

**CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINA M1 EN LECHE CRUDA Y LECHE  
ENTERA UAT COMERCIALIZADA POR FRESKALECHE S.A.S EN  
AGUACHICA-CESAR**

**BELKYS XIOMARA DÍAZ BASTO**

Microbióloga con énfasis en Alimentos  
Grupo de Investigación en Microbiología y Biotecnología  
GIMBIO

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA  
FACULTAD DE INGENIERÍAS Y ARQUITECTURA  
MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS  
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIONES  
PAMPLONA  
2017**

**CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINA M1 EN LECHE CRUDA Y LECHE  
ENTERA UAT COMERCIALIZADA POR FRESKALECHE S.A.S EN  
AGUACHICA-CESAR**

**BELKYS XIOMARA DÍAZ BASTO**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de  
Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos**

**Directora  
OLGA LILIANA ROJAS CONTRERAS MSc.**

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA  
FACULTAD DE INGENIERÍAS Y ARQUITECTURA  
MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS  
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIONES  
PAMPLONA  
2017**

*Primero quiero agradecerle a Dios, la oportunidad, la capacidad, por darme las fuerzas necesarias para no desfallecer y seguir luchando día a día para lograr mis metas.*

*Quiero dedicar este proyecto a mi esposo Jairo por tenerme paciencia, por su apoyo incondicional, por amarme y por darme el espacio necesario para alcanzar este logro.*

*A Maria Camila y Jairo José, motor de mi vida, quienes me inspiran a ser mejor todos los días.*

*A mi mami por estar allí siempre apoyándome y dándome su amor a demás de darme ánimo y tenerme presente en sus oraciones.*

*Y sin la inspiración de una gran mujer ejemplo a seguir, mi hermana Patty, quien por sus virtudes e inteligencia dejó en mi ese legado de alcanzar metas más grandes en el transcurso de mi vida.*

*Belkys*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi directora de proyecto y amiga incondicional Liliana Rojas, por su tiempo, dedicación y porque aparte de su valiosa amistad me ha brindado todos sus conocimientos, me enorgullece haber realizado este proyecto al lado suyo. Eternamente agradecida.

Al personal del laboratorio de Toxicología, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia Universidad Nacional de Colombia, por su apoyo incondicional.

A Freskaleche S.A.S. por permitirme realizar esta maestría y apoyarme siempre para mi desarrollo profesional.

A mi amiga, compañera y comadre Alexandra Pino por todo su apoyo en el desarrollo del proyecto.

A mi amiga Nancy Jaimes por siempre estar allí para mí y darme ánimo.

A Alberto Rodríguez por apoyarme con sus conocimientos en la parte de Micología.

A Isaac Dodino, por su acompañamiento, por inyectarme ese ánimo y amor que siente por el conocimiento, mil gracias por ayudarme a culminar este proyecto.

A la profesora Gladys Montañez por su tiempo, dedicación y paciencia.

A todas las personas que de una u otra manera me colaboraron en el desarrollo de este proyecto.

## Tabla de contenido

<b>Resumen .....</b>	<b>13</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>15</b>
<b>1. Introducción .....</b>	<b>17</b>
<b>1.1. Leche.....</b>	<b>17</b>
1.1.1. Concepto.....	17
1.1.2. Tipos de leche. ....	17
1.1.2.1. Leche cruda. ....	17
1.1.2.2. Leche higienizada. ....	17
1.1.2.3. Leche pasteurizada.....	17
1.1.2.4. Leche termizada.....	17
1.1.2.5. Leche ultrapasteurizada.....	18
1.1.2.6. Leche ultra-alta temperatura UAT (UHT) leche larga vida. ....	18
1.1.3. Historia de la leche.....	18
1.1.4. Historia de la leche pasteurizada a ultra alta temperatura (UHT). ....	19
1.1.5. Generalidades. ....	21
1.1.6. Propiedades físicoquímicas de la leche.....	24
1.1.7. Reacción química.....	33
1.1.8. Microbiología de la leche.....	35
1.1.9. Métodos de conservación de la leche.....	37
1.1.9.1. Filtración. ....	38
1.1.9.2. Clarificación. ....	38
1.1.9.3. Bactofugación.....	38
1.1.9.4. Termización.....	38
1.1.9.5. Pasteurización.....	38
<b>1.2. Tipos de alimentación para el ganado.....</b>	<b>41</b>
1.2.1. Piensos.....	42
1.2.2. Heno. ....	44
1.2.3. Ensilados. ....	45
1.2.3.1. Fermentación en el silo ....	47
1.2.3.2. Silos verticales.....	49
1.2.3.3. Silos horizontales o Cajón.....	49
1.2.3.4. Silos trinchera.....	49
1.2.3.5. Desventajas del ensilaje ....	49

1.2.3.6. Material para el ensilaje .....	49
1.2.4. Forrajes .....	51
1.2.5. Contaminación del alimento .....	52
1.2.5.1. Contaminación bacteriana .....	53
1.2.5.2 Contaminación fúngica. ....	54
1.2.5.3 Contaminación con micotoxinas. ....	54
<b>1.3. <i>Aspergillus</i> spp. ....</b>	<b>57</b>
1.3.1. Generalidades. ....	57
1.3.2. <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i> y <i>Aspergillus nomius</i> . ....	62
1.3.3. Producción de toxinas .....	65
<b>1.4. Micotoxinas .....</b>	<b>67</b>
1.4.1. Concepto.....	67
1.4.2. Origen.....	67
1.4.3. Generalidades. ....	67
1.4.4. Micotoxinas e inocuidad de alimentos.....	69
<b>1.5. Aflatoxinas .....</b>	<b>72</b>
1.5.1. Concepto.....	72
1.5.2. Generalidades. ....	72
1.5.3. Propiedades generales de las aflatoxinas .....	74
1.5.4. Estructura.....	75
1.5.5. Aflatoxina M1 (AFM1).....	76
1.5.5.1. Aspectos generales.....	76
1.5.5.2. Estructura. ....	77
1.5.5.3. Actividad biológica.....	77
1.5.5.4. Legislación. ....	79
1.5.5.5. Legislación sobre los niveles de aflatoxinas en productos lácteos.....	80
1.5.5.6. Métodos de análisis de aflatoxinas .....	83
1.5.6. Prevención y control .....	84
<b>1.6. Estudios sobre aflatoxinas M1. ....</b>	<b>91</b>
1.6.1. Estudios sobre Aflatoxinas M1 a nivel mundial.....	91
1.6.2. Estudios sobre Aflatoxinas a nivel de América Latina .....	95
1.6.3. Estudios sobre Aflatoxinas a nivel de Colombia .....	98
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>102</b>
<b>2.1. General .....</b>	<b>102</b>

<b>2.2. Específicos.....</b>	<b>102</b>
<b>3. Materiales y métodos.....</b>	<b>103</b>
<b>3.1. Materiales.....</b>	<b>103</b>
3.1.1. Población.....	103
3.1.2. Muestra.....	105
<b>3.2. Métodos.....</b>	<b>108</b>
3.2.1. Evaluación de la presencia del género <i>Aspergillus</i> en los piensos de los hatos lecheros. ....	108
3.2.1.1. Muestreo de piensos.....	108
3.2.1.2. Análisis microbiológicos de piensos (Método de referencia NTC 4491:2004). ....	109
3.2.2. Evaluación de las variables microbiológicas y fisicoquímicas de las muestras de leche cruda. .....	110
3.2.2.1. Muestreo de leche cruda en hatos. ....	110
3.2.2.2. Análisis microbiológico .....	111
3.2.2.3. Análisis fisicoquímicos .....	112
3.2.3. Detección de la presencia de Aflatoxina M1 en muestras de leche cruda. ....	113
3.2.3.1. Muestreo de leche cruda en hatos .....	113
3.2.3.2. Muestreo de leche en silos .....	114
3.2.3.3. Muestreo de bolsas de leche entera UAT.....	114
3.2.3.4. Preparación del test.....	114
3.2.3.5. Análisis de la muestra .....	115
3.2.3.6. Interpretación de resultados .....	115
3.2.4. Estimación de los niveles de Aflatoxina M1 en muestras de leche cruda y leche UAT.....	116
3.2.4.1. Método de referencia NTC 5219:2003 .....	116
3.2.4.2. Extracción y purificación de la AFM1.....	116
3.2.4.3. Etapa de acondicionamiento .....	116
3.2.4.4. Etapa de cargar la muestra .....	117
3.2.4.5. Etapa de lavado.....	117
3.2.4.6. Etapa de secado .....	117
3.2.4.7. Etapa de elución.....	117
3.2.4.8. Análisis cromatográfico. ....	118
3.2.5. Análisis estadístico.....	118
<b>4. Resultados y discusión.....</b>	<b>121</b>
<b>4.1. Evaluación de la presencia del género <i>Aspergillus</i> en los piensos de los hatos lecheros.....</b>	<b>121</b>

4.1.1. Muestreo de piensos.....	121
4.1.2. Análisis microbiológicos de piensos.....	123
<b>4.2. Características microbiológicas y fisicoquímicas de las muestras de leche cruda.....</b>	<b>128</b>
4.2.1. Análisis microbiológicos de las muestras de leche cruda .....	128
4.2.2. Análisis fisicoquímicos de las muestras de leche cruda .....	130
<b>4.3. Detección de la presencia de la Aflatoxina M1 en leche cruda y leche UAT comercializada por Freskaleche S.A.S., en Aguachica – Cesar. ....</b>	<b>137</b>
4.3.1. Detección de la presencia de la Aflatoxina M1 en leche cruda.....	137
4.3.2. Detección de la presencia de la Aflatoxina M1 en leche en silo y leche UAT comercializada por Freskaleche S.A.S., en Aguachica – Cesar.....	140
<b>4.4. Estimación de los niveles de Aflatoxina M1 en leche cruda y leche UAT comercializada por Freskaleche S.A.S., en Aguachica – Cesar. ....</b>	<b>141</b>
4.4.1. Estimación de los niveles de Aflatoxina M1 en leche cruda.....	141
4.4.2. Estimación de los niveles de Aflatoxina M1 en muestras en silos y leche UAT comercializada por Freskaleche S.A.S., en Aguachica – Cesar .....	144
<b><i>Conclusiones</i> .....</b>	<b><i>152</i></b>
<b><i>Recomendaciones</i>.....</b>	<b><i>155</i></b>
<b><i>Referencias bibliográficas</i> .....</b>	<b><i>156</i></b>
<b><i>Anexos</i> .....</b>	<b><i>175</i></b>

## Lista de figuras

		Pág
Figura 1.	Estructuras de reproducción asexual de <i>Aspergillus</i> spp.....	58
Figura 2.	Reproducción sexual y asexual de <i>Eurotium rubrum</i> .....	60
Figura 3.	<i>Aspergillus flavus</i> .....	62
Figura 4.	<i>Aspergillus parasiticus</i> .....	65
Figura 5.	<i>Aspergillus nomius</i> .....	65
Figura 6.	Factores que afectan el crecimiento fúngico y la producción de micotoxinas.....	70
Figura 7.	Metabolismo de la aflatoxina B1 .....	75
Figura 8.	Biotransformación de la aflatoxina B1 en M1 (FAO, 2001).....	77
Figura 9.	Rutas de hatos lecheros con ensilado región sur del Cesar .....	103
Figura 10.	Fotografía de jagüey seco en hato lechero de la región.....	106
Figura 11.	Presentaciones de ensilados de maíz.....	122

## Lista de Gráficas

		Pág
Gráfica 1.	Límites a nivel mundial para la aflatoxina M1 en la leche.....	82
Gráfica 2.	Curva de calibración aflatoxina M1.....	120
Gráfica 3.	Tipos de piensos en época de sequía.....	123
Gráfica 4.	Posibles candidatos a especies de <i>Aspergillus</i> encontradas en los diferentes piensos.....	128
Gráfica 5.	Comparativo de los valores de pH de leche cruda en las muestras tomadas en el Sur de Cesar, época de sequía y lluvia.....	133
Gráfica 6.	Comparativo de los valores de densidad de leche cruda en las muestras.... tomadas en el Sur de Cesar, época de sequía y lluvia con la normativa colombiana vigente.....	134
Gráfica 7.	Comparativo de los valores de grasa de leche cruda en las muestras tomadas en el Sur de Cesar, época de sequía y lluvia con la normativa colombiana vigente.....	135
Gráfica 8.	Comparativo de los valores de SNG (%m/m) leche cruda con la norma.....	136
Gráfica 9.	Comparativo de los valores de Proteína (%m/m) leche cruda con la norma.....	136
Gráfica 10.	Comparativo de los valores de S.T (%m/m) leche cruda con la norma.....	137
Gráfica 11.	Comparación de los resultados cualitativos de AFM1.....	139
Gráfica 12.	Comparativo de los resultados de la concentración de AFM1 en leche cruda en época de lluvia y sequía.....	144
Gráfica 13.	Trazabilidad de las concentraciones de AFM1.....	146
Gráfica 14.	Comparativo de los resultados de la concentración de AFM1 en leche UAT.....	147

## Lista de tablas

		<b>Pág</b>
Tabla 1.	Características fisicoquímicas de la leche cruda.....	24
Tabla 2.	Composición química media de un litro de leche de vaca.....	25
Tabla 3.	Origen y distribución media de las proteínas de la leche.....	26
Tabla 4.	Ácidos grasos de los glicéridos de la leche de vaca.....	29
Tabla 5.	Principales oligoelementos de la leche.....	31
Tabla 6.	Componentes salinos mayoritarios de la leche.....	32
Tabla 7.	Principales vitaminas de la leche.....	33
Tabla 8.	Principales nutrientes en las plantas.....	42
Tabla 9.	Afecciones en el hombre provocadas por la ingestión de micotoxinas.....	56
Tabla 10.	Localización de la Aspergilosis y factores predisponentes.....	61
Tabla 11.	Caraterísticas morfológicas de las especies de <i>Aspergillus</i> .....	63
Tabla 12.	Mohos productores de algunas micotoxinas.....	68
Tabla 13.	Niveles máximos de aflatoxinas permitidos en países con legislación.....	80
Tabla 14.	Límites internacionales para AFM1 en leche y productos lácteos para consumo humano.....	82
Tabla 15.	Incidencia de micotoxinas por zonas geográficas.....	91
Tabla 16.	Hatos lecheros tomados para la recolección de las muestras.....	103
Tabla 17.	Hatos lecheros de proveedores para cuantificación de AFM1.....	106
Tabla 18.	Muestras de leche en silos y producto terminado leche UAT.....	107
Tabla 19.	Calibración de la curva de Aflatoxina M1.....	119
Tabla 20.	Tipos de piensos utilizados en los hatos lecheros.....	121
Tabla 21.	Posibles candidatos a especies de <i>Aspergillus</i> aislados de los diferentes piensos.....	123
Tabla 22.	Especies de posibles candidatos de <i>Aspergillus</i> encontradas en los diferentes piensos.....	125
Tabla 23.	Resultados de los análisis microbiológicos de la leche cruda.....	128
Tabla 24.	Resultados estadísticos descriptivos - Recuentos microbiológicos..	129
Tabla 25.	Análisis fisicoquímicos de la leche cruda.....	130
Tabla 26.	Resultados estadísticos descriptivos -variables fisicoquímicas.....	132
Tabla 27.	Resultados de ANOVA de un factor.....	133
Tabla 28.	Detección de AFM1 en leche cruda por inmunoensayo.....	138
Tabla 29.	Muestras de leche en silo y leche entera UAT en la época de sequía y época de lluvia.....	140
Tabla 30.	Cuantificación de la AFM1 en leche cruda.....	142
Tabla 31.	Cuantificación de AFM1 en leche en silo y leche entera UAT. Época de sequía.....	144
Tabla 32.	Cuantificación de AFM1 en leche en silo y leche entera UAT. Época de lluvia.....	145

Tabla 33.	Niveles de AFM1 para las muestras de leche cruda y leche entera UAT FRESKALECHE S.A.S comercializada en Aguachica – Cesar. Época de sequía y época de lluvia 2016.....	147
Tabla 34.	Comparativo Resultados de AFM1 en la leche cruda con Método Cromatográfico – Método Inmunoensayo en época de sequía.....	150
Tabla 35.	Resultados de AFM1 en la leche cruda con Método Cromatográfico – Método Inmunoensayo en época de sequía.....	151

## Resumen

Las aflatoxinas son un grupo de compuestos químicos orgánicos no proteicos de bajo peso molecular, producidas principalmente por los hongos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus nomius*. La AFM1 es un metabolito oxidativo de la Aflatoxina B1, producida por los animales tras la ingestión de estas, la cual aparece en la leche y la orina. Las aflatoxinas tienen una gran actividad cancerígena, teratogénica y mutagénica. El principal síndrome que producen es el hepatotóxico, pudiendo también provocar problemas renales. Los principales órganos afectados son: hígado, riñón y cerebro. La región del Cesar – Colombia se caracteriza por ser una región con una economía basada en la producción ganadera de doble propósito por las características de sus relieves planos que facilitan la producción primaria; la raza del ganado resistente a climas tropicales con altos porcentajes de sólidos totales; lo que da pie al interés de los empresarios del país por generar industrias lácteas en esta región. Es común que en la época de verano se utilicen ensilados de maíz entre otros, para la alimentación del ganado vacuno, estos piensos si no son almacenados adecuadamente en los hatos lecheros traen como consecuencia la presencia de hongos aflatoxigénicos. Actualmente, no se evidencia ninguna investigación en la región del Cesar acerca de la cuantificación de Aflatoxina M1 (AFM1) en leche cruda.

El objetivo del presente estudio fue cuantificar los niveles de AFM1 en muestras de leche cruda utilizada como materia prima y leche entera UAT comercializada por Freskaleche S.A.S. en Aguachica, Cesar; utilizando una columna de inmunoafinidad y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) acoplada a un detector de fluorescencia. Se seleccionaron 40 hatos lecheros de la región que suministraron diferentes piensos (ensilado de maíz, heno, palmiste entre otros) en la época de sequía y se determinó la presencia del género *Aspergillus*, arrojando como resultado el 47,5% candidatos de las especies de *A. flavus* y *A. parasiticum*. De dichos hatos se tomaron las muestras de leche cruda y en planta las muestras de leche entera UAT hasta completar un total de 50 muestras distribuidas 25 en la época de sequía (Marzo-Mayo de 2016) y 25 en la época de lluvia (Agosto de 2016).

Se encontró que los niveles de AFM1 en la leche cruda fueron estadísticamente más altos en la época de sequía (0,0143 a 0,0435  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) correspondiente a los meses de Marzo-Mayo,

que en la época de lluvia (0,00045 a 0,001995  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) correspondiente al mes de Agosto. Así mismo, para las muestras analizadas de leche entera UAT con un intervalo de 0,02488 a 0,03832  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  para la época de sequía y 0,00475 a 0,009571  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  para la época de lluvia. A pesar de que en ambas épocas las muestras cumplieron con la normativa legal vigente

( Resolución 4506 de 2013) para Colombia de 0,5  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ , el 11,5% de muestras de leche cruda y el 9,09% de muestras de leche entera UAT no cumplieron con los valores permitidos para la exportación a la Comunidad Económica Europea (0.05  $\mu\text{g}/\text{L}$ ), por lo tanto es importante tomar medidas preventivas en la elaboración de ensilados para evitar el incremento de hongos aflatoxigénicos.

**Palabras clave:** Aflatoxigénico, Carcinogenicidad, Ensilados, HPLC.

## Abstract

Aflatoxins are a group of organic chemical compounds non-protein of low molecular weight, mainly produced by the fungus *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus nomius*. The AFM1 is an oxidative metabolite of aflatoxin B1, produced by animals after the ingestion of these, which appears in milk and urine. Aflatoxins are carcinogenic activity, teratogenic and mutagenic. The main syndrome produced is hepatotoxic, and can also cause kidney problems. The main organs affected are: liver, kidney, and brain. The region of the Cesar - Colombia is characterized for being a region with an economy based on dual purpose livestock production by the characteristics of their flat reliefs that facilitate primary production; the breed of cattle resistant to tropical climates with high percentages of total solids; What gives rise to the interest of businessmen in the country to generate dairy industries in this region. It is common to use silage maize include cattle feed in the summer, these feeds if they are not properly stored in the dairy herds brought as a consequence the presence of fungi aflatoxigenics. Currently, no evidence no investigation in the region of Cesar about the quantification of aflatoxin M1 (AFM1) in raw milk.

The objective of the present study was to quantify AFM1 levels in samples of raw milk used as raw material and milk whole UAT commercialized by Freskaleche S.A.S. in Aguachica, Cesar; using a column of immunoaffinity and liquid chromatography high efficiency (HPLC) coupled with a fluorescence detector. Selected 40 herds dairy in the region that provided different feedstuffs (silage corn, hay, palmiste, among others) in the dry season and it was determined the presence of the genus *Aspergillus*, shedding 47.5% resulting candidates of the species of *a. flavus*, *a. parasiticum*. These herds were taken samples of raw milk and plant samples of whole milk UAT to complete a total of 50 samples distributed 25 in the time of drought (March 2016) and 25 at the time of rain (August of 2016).

