo		NTE 1500	-	negativo		NTE 1500	-	negativo		NTE 1500
Suero de leche	-	negativo		NTE 1500	-	negativo		NTE 1500	-	negativo		NTE 1500
Residuos de medicamentos veterinarios	ug/l	negativo		NTE 1500	ug/l	negativo		NTE 1500	-	-		-

Tabla1.4: REQUISITOS FISICO-QUIMICOS DE LA LECHE CRUDA-PASTEURIZADA Y LARGAVIDA
FUENTE: (INEN NTE 9-10 2012) (INEN NTE 701 2009)



REQUISITOS FÍSICOS-QUÍMICOS DE LA LECHE-CRUDA PASTEURIZADA Y LARGA VIDA SEGÚN LA NORMATIVA INEN												
REQUISITOS	LECHE CRUDA				LECHE PASTEURIZADA SEMIDESCREMADA				LECHE LARGA VIDA SEMIDESCREMADA			
	UNIDAD	MÍNIMO	MÁXIMO	MÉTODO DE ENSAYO	UNIDAD	MÍNIMO	MÁXIMO	MÉTODO DE ENSAYO	UNIDAD	MÍNIMO	MÁXIMO	MÉTODO DE ENSAYO
Densidad relativa: 15°C 20°C	-	1,029	1,033	NTE INEN 11	-	1,03	1,033	NTE INEN 11	-	1,029	1,032	NTE INEN 11
	-	1,028	1,032		-	1,029	1,032		-	1,03	1,033	
Materia grasa	% fracción de masa) ⁴	3	-	NTE INEN 12	% (fracción de masa)	>1,0	<3	NTE INEN 12	%m/m	>1,0	<3	NTE INEN 12
Acidez titulable como ácido láctico	% (fracción de masa)	0,13	0,17	NTE INEN 13	% fracción de masa)	0,13	0,18	NTE INEN 13	%m/v	0,14	0,17	NTE INEN 13
Sólidos totales	% (fracción de masa)	11,2	-	NTE INEN 14	% (fracción de masa)	8,8	-	NTE INEN 14	%m/m	9,2	-	NTE INEN 14
Sólidos no grasos	% (fracción de masa)	8,2	-	*	% (fracción de masa)	8,2	-	*	%m/m	8,2	-	*
Cenizas	% (fracción de masa)	0,65	-	NTE INEN 14	% (fracción de masa)	0,7	0,8	NTE INEN 14	%m/m	0,7	0,8	NTE INEN 14
Proteínas	% (fracción de masa)	2,9	-	NTE INEN 16	% (fracción de masa)	2,9	-	NTE INEN 16	%m/m	2,9	-	NTE INEN 16
Punto de congelación	°C	-0,536	-0,512	NTE INEN 15	°C	-0,536	-0,512	NTE INEN 15	°C	-0,54	-0,512	NTE INEN 15
	°H	-0,555	-0,53		°H	-0,555	-0,53		°H	-0,56	-0,53	
Presencia de conservantes	-	negativo		NTE 1500	-	negativo		NTE 1500	-	negativo		NTE 1500
Presencia de neutralizantes	-	negativo		NTE 1500	-	negativo		NTE 1500	-	negativo		NTE 1500
Presencia de adulterantes	-	negativo		NTE 1500	-	negativo		NTE 1500	-	negativo		NTE 1500
Grasas vegetales	-	negativo		NTE 1500	-	negativo		NTE 1500	-	negativo		NTE 1500
Suero de leche	-	negativo		NTE 1500	-	negativo		NTE 1500	-	negativo		NTE 1500
Residuos de medicamentos veterinarios	ug/l	negativo		NTE 1500	ug/l	negativo		NTE 1500	-	-		-

**Tabla 1.5: REQUISITOS FISICO-QUIMICOS DE LA LECHE CRUDA-PASTEURIZADA Y LARGAVIDA
FUENTE: (INEN NTE 9-10 2012) (INEN NTE 701 2009)**



REQUISITOS FÍSICOS-QUÍMICOS DE LA LECHE-CRUDA PASTEURIZADA Y LARGA VIDA SEGÚN LA NORMATIVA INEN												
REQUISITOS	LECHE CRUDA				LECHE PASTEURIZADA DESCREMADA				LECHE LARGA VIDA DESCREMADA			
	UNIDAD	MÍNIMO	MÁXIMO	MÉTODO DE ENSAYO	UNIDAD	MÍNIMO	MÁXIMO	MÉTODO DE ENSAYO	UNIDAD	MÍNIMO	MÁXIMO	MÉTODO DE ENSAYO
Densidad relativa: 15°C 20°C	-	1,029	1,033	NTE INEN 11	-	1,031	1,036	NTE INEN 11	-	1,03	1,033	NTE INEN 11
	-	1,028	1,032		-	1,03	1,035		-	1,033	1,034	
Materia grasa	% fracción de masa) ⁴	3	-	NTE INEN 12	% (fracción de masa)	-	<1,0	NTE INEN 12	%m/m	-	<1	NTE INEN 12
Acidez titulable como ácido láctico	% (fracción de masa)	0,13	0,17	NTE INEN 13	% fracción de masa)	0,13	0,18	NTE INEN 13	%m/v	0,14	0,17	NTE INEN 13
Sólidos totales	% (fracción de masa)	11,2	-	NTE INEN 14	% (fracción de masa)	8,3	-	NTE INEN 14	%m/m	8,3	-	NTE INEN 14
Sólidos no grasos	% (fracción de masa)	8,2	-	*	% (fracción de masa)	8,2	-	*	%m/m	8,2	-	*
Cenizas	% (fracción de masa)	0,65	-	NTE INEN 14	% (fracción de masa)	0,7	0,8	NTE INEN 14	%m/m	0,7	0,8	NTE INEN 14
Proteínas	% (fracción de masa)	2,9	-	NTE INEN 16	% (fracción de masa)	2,9	-	NTE INEN 16	%m/m	2,9	-	NTE INEN 16
Punto de congelación	°C	-0,536	-0,512	NTE INEN 15	°C	-0,536	-0,512	NTE INEN 15	°C	-0,54	-0,512	NTE INEN 15
	°H	-0,555	-0,53		°H	-0,555	-0,53		°H	-0,56	-0,53	
Presencia de conservantes	-	negativo		NTE 1500	-	negativo		NTE 1500	-	negativo		NTE 1500
Presencia de neutralizantes	-	negativo		NTE 1500	-	negativo		NTE 1500	-	negativo		NTE 1500
Presencia de adulterantes	-	negativo		NTE 1500	-	negativo		NTE 1500	-	negativo		NTE 1500
Grasas vegetales	-	negativo		NTE 1500	-	negativo		NTE 1500	-	negativo		NTE 1500
Suero de leche	-	negativo		NTE 1500	-	negativo		NTE 1500	-	negativo		NTE 1500
Residuos de medicamentos veterinarios	ug/l	negativo		NTE 1500	ug/l	negativo		NTE 1500	-			-

**Tabla11. 6: REQUISITOS FISICO-QUIMICOS DE LA LECHE CRUDA-PASTEURIZADA Y LARGAVIDA
FUENTE: (INEN NTE 9-10 2012) (INEN NTE 701 2009)**



1.8.3.2. LÍMITES DE AFLATOXINA AFM1 EN LECHE CRUDA, PASTEURIZADA SEGÚN LA NORMATIVA INEN:

El límite máximo para aflatoxina AFM1 establecidos por la normativa nacional vigente (INEN NTE 9-10 2012) (INEN NTE 701 2009) es el que se indica a continuación en la tabla 1.7

LÍMITE MÁXIMO DE CONTAMINANTE						
REQUISITO	LECHE CRUDA		LECHE PASTEURIZADA		LECHE LARGA VIDA	
Aflatoxina M1, mg/Kg	Límite Máximo (LM)	Método de ensayo	Límite Máximo (LM)	Método de ensayo	Límite Máximo (LM)	Método de ensayo
	0,5	ISO 14674	0,5	ISO 14674	No existe todavía su determinación cuantitativa	-

Tabla 1.7: LÍMITE MÁXIMO DE AFLATOXINA AFM₁ PARA LA LECHE CRUDA-PASTEURIZADA Y LARGAVIDA
FUENTE: (INEN NTE 9-10 2012) (INEN NTE 701 2009)

1.8.3.3. REQUISITOS MICROBIOLÓGICOS PARA LECHE CRUDA, PASTEURIZADA Y LARGA VIDA SEGÚN LA NORMATIVA INEN:

Los requisitos microbiológicos para leche cruda, pasterurizada y larga vida, establecidos por la normativa nacional vigente (INEN NTE 9-10 2012) (INEN NTE 701 2009) son los que se indican a continuación:

REQUISITOS MICROBIOLÓGICOS						
REQUISITO	LECHE CRUDA		LECHE PASTEURIZADA		LECHE LARGA VIDA	
	Límite Máximo (LM)	Método de ensayo	Límite Máximo (LM)	Método de ensayo	Límite Máximo (LM)	Método de ensayo
Recuento de microorganismos aerobios mesófilos UFC/cm ³	1,5 x 10 ⁶	NTE INEN 1529:-5	30000	NTE INEN 1529:-5	-	-
Recuento de células somáticas/cm ³	7,0 x 10 ⁵	AOAC-978.26	-	-	-	-
Recuento de coliformes	-	-	<1	OACC 991.14	-	-
Detección de Salmonella/25g	-	-	0	NTE INEN 1529-15	-	-
Recuento de Escherichia coli, UFC/g	-	-	<10	OACC 991.14	-	-

Tabla 1 8: REQUISITOS MICROBIOLÓGICOS DE LA LECHE CRUDA-PASTEURIZA Y LARGA VIDA LARGAVIDA
FUENTE: (INEN NTE 9-10 2012) (INEN NTE 701 2009)



PARTE EXPERIMENTAL



2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MUESTREO

2.1.1. MUESTRAS DE LECHE PARA EL ANÁLISIS Y SELECCIÓN.

Para el muestreo se consideraron tres tipos de leche según el tratamiento térmico al que se someten: leche pasteurizada, leche U.H.T. (Ultra High Temperature o Temperatura ultra elevada) y leche cruda sin ningún tipo de tratamiento térmico, y dentro de cada grupo se tomó en cuenta el contenido de grasa: entera y descremada, todas ellas comercializadas en tres marcas distintas como se detalla en la tabla 2.1 y cuyas especificaciones y valor nutricional puede verificarse en el **Anexo 2.**

Para cada clase de leche se realizaron dos muestreos correspondientes cada uno a distintos lotes de producción, tres muestras por cada lote, es decir seis muestras por marca en el caso de las leches entera y descremada UHT y dos muestras en el caso de la leche entera pasteurizada y la leche cruda. Las muestras se tomaron por duplicado analizándose en total 84 muestras de leche como puede verificarse en la tabla 2.1.

Para la fácil manipulación de las muestras fueron codificadas (tabla 2.1). Se recolectaron muestras de leche mediante un muestreo aleatorio por duplicado en supermercados de consumo masivo de la ciudad de Cuenca (Supermaxi, Coralrío y Coralcentro) manteniendo la cadena de custodia de las muestras en condiciones adecuadas de transporte y almacenamiento (20-25 °C para empaques tetrapak y 4-8 °C para leches enfundadas y cruda).

Los lugares de muestreo fueron escogidos porque son de los de mayor afluencia en la ciudad y en donde se encontraron las marcas buscadas correspondientes a



distintos lotes (tres en el caso de leche UHT entera y descremada y dos lotes diferentes para leche pasteurizada entera) en los distintos tipos de leche elegidos para la investigación. El 40% del muestreo se realizó en Supermercados la Favorita y el 60% en los supermercados Coralrío. La recolección se llevó a cabo durante ocho días correspondientes a dos meses distintos como se indica en la tabla 2.1.