AFM1 levels in raw milk were statistically higher in the time of drought (0,0143 to 0,0435  $\mu\text{g/Kg}$ ) for the months of March to may, that ne rainy (0,00045 to 0,001995  $\mu\text{g/Kg}$ ) for the month of August. Thus, for the analyzed samples of whole milk UAT in the range of 0,02488 to 0,03832  $\mu\text{g/Kg}$  for the dry season and 0,00475 to 0,009571  $\mu\text{g/Kg}$  for the rainy season. While in both seasons samples cumplieron with current legal regulations for Colombia of 0.5

µg/Kg, 11.5% of samples of raw milk and 9.09% of milk samples entera UAT failed with values permitted for export to the European Economic Community (0.05 µg/L), so it is important to take preventive measures in the production of silage to avoid the increase of aflatoxigenicos fungi.

**Key words:** Aflatoxigenic, carcinogenicity, silage, HPLC.

## 1. Introducción

### 1.1. Leche.

**1.1.1. Concepto.** La leche es el producto de la secreción mamaria normal de animales bovinos, bufalinos y caprinos lecheros sanos, obtenida mediante uno o más ordeños completos, sin ningún tipo de adición, destinada al consumo en forma de leche líquida o a elaboración posterior (MPS, 2006).

#### 1.1.2. Tipos de leche.

**1.1.2.1. Leche cruda.** Leche que no ha sido sometida a ningún tipo de termización ni higienización (MPS, 2006).

**1.1.2.2. Leche higienizada.** Es el producto obtenido al someter la leche cruda o la leche termizada a un proceso de pasteurización, ultra-alta-temperatura UAT (UHT), ultrapasteurización, esterilización para reducir la cantidad de microorganismos, u otros tratamientos que garanticen productos inocuos microbiológicamente (MPS, 2006).

**1.1.2.3. Leche pasteurizada.** Es el producto obtenido al someter la leche cruda, termizada o recombinada a una adecuada relación de temperatura y tiempo para destruir su biota patógena y la casi totalidad de biota banal, sin alterar de manera esencial ni su valor nutritivo ni sus características fisicoquímicas y organolépticas. Las condiciones mínimas de pasteurización son aquellas que tienen efectos bactericidas equivalentes al calentamiento de cada partícula a 72°- 76°C por 15 segundos (pasteurización de flujo continuo) o 61°C a 63° C por 30 minutos (pasteurización discontinua) seguido de enfriamiento inmediato hasta temperatura de refrigeración (MPS, 2006).

**1.1.2.4. Leche termizada.** Producto obtenido al someter la leche cruda a un tratamiento térmico con el objeto de reducir el número de microorganismos presentes en la leche y permitir un almacenamiento más prolongado antes de someterla a elaboración ulterior. Las condiciones del tratamiento térmico son de mínimo 62°C durante 15 a 20 segundos, seguido de enfriamiento inmediato hasta temperatura de refrigeración. La leche termizada debe reaccionar positivamente a la prueba de fosfatasa alcalina, siendo prohibida su comercialización para consumo humano directo (MPS, 2006).

**1.1.2.5. Leche ultrapasteurizada.** Es el producto obtenido mediante proceso térmico en flujo continuo, aplicado a la leche cruda o termizada en una combinación de temperatura entre 135 a 150°C durante un tiempo de 2 a 4 segundos, seguido inmediatamente de enfriamiento hasta la temperatura de refrigeración y envasado en condiciones de alta higiene, en recipientes previamente higienizados y cerrados herméticamente, de tal manera que se asegure la inocuidad microbiológica del producto sin alterar de manera esencial ni su valor nutritivo, ni sus características fisicoquímicas y organolépticas, la cual deberá ser comercializada bajo condiciones de refrigeración (MPS, 2006).

**1.1.2.6. Leche ultra-alta temperatura UAT (UHT) leche larga vida.** Es el producto obtenido mediante proceso térmico en flujo continuo, aplicado a la leche cruda o termizada a una temperatura entre 135 a 150°C y tiempos entre 2 y 4 segundos, de tal forma que se compruebe la destrucción eficaz de las esporas bacterianas resistentes al calor, seguido inmediatamente de enfriamiento a temperatura ambiente y envasado aséptico en recipientes estériles con barreras a la luz y al oxígeno, cerrados herméticamente, para su posterior almacenamiento, con el fin de que se asegure la esterilidad comercial sin alterar de manera esencial ni su valor nutritivo ni sus características fisicoquímicas y organolépticas, la cual puede ser comercializada a temperatura ambiente (MPS, 2006).

**1.1.3. Historia de la leche.** Aunque no se sabe a ciencia cierta cuando tuvo su origen el consumo de leche de animales domésticos, existe evidencia de vacas que fueron ordeñadas tan lejos como 9 mil años antes de Cristo. En varias partes de la Biblia se hace referencia a leche, mantequilla y queso. De hecho, quienes escribieron la Biblia mencionan la leche en más de 30 ocasiones en el Antiguo Testamento.

La estampa más antigua de ordeño está en un panel de piedra de cuatro pies de largo, en el cual aparecen vacas con sus becerros, hombres que las ordeñan, y unas jarras altas en las cuales echan la leche ordeñada en Ur, la antigua Caldea (Cerca de Babilonia); los griegos (400 a.C.) la utilizaban con fines medicinales y cosméticos; Hipócrates la recetaba como antídoto contra los envenenamientos (Rodríguez, 2008).

En Suiza se encontraron esqueletos de ganado y equipo de hacer queso usados alrededor de 4 mil años antes de Cristo (Molina, 2001).

Por otra parte, griegos y romanos, tan atrás como 1.550 años a.C. y 750 años a.C. respectivamente, muestran que la leche, mantequilla y queso eran artículos esenciales en la dieta diaria de la población. Los romanos utilizaban los productos lácteos como artículos importantes para el comercio. Desde Roma, el conocimiento de los productos lácteos se esparció por toda Europa. Las vacas lecheras se encontraban por toda Europa desde el principio de la Era Cristiana. Las vacas y sus productos eran tan importantes para estos pueblos, que la prosperidad y riqueza se medían en términos de cantidad de ganado (Molina, 2001).

Para el año 800 d.C., el uso del queso era común en lo que hoy se conoce como Alemania. Durante el Oscurantismo el arte de producir quesos era mejor conocido y desarrollado en los monasterios. Los monjes, por varios siglos, fueron líderes en la producción de quesos, y fueron responsables de enseñarlo a los demás. Para el año 1 mil, el queso se había convertido en un importante artículo de intercambio en las ciudades de Europa. Para el siglo 15 ya existían en Suiza algunos mercados importantes en los que se comerciaba queso, Holanda y Suiza fueron los dos primeros centros de desarrollo de la industria lechera en Europa (Molina, 2001).

**1.1.4. Historia de la leche pasteurizada a ultra alta temperatura (UHT).** Los intentos de esterilizar la comida en contenedores sellados se atribuyeron históricamente al inventor francés Nicholas Appert en sus trabajos de investigación realizados en el siglo XVIII (Orv, 1987). No obstante, algunas investigaciones demuestran que con anterioridad ya se había intentado esterilizar recipientes sellados de alimentos (Cowell, 1995). Hacia fines del siglo XIX, los químicos alemanes trasladaron este procedimiento a la leche cruda, y por entonces (antes de Pasteur) empezaron a “sospechar” que los 77 tratamientos térmicos resultaban eficaces para destruir las bacterias presentes en ella. De este modo, dieron origen no sólo a un importante método de conservación, sino también a una medida higiénica fundamental para cuidar la salud de los consumidores y conservar la calidad de los alimentos (ESIL, 2005).

Fue Loius Pasteur (1822-1895) quien, a mediados del siglo XIX, comprobó que calentar ciertos alimentos y bebidas a determinadas temperaturas eliminaba los microorganismos. Acababa de nacer entonces lo que denominó la pasteurización. El tratamiento térmico de la leche cruda sentó bases, junto con otros avances técnicos, por su gran expansión en el siglo

XX. Porque antes, por ejemplo, en la edad media, era fundamentalmente consumida por los menos favorecidos (Rodríguez, 2008).

La primera pasteurización fue realizada el 20 de abril de 1882 por el mismo Pasteur y su colega Claude Bernard, sometieron a temperaturas moderadas (60 - 65°C) durante un tiempo determinado, logrando prolongar la vida de la leche sin que sufriera algún tipo de transformación de sus características organolépticas. Esto significaba que con el tratamiento térmico se destruían los microorganismos responsables de las alteraciones que conducían a la descomposición de los mismos. Por lo tanto, la pasteurización no sólo fue un procedimiento interesante de conservación, sino también de higienización capaz de garantizar la seguridad a los consumidores frente al contagio de numerosas enfermedades transmitidas por la leche contaminada (ESIL, 2005).

El avance científico de Pasteur mejoró la calidad de vida al permitir que ciertos productos alimenticios básicos, como la leche, se pudieran transportar largas distancias sin que la descomposición los afectara (ESIL, 2005).

Desde sus orígenes, la pasteurización se ha asociado con la leche. El primer investigador que sugirió este proceso para el producto lácteo fue el químico agrícola alemán Franz Von Soxhlet en el año 1886, siendo Charles North quien aplicó dicho método a la leche por primera vez en el año 1907.

En 1933, Charles Porcher definió exactamente el objetivo de la pasteurización. “Pasteurizar la leche es destruir en ella, por el empleo apropiado de calor, casi toda su flora banal y la totalidad de su flora patógena, procurando alterar lo menos posible la estructura física de la leche, su equilibrio químico y sus diastasas y vitaminas” (Veisseyre,1988).

En Francia, el principio de la pasteurización obligatoria de las leches de mezcla fue establecido por la Ley 2 de Julio de 1935. A consecuencia de los trabajos de Guttonneau, Mocquot y Eyrard, el Decreto del 26 de abril de 1939 fijó las condiciones que deben cumplir las leches pasteurizadas (Veisseyre, 1988).

El proceso VAT o lenta, fue el primer método de pasteurización, aunque la industria alimenticia lo ha ido renovando por otros sistemas más eficaces (Dalta *et al.*, 2002).

Burton (1988), investiga sobre la historia de los esterilizadores los cuales fueron patentados y construidos para calentar leche a temperaturas que van desde los 130°C hasta los 140°C antes del siglo XIX, curiosamente antes de que sus beneficios fueran entendidos. La leche esterilizada se desarrolló industrialmente en el año 1921, y el proceso de inyección de vapor fue desarrollado en 1927 por G. Grindrod en Estados Unidos. Sin embargo, las iniciativas más relevantes que dieron lugar a la comercialización del método UHT se empezaron a desarrollar a fines del decenio de 1940, debido a la técnica desarrollada en los esterilizadores de tubos concéntricos y de vapor de esterilización para los sistemas de producción de leche. Debe entenderse que los esfuerzos de aquella época fueron muy grandes en la industria para lograr empaquetar asépticamente la leche, hasta que finalmente se logró con éxito en el año 1961.

Así, la búsqueda de un producto que no sólo posea calidad, sino también estabilidad durante su comercialización, se convierte en un problema tecnológico complejo y se han diseñado procesos térmicos como pasteurización, de alta temperatura por corto tiempo (HTST) y de esterilización de ultra alta temperatura (UHT), entre otros, cuya denominación va a depender de la relación existente entre la temperatura y tiempo aplicado sobre el producto. Como ejemplo, el proceso UHT utiliza temperaturas en un rango de 132 a 155°C por 1 a 5 segundos, con el propósito de reducir drásticamente la carga microbiana (5 a 15 reducciones decimales) y al mismo tiempo minimizando las pérdidas nutricionales y cambios organolépticos (Dalta *et al.*, 2002). Esto permite extender la vida útil del producto hasta en seis meses, sin embargo, de acuerdo con resultados reportados por Driessen (1983) después de un proceso UHT quedaría una actividad lipásica y proteásica residual, la que debe ser reducida si se pretende mantener el producto almacenado por largos períodos de tiempo a temperatura ambiente. Por ello, la optimización del proceso térmico UHT, es de mucho interés económico para el sector (Arteaga *et al.*, 1994). Sin embargo, estudios de optimización dinámica aplicados al proceso UHT son escasos (Pagliarini *et al.*, 1991).

**1.1.5. Generalidades.** La leche de vaca es el principal tipo de leche utilizada para consumo humano, que corresponde al 83% de la producción mundial de leche, seguido por la leche de búfala con 13%, leche de cabra con 2%, leche de oveja con 1% y leche de camella

con 0.3%. La parte restante es producida por otras especies de productos lácteos como equinos y yaks (FAO, 2015).

La leche se puede considerar un alimento que cubre todas las necesidades nutritivas del ser humano (Spreer, 1991). El componente mayoritario de la leche de vaca es el agua y el resto comprende principalmente lípidos, proteínas y carbohidratos sintetizados en la glándula mamaria. Contiene también, aunque en pequeñas cantidades, compuestos minerales y otras sustancias hidro y liposolubles transferidas directamente del plasma sanguíneo, proteínas específicas de la sangre e indicios de enzimas e intermediarios de la síntesis que tiene lugar en la glándula (Robinson, 1987). Por lo tanto, contiene todos los nutrientes y todos los biocatalizadores necesarios para mantener y desarrollar los procesos vitales. Un litro de leche cubre aproximadamente el 20% de las necesidades energéticas diarias de una persona (Spreer, 1991).

La leche de todas las especies constituye un fluido biológico muy complejo que contiene una gran variedad de componentes y posee unas características físicas únicas.

La lactancia es el proceso por el cual la madre entrega nutrientes, inmunidad en grados variables y componentes que regulan el crecimiento al recién nacido. La composición de la leche es variable dependiendo de la especie, estado de desarrollo del neonato y del medio ambiente. El desarrollo mamario, el inicio y regulación de la secreción de la leche están íntimamente relacionados a la reproducción (Neira & López, 2016).

Los procesos que controlan la producción de leche, se deben en primer lugar a la lactogénesis (es el inicio de la síntesis y secreción de la leche por las células epiteliales de los alvéolos mamaros), en segundo lugar a la lactancia, en tercer lugar a la expulsión de la leche y finalmente a la involución de la glándula mamaria (Neira & López, 2016).

En la producción de la leche influyen dos factores: extrínsecos como: las construcciones, manejo y dieta, e intrínsecos como: genéticos, tamaño corporal, ingestión de alimentos, metabolismo y su regulación, fisiología del tracto digestivo, hígado y glándula mamaria. La velocidad de las enzimas en la glándula mamaria es mayor que la tasa de secreción de leche, por lo tanto, las enzimas no son limitantes en la producción. Esto supone que la disponibilidad de los nutrientes es el factor limitante en la secreción (Neira & López, 2016).

La glándula mamaria requiere para la síntesis de leche, agua, glucosa, aminoácidos, acetato, 3-hidroxibutirato y ácidos grasos de cadena larga. De estos, el acetato y los aminoácidos se absorben directamente desde el intestino y el 3- hidroxibutirato se forma por la conversión del butirato durante la absorción desde el intestino y el paso a través del hígado. La cantidad de glucosa absorbida es muy baja, ya que la mayor parte de los carbohidratos digeribles de la dieta son fermentados a ácidos grasos volátiles. La mayor parte de la glucosa se obtiene por gluconeogénesis a partir de propionato en el hígado (Neira & López, 2016).

Un parámetro relevante en la leche es el porcentaje de grasa, que varía según las estaciones del año, entre un 5% durante el invierno y un 3% en verano, pero la industria láctea estandariza este nivel graso a través del descremado y la homogenización; esta última dispersa en forma pareja la grasa de la leche. Las grasas lácteas son saturadas en su mayor parte, los ácidos grasos de la leche y sus derivados tienen 12, 14 y 16 átomos de carbono, lo que les confiere un poder aterogénico (Mazzeo, 2007).

El contenido de proteínas depende fundamentalmente de la alimentación y oscila entre el 3,0 y el 3,6%. Se encuentran en forma de micelas dispersas en suspensión coloidal, y la mayor parte pertenece al grupo de prótidos divididos en dos grupos: Haloprótidos (lactoalbúmina, lactoglobulina) y heteroprótidos (caseína). El contenido de caseína en la leche es de aproximadamente 27 gramos por litro y representa un 78% de los prótidos (Keating, 2011).

El carbohidrato más importante de la leche de casi todas las especies es la lactosa. La concentración de la lactosa varía desde cero en la leche de algunas focas hasta aproximadamente 100 g/L en la de ciertos primates. La leche de vaca contiene más lactosa que ningún otro componente sólido, con una concentración entre 45 a 50 g/L (Walstra & Jenness, 1987).

El contenido de vitaminas de la leche cruda depende fundamentalmente de la alimentación y del estado de salud de los animales. Los tratamientos y transformaciones a los que se somete la leche pueden rebajar algo su contenido vitamínico. La leche contiene de una forma natural ácido cítrico (aproximadamente 2,45 g por Kg de leche). El ácido láctico, el ácido butírico y todos los demás que aparecen son productos metabólicos originados en la fermentación de la lactosa por los microorganismos (Spreer, 1991).

**1.1.6. Propiedades físicoquímicas de la leche.** Desde el punto de vista físicoquímico, la leche es un producto muy complejo, lo que afecta directamente las transformaciones que se producen en ella desde la etapa de ordeño hasta su comercialización y en los derivados lácteos durante sus tratamientos industriales (Amiot, 1991).

En la Tabla 1 se presentan las principales características físicoquímicas de la leche cruda.

Tabla 1. Características físicoquímicas de la leche cruda.

<i>Leche Cruda</i>		
<i>Parámetro/unidad</i>		
Grasa % m/v mínimo	3,0	
Extracto seco total % m/m mínimo	11,30	
Extracto seco desengrasado % m/m mínimo	8,30	
Densidad 15/15°C g/ml	Mínimo	Máximo
Índice lactométrico	1,030	1,033
Acidez expresada como ácido láctico % m/v	8,40	-----
Indice °C crioscópico °H	0,13	0,17
	-0,530	-0,510

---

Fuente: (MPS, 2006).

Las propiedades físicoquímicas de una sustancia resultan de su composición y estructura:

- La estructura comprende tanto la macroestructura, visible a simple vista, como la microestructura, perceptible mediante el microscopio óptico, y la ultraestructura, solamente perceptible mediante microscopía electrónica.
- La textura responde a cómo se caracterizan, fundamentalmente por métodos sensoriales, pero también reológicos y ópticos, las propiedades estructurales del producto alimenticio.

La leche está formada aproximadamente por un 87,5% de agua y 12,5% sólidos o materia seca total cuyos principales componentes son: lactosa, proteínas, grasas y minerales.

En la Tabla 2 se muestra la composición química, tomando como volumen de referencia un litro de leche de vaca.

Tabla 2. Composición química media de un litro de leche de vaca.

<i>Parámetro/unidad</i>	<i>Leche Cruda</i>
<b>Constituyentes plásticos o energéticos</b>	
Agua/ g	900 - 910
Extracto seco total /g	125 - 130
Grasa/g	35 -45
Extracto seco magro/g	90 - 95
Lactosa/g	47 - 52
Sustancias Nitrogenadas/g	33 -36
Sales/g	9 – 9,5
<b>Biocatalizadores</b>	Difícilmente determinables o en proporciones vestigiales.
Pigmentos	
Enzimas	
Vitaminas	
<b>Gases disueltos.</b>	4-5% del volumen de leche a
Gas carbónico	la salida de la mama
Oxígeno	
Nitrógeno.	

---

Fuente: (Veisseyre, 1988).

El agua constituye la fase acuosa de la leche y es el medio de soporte para sus componentes sólidos y gaseosos. Se encuentra en dos estados: Agua libre: 96% es agua intersticial, allí se encuentra en solución la lactosa y algunas sales. El agua ligada o de enlaces es el 4%, es el elemento de cohesión de los componentes no solubles a la caseína el 50%, a proteínas solubles el 30% y a fosfolípidos el 15% (Neira & López, 2016).

La lactosa es el componente mayoritario de la materia seca de la leche. Su contenido se eleva, por término medio, a 50 g por litro de leche. Otros azúcares están también presentes, pero en cantidades vestigiales. Se trata principalmente de poliósidos que contienen fucosa y glúcidos nitrogenados, como la N-acetilglucosamida (Veisseyre, 1988).

La solubilidad de la lactosa es relativamente baja en comparación con la de otros azúcares. La sacarosa es aproximadamente diez veces más soluble que la lactosa. Es muy sensible al calor, entre 100 y 130°C la forma hidratada pierde su agua de cristalización. Más allá de los 150°C se torna amarilla y después de los 170°C tiene lugar un oscurecimiento pronunciado debido a la formación de un caramelo. Sin embargo, en la leche se observa que el oscurecimiento sobreviene a temperaturas muy inferiores. En efecto, este fenómeno no se debe a una caramelización de la lactosa, sino a una reacción del azúcar con las materias nitrogenadas, que lleva consigo la aparición de compuestos oscuros reductores llamados melanoidinas. Esta reacción de pardeamiento, catalizada por el hierro, el cobre y los fosfatos, se denomina reacción de Maillard (Veisseyre, 1988).

Las proteínas constituyen la parte más importante de la leche, desde el punto de vista nutritivo, por poseer todos los aminoácidos tanto esenciales como los no esenciales para el hombre. Aporta 4 calorías por 100 gramos de producto. Las propiedades fisicoquímicas de la leche vienen determinadas, en gran parte, por las propiedades del complejo de caseínas. Casi todas las caseínas de la leche recién segregada están agrupadas en partículas que se denominan micelas y la mayoría de los componentes solubles y lípidos de la leche interaccionan con las caseínas (Robinson, 1987). En la Tabla 3 se puede apreciar el origen y distribución media de las proteínas de la leche.

Tabla 3. Origen y distribución media de las proteínas de la leche.

<i>Proteínas (95% de las sustancias nitrogenadas totales de la leche)</i>	<i>Distribución En % de proteínas totales</i>	<i>Distribución En gramos por litro de leche</i>	<i>Origen</i>
Caseínas	80	26	Mamario
<i>Proteínas del suero</i>			
<i>lácteo:</i>			
Inmunoglobulinas (Euglobulina y Pseudoglobulina)	2	0,7	Sanguíneo
Albúminas			
β lactoglobulina	15	4,5	-

<i>Proteínas (95% de las sustancias nitrogenadas totales de la leche)</i>	<i>Distribución En % de proteínas totales</i>	<i>Distribución En gramos por litro de leche</i>	<i>Origen</i>
$\alpha$ lactoalbumina	-	-	Mamario
Seroalbúmina	-	-	Mamario
Proteasas- peptonas	-	-	Sanguíneo
Proteínas menores	2	0,5	-
(Lactotransferrina, Lactolina, proteína de la membrana del glóbulo graso).	1	0,3	-

Fuente: (Veisseyre, 1988).

Todas las caseínas son moléculas de gran tamaño que contienen fósforo y un gran número de aminoácidos, entre los cuales los más abundantes son el ácido glutámico y en menor grado la leucina y la prolina. El fósforo está presente en las moléculas en forma de monoéster fosfórico de los aminoácidos alcoholes serina y treonina (Veisseyre, 1988).

El alto valor nutricional de las proteínas solubles como la lactoalbúmina y lactoglobulina se debe a su gran contenido de aminoácidos sulfurados. Esas proteínas se desestabilizan por efecto del calor con temperaturas superiores a 70°C, precipitándose en mayor proporción a medida que aumenta la temperatura y el tiempo, reteniendo gran cantidad de agua.

La materia grasa es el componente de la leche que más varía debido a factores como la raza, edad, alimentación, salud e intervalos de ordeño del animal. El aporte calórico de la leche es de 64 a 66 calorías por 100 gramos, donde la materia grasa aporta 9 calorías (Neira & López, 2016).

La grasa de la leche se encuentra en forma de glóbulos de lípidos rodeados de una capa rica en fosfolípidos (membrana del glóbulo graso) que deriva, durante el proceso de secreción, de la membrana apical de las células secretoras. En la leche recién segregada, los glóbulos son bastante grandes (con un diámetro de hasta 6  $\mu\text{m}$ ) pero, al igual que ocurre con las micelas de caseína, existe una distribución del tamaño. La membrana le proporciona al

glóbulo la estabilidad dado que los lípidos hidrófobos no están en contacto directo con la fase acuosa de la leche. De esta forma, la grasa permanece dispersa en el líquido (Robinson, 1987).

Se suelen dividir los constituyentes de la materia grasa de la leche en dos grandes grupos: Lípidos y fracción insaponificable. Los lípidos representan el 99% de la materia grasa (en porcentaje de lípidos totales).

La composición media de los lípidos contenidos en un litro de leche es la siguiente:

- Lípidos simples ( glicéridos y estéridos).....99 a 99,5
- Lípidos complejos (Lecitinas y cefalinas).....0,5 a 1,0

Los lípidos simples son llamados también lípidos ternarios porque sólo contienen carbono, hidrógeno y oxígeno. Son ésteres de ácidos grasos y de un alcohol. Se denominan glicéridos cuando el alcohol es un glicerol (o glicerina), y esteroides si se trata de un esteroide (Veisseyre, 1988).

Los glicéridos constituyen la casi totalidad de los lípidos simples de la leche, ya que los estéridos sólo suponen de 0,11 a 0,17 g por litro. Se conocen 150 ácidos grasos diferentes. Sin embargo, solamente una quincena de ellos se encuentran en cantidades notables. Los hay saturados y no saturados. Los saturados representan el 55-60% del total de los ácidos grasos (Veisseyre, 1988).

Los más abundantes son el ácido mirístico, palmítico y esteárico que representan, sólo, cerca del 50% del total de los ácidos grasos. Los ácidos saturados de pequeño peso molecular, como el butírico, caproico, caprílico y cáprico constituyen el 8 - 9% de los ácidos grasos, proporción netamente superior a la que existe en otras grasas animales o vegetales. La presencia de estos ácidos en tal cantidad es un carácter esencial de la grasa de la leche (Veisseyre, 1988). En la Tabla 4 se especifican los ácidos grasos de los glicéridos de la leche de vaca.

Tabla 4. Ácidos grasos de los glicéridos de la leche de vaca.

ÁCIDO	FÓRMULA	CONTENIDO MEDIO DE %	EL ÁCIDO GRASO ES				
			VOLÁTIL	FIJO	SÓLIDO A TEMPERATURA AMBIENTE	LÍQUIDO A TEMPERATURA AMBIENTE	SOLUBLE EN AGUA
<b>1. ÁCIDOS SATURADOS</b>							
Butírico	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub> H	3-4	+			+	+
Caproico	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> CO <sub>2</sub> H	1,5-3	+			+	POCO+
Caprílico	C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> CO <sub>2</sub> H	0,5-2	+			+	POCO+
Cáprico	C <sub>9</sub> H <sub>19</sub> CO <sub>2</sub> H	1-3,5	+		+		MUY POCO+
Láurico	C <sub>11</sub> H <sub>23</sub> CO <sub>2</sub> H	2-5		+	+		
Mirístico	C <sub>13</sub> H <sub>27</sub> CO <sub>2</sub> H	8-11		+	+		+
Palmítico	C <sub>15</sub> H <sub>31</sub> CO <sub>2</sub> H	25-29		+	+		+
Estearico	C <sub>17</sub> H <sub>35</sub> CO <sub>2</sub> H	8-13		+	+		+
Araquídico	C <sub>19</sub> H <sub>39</sub> CO <sub>2</sub> H	0,4-1		+	+		+
<b>2. ÁCIDOS NO SATURADOS</b>							
Con doble enlace							
Decenoico	C <sub>9</sub> H <sub>17</sub> CO <sub>2</sub> H	3,4		+		+	+
Dodecenoico	C <sub>11</sub> H <sub>21</sub> CO <sub>2</sub> H	3,4		+		+	+
Tetradecenoico	C <sub>13</sub> H <sub>25</sub> CO <sub>2</sub> H	3,4		+		+	+
Oleico	C <sub>17</sub> H <sub>33</sub> CO <sub>2</sub> H	30-40		+		+	+
Con dos dobles enlaces							
Linoleico	C <sub>17</sub> H <sub>31</sub> CO <sub>2</sub> H	4-5		+		+	+
Más insaturados							
De 20 a 22°C		0,5-1,5		+		+	+

Fuente: (Veisseyre, 1988).

En la grasa de la leche, la proporción de glicéridos trisaturados es aproximadamente del 30%. El resto (70%) son glicéridos no saturados, en cuya composición intervienen casi siempre el ácido oleico (Veisseyre, 1988).

Los lípidos complejos contienen, además de carbono, hidrógeno y oxígeno, una cierta cantidad de fósforo, nitrógeno o azufre. En la leche se encuentran sólo lípidos complejos fosforados y nitrogenados, llamados fosfátidos o fosfoaminolípidos. Comprende

fundamentalmente las lecitinas (35%), las cefalinas (40%) y los fosfoesfingolípidos (25%) (Veisseyre, 1988).

Las lecitinas están constituidas por la unión del glicerol, ácidos grasos, ácido fosfórico y una base nitrogenada, la colina. Tienen propiedades emulsionantes cuyo papel es fundamental para asegurar la estabilización de la emulsión de triglicéridos en la fase acuosa de la leche; además de propiedades tensio-depresivas (esto explica la formación de espuma en la leche por agitación (Veisseyre, 1988).

La presencia de las cefalinas y los fosfoesfingolípidos, dan como resultado una mayor sensibilidad a la oxidación que hace que los fosfoaminolípidos sean los primeros componentes de la materia grasa que se ven afectados por la alteración oxidativa (Veisseyre, 1988).

Por otra parte, la fracción insaponificable contiene numerosos y variados componentes a pesar de no representar más del 1% de la materia grasa; entre los principales se tienen los carotenoides, tocoferoles, esteroides y vitaminas liposolubles.

Los carotenoides agrupan un grupo de sustancias coloreadas, rojas o amarillas, emparentadas por su constitución química, que refleja una condensación más o menos importante de un hidrocarburo: *el isopreno*. Estas sustancias son muy insaturadas, lo que explica su tendencia a oxidarse.

El  $\beta$ -caroteno es el carotenoide más abundante. Su molécula, de estructura simétrica, mediante escisión y fijación de agua, origina dos moléculas de vitamina A.

El contenido de la leche en caroteno varía mucho con las condiciones de alimentación del animal. La presencia de forrajes verdes en la ración es un elemento favorable para la elevación de la tasa de caroteno. Responsable de la coloración de la materia grasa, precursor de la vitamina A, el caroteno, figura, por tanto, entre los componentes importantes de la leche (Veisseyre, 1988).

Tocoferoles, son sustancias complejas, constituidas fundamentalmente por un núcleo biciclo cromano que lleva una cadena lateral fitilo, el  $\alpha$ -tocoferol se identifica como vitamina E. Los tocoferoles presentan una propiedad química notable: su sensibilidad al

oxígeno y agentes oxidantes, principalmente a la luz. Esta sensibilidad explica su papel de antioxidantes naturales. Junto con los fosfoaminolípidos, los tocoferoles contribuyen a proteger la materia grasa contra la alteración oxidativa (Veisseyre, 1988).

Esteroles, son alcoholes policíclicos complejos. Se encuentran en la materia grasa de la leche bajo dos formas ponderadamente muy desiguales: esteroles esterificados por ácidos grasos (estéridos) y esteroles libres (Veisseyre, 1988).

Las sales minerales se encuentran en forma soluble e insoluble o en forma orgánica e inorgánica. La homeostasis de la vaca tiende a conservar en equilibrio sus cargas eléctricas para mantener un balance en los líquidos corporales mediante sistemas tampón, la alteración en la composición se debe a procesos infecciosos o patológicos; las leches mastíticas son más saladas se aumenta el cloro y el sodio y más pobre en calcio, magnesio, fósforo y potasio que las leches normales (Neira & López, 2016). Los principales oligoelementos de la leche se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5. Principales oligoelementos de la leche.

<i>Componentes</i>	<i>Variaciones (µg)</i>
Aluminio	500-600
Bromo	300-2000
Cobre	20-50
Hierro	100-300
Flúor	100-200
Yodo	20-100
Manganeso	20-30
Molibdeno	20-60
Silicio	1500-10000
Estroncio	70-400
Cinc	3000-4000

Fuente: (Veisseyre, 1988).

Se distinguen las sales mayoritarias o macromoléculas y los oligoelementos. Las primeras están constituidas fundamentalmente por cloruros, fosfatos, citratos de potasio, calcio, sodio y magnesio. Entre los segundos, muy numerosos y variables con la alimentación del animal, figuran el aluminio, bromo, zinc, manganeso y sobre todo el hierro y cobre, cuyo interés

nutritivo y tecnológico es importante. Estos metales están, en gran parte, formando complejos con las proteínas. Así el cobre y el hierro nativos están en gran parte ligados a la membrana proteica del glóbulo graso. Cuando provienen de una contaminación externa, se encuentran sobre todo ligados a las proteínas de la fase acuosa (Veisseyre, 1988).

El ácido cítrico, presente como citrato, es específico en el organismo animal de la secreción láctea y del tejido óseo. Es un ácido tricarboxílico con una función alcohol terciaria. Su papel importante en el desarrollo del aroma de la mantequilla (Veisseyre, 1988).

Gran parte del interés de las materias salinas reside en su estado fisicoquímico que gobierna la estabilidad de la leche, como se puede evidenciar en la Tabla 6.

Tabla 6. Componentes salinos mayoritarios de la leche.

<i>Componentes</i>	<i>Contenidos medios (g/L)</i>	<i>Variaciones habituales (g/L)</i>
Potasio	1,5	1,35 – 1,7
Calcio	1,25	1, 0 – 1,4
Sodio	0,5	0,35 – 0,6
Magnesio	0,13	0,1 – 0,15
Cloro	1,0	0,8 – 1,4
Fósforo total	0,95	0,75 – 1,1
Ácido cítrico	1,75	1,2 – 2,0

Fuente: (Veisseyre, 1988).

Las vitaminas son sustancias orgánicas que se encuentran en la leche en pequeñas cantidades, pero tienen una gran importancia nutritiva y algunas contribuyen también al color de la leche y los productos lácteos, además que se considera a la leche entre los alimentos que contienen la variabilidad más completa de vitaminas (Veisseyre, 1988).

En la leche se encuentran las vitaminas liposolubles (A, D, E y K) donde las síntesis de estas dependen de factores exógenos como la luz y la alimentación, por lo tanto, varían un poco en su contenido, como se muestra en la Tabla 7. Las vitaminas hidrosolubles como (Complejo B, PP, H, C) son biosintetizadas por las bacterias del rumen, se inactivan por el calor, luz y oxígeno. Su contenido se modifica según el tratamiento térmico y el derivado lácteo donde se encuentren. La leche es deficiente en vitamina D y debe ser enriquecida. Las

vitaminas C y E actúan en la leche como antioxidantes naturales protegiendo la leche recién ordeñada (Neira & López, 2016).

Tabla 7. Principales vitaminas de la leche.

<i>Contenido medio por litro</i>	<i>Valor nutritivo de la leche</i>	<i>Porcentaje de necesidades diarias cubiertas por un litro de leche</i>	
		Adulto	Niño
<i>Vitaminas liposolubles</i>			
Vit A 500-1000 U-I (Invierno)	Aceptable	10-20	35-70
Vit A 2000-3000 U-I (Verano)	Bueno	40-50	130-200
Vit D 15 - 20 U-I	Medio	-----	4-5
Vit E 1-2 mg	Medio	-----	-----
<i>Vitaminas hidrosolubles</i>			
Vit <b>B</b> <sub>1</sub> 0,3 – 1 mg	Alto	20-30	100-160
Vit <b>B</b> <sub>2</sub> 0,3 – 3 mg	Muy bueno	80-100	400
Vit PP 1 – 2 mg	Medio	5	25 - 30
Ácido pantótenico 2-5 mg	Bueno	---	---
Vit <b>B</b> <sub>6</sub> 0,3 – 1 mg	Bueno	---	---
Vit <b>B</b> <sub>12</sub> 1 – 8 mg	Alto	---	---
Vit C 10 – 20 mg	Aceptable	25	65

Fuente: (Veisseyre, 1988).

Los principales gases presentes en la leche son el dióxido de carbono, oxígeno, nitrógeno e hidrógeno. El contenido depende del tiempo después del ordeño, la leche recién ordeñada puede contener un 8% en volumen de gas, del cual el 6,5% es carbónico. Esta cantidad disminuye hasta el 4% pero el oxígeno y el nitrógeno se elevan (Neira & López, 2016).

**1.1.7. Reacción química.** El pH de la mayoría de muestras de leche está entre 6,6 y 6,8, siendo la media 6,7 a 20°C, aproximadamente. El pH de la leche aumenta generalmente al avanzar la lactación; el del calostro puede llegar a 6,0 y el de la mayoría de las leches mastíticas alcanza 7,5 (Walstra & Jenness, 1987).

La leche recién ordeñada de una vaca sana presenta un índice de pH (acidez) de 6,4-7,0. Aproximadamente la mitad se debe a las sales ácidas, por ejemplo, el hidrogenocarbonato sódico ( $\text{NaHCO}_3$ ) y a los ácidos orgánicos (ácido cítrico) que contiene la leche, el resto se debe a la caseína que reacciona ante el hidróxido sódico ( $\text{NaOH}$ ) como un ácido de mediana fuerza (Spreer, 1991).

El conjunto de sustancias nitrogenadas que no precipitan cuando el pH de la leche se lleva a 4,6, se denominan proteínas del suero lácteo, este pH corresponde al punto isoeléctrico de la caseína bruta. Por esto, se las denomina también proteínas solubles. Se encuentran en el suero que se separa del coágulo obtenido por adición del cuajo. Representa aproximadamente el 20% del total de las proteínas de la leche. Los diversos métodos de fraccionamiento permiten distinguir cuatro grandes fracciones:

- Albúminas
- Globulinas
- Fracción proteasas-peptosa
- Proteínas menores (Veisseyre, 1988).

El incremento del índice de pH durante el transporte de la leche y de sus tratamientos posteriores en la central lechera se debe a que las bacterias, sobre todo las lácticas, transforman la lactosa en ácido láctico. Esta nueva acidez se llama acidez desarrollada y origina la desestabilización de las proteínas (Amiot, 1991).

La disolución coloidal de fosfocaseinato cálcico es muy sensible a las modificaciones del pH provocadas por adición de ácido o por el desarrollo de una fermentación láctica. Los iones  $\text{H}^+$  que proceden de la disociación del ácido neutralizan las cargas negativas de las micelas. Por otra parte, la afinidad por el agua del electrólito, añadido o desarrollado, origina cierta deshidratación de las micelas.

Estos dos fenómenos provocan la floculación de la disolución coloidal. Sin embargo, no son las micelas de fosfocaseinato cálcico las que floculan, sino la caseína, desmineralizada. En efecto, en el curso de la acidificación, se ve una migración progresiva, fuera de las micelas, del calcio ligado a las caseínas y del fosfato cálcico. A pH 4,6, punto isoeléctrico de la caseína bruta, las micelas han desaparecido debido a su completa desmineralización.

Entonces la caseína precipita completamente bajo la forma de caseína isoelectrica (Veisseyre, 1988).

El equilibrio entre los diversos iones y las propiedades de los complejos son tales que la mayor parte del citrato se encuentra como  $Cit^- Ca$  y aproximadamente la mitad del fosfato inorganico se presenta como fosfato cálcico precipitado permaneciendo solo alrededor de 2mM (a veces hasta 30mM) del calcio en solución, en forma de  $Ca^{2+}$ . De forma similar, gran parte del magnesio está formando complejos con el citrato reduciéndose la concentración de ion  $Mg^{2+}$  en solución (Robinson, 1987).

Las dos reacciones químicas más importantes en las que participan los triglicéridos son la hidrólisis (lipólisis) y la autooxidación. La lipasa naturalmente presente en la leche actúa sobre la posición *sn*-3 de los triglicéridos, los cuales, contienen en la leche de vaca una alta proporción de ácidos grasos de cadena corta. Los ácidos grasos de peso molecular bajo son volátiles y originan sabores no aceptables (particularmente el ácido butírico). Las lipasas microbianas son menos específicas y liberan una variedad mayor de ácidos grasos. La autooxidación se origina al formarse un radical libre en el grupo metileno adyacente al doble enlace que después reacciona con el oxígeno (Robinson, 1987).

**1.1.8. Microbiología de la leche.** La leche además de ser un medio nutritivo, es también un medio favorable desde el punto de vista físico para la multiplicación de microorganismos, y al ser un producto de origen animal sujeto a una gran diversidad de métodos de producción se puede contaminar con un amplio espectro de microorganismos (Robinson, 1987).

Esto exige unas rigurosas normas de higiene tanto en su producción como en su tratamiento; hecho que se reconoce en la mayoría de los países en los que la leche fue el primer alimento de ser el foco de atención de la actual legislación relativa a la higiene de los alimentos (Adams & Moss, 1997).

Las principales fuentes de contaminación de la leche son: Interior del pezón, estiércol, material y equipo, aire, personal, cuerpo de la vaca, agua y otros. Los microorganismos que contaminan la leche se pueden clasificar en banales y patógenos (Villegas De Gante, 2009).

En la granja cuando la leche sale de la ubre de la vaca sana contiene relativamente pocas bacterias y, generalmente, estas bacterias no se multiplican en la leche que se manipula bajo

condiciones normales. Durante el ordeño, la leche está expuesta a microorganismos propios del animal, sobre todo por los existentes en la parte externa de la ubre y zonas próximas a la misma. Bacterias encontradas en el estiércol, en el suelo y en el agua, pueden llegar a la leche a partir de estas fuentes de contaminación (Frazier & Westhoff, 2003).

Según su acción y las correspondientes transformaciones tecnológicas que provocan en la leche y en los productos lácteos, se puede establecer la siguiente clasificación en 3 grupos:

- Microorganismos beneficiosos para la industria: tienen una gran importancia en la industria lechera ya que son necesarios para las fermentaciones, la formación del aroma y de los gases, así como para descomponer las proteínas.
- Microorganismos perjudiciales para la industria: provocan transformaciones indeseadas en los procesos tecnológicos, por ejemplo, coagulación de la leche, variaciones del color y del sabor, descomposición de las proteínas.
- Microorganismos causantes de enfermedades (patógenos): pueden originar en los macroorganismos (el hombre, los animales y las plantas) enfermedades causadas por la producción de toxinas (sustancias venenosas).