Para evitar la contaminación cruzada se mantuvo la cadena de custodia de las muestras es decir se mantuvieron los envases cerrados hasta su análisis. Cada muestra fue etiquetada con su código respectivo, tipo de leche, marca, tratamiento térmico, etc.

En el caso de las muestras de leche cruda se recolectaron en un centro de acopio de la parroquia Tarqui hacienda Santa Elena. Las muestras se recolectaron con las debidas medidas de asepsia sanitizando la llave del tanque de frío que contenía la leche, se descartó el primer chorro, y del segundo chorro se recolectaron 50 ml directamente en recipientes estériles tapa rosca por duplicado. El muestreo se realizó en dos días diferentes en el ordeño correspondiente a la tarde cada día la misma hora y manteniendo siempre las mismas condiciones, luego se colocó el recipiente estéril con la muestra de leche en un contenedor de vacunas con refrigerantes para mantener la temperatura de refrigeración. Las muestras fueron debidamente etiquetadas y herméticamente selladas.

Se indican en la tabla 2.2 las series que agrupan las muestras de leche seleccionadas según los criterios elegidos para el muestreo, como el tipo, marca, número de lote, fecha de recolección y número de muestra, registrando por series para poder establecer su marca y tipo y sus niveles de aflatoxina presentes en cada una de las leches analizadas.

Se tomó como criterio para la elección de las distintas marcas de leche, cuáles eran las marcas más consumidas y de mayor demanda por parte de la población Cuencana en cada uno de los distintos supermercados (La Favorita, Coral centro y Coralrío) donde se realizaron los respectivos muestreos.



MARCAS	TIPOS DE LECHE	TIPO DE TRATAMIENTO TÉRMICO	No. TOTAL DE MUESTRAS	LUGAR DE RECOLECCIÓN	FECHA DE MUESTREO		NÚMERO DE LOTE
					MUESTREO No. 1	MUESTREO No. 2	
NUTRI LECHE	ENTERA DESCREMADA	UHT	12	SUPERMERCADO: LA FAVORITA CORALRIO CORALCENTRO	12/02/2013	19/02/2013	30313G(3*)
					19/02/2013	12/03/2013	30222G(3*)
LA LECHERA	ENTERA DESCREMADA	UHT	12	SUPERMERCADO: LA FAVORITA CORALRIO CORALCENTRO	12/03/2013	19/03/2013	30330G(3*)
					19/03/2013	12/02/2013	30322G(3*)
PARMALAT	ENTERA DESCREMADA	UHT	12	SUPERMERCADO: LA FAVORITA CORALRIO CORALCENTRO	12/02/2013	19/02/2013	30280682AA(3*)
					19/02/2013	12/03/2013	23600682GC(3*)
TONY	ENTERA	PASTEURIZADA	4	SUPERMERCADO: LA FAVORITA CORALRIO CORALCENTRO	12/03/2013	19/03/2013	30780682GA(3*)
					19/03/2013	12/02/2013	30770682EA(3*)
LECHE CRUDA	ENTERA		4	HACIENDA STA ELENA	12/02/2013	19/02/2013	
					19/02/2013	12/03/2013	
NUTRI LECHE	ENTERA	PASTEURIZADA	4	SUPERMERCADO: LA FAVORITA CORALRIO CORALCENTRO	12/03/2013	19/03/2013	
					19/03/2013	12/02/2013	10800(1*)
LA LECHERA	ENTERA	UHT	12	SUPERMERCADO: LA FAVORITA CORALRIO CORALCENTRO	12/02/2013	19/02/2013	14369(1*)
					19/02/2013	12/03/2013	12241(1*)
PARMALAT	ENTERA	UHT	12	SUPERMERCADO: LA FAVORITA CORALRIO CORALCENTRO	12/03/2013	19/03/2013	13323(1*)
					19/03/2013	12/02/2013	
NUTRI LECHE	ENTERA	PASTEURIZADA	4	SUPERMERCADO: LA FAVORITA CORALRIO CORALCENTRO	12/02/2013	19/02/2013	30409MZ(1*)
					19/02/2013	12/03/2013	30410MZ(1*)
LA LECHERA	ENTERA	UHT	12	SUPERMERCADO: LA FAVORITA CORALRIO CORALCENTRO	12/03/2013	19/03/2013	30508M3(1*)
					19/03/2013	12/02/2013	30507M2(1*)
PARMALAT	ENTERA	UHT	12	SUPERMERCADO: LA FAVORITA CORALRIO CORALCENTRO	12/02/2013	19/02/2013	30280682AA(3*)
					19/02/2013	12/03/2013	30570682GB(3*)
NUTRI LECHE	ENTERA	UHT	12	SUPERMERCADO: LA FAVORITA CORALRIO CORALCENTRO	12/03/2013	19/03/2013	30740863GC(3*)
					19/03/2013	12/02/2013	30660840FG(3*)
PARMALAT	ENTERA	UHT	12	SUPERMERCADO: LA FAVORITA CORALRIO CORALCENTRO	12/02/2013	19/02/2013	F316(3*)
					19/02/2013	12/03/2013	M318(3*)
NUTRI LECHE	ENTERA	UHT	12	SUPERMERCADO: LA FAVORITA CORALRIO CORALCENTRO	12/03/2013	19/03/2013	E308(3*)
					19/03/2013	12/02/2013	E318(3*)
NUTRI LECHE	ENTERA	UHT	12	SUPERMERCADO: LA FAVORITA CORALRIO CORALCENTRO	12/02/2013	19/02/2013	30313G(3*)
					19/02/2013	12/03/2013	30222G(3*)
NUTRI LECHE	ENTERA	UHT	12	SUPERMERCADO: LA FAVORITA CORALRIO CORALCENTRO	12/03/2013	19/03/2013	30202A(3*)
					19/03/2013	12/02/2013	30403A(3*)

*: número de muestras

Tabla2.1: Muestras de leche recolectadas según marca, tipos, tipo de tratamiento térmico, número de muestras seleccionadas, números de lote y lugar de recolección.



MARCA	SERIE A		SERIE B		SERIE C	
	NUTRI LECHE		LA LECHERA		PARMALAT	
TIPO	DESCREMADA UHT		DESCREMADA UHT		DESCREMADA UHT	
	No DE LOTE MUESTREO 1	No DE LOTE MUESTREO 2	No DE LOTE MUESTREO 1	No DE LOTE MUESTREO 2	No DE LOTE MUESTREO 1	No DE LOTE MUESTREO 2
	30313G(3)	30330G(3)	30280682AA(3)	30780682GA(3)	F316(3)	F327(3)
	30222G(3)	30322G(3)	23600682GC(3)	30770682EA(3)	M318(3)	F314(3)
No. MUESTRAS	6	6	6	6	6	6

MARCA	SERIE D		SERIE E		SERIE F		SERIE G	
	NUTRI LECHE		LA LECHERA		PARMALAT		TONY	
TIPO	ENTERA UHT		ENTERA UHT		ENTERA UHT		ENTERA UHT	
	No DE LOTE MUESTREO 1	No DE LOTE MUESTREO 2	No DE LOTE MUESTREO 1	No DE LOTE MUESTREO 2	No DE LOTE MUESTREO 1	No DE LOTE MUESTREO 2	No DE LOTE MUESTREO 1	No DE LOTE MUESTREO 2
	30313G(3)	30202A(3)	30280682AA(3)	30740863GC(3)	F316(3)	E308(3)	10800(1)	12241(1)
	30222G(3)	30403A(3)	30570682GB(3)	30660840FG(3)	M318(3)	E318(3)	14369(1)	13323(1)
No. MUESTRAS	6	6	6	6	6	6	2	2

MARCA	SERIE H		SERIE I	
	NUTRI LECHE		LECHERA ENTERA	
TIPO	ENTERA PASTEURIZADA			
	No DE LOTE MUESTREO 1	No DE LOTE MUESTREO 2	No DE LOTE MUESTREO 1	No DE LOTE MUESTREO 2
	30409MZ(1)	30508M3(1)	12/02/2013	12/03/2013
	30410MZ(1)	30507M2(1)	19/02/2013	19/03/2013
No. MUESTRAS	2	2	2	2

Tabla 2.2: Muestras de leche analizadas según series



2.2. ANÁLISIS DE AFLATOXINA M1

2.2.1. FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA CUANTITATIVA DE ELISA (ENZIMO- INMUNO-ANÁLISIS) POR INHIBICIÓN DIRECTA.

Yuste (2010) fundamenta que la técnica de ELISA es la abreviatura del término en inglés Enzyme Linked Inunoabsorbent Assay (ensayo de inmunoabsorción acoplado a enzima). Es una técnica de detección de antígenos o anticuerpos basada en la absorción de proteínas a pocillos de una placa de plástico tratada para favorecer su capacidad de absorber proteínas (antígenos o anticuerpos), de forma que en los pocillos se pueden incubar con soluciones muestra que contienen anticuerpos o antígenos. La reacción antígeno- anticuerpo se revela mediante una reacción enzimática que cambia el color y se cuantifica por la absorbancia de luz del fluido a una determinada longitud de onda. Permite detectar antígenos presentes en una muestra compleja y cuantificarlos de acuerdo con una serie de diluciones patrón de concentración conocida, así como cuantificar anticuerpos presentes en el suero u otro fluido biológico cuando se utiliza el antígeno absorbido al plástico y se determina la máxima dilución de la muestra que mantiene actividad (título).

2.3. REACTIVOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS AFM1.

El análisis se realizó durante los meses de abril y mayo del año 2013, en el laboratorio acreditado LIVEXLAB Quito-Ecuador.

Para la cuantificación de aflatoxinas se utilizó la técnica de inmunoensayo enzimático (ELISA) para lo cual se emplearon Kits RIDASCREEN FAST AFLATOXIN M1, cuyas especificaciones se detallan a continuación, (Ver Anexo 1).



MATERIAL	CANTIDAD	PROVEEDOR	No Lote:
Placas de 48 pocillos (6 tiras, cada una de 8 pocillos separables recubiertos con anticuerpos de captura).	1	R-Biopharm AG,Darmstadt, Alemania	15073.
Soluciones estándar: Volumen: 1,3 ml <ul style="list-style-type: none">• Concentraciones (partes por trillón p.p.t.):• 0 (estándar cero), 125, 250, 500, 1000, 2000 p.p.t.	6	R-Biopharm AG,Darmstadt, Alemania	15073.
Conjugado aflatoxina M ₁ peroxidasa Volumen: 3 ml	1	R-Biopharm AG,Darmstadt, Alemania	15073.
Anticuerpo anti-aflatoxina M ₁ Volumen: 3 ml	1	R-Biopharm AG,Darmstadt, Alemania	15073.
Solución de sustrato cromógeno (Tetrametilbencidina). Volumen: 10ml	1	R-Biopharm AG,Darmstadt, Alemania	12312.
Solución stop H ₂ SO ₄ 1 N Volumen: 14 ml	1	R-Biopharm AG,Darmstadt, Alemania	13192.
Tampón de lavado: buffer de fosfatos pH 7,4 Volumen: 10 ml	1	R-Biopharm AG,Darmstadt, Alemania	11215.

Tabla 2.3: REACTIVOS REQUERIDOS PARA EL INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO RIDASCREEN[®] FAST AFLATOXIN M₁

2.4. Preparación de Muestras

- Rotular y refrigerar las muestras a 10 °C durante 12 horas.
- Colocar 10 ml de leche de cada muestra en tubos para centrifugarlos durante 10 minutos a 1500 rpm.
- Eliminar la capa superior de crema con una pipeta automática.
- Analizar inmediatamente el sedimento para evitar el incremento de la temperatura que debe mantenerse en 10 °C.



Procedimiento

- Colocar la microplaca de cuarenta y ocho pocillos en el marco portapocillos para los estándares y para las muestras a analizar. Marcar la posición de los estándares y de las muestras.
- Agregar 50ul de los estándares y de las muestras a analizar en los pocillos correspondientes. Utilizar una punta de pipeta nueva para cada estándar y para cada muestra.
- Agregar 50 μ l del conjugado aflatoxina M₁- enzima (tapón rojo) a los pocillos correspondientes.
- Agregar 50 μ l de anticuerpo anti-aflatoxina M₁ (tapón negro) a cada pocillo. Mezclar el contenido de la microplaca suavemente e incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente (20-25⁰C).
- Vaciar los pocillos y golpear luego enérgicamente tres veces consecutivas, el marco portapocillos sobre un papel absorbente limpio para asegurar la eliminación completa de restos líquidos.
- Lavar los pocillos con 250 μ l agua en cada pocillo usando una pipeta multicanal o una botella de lavado y vaciar nuevamente los pocillos sobre papel absorbente.
- Repetir el lavado dos veces más.
- Agregar 100 μ l de Red Cromógena Pro (Tapón marrón) a cada pocillo, mezclar el contenido de la microplaca suavemente e incubar 5 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente (20-25⁰C).
- Agregar 100 μ l de la solución stop (tapón amarillo) a cada pocillo homogeneizar suavemente durante 10 minutos
- Colocar las microplacas en el lector en el portapocillos (Ver figura 3).
- Medir la absorción a 450 nm encerrando contra aire luego de estabilizar la lámpara manteniéndola encendida por tres minutos. μ .

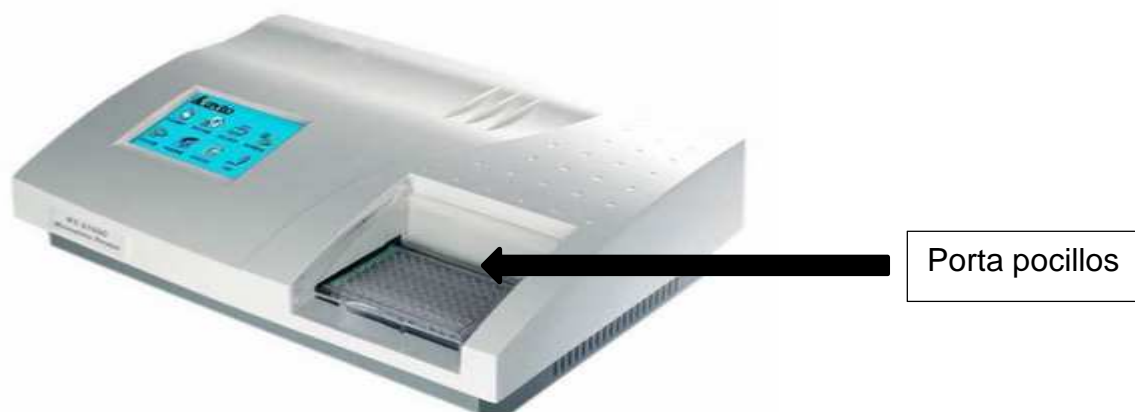


Figura No 3: Lector de Elisa Espectrofotómetro para placas de 48 pocillos, (450nm), marca Rayto, Modelo Rt 2100C.

2.4.1. Estandarización

Aplicando el procedimiento descrito en el apartado 2.4.1 se elaboró la curva de calibración con las absorbancias de los patrones de aflatoxinas AFM1 a 125, 250, 500, 1000 ppt de concentración.

Los valores reportados se obtienen mediante la aplicación de la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{absorbancia estándar (ó muestra)}}{\text{absorbancia estándar cero}} \times 100 = \% \text{ de absorbancia}$$

Para la investigación de los valores de los patrones y de las muestras fueron digitados usando el software especial RIDA^RSOFT Win (Art. No Z9999) s RIDASCREEN^R inmunoensayos enzimático y los cálculos fueron basados en Logit (p)=ln(p/1-p) siendo p la división de la absorbancia estándar para la absorbancia estándar cero que se detalla en el % de absorbancia leída en cada muestra. Logit se puede calcular si las concentraciones son menores al 100% y con este a su vez poder realizar una interpolación en la curva ploteada.



El valor del estándar cero es igual al 100% y los demás valores y los demás valores de absorción se indican en porcentaje. Los valores calculados para los estándares son aplicados a un sistema de coordenadas en papel semilogaritmico respecto a la concentración de aflatoxina M₁ (ng/l).

Para obtener la concentración real de aflatoxina M1 en ng/l de cada muestra debe ser multiplicada la concentración leída en la curva por el factor de dilución correspondiente siendo para la leche el valor de 1.

Los datos se expresaron en ng/Lt o ppt. La curva obtenida puede observarse en la figura4.

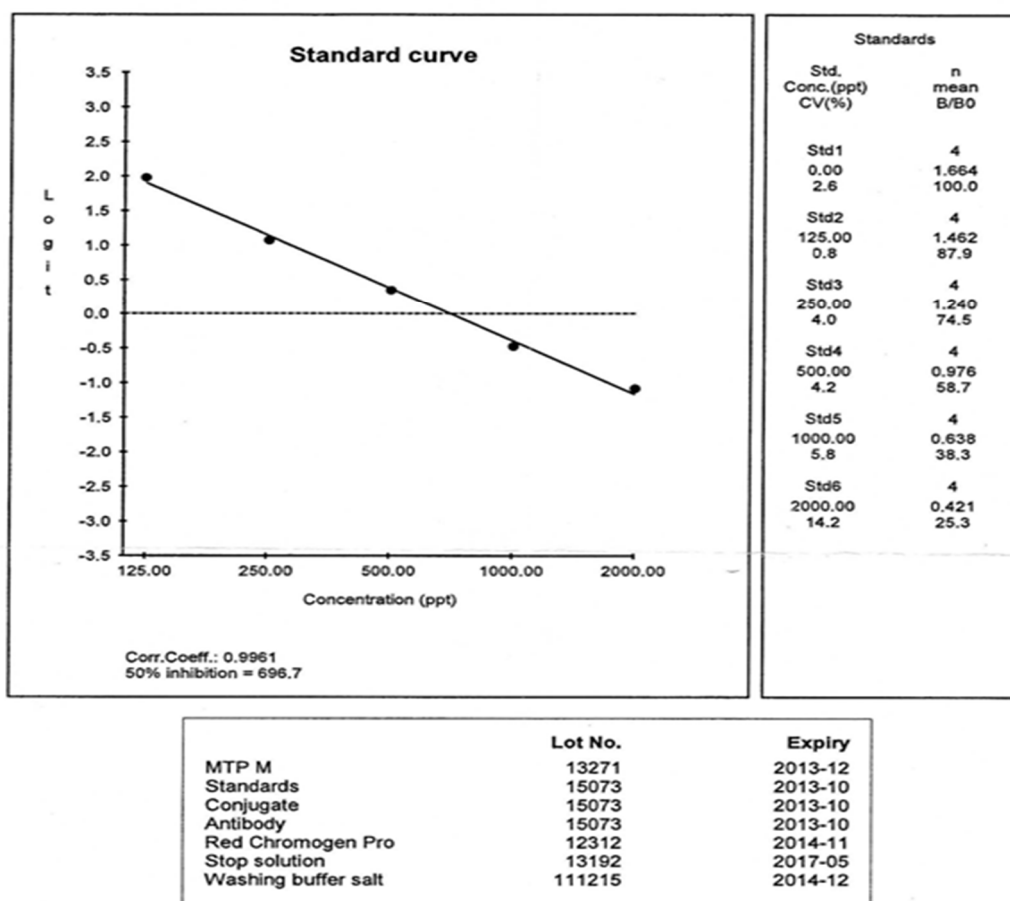


Figura 4. CURVA DE CALIBRACIÓN DE LOS PATRONES PARA LA DETERMINACIÓN DE AFM₁



ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN



III

RESULTADOS DE LA PRUEBA DE ELISA EN LA DETERMINACIÓN DE AFLATOXINA M₁ EN LECHE:

Los valores de Logit/log de absorbancia y concentración de aflatoxina AFM₁ correspondientes al primer y segundo muestreo se presentan en las tablas 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, correspondientes a los resultados de las series A, B y C correspondiente a leches descremadas UHT. Todas las determinaciones reportadas y obtenidas mediante el software RIDA SOFT Win (Art No Z9999) pueden observarse en Anexo 5-6:

SERIE A							
MARCA	NUTRI LECHE						
TIPO	DESCREMADA UHT						
MUESTREO 1							
ABSORBANCIA							
# LOTE	No. MUESTRA	MEDIA	%	*CV	**CAF _{M1}		
					ppt	ppb	
30313G	1	2,388	141,7	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	
30313G	2	2,339	138,8	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	
30313G	3	2,306	136,9	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	
MUESTREO 2							
ABSORBANCIA							
# LOTE	No. MUESTRA	MEDIA	%	*CV	**CAF _{M1}		
					ppt	ppb	
30222G	1	2,269	134,7	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	
30222G	2	2,336	138,6	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	
30222G	3	2,318	137,6	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	

*CV: Coeficiente de Variación

**CAF_{M1}: Concentración de Aflatoxinas M₁

Tabla 3.1: Valores de la media, absorbancia, coeficiente de variación y % de

De absorbancia para muestra de leche Nutri leche descremada UHT (Muestreo 1).

SERIE A							
MARCA	NUTRI LECHE						
TIPO	DESCREMADA UHT						
MUESTREO 1							
ABSORBANCIA							
# LOTE	No. MUESTR.	MEDIA	%	*CV	**CAF _{M1}		
					ppt	ppb	
30222G	1	1,971	127,7	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	
30222G	2	1,85	119,9	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	
30222G	3	1,955	126,7	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	
MUESTREO 2							
ABSORBANCIA							
# LOTE	No. MUESTR.	MEDIA	%	*CV	**CAF _{M1}		
					ppt	ppb	
30322G	1	1,763	114,3	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	
30322G	2	1,84	119,2	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	
30322G	3	1,742	112,9	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	

*CV: Coeficiente de Variación

**CAF_{M1}: Concentración de Aflatoxinas M₁

Tabla 3.2: Valores de la media, absorbancia, coeficiente de variación y % de

de absorbancia para muestra de leche Nutri leche descremada UHT (Muestreo 2).



SERIE B							
MARCA	LA LECHERA						
TIPO	DESCREMADA UHT						
MUESTREO 1							
ABSORBANCIA							
# LOTE	No. MUESTRA	MEDIA	%	*CV	**CAF _{M1}		
					ppt	ppb	
30280682AA	1	2,222	131,9	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	
30280682AA	2	2,138	126,9	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	
30280682AA	3	2,322	137,8	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	
MUESTREO 2							
ABSORBANCIA							
# LOTE	No. MUESTRA	MEDIA	%	*CV	**CAF _{M1}		
					ppt	ppb	
23600682GB	1	2,058	122,1	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	
23600682GB	2	2,32	137,7	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	
23600682GB	3	2,226	132,1	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	

*CV: Coeficiente de Variación

**CAF_{M1}: Concentración de Aflatoxinas M₁

Tabla 3.3: Valores de la media, absorbancia, coeficiente de variación y % de

de absorbancia para muestra de leche La Lechera descremada UHT (Muestreo 1).