Los microorganismos importantes desde el punto de vista de la industria lechera se clasifican de la siguiente manera:

- Bacterias: Se reproducen por división celular.
- Levaduras: Se reproducen por gemación.
- Hongos: Producen micelio.

Otros factores ambientales como la temperatura, el pH y el oxígeno del aire, a parte de los nutrientes y el agua como elemento disolvente, juegan un importante papel para el crecimiento, la reproducción y el metabolismo de estos organismos (Spreer, 1991).

La leche fresca conservada a temperatura de refrigeración durante varios días invariablemente muestra la presencia de varias o de todas las bacterias de los géneros siguientes: *Enterococcus* spp., *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *Lactobacillus* spp., *Microbacterium* spp., *Oerskovia* spp., *Propionibacterium* spp.,

*Micrococcus* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp. y *Listeria* spp., así como representantes de al menos uno de los géneros de coliformes (Jay, 2000).

Los factores que más influyen en la granja sobre la calidad de la leche son los siguientes:

- La alimentación y el alojamiento del ganado.
- El estado sanitario de las vacas productoras.
- Los procedimientos utilizados para la obtención y el tratamiento de la leche (Spreer, 1991).

La mastitis bovina es una enfermedad infecto-contagiosa de la glándula mamaria, en la cual la inflamación se produce como respuesta a la invasión a través del canal del pezón, de diferentes tipos de bacterias, micoplasmas, hongos, levaduras y hasta algunos virus. Sin embargo, las bacterias de los géneros *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp. y algunas bacterias Gram negativas son responsables de más de 90% de los casos (Neira & López, 2016).

En las infecciones por *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*, al comienzo se ven dañadas sólo pequeñas áreas del cuarto afectado, con pérdida funcional de los alvéolos involucrados. Las células de los alvéolos y pequeños conductos mamarios degeneran, mueren y son descamados. Este material más los leucocitos, fibrina, producen coágulos que bloquean a los conductos mayores, impidiendo la remoción de la leche que proviene de áreas aún no funcionales (Neira & López, 2016).

**1.1.9. Métodos de conservación de la leche.** Es importante tener en cuenta, que la leche cruda es un producto que tiene una vida útil extremadamente corta si no es expuesta a tratamientos térmicos adecuados, ya que es un fluido biológico de características bioquímicas complejas susceptible de experimentar pérdidas en su calidad, pues está formada por glóbulos de grasa suspendidos en una solución que contiene el azúcar de la leche (lactosa), proteínas (fundamentalmente caseína) y sales de calcio, fósforo, cloro, sodio, potasio y azufre. No obstante, lo anterior, puede igualmente sufrir cambios deteriorativos, aún después de ser procesada térmicamente debido a recontaminación o por el efecto de la actividad enzimática residual (Richardson, 1981).

Los métodos de conservación de la leche se basan casi todos en procedimientos físicos, ya que los procedimientos químicos afectan la inocuidad de la leche. Los métodos biológicos se usan rara vez por modificar notablemente el sabor de la leche (Veisseyre, 1988).

**1.1.9.1. Filtración.** La leche cruda pasa a través de filtros de tela sintética o de algodón para retirar las impurezas macroscópicas.

**1.1.9.2. Clarificación.** La leche cruda se somete a una centrifugación, lo que permite separar sobre la pared interna del aparato por diferencia de densidades todas las impurezas microscópicas que quedaron después de la filtración.

**1.1.9.3. Bactofugación.** Las bactofugadoras trabajan a una velocidad mayor que la clarificadora y a una temperatura superior a los 60°C, separando no solamente partículas contaminantes, sino también las bacterias esporuladas.

**1.1.9.4. Termización.** Es el tratamiento térmico para prolongar el tiempo de almacenamiento de la leche antes de someterla a una pasteurización en un pasteurizador de placas o tubular. Reduce la biota microbiana de la leche siempre que se enfríe y se mantenga de 0 a 1°C. Se realiza a temperatura mínima de 62°C durante un tiempo de 15 a 20 segundos. Después del tratamiento debe dar positivo a la prueba de fosfatasa alcalina.

**1.1.9.5. Pasteurización.** El objetivo primordial de este tratamiento es la destrucción de todos los agentes microbianos causantes de enfermedades al hombre como tuberculosis, brucelosis, salmonelosis, etc. Y la reducción de aquellos microorganismos saprófitos que son los encargados de afectar la calidad de la leche y sus derivados. Los equipos utilizados son los intercambiadores de calor ya sea de placas o tubulares, el medio calefactor y refrigerante circula de la misma forma, pero en dirección contraria a la leche en contracorriente y por la cara opuesta de cada una de las placas (Neira & López, 2016).

Los parámetros de temperatura y tiempos de pasteurización están determinados por la eliminación del *Mycobacterium tuberculosis*, los tipos de pasteurización más utilizados son:

**Pasteurización Lenta, baja ó LTLT.** Se lleva a cabo normalmente en marmitas de doble pared, tratamiento indirecto, donde la leche se calienta a temperaturas entre 61-63°C por un periodo de 30 minutos (pasteurización discontinua); con su posterior enfriamiento rápido. Se

utiliza para volúmenes pequeños y en la elaboración de quesos. La prueba de fosfatasa alcalina debe ser negativa y la de peroxidasa positiva.

*Pasteurización Rápida, Alta ó HTST.* La leche es calentada a temperaturas entre 72 a 76°C por 15-20 segundos, en pasteurizadores de placas o tubulares. Es el método más utilizado en plantas para volúmenes altos. Su duración depende de la calidad microbiológica de la leche y es aproximadamente de 3 a 5 días. La prueba de fosfatasa alcalina debe ser negativa y peroxidasa positiva (Neira & López, 2016).

*Ultrapasteurización o Pasteurización UAT (UHT).* El tratamiento de UHT está diseñado para obtener un producto comercialmente estéril, que no contenga microorganismos patógenos, banales ni esporas, para que su vida útil sea más prolongada. La leche recibe un tratamiento de 135 a 150°C durante un tiempo mínimo de 2-4 segundos. Una vez ultrapasteurizada la leche, debe ser empacada asépticamente (con barrera a la luz y al oxígeno) para evitar la recontaminación del producto. El empaque es desinfectado con aspersion de peróxido de hidrógeno. La vida útil de está leche depende del tipo de empaque, en empaque plástico y oscuro es aproximadamente de dos meses y en Tetrapack es de 6 meses (Neira & López, 2016).

El proceso UHT debe reducir el contenido de enzimas y bacterias de un producto para obtener un nivel comercialmente estable que asegure la protección al consumidor y extienda su vida útil. Así como el proceso UHT ideal debe lograr un máximo efecto bactericida, también debe provocar un mínimo deterioro químico, destruyendo todas las enzimas resistentes al calor (Perking, 1985).

Dependiendo del sistema de transferencia de calor existen dos técnicas para la elaboración de leches UHT.

*Tratamiento indirecto.* Presenta similitudes con la pasteurización alta realizada en intercambiadores de calor de placas o tubulares.

*Tratamiento directo.* El calentamiento se lleva a cabo por inyección directa de vapor o infusión de vapor. En las plantas donde se utilizan el sistema de calentamiento directo incluyen intercambiadores de placas o tubulares para el precalentamiento de la leche antes del tratamiento UHT (Neira & López, 2016).

El procesamiento UHT destruye virtualmente todos los microorganismos presentes, tanto formas vegetativas como esporas, con cualquier organismo restante incapaz de crecer en el producto bajo condiciones normales de almacenamiento; esto asegura que la leche UHT tenga una larga vida útil sin refrigeración. Sin embargo, tales tratamientos térmicos además provocan cambios en las propiedades nutricionales y organolépticas de la leche. Además, pueden ocurrir cambios adicionales como pérdida de vitaminas, cambios de sabor y color, reacciones del tipo Maillard y gelificación durante el almacenaje (Elliott *et al.*, 2005).

La actividad enzimática residual es debido a la presencia de proteasas y lipasas de origen tanto endógeno como exógeno. Algunos autores Snoeren *et al.* (1979), han descrito la termorresistencia de las proteasas nativas de la leche: de la plasmina y especialmente su precursor que es el plasminógeno. Según Walstra & Jenness (1984), la plasmina resiste la pasteurización y parcialmente también resiste un tratamiento de esterilización del tipo UHT. Sobre las proteasas de origen leucocitario, importante en leches de vaca con mastitis subclínica, hay poca información, aunque también se ha descrito que presentan un cierto nivel de termorresistencia (Verdi, 1989). El componente exógeno lo conforman enzimas tales como proteasas y lipasas, secretadas por bacterias psicrófilas. Estas bacterias se ven favorecidas en su desarrollo por las condiciones de almacenamiento refrigerado previo a los tratamientos térmicos de alta temperatura en planta (Romero & Rojas, 1984). Estas bacterias presentan una marcada termorresistencia aún después de tratamientos térmicos a temperaturas elevadas (Poffe & Metens, 1988; Fox, 1981). Debido a ello, el uso masivo de estanques prediales ha tenido la desventaja de seleccionar una biota bacteriana diferente, como es la psicrófila, la cual genera enzimas de carácter termorresistente que deterioran finalmente el producto, manifestándose en olores y sabores desagradables, producto de la hidrólisis de la materia grasa, y pérdida de textura (apariencia mucilaginosa) producto de la acción proteolítica de algunas enzimas.

La optimización de un proceso industrial, requiere el desarrollo de un buen modelo matemático del sistema, una correcta función objetivo y la aplicación de un algoritmo acorde con las características del problema (Evans, 1982), en resumen, una metodología de optimización debe ser entendible, flexible y automática si se desea que sus resultados sean aplicables (Arteaga *et al.*, 1994).

La búsqueda de un proceso UHT dinámico óptimo, se justifica por los disímiles valores de energía de activación ( $E_a$ ) entre el microorganismo de referencia para el diseño del tratamiento térmico (*Bacillus stearothermophilus*), los factores de calidad (formación de color, retención de vitaminas, pérdida de lisina, etc.) y los factores que determinan la estabilidad del producto en el tiempo (inactivación de lipasas y proteasas). Estos valores disímiles de energía de activación son los que determinan que dos procesos equivalentes desde el punto de vista de la esterilidad comercial no sean equivalentes en cuanto a la inactivación de lipasas, proteasas y tampoco con respecto a los factores de calidad. Incluso mientras más alta es la temperatura de proceso (para procesos de letalidad equivalente), se asegura una mayor retención de calidad, pero simultáneamente se disminuye la inactivación de lipasas y proteasas, lo que se traducirá en una menor estabilidad del producto durante el período de almacenamiento. Esto permite inferir que un proceso a temperatura variable o en etapas, puede simultáneamente satisfacer los requerimientos de esterilización comercial, calidad final y estabilidad temporal (Simpson *et al.*, 2000).

## **1.2. Tipos de alimentación para el ganado**

El objetivo principal de la suplementación es aumentar el consumo total de materia seca (MS) y el consumo de energía respecto de aquellos que se pueden alcanzar con sólo pastoreo (Bargo *et al.*, 2002<sup>a</sup>).

Los objetivos específicos buscados en base suplementación son principalmente:

- Aumentar la producción de leche por vaca.
- Aumentar la carga y la producción de leche por unidad de superficie.
- Mejorar el uso de las praderas a través de mayores cargas.
- Aumentar el largo de las lactancias en épocas de producción de MS limitada.
- Aumentar el contenido de proteína en la leche a través de la suplementación energética (Bargo *et al.*, 2003).

Un alimento rico y bueno contiene más energía que un forraje pobre, de forma que una vaca obtiene de 1 Kg de sorgo, cebada o maíz, tanta energía como de 6 Kg de hierba. Algunos

alimentos son muy pobres y de poco valor para el animal. Por ejemplo, la paja vieja contiene poca energía, la mayor parte no es digerible y se expulsa al exterior como excremento.

- Los forrajes fibrosos son voluminosos y pobres en carbohidratos productores de energía. Son ejemplos de este tipo de alimentos la hierba, los tallos de maíz y de batata.
- Los concentrados son piensos ricos en proteínas y carbohidratos, por ejemplo, los granos.

La respuesta a la suplementación con energía puede estar influenciada por los tipos de carbohidratos y granos suministrados. El maíz, es uno de los suplementos más comúnmente utilizados para la alimentación de vacas a pastoreo, provee de energía extra e incrementa el consumo total de MS comparado con sistemas basados sólo en praderas (Delahoy *et al*, 2003).

El gran tamaño del estómago de los rumiantes con sus cuatro compartimientos permite a éstos vivir fundamentalmente alimentándose de forrajes bastos. Los animales con un sólo estómago necesitan más concentrados que los rumiantes (FAO, 1995).

La ración diaria es la cantidad de alimento que el animal necesita cada día. Una buena ración debe contener todos los nutrientes. Algunos de ellos se encuentran en gran cantidad en determinadas plantas, en la Tabla 8 se muestran los principales nutrientes en las plantas.

Tabla 8. Principales nutrientes en las plantas.

<i>Nutriente</i>	<i>Plantas</i>
Carbohidrato	Maíz, sorgo, trigo, avena, arroz, hierba
Proteína	Alfalfa, trébol, legumbres, hierba
Grasa	Semilla de algodón, semillas de girasol, hierba, maní (cacahuete)

Fuente: FAO, 1995.

Un ejemplo de buena ración para suministrar a los animales que no pastan son 3 partes de maíz, 1 de semillas de girasol y 1 de maní (cacahuete) sin descascarillar. La ración se suministra diariamente en una proporción equivalente al 2-3 % del peso corporal del animal.

**1.2.1. Piensos.** La hierba verde en crecimiento contiene todos los nutrientes, pero en la estación seca tiene pocas proteínas y vitaminas. En esta época deben suministrarse piensos

adicionales para evitar pérdidas de peso y mantener alta la producción de leche, el crecimiento y la reproducción. También puede ser necesario suministrar minerales a los animales (FAO, 1995).

El consumo regulado de pienso es un procedimiento útil para manejar la altura del pastizal. Al ofrecer a los animales, piensos que no es probable que consuman mejor que la hierba pastada (heno, paja, o ensilado en paca grande), el pienso regulado actúa como un suplemento más que como un sustitutivo del forraje pastado. Las vacas que reciben un pienso regulado tras cada ordeño durante una media hora, pueden consumir suficiente sustancia seca adicional para rectificar un menor consumo de hierba del pastizal. El retraso en la vuelta al pastizal tras el ordeño favorece el cierre del orificio del pezón que puede ayudar a reducir la mastitis. Si es muy bajo el aporte de hierba fresca y conservada, entonces puede utilizarse como pienso regulado una mezcla de 3 partes de gramos húmedos de cervecera con una parte de paja con álcalis sobre la base de su peso fresco (Chamberlain & Wilkinson, 2002).

El mejor pienso suplementario son las tortas, la más barata de las cuales es el material de desecho de la elaboración del coco, del maní, de la semilla de algodón y el aceite de palma. Se puede emplear lo que se disponga en la zona (FAO, 1995).

Es necesario, por lo tanto, considerar además de la cantidad de energía a suplementar mediante los concentrados, el tipo de carbohidrato suplementario (grano) y el método de aporte. En las raciones basadas en praderas ocurre una falta de sincronía entre los aportes de energía a nivel ruminal en relación a la liberación del N en el rumen. La sincronización de este proceso se sugiere como el medio para mejorar la captura de la proteína degradable en el rumen (PDR), la síntesis de proteína microbiana y por consiguiente la producción animal (Muller, 1999).

Es imposible fabricar piensos de alta calidad con ingredientes de baja calidad. Los granos deben estar libres de mohos, insectos, tierra, piedras y otros residuos varios cuando se almacenan. Los ingredientes se deben obtener de fuentes inocuas. El monitoreo de los ingredientes de piensos debe incluir la inspección y el muestreo, así como el análisis de sustancias indeseadas mediante protocolos a base de riesgos. Los ingredientes de piensos deben cumplir con las normas aceptables y, en caso de que corresponda, con las previstas en

la ley en cuanto a los niveles de patógenos, micotoxinas, plaguicidas y sustancias no deseadas que pudieran dar surgimiento a peligros a la salud del consumidor (FAO, IFIF, 2014).

**1.2.2. Heno.** El heno es la hierba seca. El mejor se prepara con hierba joven. Se corta la hierba y se deja secar varios días al sol volteándola para estar seguros de que está completamente seca al almacenarla y hasta que se necesite. No conviene hacer heno en época lluviosa (FAO, 1995).

Phillips (1988) señala que el uso de heno en animales en pastoreo, se ha visualizado como un medio de aumentar el consumo de MS cuando la pradera es restrictiva, y como única manera de aumentar el consumo de fibra durante la primavera. Las respuestas observadas en cuanto a producción y composición láctea son muy variables y dependen según dicho autor de la disponibilidad de forraje, y de la época de pastoreo, lo cual condiciona su contenido en fibra. Cuando la pradera está disponible *ad libitum*, la oferta de heno tiene muy poco efecto sobre el consumo total de MS; toda vez que la TS es de aproximadamente 1,0 Kg/Kg. Debido al menor consumo de pradera la tasa de utilización disminuye, a menos que se aumente la presión de pastoreo. En primavera las TS tienden a disminuir, coincidiendo este fenómeno con una menor ingestión de fibra. Aun así, el consumo de heno es bajo teniendo muy poco efecto en la relación acético: propiónico. En algunos experimentos revisados por este mismo autor, el aporte de heno ha permitido disminuir el declive del contenido de grasa láctea que generalmente se observa durante la primavera. Sin embargo, este hecho se asocia por lo general, a una disminución en el contenido proteico. En las experiencias conducidas durante el verano, cuando el contenido de fibra de la pradera es alto, el ofrecer heno tiene un efecto muy variable sobre la producción dependiendo éste principalmente de la cantidad de pradera disponible.

Bargo *et al.*, (2003) revisaron cinco ensayos en los cuales se aportó heno en complemento a concentrados en vacas lecheras de alta producción a pastoreo o como único suplemento, proporcionado en diferentes formas (heno largo, picado, pellets o cubos de heno) y cantidades (0,9 a 3,9 Kg/d). Los autores concluyeron que las diferentes formas y cantidades redujeron el consumo de MS de la pradera en un promedio de 3,5 Kg/d. El efecto de la suplementación sobre el consumo total de MS, dependió de la TS (0,81 a 0,97 Kg pradera/Kg de heno).

Además, no se encontró respuesta en producción en lactancias tempranas, cuando el heno fue suministrado largo, en cubos o pellets o picado y agregado al concentrado. Tampoco se afectó el contenido de grasa láctea, a excepción de un ensayo donde se utilizó heno largo disminuyendo contenido de ésta. Por último, ningún ensayo reportó cambios en el contenido de proteína.

**1.2.3. Ensilados.** El ensilaje, es un alimento que resulta de la fermentación anaeróbica de un material vegetal húmedo mediante la formación de ácido láctico, para suplementar al ganado durante períodos de sequía, garantizando la alimentación de los animales durante todo el año (Filippi, 2011).

La práctica del ensilaje contrarresta el efecto negativo que provocan los períodos secos en la producción bovina, como es la pobre disponibilidad de forrajes tanto en cantidad como en calidad, creando una disminución en la producción de leche y carne. El uso del ensilaje en el trópico interesa por varias razones. A medida que los países progresan, los agricultores presentan nuevas aspiraciones y el productor ya no acepta que la cosecha diaria de forraje sea la única opción para alimentar a sus animales. Los productores buscan alternativas mediante la práctica del ensilaje que les permitan disponer de alimentos baratos y que puedan ser almacenados y utilizados con facilidad (Wong, 2001).

El ensilaje ofrece la posibilidad de asegurar alimentos durante épocas de alta producción para conservarlos para su empleo futuro, especialmente en períodos de escasez (Wong, 2001).

Cuando se hace un silo, se puede aprovechar el pasto verde de la época lluviosa, principalmente pastos de cortes como el King grass común, pasto Camerún, maíz, sorgo y caña. De igual forma, se evita las pérdidas en la finca y se dispone de alimento en cantidad y calidad adecuado, sosteniendo la producción normal de la explotación durante todo el año (Sosa *et al.*, 2005).

Los suplementos por lo general, son más costosos que la pradera en sí y se utilizan principalmente durante los períodos de déficit de ésta. En el pasado los más utilizados eran los provenientes de pradera conservada (heno y ensilaje) y cultivos. Hoy en día, el ensilaje

de maíz es usado extensamente y también subproductos de las industrias procesadoras de alimentos en general (Holmes *et al.*, 2002).

El ensilaje de maíz puede ser un excelente forraje para complementar las praderas, ya que suministra energía extra a los microorganismos ruminales, ayudando a una mejor utilización del alto contenido de N presente en épocas de activo crecimiento (primavera) (Muller *et al.*, 2003).