SERIE B							
MARCA	LA LECHERA						
TIPO	DESCREMADA UHT						
MUESTREO 1							
ABSORBANCIA							
# LOTE	No. MUESTRA	MEDIA	%	*CV	**CAF _{M1}		
					ppt	ppb	
30780682GA	1	1,567	101,6	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	
30780682GA	2	1,531	99,2	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	
30780682GA	3	1,797	116,2	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	
MUESTREO 2							
ABSORBANCIA							
# LOTE	No. MUESTRA	MEDIA	%	*CV	**CAF _{M1}		
					ppt	ppb	
30770682EA	1	1,563	101,3	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	
30770682EA	2	1,799	116,6	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	
30770682EA	3	1,765	114,4	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	

*CV: Coeficiente de Variación

**CAF_{M1}: Concentración de Aflatoxinas M₁

Tabla 3.4: Valores de la media, absorbancia, coeficiente de variación y % de

de absorbancia para muestra de leche La Lechera descremada UHT (Muestreo 2).



SERIE C						
MARCA	PARMALAT					
TIPO	DESCREMADA UHT					
MUESTREO 1						
ABSORBANCIA						
# LOTE	No. MUESTRA	MEDIA	%	*CV	**CAF _{M1}	
					ppt	ppb
F316	1	2,299	136,4	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb
F316	2	2,468	146,5	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb
F316	3	2,44	144,8	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb
MUESTREO 2						
ABSORBANCIA						
# LOTE	No. MUESTRA	MEDIA	%	*CV	**CAF _{M1}	
					ppt	ppb
M318	1	2,359	140	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb
M318	2	2,298	136,4	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb
M318	3	2,518	149,4	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb

*CV: Coeficiente de Variación

**CAF_{M1}: Concentración de Aflatoxinas M₁

Tabla 3.5. Valores de la media, absorbancia, coeficiente de variación y % de

de absorbancia para muestra de leche Parmalat Descremada UHT (Muestreo 1).

SERIE C						
MARCA	PARMALAT					
TIPO	DESCREMADA UHT					
MUESTREO 1						
ABSORBANCIA						
# LOTE	No. MUESTRA	MEDIA	%	*CV	**CAF _{M1}	
					ppt	ppb
F327	1	1,966	127,4	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb
F327	2	1,849	119,8	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb
F327	3	1,915	124,1	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb
MUESTREO 2						
ABSORBANCIA						
# LOTE	No. MUESTRA	MEDIA	%	*CV	**CAF _{M1}	
					ppt	ppb
F314	1	2,003	129,8	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb
F314	2	1,913	124	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb
F314	3	1,925	124,8	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb

*CV: Coeficiente de Variación

**CAF_{M1}: Concentración de Aflatoxinas M₁

Tabla 3.6. Valores de la media, absorbancia, coeficiente de variación y % de

de absorbancia para muestra de leche Parmalat Descremada UHT (Muestreo 2).

Los resultados de todas las muestras indican que las concentraciones cuantificadas están por debajo de los límites de detección de la técnica de ELISA por competencia (< 125p.p.t ó 0,125p.p.b) lo cual está por debajo de la normativa INEN NTE 9-10 (0,5 ug/L), e internacionales FAO (0,5ug/L) y FDA 0,5 p.p.b. de aflatoxina M₁.



Los valores de Logit/log de absorbancia y concentración de aflatoxina AFM₁ correspondientes al primer y segundo muestreo de leches se presentan en las tablas 3.7, 3.8, 3.9, 3.10, 3.11, 3.12, 3.13, 3.14 correspondientes a los resultados de las series D, E, F y G de leche entera UHT. Todas las determinaciones reportadas y obtenidas mediante el software RIDA SOFT Win (Art No Z9999) pueden observarse en Anexo5-6.

SERIE D							
MARCA	NUTRI LECHE						
TIPO	ENTERA UHT						
MUESTREO 1							
ABSORBANCIA							
# LOTE	No. MUESTRA	MEDIA	%	*CV	**CAF _{M1}		
					ppt	ppb	
30313G	1	2,451	145,5	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	
30313G	2	2,399	142,4	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	
30313G	3	2,545	151	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	
MUESTREO 2							
ABSORBANCIA							
# LOTE	No. MUESTRA	MEDIA	%	*CV	**CAF _{M1}		
					ppt	ppb	
30222G	1	2,405	142,7	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	
30222G	2	2,421	143,7	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	
30222G	3	2,268	134,6	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	

*CV: Coeficiente de Variación

**CAF_{M1}: Concentración de Aflatoxinas M₁

SERIE D							
MARCA	NUTRI LECHE						
TIPO	ENTERA UHT						
MUESTREO 1							
ABSORBANCIA							
# LOTE	No. MUESTRA	MEDIA	%	*CV	**CAF _{M1}		
					ppt	ppb	
30202A	1	2,017	130,7	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	
30202A	2	1,883	122	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	
30202A	3	2,012	130,4	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	
MUESTREO 2							
ABSORBANCIA							
# LOTE	No. MUESTRA	MEDIA	%	*CV	**CAF _{M1}		
					ppt	ppb	
30403A	1	1,985	128,6	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	
30403A	2	1,947	126,2	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	
30403A	3	2,017	130,7	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	

*CV: Coeficiente de Variación

**CAF_{M1}: Concentración de Aflatoxinas M₁

Tabla 3.7: Valores de la media, absorbancia, coeficiente de variación y % de

De absorbancia para muestra de leche Nutri Leche entera UHT(Muestreo 1).

Tabla 3.8 Valores de la media, absorbancia, coeficiente de variación y % de

de absorbancia para muestra de leche Nutri Leche entera UHT (Muestreo 2).



SERIE E							
MARCA	LA LECHERA						
TIPO	ENTERA UHT						
MUESTREO 1							
ABSORBANCIA							
# LOTE	No. MUESTRA	MEDIA	%	*CV	**CAF _{M1}		
					ppt	ppb	
30280682AA	1	2,311	137,2	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	
30280682AA	2	2,413	143,2	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	
30280682AA	3	2,412	143,1	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	
MUESTREO 2							
ABSORBANCIA							
# LOTE	No. MUESTRA	MEDIA	%	*CV	**CAF _{M1}		
					ppt	ppb	
30570682GB	1	2,321	137,7	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	
30570682GB	2	2,35	139,5	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	
30570682GB	3	2,28	135,3	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	

*CV: Coeficiente de Variación

**CAF_{M1}: Concentración de Aflatoxinas M₁

Tabla 3.9: Valores de la media, absorbancia, coeficiente de variación y % de absorbancia para muestra de leche La Lechera entera UHT (Muestreo 1).

SERIE E							
MARCA	LA LECHERA						
TIPO	ENTERA UHT						
MUESTREO 1							
ABSORBANCIA							
# LOTE	No. MUESTRA	MEDIA	%	*CV	**CAF _{M1}		
					ppt	ppb	
30740863GC	1	1,676	108,6	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	
30740863GC	2	1,888	122,4	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	
30740863GC	3	1,551	100,5	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	
MUESTREO 2							
ABSORBANCIA							
# LOTE	No. MUESTRA	MEDIA	%	*CV	**CAF _{M1}		
					ppt	ppb	
30660840FG	1	1,829	118,5	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	
30660840FG	2	1,84	119,2	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	
30660840FG	3	1,922	124,6	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	

*CV: Coeficiente de Variación

**CAF_{M1}: Concentración de Aflatoxinas M₁

Tabla 3.10: Valores de la media, absorbancia, coeficiente de variación y % de absorbancia para muestra de leche La Lechera entera UHT (Muestreo 2).



SERIE F						
MARCA	PARMALAT					
TIPO	ENTERA UHT					
MUESTREO 1						
ABSORBANCIA						
# LOTE	No. MUESTRA	MEDIA	%	*CV	**CAF _{M1}	
					ppt	ppb
F316	1	2,524	149,8	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb
F316	2	2,395	142,1	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb
F316	3	2,307	136,9	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb
MUESTREO 2						
ABSORBANCIA						
# LOTE	No. MUESTRA	MEDIA	%	*CV	**CAF _{M1}	
					ppt	ppb
M318	1	2,391	141,9	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb
M318	2	2,439	144,7	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb
M318	3	2,511	149	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb

*CV: Coeficiente de Variación

**CAF_{M1}: Concentración de Aflatoxinas M₁

Tabla 3.11: Valores de la media, absorbancia, coeficiente de variación y % de

de absorbancia para muestra de leche Parmalat entera UHT (Muestreo 1).

SERIE F						
MARCA	PARMALAT					
TIPO	ENTERA UHT					
MUESTREO 1						
ABSORBANCIA						
# LOTE	No. MUESTRA	MEDIA	%	*CV	**CAF _{M1}	
					ppt	ppb
E308	1			0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb
E308	2			0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb
E308	3			0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb
MUESTREO 2						
ABSORBANCIA						
# LOTE	No. MUESTRA	MEDIA	%	*CV	**CAF _{M1}	
					ppt	ppb
E318	1	1,829	118,5	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb
E318	2	1,84	119,2	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb
E318	3	1,922	124,6	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb

*CV: Coeficiente de Variación

**CAF_{M1}: Concentración de Aflatoxinas M₁

Tabla 3.12. Valores de la media, absorbancia, coeficiente de variación y % de

de absorbancia para muestra de leche Parmalat entera UHT (Muestreo 2).



SERIE G							
MARCA	TONY						
TIPO	ENTERA UHT						
MUESTREO 1							
ABSORBANCIA							
# LOTE	No. MUESTRA	MEDIA	%	*CV	**CAF _{M1}		
					ppt	ppb	
10800	1	2,361	140,1	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	
MUESTREO 2							
ABSORBANCIA							
# LOTE	No. MUESTRA	MEDIA	%	*CV	**CAF _{M1}		
					ppt	ppb	
14369	1	2,488	147,7	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	

*CV: Coeficiente de Variación

**CAF_{M1}: Concentración de Aflatoxinas M₁

Tabla 3.13: Valores de la media, absorbancia, coeficiente de variación y % de absorbancia para muestra de leche Tony entera UHT (Muestreo 1).

SERIE G							
MARCA	TONY						
TIPO	ENTERA UHT						
MUESTREO 1							
ABSORBANCIA							
# LOTE	No. MUESTRA	MEDIA	%	*CV	**CAF _{M1}		
					ppt	ppb	
12241	1	1,812	117,4	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	
MUESTREO 2							
ABSORBANCIA							
# LOTE	No. MUESTRA	MEDIA	%	*CV	**CAF _{M1}		
					ppt	ppb	
13323	1	1,899	123,1	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	

*CV: Coeficiente de Variación

**CAF_{M1}: Concentración de Aflatoxinas M₁

Tabla 3.14: Valores de la media, absorbancia, coeficiente de variación y % de absorbancia para muestra de leche Tony entera UHT (Muestreo 2).

Los resultados de todas las muestras indican que las concentraciones cuantificadas están por debajo de los límites de detección de la técnica de ELISA por competencia (< 125p.p.t ó 0,125p.p.b) lo cual está por debajo de la normativa INEN NTE 9-10 (0,5 ug/L), e internacionales FAO (0,5ug/L) y FDA 0,5 p.p.b. de aflatoxina M₁.



Los valores de Logit/log de absorbancia y concentración de aflatoxina AFM₁ correspondientes al primer y segundo muestreo de leches se presentan en las tablas 3.15, 3.16, correspondientes a los resultados de la series H de leche entera pasteurizada. Todas las determinaciones reportadas y obtenidas mediante el software RIDA SOFT Win (Art No Z9999) pueden observarse en Anexo 5-6.

SERIE H						
MARCA	NUTRI LECHE					
TIPO	ENTERA PASTEURIZADA					
MUESTREO 1						
ABSORBANCIA						
# LOTE	No. MUESTRA	MEDIA	%	*CV	**CAF _{M1}	
					ppt	ppb
30409MZ	1	2,273	134,9	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb
MUESTREO 2						
ABSORBANCIA						
# LOTE	No. MUESTRA	MEDIA	%	*CV	**CAF _{M1}	
					ppt	ppb
30410MZ	1	0	0	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb

*CV: Coeficiente de Variación

**CAF_{M1}: Concentración de Aflatoxinas M₁

Tabla 3.15. Valores de la media, absorbancia, coeficiente de variación y % de

De absorbancia para muestra de leche Nutri Leche entera Pasteurizada.

SERIE H						
MARCA	NUTRI LECHE					
TIPO	ENTERA PASTEURIZADA					
MUESTREO 1						
ABSORBANCIA						
# LOTE	No. MUESTRA	MEDIA	%	*CV	**CAF _{M1}	
					ppt	ppb
30508M3	1	1,775	115	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb
MUESTREO 2						
ABSORBANCIA						
# LOTE	No. MUESTRA	MEDIA	%	*CV	**CAF _{M1}	
					ppt	ppb
30507M2	1	1,799	116,6	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb

*CV: Coeficiente de Variación

**CAF_{M1}: Concentración de Aflatoxinas M₁

Tabla 3.16. Valores de la media, absorbancia, coeficiente de variación y % de

de absorbancia para muestra de leche Nutri Leche entera UHT (Muestreo 2).

Los resultados de todas las muestras indican que las concentraciones cuantificadas están por debajo de los límites de detección de la técnica de ELISA por competencia (< 125p.p.t ó 0,125p.p.b) lo cual está por debajo de la normativa INEN NTE 9-10 (0,5 ug/L), e internacionales FAO (0,5ug/L) y FDA 0,5 p.p.b. de aflatoxina M₁.



Los valores de Logit/log de absorbancia y concentración de aflatoxina AFM₁ correspondientes al primer y segundo muestreo de leches se presentan en las tablas 3.17, 3.18, correspondientes a los resultados de la serie I de leche entera cruda. Todas las determinaciones reportadas y obtenidas mediante el software RIDA SOFT Win (Art No Z9999) pueden observarse en Anexo 5-6.

SERIE I							
MARCA	LECHE ENTERA						
TIPO	CRUDA						
MUESTREO 1							
ABSORBANCIA							
# LOTE	No. MUESTRA	MEDIA	%	*CV	**CAF _{M1}		
					ppt	ppb	
12/02/2013	1	2,456	145,8	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	
MUESTREO 2							
ABSORBANCIA							
# LOTE	No. MUESTRA	MEDIA	%	*CV	**CAF _{M1}		
					ppt	ppb	
19/02/2013	1	2,372	140,8	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	

*CV: Coeficiente de Variación

**CAF_{M1}: Concentración de Aflatoxinas M₁

Tabla 3.17: Valores de la media, absorbancia, coeficiente de variación y % de

De absorbancia para muestra de leche Entera Cruda (Muestreo 1)

SERIE I							
MARCA	LECHE ENTERA						
TIPO	CRUDA						
MUESTREO 1							
ABSORBANCIA							
# LOTE	No. MUESTR	MEDIA	%	*CV	**CAF _{M1}		
					ppt	ppb	
12/03/2013	1	1,592	103,2	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	
MUESTREO 2							
ABSORBANCIA							
# LOTE	No. MUESTR	MEDIA	%	*CV	**CAF _{M1}		
					ppt	ppb	
19/03/2013	1	1,922	124,6	0,0	<125 ppt	< 0,125 ppb	

*CV: Coeficiente de Variación

**CAF_{M1}: Concentración de Aflatoxinas M₁

Tabla 3.18: Valores de la media, absorbancia, coeficiente de variación y % de

de absorbancia para muestra de leche Entera cruda UHT (Muestreo 2).

Los resultados de todas las muestras indican que las concentraciones cuantificadas están por debajo de los límites de detección de la técnica de ELISA por competencia (< 125p.p.t ó 0,125p.p.b) lo cual está por debajo de la normativa INEN NTE 9-10 (0,5 ug/L), e internacionales FAO (0,5ug/L) y FDA 0,5 p.p.b. de aflatoxina M₁.



Al comparar los resultados obtenidos de las diferentes clases de leche por su contenido de grasa o por su proceso de no es posible estimar la concentración de aflatoxinas AFM1 para ninguna de ellas por estar por debajo del límite de detección debajo de 125 ppt.

Considerando que la sensibilidad de la técnica de ELISA no ha permitido determinar la concentración de aflatoxinas contenidas en la leche y con la finalidad de determinar las concentraciones de AFM1 con una técnica de mayor sensibilidad como lo es la cromatografía líquida de alta resolución HPLC se realizó la cuantificación de una muestra de leche descremada seleccionada de manera aleatoria y los resultados se reportan a continuación y el cromatograma puede observarse en el anexo 9.

Muestra	TÉCNICA DE ELISA COMPETITIVA	TÉCNICA HPLC	Número de Lote
Nutri Leche Entera Descremada	< 0,125ppb	0.018 ppb	3086801AG

Tabla 3.19: Valores de Aflatoxina AFM1 determinados por HPLC

El resultado obtenido mediante HPLC señala también que la concentración de AFM1 está por debajo de las concentraciones señaladas por las normas INEN NTE 10: 2012 y FAO que es de 0,5Y $\mu\text{g}/\text{Kg}$ y según la FDA corresponde a 0,5ppb .



3.2 . DISCUSIÓN:

Para este estudio se aplicó la técnica de ELISA competitiva y se tomó como referencia la normativa nacional INEN NTE 9-10: 2012 (0,5 µg/L o 0,5 p.p.b.) y las internacionales establecidas por la FDA (0,5 p.p.b.) y la FAO (0,5 µg/L o 0,5 p.p.b.). Los valores de AFM₁ obtenidos en los dos muestreos fueron inferiores al límite de detección de la técnica (0,125 p.p.b.), valor inferior a la concentración de aflatoxinas AFM₁ permitido por la norma, por lo tanto las distintas clases de leche estudiadas en esta investigación podrían considerarse seguras y aptas para su consumo.

Para la selección de la técnica se tomó en cuenta la simplicidad y facilidad del montaje puesto que se requirió un volumen pequeño de muestra, la preparación de esta es simple y permite el análisis de varias muestras a la vez.

Los valores de concentración de aflatoxina demuestran que los diferentes tipos de leches cruda, pasteurizada y ultrapasteurizada comercializadas en la ciudad de Cuenca cumplen con las normas exigidas y si se comparan los resultados con los de otras investigaciones como los reportados en Arequipa-Perú por Ortiz en 2009 quien aplicó la misma técnica de ELISA y concluyó que ninguna muestra de leche analizadas estuvo contaminada con aflatoxina M₁ y que los valores encontrados están por debajo de los establecidos por la FDA y FAO; la misma situación se encuentra en estudios realizados en Argentina pues la bibliografía reporta que López en 2003 estudió la presencia de AFM₁ en los distintos tipos de leche encontrando valores inferiores a los exigidos por la FDA y la FAO.

Falla en 2010 indica que en países como Irán, se han encontrado concentraciones de AFM₁ en leche pasteurizada, con rangos de 0.0058 a 0.5285 µg/L, mayores a las detectadas en nuestro estudio; sin embargo se reportan una incidencia mayor (26.7%) de muestras por encima del LMR establecido por la Unión Europea. Pérez en 2010 indica en estudios realizados en el altiplano Mexicano que los resultados reportados menciona una incidencia de 59 % de contaminación por AFM₁ en leches cruda,



ultrapasteurizada y orgánica, excediendo en todos los casos el LMR propuesto por la FAO y Unión Europea, lo cual difiere de nuestros resultados obtenidos donde todas las muestras analizadas en nuestra investigación, están por debajo de los LMR de AFM1 establecido por la FDA Y FAO.



CONCLUSIONES



IV.

4.1. CONCLUSIONES:

- Concluida la investigación respecto a la hipótesis en su segunda ni se rechaza ni se acepta, tan solo se la puede estimar ya que ninguna de las leches analizadas reportan concentraciones de aflatoxina que superen la normativa. Encontrando en todas las muestras analizadas valores ($< 0,125\text{ppb}$) lo cual está por debajo de la norma INEN NTE 9-10 ($0,5\text{ ug/L}$), e internacionales FAO ($0,5\text{ug/L}$) y FDA $0,5\text{ p.p.b.}$ de aflatoxina M_1 , siendo la leche de buena calidad y segura para el consumo como complemento nutricional.
- Respecto a la primera parte de la hipótesis no es posible comparar las concentraciones pues la sensibilidad de la técnica no permitió la determinación de la concentración de aflatoxinas sino que se estima que los valores están por debajo del límite de sensibilidad de la misma.

De acuerdo con los objetivos planteados para el estudio se concluye:

- Los niveles de aflatoxina encontrados por la Técnica de ELISA están por debajo de los límites de detección de la técnica de ELISA por competencia ($< 125\text{p.p.t}$ ó $0,125\text{p.p.b}$) lo cual también está por debajo de la normativa INEN NTE 9-10 ($0,5\text{ ug/L}$), e internacionales FAO ($0,5\text{ug/L}$) y FDA $0,5\text{ p.p.b.}$ de aflatoxina M_1 .
- Se determinó aflatoxina AFM_1 en leche cruda, pasteurizada y ultrapasteurizada consumidas en la ciudad de Cuenca y se concluye que los niveles encontrados de aflatoxina AFM_1 están por debajo de los límites establecidos por la normativas nacional INEN NTE 9-10 y las internacionales FAO Y FDA.



RECOMENDACIONES



V.

5.1. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios de aflatoxinas usando técnicas más sensibles que ELISA debido a que esta tiene una sensibilidad no suficiente para determinar cuantitativamente concentraciones bajas de la toxina FM1.
- Dado el riesgo toxicológico de aflatoxinas se recomienda realizar estudios en otros alimentos como derivados lácteos, cereales, frutos secos, maíz ya que son también alimentos de consumo masivo por parte de la población.
- Es importante contar con laboratorios certificados o especializados en la detección de aflatoxinas en nuestro país para garantizar una mejor calidad del alimento ante la sociedad.



VI

BIBLIOGRAFÍA



6.1. BIBLIOGRAFÍA

1. CAMEAN, A., REPETTO, M., et.al. **Toxicología Alimentaria**. Díaz de Santos. España, 2008.
2. ELIKA, (2007). **Aflatoxina M1 enleche**. http://www.elika.net/datos/riesgos/Archivo10/informe%20aflatoxinaM1%20ene%2007_web.pdf
3. Diccionario Enciclopédico Vox 1. © 2009 Larousse Editorial, S.L
4. Falla AA. (2010). **Assessment of aflatoxin M1 contamination in pasteurized and UHT milk marketed in central part of Iran**. Food Chem Toxicol. 48(3):988-991.
5. FLORES, O.; col. **Contaminación por micotoxinas en alimento balanceado y granos de uso pecuario en México en el año 2003**. Tec Pec Méx. 2006; 44(2):247-256.
6. GARCIA, J.; **Micotoxinas en Rumiantes. Un problema pasado o presente**. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia, Universidad de León, 2002; pp. 66-81. ISBN 84-7719-810-1. http://www.veterinaria.org/asociaciones/vet-uy/articulos/artic_bov/nuevos/105/bov000.htm
7. Gimeno, A. Martins, M., et.al. (2011).; **Micotoxinas y micotoxicosis en Animales y humanos** USA. SPECIAL NUTRIENTS, INC
8. GIMENO, A; MARTINS, M.L. (2001). **“Métodos de Analisis de Micotoxinas en Alimentos Compuestos y Materias Primas”**. En internet: www.engormix.com (área en castellano. Ir a: Micotoxinas) (Consultado en 1-05-04).
9. Guía para citas y referencias bibliográficas. sistema Harvard-Apa http://www4.ujaen.es/~emilioml/doctorado/guia_rapida_de_citas_apa.pdf
10. Grupo Oceano. (2010).; **Diccionario de medicina OCEANO MOSBY**. Barcelona(España): MMIX EDITORIAL OCEANO, s.f.
11. INEN NTE 9: 2012 LECHE CRUDA REQUISITOS. Quinta Revisión.