La utilización de este tipo de ensilaje se ha efectuado en vacas a pastoreo, en la mayoría de los casos como único suplemento o por otra parte, utilizándolo además de un concentrado en cantidades variables (3,2 Kg/d vs. 8,7 Kg/d). Phillips (1988), analizó la suplementación con este forraje bajo distintas condiciones. Dicho autor señala que cuando este alimento se aporta en una proporción de hasta un 33 % de la MS, incrementa el consumo total; efecto que está condicionado en gran medida por la disponibilidad de la pradera. Además, se han observado respuestas importantes en producción de leche cuando la disponibilidad de pradera es restrictiva, pero consistentemente se ha visto que ésta disminuye cuando la pradera está disponible *ad libitum* y el ensilaje de maíz constituye una alta proporción de la dieta.

La técnica de la preparación del ensilaje favorece el manejo y uso integral de los recursos en la relación suelo-planta, promueve el uso de alimentos de la región, reduce la importación de concentrados y, por consiguiente, la fuga de divisas nacionales, además de ser una alternativa para épocas de crisis en la producción de pastos (Wagner & Sánchez, 2013).

Se deben tomar en cuenta tres condiciones esenciales antes de decidir iniciar un programa de ensilaje (FAO, 2001):

- La necesidad objetiva y concreta para hacer uso del ensilaje.
- Que se disponga de suficiente cantidad de forrajes u otros productos de buena calidad para ensilar.
- Tener condiciones para hacer un buen ensilaje.

Wagner & Sánchez (2013), propusieron las siguientes características para un ensilaje de calidad.

- Buen color (amarillo, marrón o verduzco)

- Buen olor (avinagrado)
- Textura (no babosa)
- pH de 4.2 o menor

La adecuada conservación del ensilado para la obtención de un forraje altamente nutritivo depende de la fermentación controlada del forraje en el silo. La regulación precisa de aire y la temperatura debe ser menor a 30°C (Bethancourt & García, 2009).

**1.2.3.1. Fermentación en el silo.** Al entrar en el silo el oxígeno presente en la masa de forraje recolectada y compactada, se agota mediante la respiración de las plantas y el crecimiento de bacterias anaerobias. La fermentación prosigue en ausencia de oxígeno, y este proceso es el principal responsable de la acidificación característica del ensilado almacenado (Chamberlain & Wilkinson, 2002).

La fermentación primaria en el silo supone la producción de ácido láctico como principal producto final. La fermentación secundaria tiene lugar cuando es insuficiente el ácido producido por la fermentación primaria para reducir el pH por debajo de un nivel crítico de pH 4.5, aproximadamente. Esto puede suceder si el forraje se encuentra demasiado húmedo, o si es demasiado bajo el contenido de azúcar, o si es demasiado elevada la capacidad tampón del cultivo. Las bacterias responsables de la fermentación secundaria son principalmente los *Clostridios*. Estas bacterias son anoxigénicas estrictas y pueden convertir el ácido láctico en butírico, o pueden degradar proteínas, péptidos y aminoácidos hasta aminas y amoníaco, dependiendo de la estirpe particular de *Clostridios* que se desarrolla. *Clostridium* spp. medran en condiciones de humedad, por lo que es posible que el pH alcance un valor elevado y estable en un ensilado seco y sin evidencia de fermentación secundaria (Chamberlain & Wilkinson, 2002).

El ensilado bien conservado contiene ácido láctico como producto principal de la fermentación de los carbohidratos hidrosolubles, principalmente fructosa y glucosa (Chamberlain & Wilkinson, 2002).

El forraje verde debe contener de 60 a 70 % de humedad. Para determinar su punto óptimo, el forraje se pica al tamaño de partículas que se va a ensilar y se recomienda presionar una cantidad que abarque las dos manos por treinta segundos. Si el forraje deja húmeda las manos

y mantiene la forma ejercida por la presión, indica que tiene un contenido ideal de humedad (Wagner & Sánchez, 2013).

El silo es una estructura a prueba de aire y agua (Sosa *et al.*, 2005) que permite la conservación del pasto y el forraje, manteniendo su condición jugosa y su color verde sin disminuir el valor nutritivo. Por ejemplo, se puede utilizar un contenedor grande, redondo, de ladrillo o metálico, con lonas, en bloques o con cualquier material que permita un cierre hermético.

El valor nutritivo del producto ensilado es similar al del forraje antes de ensilar. Sin embargo, es posible añadirle nutrientes, como almidones y azúcares, que pueden acelerar el proceso de aumentar el valor nutritivo del producto. El ensilado debe ser siempre empacado en forma compacta y mantenido bajo condiciones anaeróbicas, de tal forma, que se favorezca una buena fermentación (Bethancourt & García, 2009).

Se puede hacer uso de una gran variedad de recipientes tales, como: tambores de metal o plástico; tubos de concreto de 2 m de diámetro y 2 m de altura, bolsas plásticas para empaque comercial de un espesor de 2 mm, como las usadas para envasar fertilizantes. En grandes explotaciones existen silos con capacidades de 100 m<sup>3</sup> o más, altamente mecanizados que son llenados y vaciados mecánicamente. Esto permite aumentar la eficiencia en el empleo del tiempo y reduce el costo de mano de obra (Wagner & Sánchez, 2013).

En fincas pequeñas, con pocos animales, recipientes con capacidades de hasta 200 litros que se llenan manualmente, suelen ser silos muy eficaces. Al usar bolsas, se debe sellar la boca y atarla con hilo para mayor seguridad, apilar las bolsas en forma piramidal sobre una plataforma firme de tierra o cemento y protegerlas con un cobertor (FAO, 2001).

Existe una gran diversidad de silos:

- Permanentes o temporales
- Verticales y horizontales
- De anillo
- Trinchera
- Cajón
- Tanques

- Bolsas de hilos (sacos).

**1.2.3.2. Silos verticales.** Pueden hacerse de concreto, zinc, madera, metal o plástico. Deben de tener forma cilíndrica para facilitar la compactación. Son ideales para asegurar una buena compactación, debido a la gran presión que se acumula en su interior a medida que se agrega forraje y aumenta la altura del ensilado. Esto protege el ensilaje de quedar expuesto al aire durante el proceso de ensilado y aprovechamiento del silo.

**1.2.3.3. Silos horizontales o Cajón.** Este tipo de silo es el más usado y, generalmente, se construyen sobre la superficie del suelo. Puede tener forma de trinchera (cajón) paredes laterales de concreto o de madera.

**1.2.3.4. Silos trinchera.** Estos silos, en su variedad de zanja, consisten en una excavación en el suelo con un plano inclinado en la entrada del silo, para facilitar el acceso durante el ensilado y su explotación. Cuando su tamaño es pequeño, es decir, con una capacidad menor a 2 m<sup>3</sup>, su forma puede ser un paralelepípedo con base rectangular. Entre las desventajas del silo en zanja están: la necesidad de recubrir sus paredes para evitar el contacto con la tierra y de tomar precauciones para asegurar que no penetre agua dentro del silo (Wagner & Sánchez, 2013).

**1.2.3.5. Desventajas del ensilaje.** Si no se tiene cuidado con el manejo de las condiciones que favorecen la acción de las bacterias ácido lácticas, respecto al mantenimiento de anaerobiosis, temperatura menor a los 30°C y la disponibilidad de carbohidratos, las pérdidas del alimento pueden ser cuantiosas o su valor nutricional bajo. El ensilaje no tiene un valor de mercado establecido, por el corto período de vida que tiene cuando se abre el silo. Normalmente, el ensilado no debe exceder el 50 % de la dieta (Argueta, 2005).

**1.2.3.6. Material para el ensilaje.** Todos los pastos pueden ser ensilados, pero para esto se necesita que cumplan con los requisitos de calidad deseada y se encuentren en excedentes, de lo contrario es recomendable que se ensilen sólo aquellos que se utilizan como suplementos o complementos de la ración diaria. Por ejemplo, pastos de corte como maíz (*Zea mays L.*), sorgo (*Sorghum vulgare*), yerba merker (Super merker, elefante, merker morada y merker enana), entre otros. Para el caso del maíz, el elevado contenido en almidón

del grano hace que este forraje tenga un contenido energético superior al heno o al forraje de sorgo y que, sea un buen material para ensilar (Wong, 2001).

También, se pueden ensilar leguminosas asociadas con gramíneas, subproductos de cosechas agrícolas y desechos de industrias (pulpa de cítricos y pulpa de café, entre otros). El corte para ensilaje debe efectuarse al principio del período de crecimiento de la planta para lograr un buen nivel de proteína y un alto valor de digestibilidad. Sin embargo, en ese momento el contenido en agua de la planta también es alto, lo cual produce un efecto adverso para una buena fermentación del ensilaje (Quiroz, 2009).

Dentro de la parcela, el pasto debe ser cortado de 5 a 15 cm del suelo, de manera que favorezca el rebrote de la planta. El corte puede efectuarse de forma manual (machete) o mecánica (guadaña) (Sosa *et al.*, 2005).

Wagner & Sánchez (2013), propusieron los siguientes pasos para ensilar forraje.

- El forraje a ensilar debe tener un alto valor nutritivo.
- El forraje no debe estar contaminado con suelo.
- El forraje deberá ser triturado en trozos no mayores a 2 cm para facilitar la compactación y reducir la cantidad de aire retenido en el forraje.
- Depositar el forraje en el silo en capas y compactar de inmediato (capas de 20 cm).
- Luego de compactado el material, esparcir una capa de sal (un 0.5 % de urea disuelto en melaza o en agua como enriquecedor proteico energético) en toda la superficie del silo, con la finalidad de evitar la proliferación de hongos y bacterias. En el uso de subproductos de cosechas es recomendable usar 0.5% de urea y 2% melaza tomando en cuenta el costo por toneladas.
- Antes de sellar el silo, para impedir la penetración de aire y de agua, se debe expulsar el máximo de aire del interior del silo.
- Cubrir el silo con una lona cubierta de tierra u otro material que la proteja.
- El ensilado y el sellado del silo se debe realizar en el tiempo más breve posible.
- Durante el uso del silo para alimentar los animales, el área de ataque del silo debe ser reducido para que la superficie expuesta al aire sea pequeña. Esta operación debe ser rápida y se debe sellar el silo después de cada uso.

El énfasis que se hace sobre la conservación de forrajes en países tropicales está relacionado con la falta de uniformidad en la producción de forrajes durante el año. Esto se debe a las variaciones climáticas que imperan en las zonas tropicales (Betancourt & García, 2009).

**1.2.4. Forrajes.** Delaby *et al.*, (2003) indican que el aporte de forrajes conservados no produce un incremento en la respuesta desde el punto de vista de la producción y no se justificaría sino, sólo en el caso de escasez de pradera (por ejemplo, en verano, debido a sequía estival) con el propósito de aumentar la ingestión total o de prolongar la estación de pastoreo.

El forraje es el componente más importante en la dieta de la vaca lechera; experimenta dos tipos de crecimiento: vegetativo y reproductivo. El crecimiento vegetativo, conocido también como retoño, consiste en el desarrollo de nuevos brotes a nivel del suelo que finalmente se convierten en plantas nuevas. El crecimiento reproductivo consiste en el alargamiento del tallo y el desarrollo de la cabeza floral (Chamberlain & Wilkinson, 2002).

Los factores clave que influyen sobre el rendimiento anual de los forrajes son: Las especies forrajeras, la clase de tierra, contenido de nitrógeno (N) del suelo y fertilizantes nitrogenados, fósforo y potasio, densidad del pastizal, estrategias de siega y pastoreo (Chamberlain & Wilkinson, 2002).

La hierba consumida en los prados es el alimento más barato para la vaca lechera, por lo que es importante que sea tan elevado como sea posible. Esto supone que deberá desarrollarse una estrategia de pastoreo para un determinado rebaño. La estrategia adoptada será un reflejo de la clase del terreno, del diseño de los campos de la explotación y del nivel deseado del rendimiento del rebaño (Chamberlain & Wilkinson, 2002).

En algunas comunidades, la gente corta tradicionalmente las ramas de los árboles para alimentar al ganado. Algunos árboles son mejores que otros como forraje. Los mejores son los árboles de la familia de las leguminosas (*Leucaena*).

Estos árboles pueden crecer en filas separadas unos 4 metros. Entre sus filas pueden crecer otras cosechas (cultivo intercalado). Las ramas y hojas de los árboles pueden cortarse todo el año y emplearse como forraje.

El empleo de estos árboles como forraje es beneficioso porque:

- Sus hojas proporcionan un buen alimento a los animales durante todo el año.
- Las hojas descompuestas proporcionan a otras cosechas un abono (fertilizante natural) rico en minerales.
- Los árboles proporcionan leña para combustible, madera y una protección contra el viento.
- Los árboles evitan la erosión y mejoran la fertilidad del suelo (FAO, 1995).

En la estación seca, la hierba escasea y es pobre en nutrientes. Cuando la hierba abunda en la estación húmeda puede segarla y almacenarla hasta que la necesite en la estación seca. La hierba puede conservarse como heno o como producto ensilado.

Otros métodos de alimentación del ganado que se utilizan en muchos países:

- Alimentación con paja tratada con urea. La paja es un forraje pobre en nutrientes para rumiantes, pero si se humedece con urea y se mantiene tapada una semana resulta más nutritiva.
- Bloques de melaza- urea- minerales. Estos bloques son un buen suplemento para los rumiantes que los lamen y toman así sus nutrientes (FAO, 1995).

Si no se tiene cuidado con el manejo de las condiciones que favorecen la acción de las bacterias ácido lácticas, respecto al mantenimiento de anaerobiosis, temperatura menor a los 30°C y la disponibilidad de carbohidratos, las pérdidas del alimento pueden ser cuantiosas o su valor nutricional bajo. El ensilaje no tiene un valor de mercado establecido, por el corto período de vida que tiene cuando se abre el silo. Normalmente, el ensilado no debe exceder el 50% de la dieta (Argueta, 2005).

**1.2.5. Contaminación del alimento.** La contaminación del alimento para animales es un grave problema que afecta a los granjeros, a la industria ganadera, a los fabricantes de alimento y los procesadores de alimento (Channalah, 2012).

En la mayoría de los casos la principal fuente de contaminación microbiana y de toxinas de los alimentos son las materias primas. La prevención de los contaminantes que entran en

la producción de alimentos es una mejor práctica que intentar tratar los alimentos contaminados (Channalah, 2012).

Las primeras fuentes de peligros microbiológicos en los piensos son los pastizales contaminados, los forrajes y las harinas proteicas animales y vegetales suministradas directamente a los animales (FAO, IFIF, 2014).

**1.2.5.1. Contaminación bacteriana.** La actividad y los derivados (material fecal) de plagas de insectos, aves y roedores en productos almacenados en el medio ambiente de alimentación también pueden incrementar la posibilidad de contaminación bacteriana patógena (Channalah, 2012).

European Food Safety Authority EFSA, (2008) realizó una evaluación de riesgos microbiológicos (MRA) en piensos identificando y caracterizando los peligros microbiológicos: *Salmonella* spp., *Listeria* spp., *Escherichia coli*, *Clostridium* spp., *Campylobacter* spp.

*Salmonella* spp., es aún un motivo de preocupación para la salud humana en todo el mundo. Está demostrado que la infección en los animales tiene un impacto directo en los seres humanos debido a su transmisión a través de los alimentos de origen animal. Los piensos contaminados pueden representar una importante vía de exposición a *Salmonella* spp. No obstante, en la Reunión de Expertos se dispuso de pocos datos científicos sobre la correlación entre piensos contaminados e infección del ganado por la misma cepa de *Salmonella* spp. y la contaminación de la carne, leche y huevos obtenidos de esos mismos animales (FAO, IFIF, 2014).

La contaminación con *E. coli*, incluyendo *E. coli* O157:H7, es otro de los principales contaminantes bacterianos patógenos en productos para la alimentación animal. Existe preocupación con respecto a la transferencia de estos patógenos de los animales de consumo a los seres humanos a través de la cadena alimenticia (Channalah, 2012).

En algunos países afectados por la brucelosis, los rumiantes que padecen la infección pueden parir o abortar en los campos donde pastan o de donde se cosecha el pasto que se usa como pienso. Es bien sabido que las placentas de los animales infectados contienen altos niveles de microorganismos de Brucela. Si se suministra forraje contaminado a los animales

lecheros, estos pueden excretar microorganismos en la leche. Si la leche no se somete a un proceso de pasteurización antes del consumo humano, puede representar un riesgo para la inocuidad alimentaria (FAO, IFIF, 2014).

**1.2.5.2 Contaminación fúngica.** Los mohos pueden presentarse en la alimentación del ganado, estos forman esporas mediante reproducción sexual, y según esto, se clasifican como mohos perfectos o imperfectos, respectivamente. Los mohos forman numerosas esporas asexuales, y dependiendo del tipo pueden formar conidias, esporangiosporas y artrosporas. Entre los mohos importantes en alimentos, las especies de *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. forman conidias. Una spora en un ambiente adecuado germina y forma una hifa y reanuda el crecimiento para producir el tallo (Ray & Bhunia, 2010).

**1.2.5.3 Contaminación con micotoxinas.** Además, a menudo los alimentos para animales están contaminados con micotoxinas que son compuestos tóxicos que producen ciertas especies de hongos filamentosos que se encuentran en granos y productos contaminados para la alimentación animal tales como: aflatoxinas, fumonisinas, deoxinivalenol, etc.; las cuales son capaces de provocar enfermedades y trastornos en los animales afectando a la industria ganadera. Aunque es difícil la trazabilidad de la contaminación de los alimentos terminados a su fuente inicial, la fuente de los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos se vincula al consumo de alimentos contaminados (Channalah, 2012).

Teniendo en cuenta que los alimentos para animales se producen en pequeñas cantidades a nivel de granja y comercialmente en grandes cantidades en fábricas de alimentos. Las materias primas son la principal fuente de micotoxinas en los productos alimenticios. En general, el uso de materias primas de granos de bajo costo y bajo grado es el motivo de los productos contaminados para alimentación animal (Channalah, 2012).

La presencia de micotoxinas tales como: aflatoxinas, fumonisinas, tricotecenos (incluyendo desoxinivalenol), ocratoxina A y zearalenona en los alimentos para animales en niveles superiores a los límites de tolerancia puede afectar gravemente la economía del país (Channalah, 2012).

Los agricultores deben tener presente que los animales alimentados con piensos contaminados por aflatoxinas no muestran signos clínicos de aflatoxicosis. Los piensos que presentan mayor susceptibilidad a la aflatoxina son los cereales (en particular, el maíz), las semillas de algodón, los cacahuets y la copra. La contaminación por aflatoxinas no es homogénea, por lo que es muy importante aplicar un método de muestreo adecuado. No deben suministrarse piensos con una significativa contaminación por aflatoxinas ni a las vacas lecheras u otros animales de los que se obtiene leche para consumo humano ni a otros animales destinados a la producción de alimentos (FAO, IFIF, 2014).

La aflatoxina B1 (AFB1) es la que tiene mayor potencia y actividad carcinogénica a nivel hepático, fetal teratogénica y de ciclo celular mutagénica. La aflatoxina B2 es similar a la B1, excepto por la saturación del primer anillo de furano; es carcinogénica, pero menos tóxica y menos frecuente que la B1. Las propiedades carcinogénicas de ambas se han demostrado en truchas arcoiris, ratas, ratones, cerdos, vacas, caballos, ovejas, patos, pavos, faisanes y pollos (Bogante *et al.*, 2004).

Los tricotecenos (desoxinivalenol, toxina T-2 y otros) (producidos por *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* y *F. sporotrichioides*) causan distintas afecciones según la toxina específica y la cantidad ingerida. El desoxinivalenol, también llamado vomitoxina, es un contaminante frecuente del trigo, tiene propiedades inmuno y neurotóxicas, y es 70 veces menos tóxico que la toxina T-2 (Summerell *et al.*, 2001). Los tricotecenos en su mayor parte son destruidos en el rumen. El rango de los residuos de toxina T-2 en carne y vísceras vacunas es 8,8-18,5 µg/Kg y en leche 11,4 µg/Kg para animales que consumieron forraje con 31 mg/Kg (Who, 1990). El nivel máximo admisible de toxina T-2 y HT-2 es 100 y 25- 100 µg/Kg respectivamente, mientras que el de desoxinivalenol es 5.000-10.000 µg/kg (Sanchis *et al.*, 2000). Cabe resaltar que la toxicosis en humanos fue observada en Ucrania (World Cancer Research Fund, 1997) y varias regiones de Asia (Edwards *et al.*, 2002).

Los niveles de contaminación de productos agrícolas con fumonisinas pueden alcanzar hasta 330.000 µg/Kg, principalmente en los destinados al consumo animal. El nivel medio en maíz de exportación es menor que 300 µg fumonisina B1/Kg (Shephard *et al.*, 1996). La “International Agency for Research on Cancer” clasificó a estas micotoxinas como posibles cancerígenos en humanos (World Cancer Research Fund, 1997).

En Argentina, la ingesta media diaria estimada de fumonisina B1 es 0,2 µg/Kg de peso corporal y este valor debería aumentarse un 40% si se consideran fumonisinas totales. La ingesta diaria por persona en Latinoamérica oscila entre 0,2 y 17.000 µg (Bolger *et al.*, 2001). Hay una correlación positiva entre el contenido de esta toxina y el cáncer de esófago en zonas de China (Sanchis *et al.*, 2000).

Mientras que los psoralenos originan fotodermatitis, la zearalenona (producida por *F. graminearum* y *F. culmorum*) es hiperestrogénica (Smith & Henderson, 1991). La “Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives” (JECFA) estableció una ingesta máxima tolerable de zearalenona de 0,5 µg toxina/Kg de peso corporal/día (Eriksen *et al.*, 2000). La ocratoxina A (producida por *Penicillium verrucosum*) también es considerada como posible cancerígena y los valores máximos en granos alcanzan hasta 5.000 µg/Kg. La JECFA estimó tolerable una ingesta semanal máxima de 0,1 µg/Kg de peso corporal y se establecieron límites de 1 a 50 µg/Kg para el consumo humano y veinte veces mayor para los animales (World Cancer Research Fund, 1997).

En la Tabla 9 se puede observar un resumen de las afecciones en el hombre provocadas por la ingesta de las micotoxinas.

Tabla 9. Afecciones en el hombre provocadas por la ingestión de micotoxinas.

<i>Micotoxinas</i>	<i>Afecciones</i>
Aflatoxina B1	Inducción de cáncer hepático, se excreta por leche como aflatoxina M1, pasa al feto (World Cancer Research Fund, 1997).
Aflatoxina M1	Inducción de cáncer hepático, excretada en leche materna, pasa al feto (Jonsyn <i>et al.</i> , 1995)
Alcaloides del ergot	Ergotismo convulsivo; ergotismo gangrenoso necrótico (Doyle <i>et al.</i> , 1997)
Citroviridina	Beriberi cardíaco agudo (Smith & Henderson, 1991).
Desoxinivalenol	Diarrea, náuseas, vómitos, cefalalgia, dolor abdominal, anorexia, escalofríos, convulsiones, vértigo; inmunotoxicidad (Doyle <i>et al.</i> , 1997).
Fumonisinias	Lesiones precancerosas en esófago (Doyle <i>et al.</i> , 1997).

<i>Micotoxinas</i>	<i>Afecciones</i>
Moniliformina	Cardiopatía endémica en China (Summerell, <i>et al.</i> , 2001).
Ocratoxina A	Nefropatía endémica de los Balcanes, Túnez y Escandinavia; excreción por leche materna, pasa al feto; tumores en tracto urinario (Jonsyn, <i>et al.</i> , 1995)
Psoralenos	Dermatitis por contacto, eritema y ampollas (Smith & Henderson, 1991)
T-2 y HT-2	Aleukia tóxica alimentaria: sensación de quemazón en boca y garganta; vómitos, diarrea y dolor abdominal; hemorragias; destrucción de médula ósea; inmunosupresión; muerte (Doyle <i>et al.</i> , 1997)
Zearalenona	Cambios puberales precoces (Doyle <i>et al.</i> , 1997)

Fuente: Carrillo & Audisio, 2007.

Los ingredientes que no se deben usar en la alimentación animal son: Los que estén identificados como probables introductores de agentes zoonóticos (que incluye a las encefalopatías espongiformes transmisibles o TSE) a la población que se va a sacrificar, o que contengan sustancias químicas (por ejemplo, medicamentos, veterinarios o plaguicidas) o contaminantes que pudieran resultar en residuos en la carne a niveles que hagan que el producto no sea inocuo para su consumo (FAO, IFIF, 2014).

### **1.3. *Aspergillus* spp.**

**1.3.1. Generalidades.** Pertenece a la división Deuteromycota, clase Hyphomycetes, orden de los Hyphomycetales y familia Moniliaceae (Ortega, 2002). *Aspergillus* spp. se caracterizan por tener micelio vegetativo compuesto de hifas septadas, ramificadas, incoloras, estructura conidial desarrollada como pedicelos y cabezuelas de origen en células hifales especializadas (células del pie), de paredes gruesas, las cuales producen conidiofóros como ramas aproximadamente perpendiculares al eje longitudinal de la célula del pie (García & Verástegui, 2001).

La clasificación se hace por las estructuras de reproducción y color de sus colonias. Los miembros de este género son aerobios de crecimiento rápido, la colonia es inicialmente plana, blanca que crece haciéndose algodonosa. A medida que envejece y va apareciendo la

esporulación, el centro de la colonia se va tornando de color distinto según la especie (Arias & Piñeros, 2008).

El género *Aspergillus* comprende alrededor de 180 especies, son hongos filamentosos, hialinos y ubicuos. Se reproducen asexualmente por conidias que se originan de grupos de fiálides localizadas en un ensanchamiento terminal del conidióforo (vesícula) Figura 1. (Méndez, 2015).

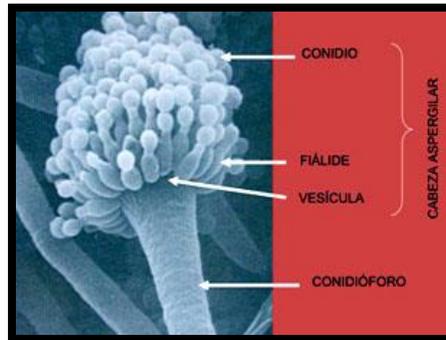


Figura 1. Estructuras de reproducción asexual de *Aspergillus spp.*

Cabeza aspergilar donde se observa el conidióforo, vesículas, fiálides y cadenas de filococonidias, estructuras todas ellas que intervienen en la reproducción asexual de los hongos de este género.

Fuente: Méndez, 2015.

*Aspergillus spp.* se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, pudiéndose aislar de una extensa gama de sustratos; ha sido estudiado desde hace siglos debido a sus propiedades industriales, de deterioro, biotecnológicas y efectos negativos en la salud humana y animal (Alvarenga *et al.*, 2012).

La identificación a nivel de género es sencilla mediante características morfológicas; sin embargo, a nivel de especies se complica. La taxonomía de *Aspergillus spp.*, se fundamenta hasta el siglo pasado, en características fenotípicas. En la actualidad se recomienda el llamado enfoque polifásico, basado en la utilización de caracteres morfológicos en combinación con características bioquímicas y moleculares para dar perfiles de especies mucho más detallados (Klich & Samson, 2007).

En (1965), Rapper y Fennell, publicaron el libro, "The genus *Aspergillus*", básico para la identificación de estos hongos durante la mayor parte del siglo pasado. Dicha publicación, aceptaba 132 especies subdivididas en 18 grupos. Actualmente, se consideran más de 180

especies anamórficas aceptadas, que presentan teleomorfos en 9 géneros diferentes. *Aspergillus* se subdivide en 7 subgéneros que a su vez se dividen en grupos (Samson & Pitt, 2000).

Aproximadamente, 50 nuevas especies de *Aspergillus* fueron descritas a partir de 2000, basándose en características morfológicas y moleculares siendo muchas de ellas imposibles de diferenciar morfológicamente (Klich, 2009). Numerosas especies importantes de *Aspergillus* se hallan descritas en bases de datos como Mycobank.org o Index Fungorum.

Los criterios morfológicos utilizados para la clasificación de las especies del género *Aspergillus* y sus teleomorfos, se basan en la utilización de medios de cultivo diferenciales y temperaturas de incubación que permitan el desarrollo de características útiles en su identificación (Rodríguez *et al.*, 2007). Las principales características macro y microscópicas utilizadas en la clasificación a nivel de especie en estos hongos incluyen el diámetro de las colonias, coloración del anverso y reverso de las colonias, presencia de esclerocios, gotas de exudado y pigmento difusible, textura de las colonias, disposición de las métulas o fiálides sobre la vesícula, medidas de los estipes, vesículas, ornamentación y color de las conidias, de las células de Hülle y de las ascosporas (Rodríguez *et al.*, 2007).

En estos hongos se ha descubierto su fase de reproducción sexual y se ubican dentro de la división Ascomycota. Son organismos heterotálicos y la unión de hifas de sexo diferente origina la formación de ascas que contienen ascosporas, tanto las ascas como las ascosporas están contenidas en un cuerpo fructífero que puede ser redondo y cerrado que se conoce como cleistotecio, o bien, puede tener forma de pera llamado peritecio, como se aprecia en la Figura 2 (Alvarenga *et al.*, 2012).

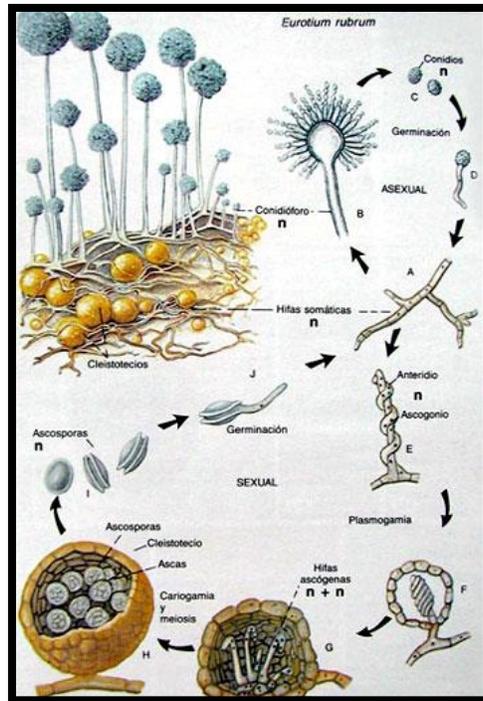


Figura 2. Reproducción sexual y asexual de *Eurotium rubrum*.

En este caso, las ascas y ascosporas se encuentran dentro de un cleistotecio.

Fuente: Herrera & Ulloa, 1998.

Aunque conocer la forma de reproducción sexual es de gran utilidad para estudios taxonómicos, fisiológicos y de reproducción, las enfermedades causadas por estos hongos se presentan cuando el hongo se reproduce asexualmente (Alvarenga *et al.*, 2012).

Los hongos de este género, tienen gran potencial biótico y son degradadores activos del material orgánico y en consecuencia muy útiles en la ecología del planeta. Sin embargo, causan enfermedades en el humano y animales por tres mecanismos diferentes:

**Hipersensibilidad.** Esta puede ser congénita y en estos casos *Aspergillus* spp. sólo actúan como lo harían otros antígenos ambientales, por ejemplo, polvo o pólenes ocasionando desde una rinitis alérgica, hasta un asma crónico severo, los pacientes tienen concentración elevada de IgE. En otros casos, las personas pueden hacerse hipersensibles a los hongos de este género, si trabajan en sitios con altos niveles de contaminación por el agente, como puede ocurrir en los silos donde se almacenan granos en malas condiciones de humedad y temperatura, en estos casos se incrementa la concentración de IgG (Alvarenga *et al.*, 2012).

Intoxicación por ingesta de metabolitos fúngicos (micotoxicosis). En estos casos, sustancias como las aflatoxinas producidas durante el crecimiento de *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius* cuando se desarrollan abundantemente sobre alimentos, pueden causar daños a diversos órganos, aun cuando al momento de la ingesta, el hongo ya no esté presente. Se ha demostrado el potencial hepatotóxico y cancerígeno de muchos metabolitos como las aflatoxinas y ocratoxinas de diversas especies de *Aspergillus*; y otras como la gliotoxina en estudios de laboratorio han mostrado tener un efecto inmunosupresor (Alvarenga *et al.*, 2012).

Invasión (micosis). El sufijo “osis” se refiere a enfermedad o invasión, como en todas las infecciones, se substituye la última sílaba por el sufijo y entonces cuando decimos aspergilosis nos referimos a la invasión de tejidos y órganos por hongos de este género. Los hongos del género *Aspergillus*, son capaces de invadir porque producen diversas enzimas inducidas como lipasas o proteasas, elastasas o DNAsas. A pesar de la diversidad de sustancias potencialmente patógenas, las infecciones humanas generalmente requieren de factores predisponentes, entre los más importantes tenemos los que se muestran en la Tabla 10 (Alvarenga *et al.*, 2012).

Tabla 10. Localización de la Aspergilosis y factores predisponentes.

<i>Localización</i>	<i>Factores predisponentes</i>
Aspergilosis alérgica	Pacientes hipersensibles que habitualmente sintetizan gran cantidad de IgE. También la pueden presentar como enfermedad laboral personas que trabajan en sitios altamente contaminados con <i>Aspergillus</i> spp, en ellos se eleva la IgG específica contra estos hongos.
Aspergiloma pulmonar	Cavidades pre- existentes como las causadas por la tuberculosis o funcionales v.g. bronquiectasia.
Aspergilosis pulmonar invasiva	Leucemia, trasplantes de médula ósea u órganos sólidos, tratamiento para el cáncer, esteroides de alta potencia por períodos prolongados.
Queratitis	Lesiones corneales con materiales contaminados y uso de antiinflamatorios
Cutánea	Quemaduras, abrasiones extensas en la piel.

<i>Localización</i>	<i>Factores predisponentes</i>
Senos paranasales	Vivir en zonas de clima tropical e infecciones bacterianas frecuentes.
Otitis externas	Pacientes con prótesis auditivas, personas que practican natación con frecuencia o que habiten en regiones con gran humedad y temperatura elevada (clima tropical).
Otros órganos	Habitualmente son secundarias a otro foco de aspergilosis y generalmente son muy graves.

Fuente: Alvarenga *et al.*, 2012.

**1.3.2. *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus nomius*.** Estos se encuentran en el suelo y crecen rápidamente sobre materia orgánica corrupta. Sus colonias son generalmente amarillas, verde amarillo, amarillo-marrones, o verdes; granulares, aterciopeladas, o algodonosas; y tienen una saliente periférica blanca y un margen distintivo (Kimblas, 2004).

Aunque los especímenes deben sembrarse en medio de agar dextrosa Sabouraud (ADS) simple y ADS con antibióticos, este género de hongos es sensible a la cicloheximida, por lo que sólo se desarrolla sobre ADS simple. El estudio macroscópico y microscópico de las colonias generalmente permite identificar a *A. flavus* (Figura 3) (Méndez, 2015).



*Figura 3. Aspergillus flavus.*

El primer aislamiento generalmente es verde amarillento, en resiembras de cultivos puede adquirir un color beige o amarillento (centro). El estudio microscópico muestra fiálides dispuestas en toda la superficie de la vesícula del conidióforo.

Fuente: Méndez, 2015.

En la Tabla 11 se pueden apreciar las características y parámetros de desarrollo de las principales especies de *Aspergillus* productoras de Aflatoxinas.

Tabla 11. Características morfológicas de las especies de *Aspergillus*.

<i>Especie de Aspergillus</i>	<i>Características</i>	<i>Parámetros de desarrollo</i>
<i>Aspergillus flavus</i>	<p>Las colonias sobre agar Czapek alcanzan un diámetro de 3,5 cm dentro de 7 días, a 25°C. Usualmente, consisten de micelio verde-amarillo, verde claro y oscuro de textura pulverulenta. Margen de la colonia de color blanco, textura algodonosa. Reverso verde-crema oscuro. No presenta exudación (Arias &amp; Piñeros, 2008).</p> <p>Conidióforos hialinos, ligeramente rugosos. Vesícula globosa a subglobosa, 20 -35 µm de diámetro. Las fiálides (6-10 x 4.0 -5.5 µm) crecen directamente sobre la vesícula o sobre las métulas. Métulas 6.5 – 10 x 35.0 µm. Conidios globosos a subglobosos. 3.4 µm de diámetro, de color verde claro (Arias &amp; Piñeros, 2008).</p>	<p>Los parámetros para el desarrollo de <i>Aspergillus flavus</i> son: temperatura que oscile entre 10 y 43°C, pero cabe recalcar, que la temperatura óptima de este hongo es entre 20 y 30°C; una actividad de agua óptima de 0,99; y máxima de 0,998; y un pH que oscila entre los valores de 2,1 y 11,2 (Vargas &amp; Velásquez, 2013).</p>
<i>Aspergillus parasiticum</i> (Figura 4)		<p>Los parámetros para el desarrollo para el crecimiento del hongo productor se da a partir de los 30°C, mientras que el de la aflatoxina, se da desde</p>

<i>Especie de Aspergillus</i>	<i>Características</i>	<i>Parámetros de desarrollo</i>
-------------------------------	------------------------	---------------------------------

los 28°C, de manera óptima; la actividad de agua requerida para el crecimiento de este hongo es realmente menor que *Aspergillus flavus* y oscila entre los 0,87; este hongo es más sensible al pH, debido a que su crecimiento es viable en un rango de 4 como mínimo, ya se inhibe el crecimiento a un pH menor, y como máximo tiene un valor de 7 (Vargas & Velásquez, 2013).

*Aspergillus nomius* (Figura 5)

Representa una nueva especie aflatoxigénica fenotípicamente similar a *A. flavus*. La separación de *A. flavus* se basa en la presencia de esclerocios indeterminados y una menor temperatura de crecimiento. Las comparaciones de la relación del ADN muestran que *A. nomius* sólo ha evolucionado relativamente recientemente de *A. flavus* y *A. tamarai* (Kurtzman *et al.*, 1987).

---

Fuente: Autor.

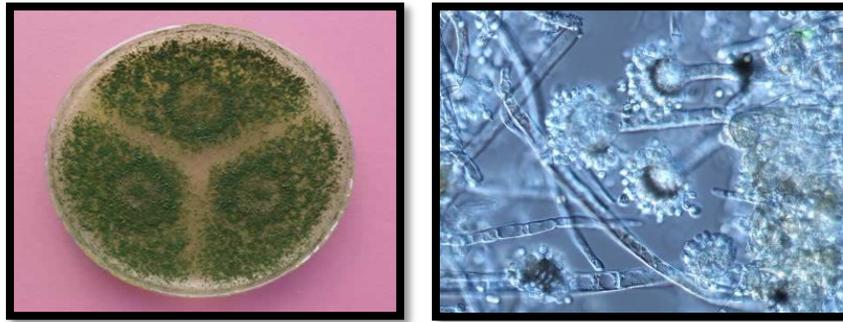


Figura 4. *Aspergillus parasiticus*.

Fuente: [www.ars.usda.gov/southeast-area/dawson-ga/peanut-research/docs/mycotoxin-research/page-3/](http://www.ars.usda.gov/southeast-area/dawson-ga/peanut-research/docs/mycotoxin-research/page-3/).

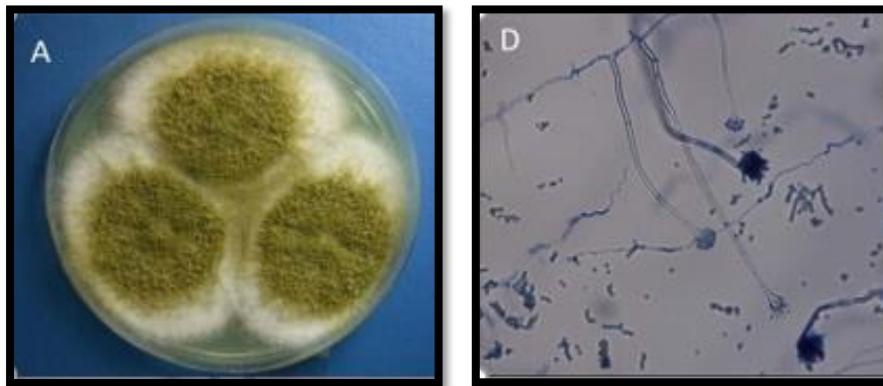


Figura 5. *Aspergillus nomius*.

Cultivo y examen microscópico en aislamiento clínico con SDA después de 5 días a 37°C.

Fuente: Tam *et al.*, 2014.

**1.3.3. Producción de toxinas.** La temperatura mínima necesaria para desarrollarse y producir micotoxinas es de 10-12°C, en general para *Aspergillus* spp. La actividad de agua (Aw) mínima necesaria para iniciar su desarrollo y para producir micotoxinas es de 0,75 y de 0,83, respectivamente. *Aspergillus* crece y puede producir micotoxinas de una forma óptima a 25°C, con una actividad de agua de 0,95. Sin embargo, existen estirpes de *Aspergillus flavus* que en sustratos tales como el arroz, crecen entre 6 y 45°C con un óptimo a 37°C y la producción de micotoxinas se efectúa entre 11 y 36°C con un máximo de producción a 30°C (Gimeno, 2005).

Las principales especies productoras de aflatoxinas son *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius*, aunque se conocen otras. La aflatoxina B<sub>1</sub> es la sustancia con potencial cancerígeno más elevado que existe en la naturaleza (Perrone *et al.*, 2007), siendo *A. flavus* la especie más común asociada a su contaminación. También especies como *A. pseudotamaris* y *A. caelatus* son reconocidos por ser productores de Aflatoxina G1 y G2 (Vargas & Velásquez, 2013).

La diversidad genética dentro de poblaciones de *A. flavus* ha sido ampliamente estudiada en relación con su potencial de producción de aflatoxinas y su relación con las variantes morfológicas L (400 µm o más) y S (menores a 400 µm) denominadas así de acuerdo al tamaño de los esclerocios que producen (Perrone *et al.*, 2007). En laboratorio, en medios de cultivo, los aislamientos de suelo de cepas tipo S, producen niveles más altos de aflatoxinas (Perrone *et al.*, 2007). La síntesis de aflatoxinas y sus metabolitos precursores se asocia también a una mayor producción de conidios (Wilkinson *et al.*, 2004).