12. INEN NTE 10: 2012 LECHE PASTEURIZADA REQUISITOS. Quinta Revisión
13. INEN NTE 701: 2009 LECHE LARGA VIDA REQUISITOS. Quinta Revisión
14. International Agency for Research on Cancer 1998, **Monographs Programme on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, IARC monographs vol 56 <http://WWW-de.iarc.fr/htdoos/monographs/vol82/82-04.html>
15. Leonardo J. De Luca (1900)-; **Cátedra Producción Láctea**, Univ. Nac. de Lomas de Zamora (B.A.) <http://www.engormix.com/MA-icotoxinas/articulos/micotoxinas-laboratorios-burnet-t464/255-p0.htm>
16. Landeros., et-a (2012). **Investigación de Niveles de Aflatoxina m1 en leche cruda y pasteurizada comercializada en la zona metropolitana de Guadalajara, México.** Revista Iberoamericana de Salud Animal Scielo, ISSN 0253-570x, Vol. 34, No 1. 2012, pags. 8-12. http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0253-570X2012000100006&script=sci_arttext
17. LAZO, R; SIERRA, G; (2008). **Investigación de Micotoxinas en el ser humano.** Revista Iberoamericana de Micología, IS SN 1130-1406, Vol.25, No 1. 2008, págs. 7-11. <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2599061/> www.reviberoammicol.com
18. Lopez C, et-al.(2003). **Presence of aflatoxin M1 in milk for human consumption in Argentina.** Food Control. 2003; 14:31-34.
19. Mildenberg, S. Combita, A (2009). ; **Detección de Aflatoxina M1 en leches frescas comercializadas en la Zona del Valle del Cauca (Colombia) mediante la técnica de ELISA.** <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis202.pdf>
20. Ortiz, Z. (2008). ; **Análisis De Aflatoxina M1 en Leche Fresca De Establos Lecheros De Arequipa.** Revista Iberoamericana de Salud



- Animal Scielo, ISSN 0253-570x, Vol. 20, No 1.2009, pags. 139-141.
<http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v20n1/a21v20n1.pdf>
21. PERAICA, M¹., RADIC, B²., LUCIC, A³., PAVLOVIC, M⁴., et.al. (2000).
Efectos tóxicos de las Micotoxinas en el ser humano [Versión electrónica]. Journal, of the World Health Organization, 77(9);754-766. Consultado Diciembre, 12, 2012 de
a. <https://apps.who.int/bulletin/digests/spanish/number2/bu0024.pdf>
22. Pérez J, et.all. **Ocurrencia de aflatoxina M1 en leches cruda, ultrapasteurizada y orgánica producidas y comercializadas en el Altiplano Mexicano.** Rev Salud Anim. 2008;30 (2):103-109.
23. REQUENA, F; col. Revista cielo. Micotoxinas: **Riesgos y prevención Zootecnia Tropical versión impresa** ISSN 0798-7269. Zootecnia Trop. v.23 n.4 Maracay ene. 2005.
24. www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0798-72692005000400005&script=sci_arttext&tlng=en
25. RODRIGUEZ, M; et-al (2010). **ELISA and HPLC determination of the occurrence of aflatoxin M 1 in raw cow's milk.** Instituto de Toxicología de Castilla y León (INTOXCAL), Auda.Real, Parque científico de León 24006 León, Spain. 6 págs.
26. RODRICKS J.V.; STOLOFF, L. 1977. **"Aflatoxin Residues from Contaminated Feed in Edible Tissues of Food-Producing Animals" in Mycotoxins in Human and Animal Health.** Edited by: Joseph V.Rodricks, Clifford H.Hesseltine and Myron A.Melhman. Pathotox Publishers, INC. Park Forest South Illinois.pp.67-79.
27. REYES, W; et.al. (2009). **Aflatoxinas totales en raciones de bovinos y AFM1 en leche cruda obtenida en establos del estado de Jalisco, México.** Rev. Redalyc. Vol. 47. Consultado en noviembre-15-2012.
<http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=613121160093>
28. Santos Chona Mauricio. **Importancia y Efectos de la Aflatoxina en los Seres Humanos.** Universidad autónoma de Bucaramangara.



a. [http://www.elika.net/datos/riesgos/Archivo10/informe%20aflatoxin
aM1%20ene%2007_web.pdf](http://www.elika.net/datos/riesgos/Archivo10/informe%20aflatoxin%20aM1%20ene%2007_web.pdf)

29. VELASCO, M.L.R.; DELSO, M.M.C.; ESCUDERO, D.O. (2003). **ELISA and HPLC determination of the occurrence of aflatoxin M₁ in raw cow's milk. Food Addit. Contam**, 20(3), 276-280.

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

31. YUSTE, R; et.al. (2010). **La Clínica y el Laboratorio.**, Masson. España. 2010.



ANEXOS



ANEXO 1: Kits RIDASCREEN FAST AFLATOXIN M1





ANEXO2: Contenido Nutricional Para Leche Cruda, Pasteurizada Y Ultrapasteurizada.

MARCA	TIPO		
	NUTRI LECHE		
C O N T E N I D O N U T R I C I O N A L	ENTERA UHT (CAJA AZUL)	DESCREMADA UHT (CAJA VERDE)	ENTERA PASTEURIZADA (FUNDA AZUL)
	Tamaño por porción: 1 vaso(200 ml) Porciones por envase: 5 Cantidad por porción: • Grasa total..... 6,2 g • Sodio.....125z90 mg • Carbohidratos totales.....10 g • Proteínas.....6 g	Tamaño por porción: 1 vaso(200 ml) Porciones por envase: 5 Cantidad por porción: • Grasa total..... 3 g • Sodio.....90 mg • Carbohidratos totales.....10 g • Proteínas.....6 g	Tamaño por porción: 1 vaso(200 ml) Porciones por envase: 5 Cantidad por porción: • Grasa total..... 6,2 g • Sodio.....125z90 mg • Carbohidratos totales.....10 g • Proteínas.....6 g
	LA LECHERA		
	ENTERA UHT (CAJA AZUL)	DESCREMADA UHT (CAJA CELESTE SWELTI)	
	Tamaño por porción: 1 vaso (240 ml) Porciones por envase: 4 Cantidad por porción: • Grasa total..... 8 g • Sodio.....170 mg • Carbohidratos totales.....11 g • Proteínas.....7 g	Tamaño por porción: 1 vaso (240 ml) Porciones por envase: 4 Cantidad por porción: • Grasa total..... 1 g • Sodio.....115 mg • Carbohidratos totales.....12 g • Proteínas.....8 g	
	PARMALAT		
	ENTERA UHT (CAJA AZUL CON ROJO)	DESCREMADA UHT (CAJA AZUL CON ROJO)	
	Tamaño por porción: 1 vaso (240 ml) Porciones por envase: 4 Cantidad por porción: • Grasa total..... 7 g • Sodio.....95 mg • Carbohidratos totales.....11 g • Proteínas.....7 g	Tamaño por porción: 1 vaso (240 ml) Porciones por envase: 4 Cantidad por porción: • Grasa total..... 2 g • Sodio.....95 mg • Carbohidratos totales.....11 g • Proteínas.....8 g	
	TONY		
	ENTERA PASTEURIZADA UHT (CAJA AZUL)		
Tamaño por porción: 1 vaso (240 ml) Porciones por envase: 4 Cantidad por porción: • Grasa total..... 1 g • Sodio.....95 mg • Carbohidratos totales.....11 g • Proteínas.....8 g			
LECHE CRUDA *			
Tamaño por porción: 100 ml Cantidad por porción: • Grasa total..... 3,9 g • Sodio.....0,8 mg • Carbohidratos totales.....13 g • Proteínas.....3,4 g			

Fuente: * (<http://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/3978/3/CD-3755.pdf>)

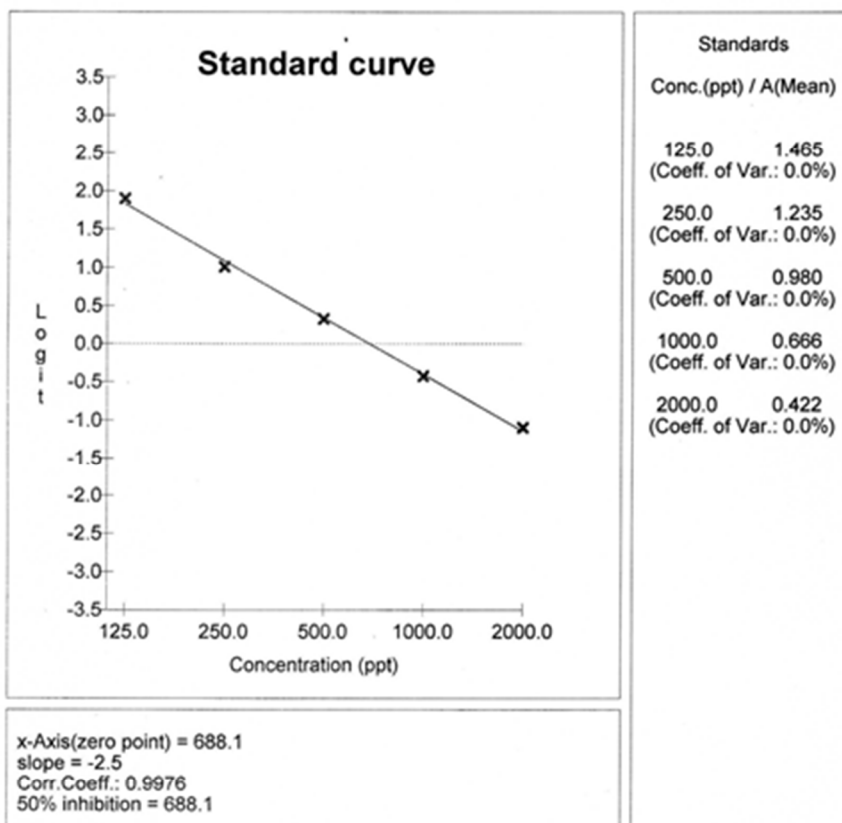
ELABORADO POR: AUTORA.



ANEXO No3: Tabla resumen de los valores de absorbancia y concentración de aflatoxina AFM₁ y curva estándar correspondientes al primer muestreo

FAST Aflatoxin M1
12. Apr. 2013, Logit/Log, Ser.No: 11109.146

	Plate Values											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1.685E	2.518E	2.511E	2.524E	2.322E	2.545E	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
B	1.465E	2.361E	2.321E	2.395E	2.336E	2.405E	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
C	1.235E	2.488E	2.350E	2.307E	2.318E	2.421E	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
D	0.980E	2.058E	2.280E	2.311E	2.299E	2.268E	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
E	0.666E	2.320E	2.388E	2.413E	2.468E	2.456E	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
F	0.422E	2.226E	2.339E	2.412E	2.440E	2.372E	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
G	2.359E	2.391E	2.306E	2.222E	2.451E	2.273E	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
H	2.298E	2.439E	2.269E	2.138E	2.399E	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000





ANEXO 4: Resultados de los valores de absorbancia y concentración de aflatoxina AFM₁ estándar correspondientes al primer muestreo reportado por el laboratorio certificado LIVEXLAB.