Estudios sobre la biodiversidad de las especies de *Aspergillus* toxígenas son útiles para aclarar molecular, bioquímica y ecológicamente las características de las diferentes especies en relación con su adaptación a diferentes condiciones ambientales y geográficas, así como su potencial de toxigenicidad (Samson *et al.*, 2007). Cinco de los seis subgéneros de *Aspergillus* incluyen una o más especies que producen un teleomorfo, y muchos más que no lo hacen (Samson *et al.*, 2007).

Las relaciones teleomorfo - anamorfo de *Aspergillus* son complejas. La evidencia molecular hasta la fecha indica que todas estas están filogenéticamente relacionadas (Peterson, 2000). Sin embargo, los teleomorfos y anamorfos de *Aspergillus* son muy distintos entre sí, tanto en la morfología como en la fisiología (Samson *et al.*, 2007). La presencia de un teleomorfo es un importante indicador de la fisiología, capacidad de descomposición y potencial para la producción de micotoxinas. En aquellas especies cuyos teleomorfos no se conocen, las mismas son llamadas por sus anamorfos (Pitt & Samson, 2007).

Cabe recalcar, que los factores de crecimiento del hongo, no necesariamente son los mismos que los de la micotoxina, debido a la exigencia de cepas no toxigénicas en el hongo; así como la ausencia del hongo productor, no implica que el alimento esté libre de aflatoxinas,

poseen mayor resistencia, ante ambientes adversos que *Aspergillus* spp. (Vargas & Velásquez, 2013).

#### **1.4. Micotoxinas**

**1.4.1. Concepto.** La FAO (1991), las define como metabolitos secundarios de hongos, producidos en la etapa final del crecimiento exponencial de una colonia fúngica, que provocan cambios patológicos tanto en seres humanos como animales, y la micotoxicosis son los síndromes de la toxicidad resultante de la absorción de micotoxinas.

El término micotoxicosis hace referencia a un amplio grupo de intoxicaciones causadas por la inhalación, el contacto directo o la ingestión de alimentos que han sido contaminados con micotoxinas (Serrano & Cardona, 2015). Muchos investigadores han analizado los efectos nocivos de las micotoxinas en el ganado (Channalah, 2012).

Gimeno (2011), especifica que las micotoxinas son compuestos policetónicos resultantes de las reacciones de condensación 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 mohos. Estos ácidos grasos son metabolitos primarios utilizados por los mohos como fuente de energía. Las micotoxinas se suelen formar al final de la fase exponencial o al principio de la fase estacionaria del crecimiento del moho.

**1.4.2. Origen.** El término micotoxina deriva de las palabras griegas “mykes” (hongos) y “toksicons” (veneno) (Céspedes, 1997). Estas pueden ser producidas antes o después de la cosecha, durante el almacenaje, transporte, procesamiento o en el momento de ser utilizados en alimentación.

Hay factores, tanto intrínsecos, como extrínsecos que influyen en el crecimiento fúngico y en la producción de micotoxinas sobre un substrato dado. Entre los factores intrínsecos están la actividad hídrica, el pH, y el potencial de reducción-oxidación, mientras que los factores extrínsecos que influyen en la producción de micotoxinas son la humedad relativa, la temperatura y la disponibilidad de oxígeno (FAO, 2000).

**1.4.3. Generalidades.** Las micotoxinas poseen estructuras químicas muy diversas, aunque todas son compuestos orgánicos de masa molecular relativamente baja (EFSA, 2004). Las principales micotoxinas que afectan a los alimentos son: Aflatoxinas (producidas por hongos

del género *Aspergillus*), Ocratoxinas (producidas por hongos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*), Tricotecenos, Fumonisinias y Zearalenona (producidas por hongos del género *Fusarium*) y Patulina (producidas por hongos del género *Penicillium*) (Henry *et al.*, 2001).

En la Tabla 12 se resumen los mohos productores de algunas micotoxinas.

Tabla 12. Mohos productores de algunas micotoxinas.

<b>Micotoxinas</b>	<b>Mohos</b>
Aflatoxinas	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. nomius</i> , <i>A. parasiticus</i>
Alcaloides del ergot	<i>Claviceps purpurea</i> , <i>Neotyphodium coenophialum</i>
Citroviridina	<i>Aspergillus terreus</i> , <i>Eupenicillium ochrosalmoneum</i> , <i>Penicillium citreonigrum</i>
Desoxinivalenol	<i>Fusarium culmorum</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. pseudograminearum</i>
Fumonisinias	<i>Alternaria arborescens</i> , <i>Fusarium nygamai</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>F. verticilloides</i>
Moniliformina	<i>Fusarium acuminatum</i> , <i>F. avenaceum</i> , <i>F. fujikuroi</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>F. subglutinans</i> , <i>F. thapsinum</i>
Ocratoxina A	<i>Aspergillus alliaceus</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>A. melleus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. sclerotiorum</i> , <i>A. sulphureus</i> , <i>Penicillium verrucosum</i>
Psoralenos	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
Toxina T-2	<i>Fusarium armeniacum</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. musarum</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. sporotrichioides</i>
Zearalenona	<i>Fusarium crookwellense</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. semitectum</i>

Fuente: Carrillo & Audisio, 2007.

Las micotoxinas ejercen efectos tóxicos sobre los seres humanos y sobre los animales. Esta toxicidad está influenciada por toda una serie de factores, como los que se detallan a continuación:

- Tipo de micotoxina, biodisponibilidad y concentración de la misma en el alimento.
- Sinergismos entre las micotoxinas presentes.
- Cantidad de alimento consumido y continuidad o intermitencia en la ingestión.

- Peso del individuo, edad y estado fisiológico del mismo.

Las micotoxinas pueden producir una disminución de las defensas inmunitarias en el ser humano y en los animales, pudiendo aumentar la susceptibilidad a determinadas infecciones. Asimismo, las micotoxinas pueden actuar sobre el metabolismo de los glúcidos y de los lípidos, así como sobre la actividad de diversas enzimas participantes en dichos metabolismos. También tienen efectos sobre determinados órganos diana, que suelen ser: Sistema Nervioso Central, sistema gastrointestinal, hígado, riñón y piel (Henry *et al.*, 2001).

La información sobre las interacciones potenciales entre todos esos compuestos es todavía muy escasa. Además, se sabe que algunas micotoxinas, como la aflatoxina B1, están asociadas con enfermedades de los seres humanos y de los animales. Por ello, la elaboración de estrategias prácticas de control y gestión es esencial para garantizar la seguridad de los consumidores. Debido al carácter imprevisible y heterogéneo de la contaminación por micotoxinas, se considera que la destrucción del 100 % de todas las micotoxinas en todos los sistemas alimentarios no es una opción viable. Sin embargo, un enfoque práctico consiste en utilizar un sistema de “obstáculos”, basado en el concepto de HACCP, en que la contaminación se controlará a través de la producción y de las operaciones posteriores a ésta (FAO/ OMS/PMA, 1999).

Los sistemas integrados de gestión de micotoxinas deben considerar los puntos de control, desde el campo hasta el consumidor. Este tipo de sistema de gestión tiene en cuenta la comunicación entre expertos en el control antes y después de la cosecha o producción y en el curso de ésta. En un sistema de este tipo, cada fase de la producción contribuiría a reducir el riesgo, de manera que cuando el alimento/pienso final llegue al consumidor los peligros asociados con la contaminación por micotoxinas se habrían reducido al mínimo (García, 2002).

**1.4.4. Micotoxinas e inocuidad de alimentos.** Las micotoxinas juegan un papel importante en la protección de alimentos para consumo humano teniendo de esta manera alta implicación en la inocuidad alimentaria. Las características del metabolismo de las micotoxinas, indican que hay una eliminación del metabolito de la aflatoxina B1 (AFB1) en la leche como aflatoxina M1, que representa el único factor de riesgo en los alimentos de origen animal para los humanos (Duarte & Villamil, 2006).

La mayoría de los hongos crecen en los cereales, produciendo sus toxinas cuando las condiciones son favorables. Así, se estima que entre el 25 y 40% de los cereales pueden estar contaminados con alguna o varias micotoxinas (Pittet, 1998). De esta forma, los cereales cobran una atención prioritaria por la incidencia de su contaminación, así como por su elevado consumo por animales y el hombre. Sin embargo, la incidencia y concentración de las micotoxinas en los productos es variable y esporádica en diferentes años y localizaciones geográficas (CAST, 1989), en parte debido a la variación en las condiciones climáticas. En la Figura 6 se presentan los factores que afectan el crecimiento fúngico y producción de micotoxinas.

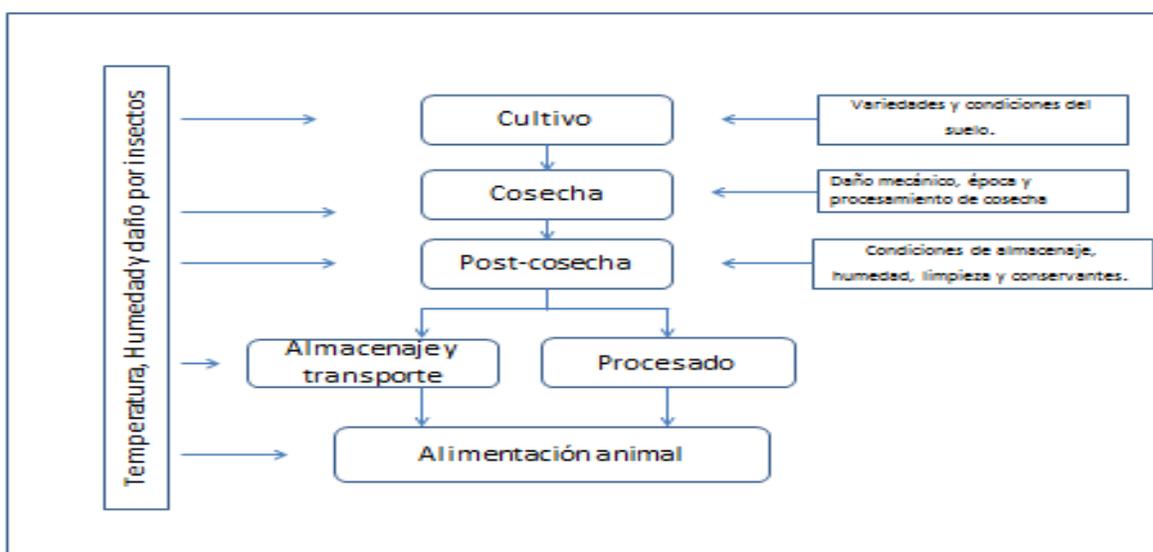


Figura 6. Factores que afectan el crecimiento fúngico y la producción de micotoxinas.

Fuente: Denli & Pérez, 2006.

Los primeros casos de micotoxicosis conocidos en la Edad Media fueron debidos al centeno contaminado con *Claviceps purpurea*. En 1912 Quevedo, en la Argentina, describió la acción de los metabolitos tóxicos de un *Aspergillus* del maíz sobre varias especies animales, lo que constituye la primera observación científica de las micotoxicosis en Sudamérica. En 1960 la intoxicación masiva de pavos en Inglaterra llevó al aislamiento de las aflatoxinas, llamadas así pues son producidas por especies del grupo *Aspergillus flavus* (Smith & Henderson, 1991).

La presencia de las micotoxinas en los vegetales puede deberse:

- A la infección de la planta en el campo por el hongo patógeno
- A la colonización por los saprobios, o al crecimiento de los mohos saprobios
- Patógenos postcosecha sobre los frutos y granos almacenados,
- Al desarrollo fúngico saprobio durante el almacenamiento de los productos ya procesados (Swanson, 1987).

Las micotoxinas son compuestos ubicuos que difieren en sus propiedades químicas, biológicas y toxicológicas. Una micotoxicosis primaria se produce al consumir vegetales contaminados, y secundaria al ingerir carne o leche de animales que comieron forrajes con micotoxinas (Smith & Henderson, 1991). La presencia de aflatoxina M1 en la leche materna es consecuencia de la ingestión de aflatoxina B1 con los alimentos y provoca una micotoxicosis en el bebé (Jonsyn, 1995).

En cuanto a seguridad alimentaria, las aflatoxinas generan el principal problema que se refiere a la disminución de los parámetros productivos en la mayoría de las especies destinadas a la producción de alimentos, ya que las intoxicaciones y el daño que éstas causan en el sistema inmune pueden predisponer a las especies a enfermedades infecciosas enmascarando la etiología principal.

La AFB1 afecta fundamentalmente a las aves, cerdos y otros monogástricos. Los rumiantes son menos vulnerables a la ingesta de aflatoxina. En los animales monogástricos la sintomatología clínica puede producirse tras el consumo de piensos contaminados con concentraciones por encima de 50 ppb, mientras que en el vacuno la sintomatología sobreviene con concentraciones por encima de 1,5-2,23 mg/Kg (Miller & Wilson, 1994). Dependiendo de la presencia de otros factores simultáneos, pequeñas cantidades de AFB1 (>20 ppb) pueden provocar efectos tóxicos. En estas condiciones un nivel de aflatoxina por encima de 100 ppb puede resultar también tóxico en rumiantes. Los síntomas de aflatoxicosis aguda consisten en depresión, anorexia, pérdida de peso, afección gastrointestinal, hemorragias, lesiones hepáticas (hígado graso, necrosis, y apoptosis) y edema pulmonar. Los síntomas a una exposición moderada y prolongada a aflatoxinas pueden reflejarse en un descenso en el consumo de pienso y de las producciones (crecimiento, producción de huevos y leche). Las aflatoxinas pueden afectar también a la calidad de leche y de los productos lácteos, y representan un riesgo de presencia de AFM1, como derivado de la AFB1

consumida por las hembras lactantes. La relación entre la AFB1 consumida y la cantidad de AFM1 contenida en la leche es bastante variable; como media se estima un depósito entre 0,3-6,2% de la AFB1 en forma de AFM1 en la leche (Creppy, 2002).

El nivel de excreción de micotoxinas en la leche es generalmente bajo y se ve afectado por el peso molecular y la lipofilia de una determinada micotoxina. La tasa de transporte también está influenciada por el gradiente de pH entre el plasma sanguíneo y la leche, que cambia según el estado de salud del animal (Yiannikouris & Jouany 2002; Kalac, 2011).

La absorción de micotoxinas por la glándula mamaria puede ocurrir a través de la filtración intercelular, la difusión pasiva por la membrana celular o el transporte activo (Jouany 2001; Yiannikouris & Jouany 2002), depende de la micotoxina, su estado iónico, entre otros.

## **1.5. Aflatoxinas**

**1.5.1. Concepto.** La palabra aflatoxina proviene de la primera letra “A” que denota al género *Aspergillus*, seguida de las tres letras “FLA” correspondiente a la especie *flavus* y el sustantivo “toxina” que significa veneno (Ellis *et al.*, 1991).

**1.5.2. Generalidades.** Las aflatoxinas son un grupo de compuestos químicos orgánicos no proteicos de bajo peso molecular, cuyo esqueleto básico es un anillo de Furano unido al núcleo de Cumarina, producidas principalmente por los hongos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus nomius* (Kimblas, 2004), pueden encontrarse en el suelo, en las plantas, en los restos de animales, en granos y en semillas de maíz y maní (Decastelli *et al.*, 2007).

La diferenciación entre estas especies puede efectuarse según la producción de determinados metabolitos secundarios. Así, *A. flavus* produce sólo aflatoxinas B1 y B2, mientras que *A. parasiticus* produce aflatoxinas B1, B2, G1 y G2. La especie recientemente descrita *A. nomius* se caracteriza por producir aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 y un metabolito exclusivo, la nominina. Algunos autores indican que, en algunas colecciones internacionales de cultivos, diversas cepas de *A. parasiticus* son en realidad *A. flavus* y algunas cepas identificadas como *A. flavus* deberían denominarse *A. nomius* (Abarca *et al.*, 2000).

Bajo condiciones de estrés tales como: sequía o infestación por insectos, la contaminación por aflatoxinas es probablemente alta. Generalmente, condiciones ambientales de humedad relativa y temperatura altas conducen a aumentar el crecimiento del hongo en el alimento almacenado y a la producción de altos niveles de aflatoxinas (Kimblas, 2004).

Las aflatoxinas pueden encontrarse como contaminantes naturales en diferentes tipos de alimentos aparte de los cereales y sus subproductos, como son, los frutos de oleaginosas (algodón, cacahuete, coco y girasol); frutas, frutos secos, productos de salchichería, especias, vinos, leguminosas, leche y derivados (esencialmente las aflatoxinas M1 y M2) (Gimeno & Martins, 2011).

Hasta el momento han sido identificadas 20 aflatoxinas diferentes, sin embargo, únicamente las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 son las contaminantes en alimentos y piensos, originadas de manera natural (Decastelli *et al.*, 2007). Las demás aflatoxinas (M1, M2, P1, Q1, aflatoxicol, etc.) ocurren como productos metabólicos de sistemas microbianos o animales (Smith *et al.*, 1994).

Las toxinas tipo B se caracterizan por la fusión de un anillo ciclopentanona a un anillo lactona de la estructura cumarina, mientras las toxinas G contienen un anillo lactona fusionado en lugar del anillo ciclopentanona. La AFB1, es la más frecuente y tóxica (Afanador, 1997).

La nomenclatura hace referencia a sus propiedades fisicoquímicas; las aflatoxinas son cristales sólidos de color que va del blanco al amarillo, sin olor, sin sabor e incoloros, son insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos (metanol, cloroformo, acetona, acetonitrilo, y dimetilsulfóxido), cuando las aflatoxinas están en cloroformo o benceno son estables por años en refrigeración y oscuridad (Carvajal, 2013). Las aflatoxinas en solución son sensibles a la luz, se descomponen en el aire, oxígeno, soluciones alcalinas o de ácidos suaves (Carvajal, 2013), y se nombran según el color de la fluorescencia, ya que las de tipo B presentan fluorescencia azul (blue) y las de tipo G fluorescencia verde (green) cuando se les observa bajo luz ultravioleta a 365 nm (De Jimeno *et al.*, 1980). Los subíndices 1 o 2 de las aflatoxinas tipo B, G, M o P indican la movilidad que tienen en la cromatografía de capa fina según su peso molecular (328 para AFM1), que dan diferentes coeficientes de retención (RF) que las identifican (Carvajal, 2013). Se descomponen al alcanzar el punto de fusión (B1

268 - 269°C, B2 286 - 289°C, G1 244-246°C, G2 237-240°C, M1 299°C, M2 330°C) (Detroy,1971).

**1.5.3. Propiedades generales de las aflatoxinas.** Las aflatoxinas tienen una gran actividad cancerígena, teratogénica y mutagénica. El principal síndrome que producen es el hepatotóxico, pudiendo también provocar problemas renales. Los principales órganos afectados son: hígado, riñón y cerebro. Por ello, la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC), las incluyó como compuestos carcinogénicos primarios (IARC, 2012).

Entre las principales manifestaciones asociadas a la exposición de las aflatoxinas, están el daño hepático y renal; mutagénesis, por la mutación en el codón 249 del gen TP53, en casos de carcinoma hepatocelular (Szymanska *et al.*, 2004); la teratogénesis es atribuible al cruce de la placenta humana, lo que puede crear malformaciones fetales, inmunosupresión, alteración de la funcionalidad del sistema del complemento y enmudece la acción de la IgA y la IgG, además de genotoxicidad, por la formación de aductos con el ADN y con la albúmina que induce a la mutación de genes y alteraciones cromosómicas, como intercambio entre cromátidas hermanas y recombinación (Eley,1992).

Otros efectos presuntamente relacionados involucran el daño al hígado, Síndrome de Reye-Kwashiorkor, cirrosis en niños, gastritis crónica, y daños respiratorios (Castillo & Durán de Bazúa, 2006).

Se debe destacar que el consumo de pienso contaminado con aflatoxinas, se ha asociado a un incremento de susceptibilidad a la salmonelosis, candidiasis y coccidiosis en aves, fasciolosis en bovinos. Los animales más sensibles son: aves, cerdos, conejos y rumiantes (Gimeno & Martins., 2011).

Las aflatoxinas son sensibles a los rayos UV AFB1 absorbe luz UV a 222, 265 y 362 nm, lo cual puede llevar a la formación de más de 12 productos de fotodegradación que son menos tóxicos. Hay ejemplos de alimentos tratados con este método como aceite de cacahuete, leche e higos secos (Martínez *et al.*, 2013).

Las aflatoxinas son inmunosupresoras ya que inhiben la fagocitosis y la síntesis proteica (los anticuerpos son proteínas) interrumpiendo la formación del ADN, ARN y proteínas en

el ribosoma; la absorción de los aminoácidos se ve alterada y su retención hepática aumenta (Gimeno, 2005).

**1.5.4. Estructura.** De su composición química su parte más reactiva es el anillo lactónico. Gracias a la presencia del núcleo bifurano, las aflatoxinas poseen gran rigidez lo que favorece la interacción con algunos componentes celulares (Combita & Mildenberg, 2009).