FAST Aflatoxin M1 12. Apr. 2013, Logit/Log, Ser.No: 11109.146						
Standards						
Ser. No.	Concentration ppt	Absorbance (Mean)	(CV)	B/B0 (%)	calculated ppt	Deviation (%)
1	0.0	1.685	0.0	100.0		
2	125.0	1.465	0.0	86.9	117.56	6.0
3	250.0	1.235	0.0	73.3	268.56	7.4
4	500.0	0.980	0.0	58.2	506.25	1.2
5	1000.0	0.666	0.0	39.5	1022.85	2.3
6	2000.0	0.422	0.0	25.0	1911.54	4.4
Samples						
Ser. No.	ID	Absorbance (Mean)	(CV)	(%)	calculated ppt	ppt
1	2.359	0.0	140.0	not calculable!	1.00
2	2.298	0.0	136.4	not calculable!	1.00
3	2.518	0.0	149.4	not calculable!	1.00
4	2.361	0.0	140.1	not calculable!	1.00
5	2.488	0.0	147.7	not calculable!	1.00
6	2.058	0.0	122.1	not calculable!	1.00
7	2.320	0.0	137.7	not calculable!	1.00
8	2.226	0.0	132.1	not calculable!	1.00
9	2.391	0.0	141.9	not calculable!	1.00
10	2.439	0.0	144.7	not calculable!	1.00
11	2.511	0.0	149.0	not calculable!	1.00
12	2.321	0.0	137.7	not calculable!	1.00
13	2.350	0.0	139.5	not calculable!	1.00
14	2.280	0.0	135.3	not calculable!	1.00
15	2.388	0.0	141.7	not calculable!	1.00
16	2.339	0.0	138.8	not calculable!	1.00
17	2.306	0.0	136.9	not calculable!	1.00
18	2.269	0.0	134.7	not calculable!	1.00

C:\RIDAWIN\FOOD\FASTAFLAM1.MET
Page 2 of 4

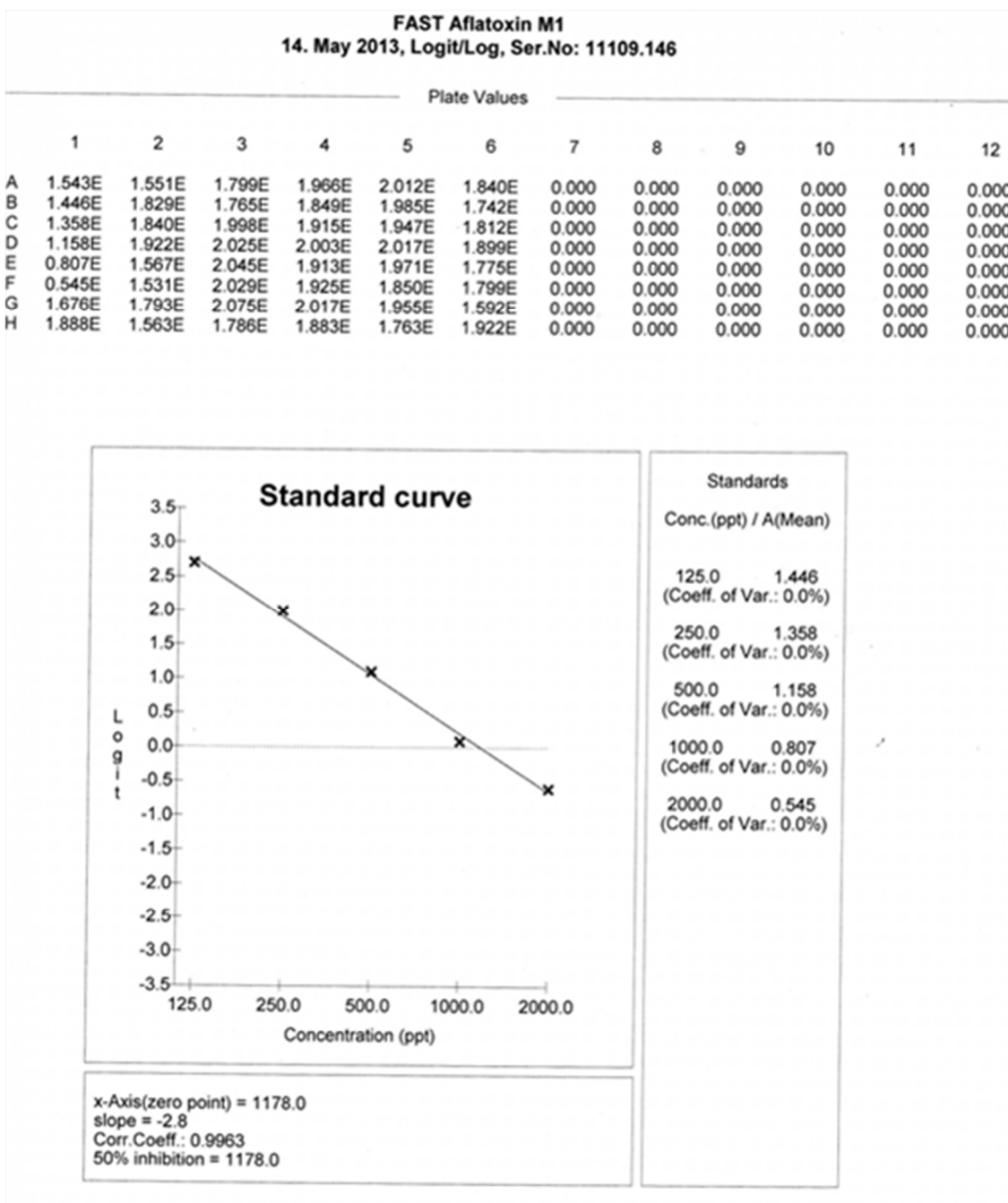


FAST Aflatoxin M1 12. Apr. 2013, Logit/Log, Ser.No: 11109.146								
Ser. No.	ID	Samples			calculated ppt	*	=	ppt
		Absorbance (Mean)	(CV)	(%)				
19	2.524	0.0	149.8	not calculable!	1.00		
20	2.395	0.0	142.1	not calculable!	1.00		
21	2.307	0.0	136.9	not calculable!	1.00		
22	2.311	0.0	137.2	not calculable!	1.00		
23	2.413	0.0	143.2	not calculable!	1.00		
24	2.412	0.0	143.1	not calculable!	1.00		
25	2.222	0.0	131.9	not calculable!	1.00		
26	2.138	0.0	126.9	not calculable!	1.00		
27	2.322	0.0	137.8	not calculable!	1.00		
28	2.336	0.0	138.6	not calculable!	1.00		
29	2.318	0.0	137.6	not calculable!	1.00		
30	2.299	0.0	136.4	not calculable!	1.00		
31	2.468	0.0	146.5	not calculable!	1.00		
32	2.440	0.0	144.8	not calculable!	1.00		
33	2.451	0.0	145.5	not calculable!	1.00		
34	2.399	0.0	142.4	not calculable!	1.00		
35	2.545	0.0	151.0	not calculable!	1.00		
36	2.405	0.0	142.7	not calculable!	1.00		
37	2.421	0.0	143.7	not calculable!	1.00		
38	2.268	0.0	134.6	not calculable!	1.00		
39	2.456	0.0	145.8	not calculable!	1.00		
40	2.372	0.0	140.8	not calculable!	1.00		
41	2.273	0.0	134.9	not calculable!	1.00		
42	0.000	0.0	0.0	not calculable!	1.00		

C:\RIDAWIN\FOOD\FAST\AFLM1.MET
Page 3 of 4



ANEXO 5: Informe de resultados de los Valores de absorbancia y concentración de aflatoxina AFM₁ y curva estándar correspondientes al segundo muestreo reportados por el laboratorio certificado LIVEXLAB.





ANEXO 6: Resultados de los valores de absorbancia y concentración de aflatoxina AFM₁ correspondientes al segundo muestreo reportados por el laboratorio certificado LIVEXLAB.

FAST Aflatoxin M1
14. May 2013, Logit/Log, Ser.No: 11109.146

Standards						
Ser. No.	Concentration ppt	Absorbance (Mean)	(CV)	B/B0 (%)	calculated ppt	Deviation (%)
1	0.0	1.543	0.0	100.0		
2	125.0	1.446	0.0	93.7	131.68	5.3
3	250.0	1.358	0.0	88.0	233.91	6.4
4	500.0	1.158	0.0	75.0	482.28	3.5
5	1000.0	0.807	0.0	52.3	1093.27	9.3
6	2000.0	0.545	0.0	35.3	1924.16	3.8

Samples						
Ser. No.	ID	Absorbance (Mean)	(CV)	(%)	calculated ppt	* = ppt
1	1.676	0.0	108.6	not calculable!	1.00
2	1.888	0.0	122.4	not calculable!	1.00
3	1.551	0.0	100.5	not calculable!	1.00
4	1.829	0.0	118.5	not calculable!	1.00
5	1.840	0.0	119.2	not calculable!	1.00
6	1.922	0.0	124.6	not calculable!	1.00
7	1.567	0.0	101.6	not calculable!	1.00
8	1.531	0.0	99.2	Probe < Std2	1.00
9	1.793	0.0	116.2	not calculable!	1.00
10	1.563	0.0	101.3	not calculable!	1.00
11	1.799	0.0	116.6	not calculable!	1.00
12	1.765	0.0	114.4	not calculable!	1.00
13	1.998	0.0	129.5	not calculable!	1.00
14	2.025	0.0	131.2	not calculable!	1.00
15	2.045	0.0	132.5	not calculable!	1.00
16	2.029	0.0	131.5	not calculable!	1.00
17	2.075	0.0	134.5	not calculable!	1.00
18	1.786	0.0	115.7	not calculable!	1.00



FAST Aflatoxin M1
14. May 2013, Logit/Log, Ser.No: 11109.146

Ser. No.	ID	Absorbance			calculated ppt	* =	ppt
		(Mean)	(CV)	(%)			
19	1.966	0.0	127.4	not calculable!	1.00	
20	1.849	0.0	119.8	not calculable!	1.00	
21	1.915	0.0	124.1	not calculable!	1.00	
22	2.003	0.0	129.8	not calculable!	1.00	
23	1.913	0.0	124.0	not calculable!	1.00	
24	1.925	0.0	124.8	not calculable!	1.00	
25	2.017	0.0	130.7	not calculable!	1.00	
26	1.883	0.0	122.0	not calculable!	1.00	
27	2.012	0.0	130.4	not calculable!	1.00	
28	1.985	0.0	128.6	not calculable!	1.00	
29	1.947	0.0	126.2	not calculable!	1.00	
30	2.017	0.0	130.7	not calculable!	1.00	
31	1.971	0.0	127.7	not calculable!	1.00	
32	1.850	0.0	119.9	not calculable!	1.00	
33	1.955	0.0	126.7	not calculable!	1.00	
34	1.763	0.0	114.3	not calculable!	1.00	
35	1.840	0.0	119.2	not calculable!	1.00	
36	1.742	0.0	112.9	not calculable!	1.00	
37	1.812	0.0	117.4	not calculable!	1.00	
38	1.899	0.0	123.1	not calculable!	1.00	
39	1.775	0.0	115.0	not calculable!	1.00	
40	1.799	0.0	116.6	not calculable!	1.00	
41	1.592	0.0	103.2	not calculable!	1.00	
42	1.922	0.0	124.6	not calculable!	1.00	



ANEXO 7: Informe de la medición de Aflatoxina AFM₁ por HPLC de Leche Nutri Leche Entera Descremada UHT realizada por Proyecto VLIR "Alimentación, nutrición y salud de la Universidad de Cuenca.



PROGRAMA VLIR-IUC
COOPERACIÓN INTER UNIVERSITARIA
Universidad de Cuenca-Consejo de Universidades Flamencas
Proyecto "Alimentación, nutrición y salud"
"Food, nutrition and health"



Con atención a: Dra. Fernanda Uguña

Fecha de entrega de la muestra: 26/09/2013

Fecha de entrega de resultados: 27/09/2013

MUESTRA: Leche descremada UHT

ANÁLISIS: Aflatoxina M₁

TÉCNICA: HPLC-FLD

RESULTADOS:

	Concentración (µg/kg)
Aflatoxina M ₁	0.018

Límite de detección: 0.015 µg/kg

Bioq. Johana Ortiz U.

Bioq. Gabriela Astudillo R.

Dirección: Manuel Albornoz y Cerezos Quinta Balzay

Tel: 074051000 Ext: 4124

E-mail: johana.ortiz@ucuenca.edu.ec

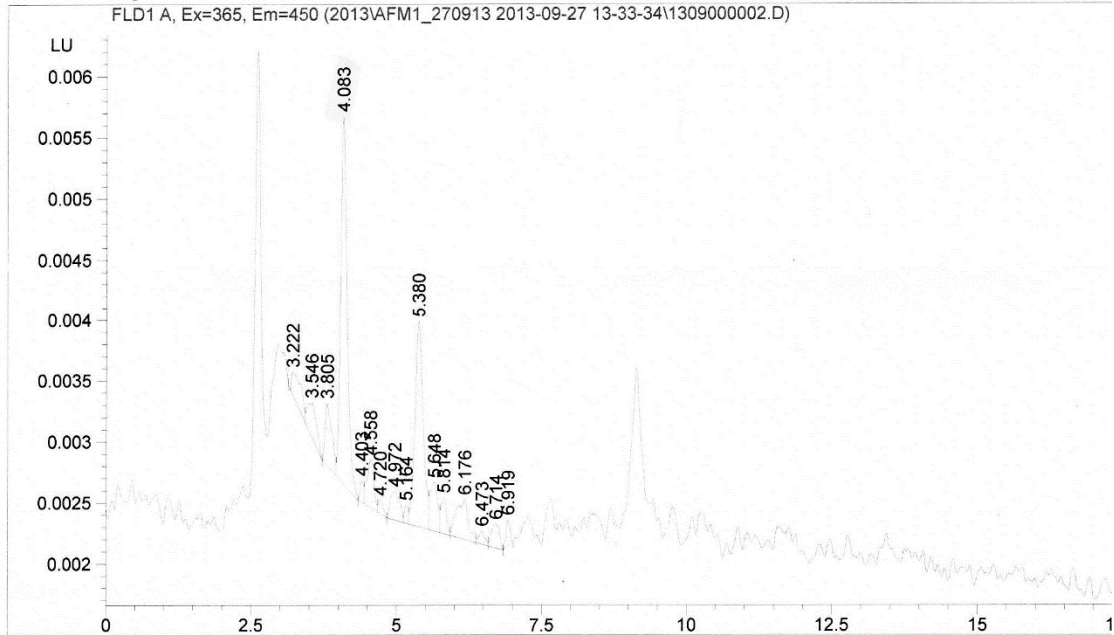
Cuenca-Ecuador



```

=====
Acq. Operator   : Johana                      Seq. Line :    2
Acq. Instrument : VLIR / LC1200              Location  : Vial 2
Injection Date  : 9/27/2013 1:57:44 PM      Inj       :    1
                                           Inj Volume: 20 µl
Acq. Method    : I:\VLIR-LC1200\DATOS\2013\AFM1_270913 2013-09-27 13-33-34\AFM1.M
Last changed   : 8/14/2013 12:23:54 PM by Johana
Analysis Method: I:\VLIR-LC1200\METODOS\AFM1.M
Last changed   : 8/14/2013 12:23:54 PM by Johana
=====

```



```

=====
                          Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By           : Signal
Calib. Data Modified : 8/14/2013 12:23:51 PM
Multiplier:         : 1.0000
Dilution:           : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: FLD1 A, Ex=365, Em=450

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area LU	Area %	Name
1	3.222	BV	0.1764	2.63141e-3	3.6633	?
2	3.546	VV	0.1330	2.99576e-3	4.1705	?
3	3.805	VV	0.1096	4.10770e-3	5.7185	?
4	4.083	VV	0.1187	2.39821e-2	33.3867	AFM1
5	4.403	VV	0.0565	7.36642e-4	1.0255	?
6	4.558	VV	0.1018	3.24287e-3	4.5146	?
7	4.720	VV	0.0712	6.37104e-4	0.8869	?
8	4.972	VV	0.1365	2.60389e-3	3.6250	?
9	5.164	VV	0.0519	5.64809e-4	0.7863	?



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area LU	Area *s	Area %	Name
10	5.380	VV	0.1412	1.66141e-2	23.1293	AFB1	
11	5.648	VV	0.1164	3.64321e-3	5.0719	?	
12	5.814	VV	0.0818	1.82396e-3	2.5392	?	
13	6.176	VV	0.1729	4.63861e-3	6.4576	?	
14	6.473	VV	0.0894	7.43676e-4	1.0353	?	
15	6.714	VV	0.1178	1.80920e-3	2.5187	?	
16	6.919	VBA	0.0624	1.05636e-3	1.4706	?	

Totals : 7.18314e-2

2 Warnings or Errors :

Warning : Invalid calibration curve, (AFM1)

Warning : Invalid calibration curve, (AFB1)

=====
*** End of Report ***



GLOSARIO



GLOSARIO DE TERMINOS

- **Aductos.**- Nueva especie química AB formada por combinación de dos entidades moleculares A y B, sin que se produzca ningún cambio en la conectividad en los átomos de las moléculas A y B. Son posibles estequiometrias distintas de 1:1. Pueden formarse aductos intermoleculares entre grupos A y B de una misma molécula. Un aducto es un producto de adición que se forma, sin pérdidas moleculares, entre las sustancias que se unen. Desde un punto de vista químico estricto esto sólo ocurre en las reacciones de Diels-Alder, con formación de cicloaductos. En Toxicología se aplica usualmente el término aducto a los productos formados entre un xenobiótico, o sus metabolitos activos, y una macromolécula biológica, por ejemplo, óxido de etileno y ADN.
- **ADUCCIONES.**- Movimiento por el cual un miembro o un órgano se acerca al eje central del cuerpo.
- **Apoptosis.**- f. Biol. Modalidad específica de muerte celular, implicada en el control del desarrollo y el crecimiento. Proceso fisiológico previsto de muerte y desintegración de tejidos dentro del desarrollo normal de los seres vivos.
- **Bases de Schiff.**- Compuesto intermedio de vida media muy corta, que se forma durante algunas reacciones químicas por reacción de un grupo amino con un grupo carbonilo.
- **Biotransformación.**- Proceso en el cual un organismo vivo modifica una sustancia química. Serie de eventos fisiológicos de un organismo para modificar las sustancias tanto endógenas como exógenas y transformarlas en metabolitos que puedan ser reabsorbidos y excretados.
Cualquier transformación química de una sustancia producida por organismos vivos o por preparaciones obtenidas de estos. Nagel, 1991.
- **Carcinogénicos.**- (del griego carcinogenic). Relativo a la capacidad de inducir el desarrollo de un cáncer denominado también cancerígeno; cancerígeno.
- **Codón.**- m. Biol. Triplete que, en un ARN mensajero, codifica la incorporación de aminoácidos específicos en la biosíntesis de proteínas.
- **EPOXIDO.**- m. QUÍM. ORG. Compuesto orgánico que contiene un átomo de oxígeno unido a dos átomos de carbono enlazados entre sí.
- **Genotóxicos.**- Tóxico (dañino) para el ADN. Las sustancias genotóxicas pueden unirse directamente al ADN o actuar indirectamente mediante la



afectación de las enzimas involucradas en la replicación del ADN y causando, en consecuencia, mutaciones que pueden o no desembocar en un cáncer. Las sustancias genotóxicas no son necesariamente cancerígenas, pero la mayor parte de los cancerígenos son genotóxicos.

- Glicólisis.- (Del ingl. glycol). m. Quím. Molécula que posee grupos alcohólicos sobre átomos de carbono adyacentes.
- Gluconeogénesis.- (glyconeogenesis). Síntesis de glucosa a partir de precursores tales como pirúvico, lactato, ciertos aminoácidos y productos intermedios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos.
- HIDROXILACION.- Colocación de un grupo hidroxilo en un compuesto en una posición donde no existía antes.(DeCS SERVER)
- Inmunosupresores (immunosuppressive). Sustancia o técnica que atenúa o evita una respuesta inmunitaria.
- LD50: La cantidad de una sustancia química que es letal a la mitad (50%) de los animales experimentales expuestos a él.
LD50s se expresan como el peso de la sustancia por unidad de peso corporal (mg/kg). Puede ser alimentado (LD50 oral), aplicado a la piel (LD50 cutáneo) o administrado en forma de vapores (inhalación DL50)
- Micotoxicosis: Envenenamiento provocado por sustancias tóxicas de origen fúngico. Éstas incluyen ingestión de hongos venenosos o la ingestión de granos, semillas, hojas muertas caídas, tallos, frutos, forraje afectados por micelio o diversas estructuras fúngicas.
- Mutagenicidad: Capacidad de un agente biológico, químico o físico para inducir cambios heredables (mutaciones).
- Mutagénicos: adj. Biol. Capaz de producir mutaciones.
- Nefrotoxicidad: Afectación renal por tóxicos, que se caracteriza por alteraciones funcionales o estructurales Pueden ser productos químicos o biológicos, que actúan de forma directa o a través de sus metabolitos, y que pueden ser ingeridos, inhalados, inyectados o producidos por el propio organismo. Por ejemplo, se encuentran entre estos agentes tóxicos: antibióticos diversos, analgésicos y antiinflamatorios, antineoplásicos, metales pesados, contrastes iodados, disolventes orgánicos, inmunosupresores, etc.



- Oncogénesis: f. Med. Origen y producción de los tumores malignos.
- Órgano diana: (target organ). Aquel en el cual un tóxico ejerce su acción de manera preferente, dañándolo o alterando su función.
- Receptores específicos: En todo organismo vivo existen unos elementos celulares encargados de percibir las modificaciones que se producen en el medio exterior o su propio cuerpo. Los dispositivos encargados de captar estas informaciones se denominan receptores, consistentes normalmente en una célula nerviosa, conectada con el sistema nervioso central, de forma que la información recibida por él es transferida a éste, el cual elabora la respuesta correspondiente.

La estimulación continua del receptor produce una fatiga en la transmisión de la información. Se habla entonces de una adaptación del receptor cuyo mecanismo es específico. Existen, así, unos receptores de baja adaptación, como son los del dolor, oído, posición (mácula), y unos de alta adaptación, que se adaptan fácilmente y sólo transmiten información si se producen cambios en la intensidad del estímulo. Estos últimos tienen, pues, una función de predicción.
- Saprófitos: *adj.*-s. BIOL. Dícese del organismo que se desarrolla sobre sustancias orgánicas en descomposición.
- Transversión: Mutación puntual que consiste en el cambio de un nucleótido por otro de distinta clase (es decir, purina por pirimidina o pirimidina por purina).
- Teratogénicos: *adj.* Biol. Que produce malformaciones en el embrión o feto.
- Tóxicos: Cualquier agente químico o físico capaz de producir un efecto adverso para la salud. Todos los agentes físicos y químicos son tóxicos potenciales, ya que su acción depende de la dosis y de las circunstancias individuales y ambientales.
- Toxicogénesis: Proceso por el que algunas bacterias y otros organismos patógenos producen toxinas en el medio en que viven. Biol. Producción de toxinas por organismos patógenos