Existen varios derivados hidroxilados de las aflatoxinas B1 y B2. Los derivados de aflatoxinas B1 y B2 conocidos como aflatoxinas M1 y M2 respectivamente, se excretan en la leche de animales que consumieron alimentos contaminados con aflatoxinas (Figura 7).

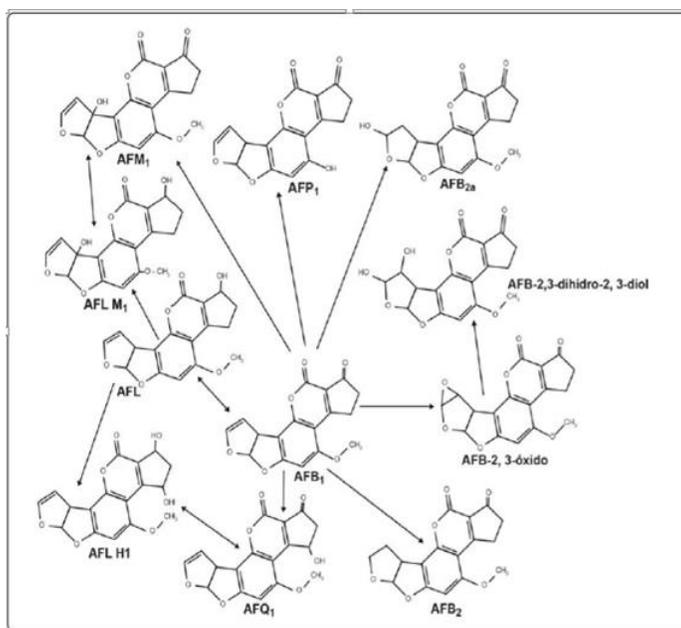


Figura 7. Metabolismo de la aflatoxina B1  
Fuente: Eaton *et al.*, (1993).

La aflatoxina se sintetiza por la ruta metabólica de los policétidos y las reacciones involucradas incluyen condensación, oxidación, reducción, alquilación y halogenación, llevando a la formación de una molécula que consiste en un anillo cumarín unido a una unidad bishidrofurano y a una ciclopentanona. Estos metabolitos se forman por la condensación del acetil-coenzima A y malonil conenzima A, dando lugar al acetil-S conenzima A, la cual será la molécula iniciadora de la AFB1. Dentro de la vía biosintética, la formación de la versicolorina A es particularmente relevante, ya que es la primera molécula en la vía de la AFB1 que contiene un doble enlace en la posición de la molécula del bisfurano. Este doble

enlace es el blanco para la activación de una molécula altamente reactiva (Guzmán, 2007).

Durante la síntesis ocurren al menos 23 reacciones enzimáticas y se han identificado 15 intermediarios, bien definidos estructuralmente. Los 25 genes involucrados en la mayoría de los pasos de interconversión han sido secuenciados, confirmados por disrupción génica y por estudios enzimáticos, están agrupados en una región del ADN de 70-kb y su nomenclatura ha sido propuesta por Yu *et al.*, (2004).

Las aflatoxinas M1 y M2 son igualmente activas y constituye un riesgo para la salud humana. Estos derivados hidroxilados, pueden estar presentes tanto en leche líquida como en polvo (Blunden *et al.*, 1991).

La AFB1 es absorbida vía tracto gastrointestinal, dentro del sistema portal sanguíneo y es llevada para el hígado donde se metaboliza. Una porción de aflatoxina es activada y fijada en los tejidos hepáticos. Algunos metabolitos conjugados de la AFB1 solubles en agua son excretados dentro de la bilis y van a las heces (Gimeno, 2005).

Otras formas conjugadas solubles en agua, productos de degradación de la AFB1 y metabolitos no conjugados de ésta, son excretadas en el sistema circulatorio sanguíneo y se distribuyen de forma sistémica. Eventualmente, esos residuos mencionados van a la leche, huevos, músculo y tejidos comestibles (Dennis & Hsieh, 1981).

La AFM1 es uno de esos derivados metabólicos que va a la leche contaminándola. De la AFB1 se forman otros metabolitos, entre ellos, el aflatoxicol (18 veces menos tóxico que la AFB1) y la aflatoxina B2a (no tóxica) (Gimeno, 2005).

El organismo animal produce generalmente esos matabolitos como un sistema de autodetoxicación. La reacción que tiene lugar a partir de la micotoxina original no tiene forzosamente que ser completa ni irreversible (Gimeno, 2005).

#### **1.5.5. Aflatoxina M1 (AFM1).**

**1.5.5.1. Aspectos generales.** La AFM1 es el primer producto conocido procedente de la metabolización de las aflatoxinas y es excretada en la leche de las hembras de mamíferos que consumen AFB1 en la dieta (aflatoxinas M, del inglés milk, leche). Debido a esto, es muy



desaparece de la leche a las pocas horas de suspender la administración de la ración contaminada a los animales. Aunque la excreción de micotoxinas en la leche es baja, cambios en la barrera sangre-leche debido a las infecciones sistémicas y locales, como mastitis pueden afectar su integridad permitiendo el paso de las micotoxinas a la leche (Fink, 2008). Asimismo, cuando la biota del rumen se ve afectada en el curso de las enfermedades metabólicas, como acidosis ruminal, se disminuye la capacidad de degradación lo que favorece el paso inesperado de toxinas no metabolizadas (Fink, 2008; Pattono *et al.*, 2011).

En vacas lecheras la relación entre la concentración de AFB1 en la ración final (racionamiento y/o unifeed) y la de AFM1 excretada en la leche podría ser de 300:1; sin embargo, esa relación es muy aproximada y el rango oscila entre 34:1 a 1600:1. Así pues, en vacas lecheras Holstein consumiendo raciones finales con 80, 86, 470, 557, 1493 y 1089 microgramos AFB1/Kg (ppb) (sobre sustancia seca) se encontraron concentraciones de AFM1 en leche del orden de, 1,5; 0,245; 13,7; 4,7; 12,4 y 20,2 microgramos/Litro (ppb), respectivamente. En vacas Brindle la contaminación en la ración fue 540 ppb de AFB1, y en la leche fue de 0,92 ppb de AFM1. En otras vacas, los valores de contaminación en la ración oscilaron entre 64 y 1799 ppb de AFB1 dando unos residuos en leche entre 0,35 y 14,2 ppb de AFM1 (Gimeno y Martins, 2000<sup>a</sup>; Rodricks & Stoloff, 1977).

Con una ingesta de AFB1 correspondiente a 2-60 mg/vaca/día, los residuos de AFM1 en leche podrían oscilar entre 1 y 50 ppb (Edds, 1979). Esto representaría raciones finales contaminadas desde 57 hasta 1714 ppb de AFB1 para consumos de 35 Kg de ración/vaca/día. La vaca puede ya transformar AFB1 en AFM1 dentro de las 12-24 horas de ingestión del alimento contaminado. Incluso a las 6 horas ya pueden aparecer residuos de AFM1 en la leche.

Algunos autores Patterson *et al.*, (1980); Van Egmond (1989), refieren que el nivel de residuos de AFM1/día (mg) en leche podría ser aproximadamente el 2,2% de la ingesta diaria de AFB1 (mg), con un coeficiente de variación (CV) entre 42 y 59%. Dividiendo el resultado obtenido por el número de litros de leche producidos/vaca/ día y multiplicando por 1000, daría la concentración de AFM1 (ppb) en la leche.

Otros autores Sieber & Blanc (1978); Van Egmond (1989), dicen que esta relación estaría comprendida entre 0 y 4% con una media del 1%; incluso estos autores proponen la siguiente ecuación:

$$y = -2,55 + 0,84x \text{ (} r^2 = 0,73; n = 43 \text{),}$$

donde,

$$x = \text{mg AFB1/vaca/día;}$$

$y$  = microgramos AFM1/litro de leche (calculando una media de 20 litros de leche/vaca/día).

La concentración de AFM1 en la leche variará según la raza de la vaca, la concentración de AFB1 en la ración, la cantidad y duración del consumo de alimento contaminado y el estado de salud del animal. Sin embargo, a todo esto, se debe añadir que estas discordancias de correlación entre autores serán también debidas, entre otras cosas, al sistema metabólico de un animal poligástrico, lo que provoca que las concentraciones de AFM1 en la leche varíen entre animales, de un día para otro y de una producción de leche a la siguiente (Gimeno, 2005).

**1.5.5.4. Legislación.** Teniendo en cuenta que la aflatoxina M1, es cancerígena, su presencia en este alimento destinado principalmente a la población infantil, debe ser estrictamente controlada. Debido a la alta toxicidad y a la acción cancerígena de las aflatoxinas, aproximadamente 60 países publicaron reglamentaciones referentes a la contaminación de los productos alimenticios. En los países industrializados, las cantidades máximas admisibles de aflatoxina (límite máximo de residuos = LMR) oscilan generalmente entre 5 a 300  $\mu\text{g/Kg}$ . En el caso de la Aflatoxina B1 para la alimentación humana, el límite máximo indicado es de 0,5  $\mu\text{g/Kg}$  (0.005 mg/Kg), de 0,5  $\mu\text{g/Kg}$  para la aflatoxina M1 en la leche (Rendón, 2007).

En la actualidad existen leyes de alimentos que prohíben o limitan la presencia de ciertas sustancias contaminantes naturales o artificiales y dentro de los contaminantes naturales se contemplan las micotoxinas; en el caso de Colombia la Resolución del Mministerios de Salud y Protección Social 4506 de 2013.

Luego del descubrimiento de las aflatoxinas hacia comienzos de la década de los 60, muchos países desarrollaron una legislación específica para estas micotoxinas (Van Egmond, 1989).

En los Estados Unidos la Administración de Alimentos y Drogas (FDA), fijó inicialmente el “nivel de acción” para las aflatoxinas en 30 ppb a comienzos de la década de los 60. Esta decisión se basó en el límite de detección de las técnicas disponibles en ese momento. De acuerdo con la FDA, el nivel de acción es el nivel por encima del cual un testigo calificado experto podrá testificar en una corte federal que la presencia de toxina en el alimento hace que este cause efectos adversos sobre la salud (Díaz, 1995).

En 1989, la FDA fijó el nivel de acción de la aflatoxina M1 en 0.5 ppb, debido a que niveles de aflatoxinas de 20 ppb en la dieta de las vacas lecheras resultan en niveles de aflatoxina M1 por debajo de 0,5 ppb en la leche (Díaz, 1995).

La mayoría de países han fijado un límite máximo de 5 ppb de aflatoxinas B1 para alimentos de consumo humano, mientras que los niveles máximos para la suma de las cuatro aflatoxinas naturales (B1, B2, G1 y G2 = aflatoxinas totales) han sido fijados entre 10 y 20 ppb. Para el caso de la aflatoxina M1, los límites máximos de 0.05 y 0.5 ppb como se puede apreciar en la Tabla 13 (Díaz, 1995).

Según un estudio de reglamentación mundial de niveles de micotoxinas realizado por Van Egmond (1989), 50 países tienen regulación con respecto a aflatoxinas B1, G1 y G2, mientras que 14 países han legislado con respecto a la aflatoxina M1.

Tabla 13. Niveles máximos de aflatoxinas permitidos en países con legislación.

<i>Nivel máximo permitido en la mayoría de países</i>		<i>Promedio</i>	<i>Rango</i>
Aflatoxina B1	5 ppb	9,5 ppb	0 – 50 ppb
Aflatoxinas totales (B1, B2, G1 Y G2)	10 – 20 ppb	14,8 ppb	0,50 ppb
Aflatoxina M1	0,05 – 0,5 ppb	0,3 ppb	0 – 1 ppb

Fuente: Díaz, 1995.

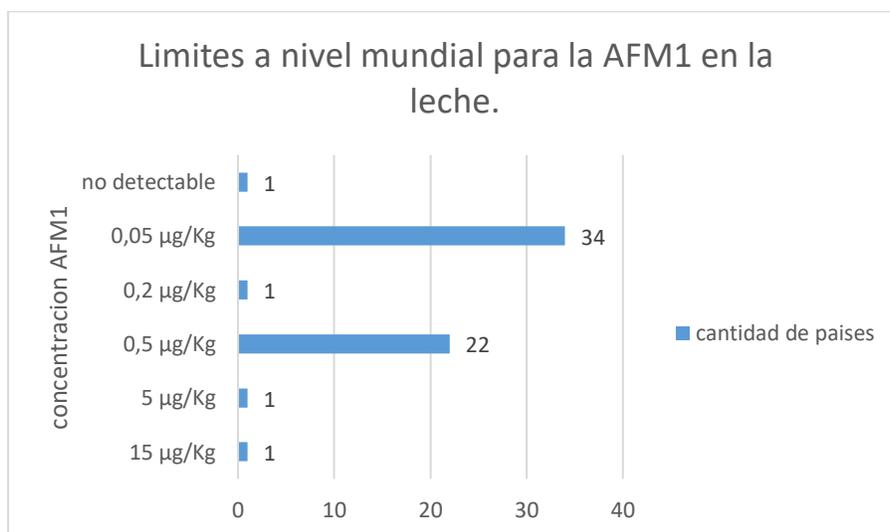
**1.5.5.5. Legislación sobre los niveles de aflatoxinas en productos lácteos.** En el caso de las aflatoxinas como contaminantes de productos lácteos, las medidas reguladoras afectan

tanto a estos alimentos como a los destinados al consumo por el ganado lechero (Stoloff, 1991).

Las razones para establecer límites en el contenido de AFM1 en productos lácteos fueron presentadas por la FDA y por las autoridades sanitarias holandesas. Los argumentos propuestos por la FDA están basados en la mayor susceptibilidad de los niños a los efectos de las aflatoxinas y en los posibles efectos de la AFM1 en la salud. Las razones argumentadas por Holanda se basaban en diferentes estudios experimentales sobre la carcinogenicidad de la AFB1 y su comparación con la AFM1 (Stoloff, 1991).

A fines del año 2003, existían reglamentaciones para la aflatoxina M1 en 60 países como lo muestra la Gráfica 1, un incremento superior a las tres veces comparado con el año 1995. Nuevamente, son la UE (Unión Europea), la AELC (Asociación Europea de Libre Comercio) y los países candidatos a incorporarse a la UE (Albanía, Antigua República Yugoslava de Macedonia, Islandia, Montenegro, Serbia, Turquía), los que contribuyen mayoritariamente al pico más significativo indicado en la Gráfica 1 (0,05 µg/kg), aunque otros países en África, Asia y América Latina aplican también este límite. Otro límite significativo aparece con 0,5 µg/Kg. Este límite superior se aplica en los Estados Unidos, varios países asiáticos y europeos, aunque con más frecuencia aparecen en América Latina donde ha sido fijado también como un límite armonizado en el MERCOSUR (FAO, 2004).

En la siguiente gráfica se presentan los límites de AFM1 a nivel mundial para la leche cruda.



Gráfica 1. Límites a nivel mundial para la aflatoxina M1 en la leche.

Fuente: FAO, 2004.

Muchos países tienen reglamentos para controlar los niveles de AFB1 en los alimentos y para establecer los niveles máximos permisibles de AFM1 en la leche y los productos lácteos para reducir los riesgos de enfermedad (Rastogi *et al.*, 2004), como se describe en la Tabla 14.

Tabla 14. Límites internacionales para AFM1 en leche y productos lácteos para consumo humano.

<b>País</b>	<b>Leche cruda (µg/Kg)</b>	<b>Derivados lácteos (µg/Kg)</b>
Unión europea	0,05	0,05
Alemania	0,05	-
Belgica	0,05	-
Italia	-	0,01(alimentos para niños) 0,05(alimentos leche fluida)
Uruguay	0,5	0,5
Barbados	0,05	-
Chipre	0,5	0,5
Mauritius	10	10
Austria	0,05	-
	0,01(leche past. Para niños)	0,02(mantequilla); 0,25(queso); 0,4(L.P)
Francia	0,05	0,05
	0,03(para niños < 3 años)	0,03 (leche en polvo para niños < 3 años)
Suiza	0,05	0,025 (suero y sus productos); 0,25 (queso); 0,02 (mantequilla); 0,01 (leche en polvo)
Bulgaria	0,5	0,10(leche en polvo); 0 (leche en polvo infantil); 0,02(alimentos infantiles)
Rumania	0	-
República checa	0,05	5 0,1(alimentos infantiles)
USA	-	0,5
Brasil	-	0,5(leche fluida); 5,0(leche en polvo) 0,025(queso)
Argentina	0,05	0,05
		0,05 (leche en polvo)
Honduras	0,05	0,25(queso); 0,02 (alimentos infantiles)
Nigeria	1	-
Egipto	0	0
Turquia	0,05	0,25 (queso)
Mercosur	0,5	5,0 (leche en polvo)

Fuente: Rastogi *et al.*, 2004

En Colombia, el Instituto Colombiano de Normas Técnicas ICONTEC ha fijado un límite máximo provisional de 400 ng/litro para leche cruda, basándose en los estudios realizados en otros países y en regulaciones establecidas por agencias externas (Díaz, 2005).

Los niveles de sustancias tales como metales pesados, residuos de antibióticos o de otros medicamentos de uso veterinario, plaguicidas y aflatoxina M1, se deben regir por normas oficiales o en su defecto las normas internacionales del Codex Alimentarius (MPS, 2006).

A partir del año 2013, empieza a regir la Resolución del Ministerio de Salud y Protección Social 4506 del 30 de octubre de 2013, determinando los niveles máximos de contaminantes en los alimentos destinados al consumo humano, estipulando un rango para aflatoxina M1 de 0,5 µg/Kg para leche (MPS, 2013).

**1.5.5.6. Métodos de análisis de aflatoxinas.** Los métodos analíticos aplicados al estudio de las micotoxinas se centran en tres grupos: cromatográficos, inmunológicos y sensores - biosensores.

*Métodos Cromatográficos.* Los métodos cromatográficos están basados en el análisis del tiempo de retención del analito frente a un estándar, en el caso particular de las micotoxinas existen métodos con fase móvil gaseosa (GC) y líquida: de alta presión (HPLC) o cromatografía de capa fina (TLC) (Skoog, *et al.*, 2001). Para todos los casos se deben hacer algunos procedimientos previos con el propósito de enriquecer la concentración de la aflatoxina; es de resaltar que los métodos de TLC están prácticamente en desuso. Las rutinas cromatográficas con mejores límites de detección y cuantificación, implementan el paso de purificación por cromatografía de inmunoafinidad (IMAC); finalmente, los métodos cuya detección está basada en fluorescencia precisan de procedimientos de derivatización. Previamente a la separación por HPLC se puede aislar selectivamente una micotoxina en concreto, mediante una columna de inmunoafinidad conteniendo anticuerpos específicos de la micotoxina en cuestión (Carrillo, 2003). Recientemente se han desarrollado configuraciones de HPLC-MS y HPLC-MS/MS los cuales, si bien son costosos, presentan los mejores niveles de detección con alta confiabilidad.

*Métodos Inmunológicos.* Se basan en el principio de ELISA (Ensayo Inmuno Absorbente Ligado a Enzimas). Estos métodos se utilizan a menudo para chequeo rutinario y en análisis

de campo. Existen diversas versiones que varían en la rapidez del procedimiento y la cuantificación de los resultados. Un paso muy importante de la validación es la detección del efecto matriz, y puesto que puede ocurrir el falso positivo, los resultados deben requerir la confirmación por métodos cromatográficos más costosos. Algunos autores han estudiado su correlación con los métodos cromatográficos. Los límites de detección publicados por el procedimiento de ELISA eran siempre más elevados que los métodos cromatográficos (Beaver *et al.*, 1991; Dreher & Usleber 1996).

*Métodos Sensores - Biosensores.* De acuerdo con la IUPAC, el término biosensor define un dispositivo analítico que consta de dos partes: un sistema biológico de reconocimiento (que reconoce el analito) y un elemento físicoquímico de transducción íntimamente asociado que en presencia del analito produce una señal medible, discreta o de carácter continuo, proporcional a la cantidad presente del mismo.

El principio de detección de un biosensor se basa en la interacción específica entre el compuesto de interés y el elemento de reconocimiento. Como resultado de esta unión se produce la variación de una o varias propiedades físicoquímicas (pH, transferencia de electrones, de calor, cambio de potencial, de masa, variación de las propiedades ópticas, etc.) que detecta el transductor. Este sistema transforma la respuesta del elemento de reconocimiento en una señal electrónica indicativa de la presencia del analito sometido a estudio o proporcional a su concentración en la muestra.

Pueden utilizarse biosensores basados en reacciones de bioafinidad, mediante síntesis de anticuerpos específicos contra estas toxinas o bien en reacciones biocatalíticas, ya que muchas de estas toxinas son inhibidores enzimáticos.

**1.5.6. Prevención y control.** La principal vía de entrada de las micotoxinas a la cadena alimenticia de la población humana y de los animales, es a través de alimentos de origen vegetal sobre los cuales se ha producido el crecimiento de los hongos toxicogénicos. También es posible que las micotoxinas se incorporen a la cadena alimentaria humana a través de alimentos de origen animal (carne, leche) que en sí mismos no fueron contaminados por mohos. Las diferentes especies animales poseen mecanismos de detoxificación a través de la excreción de los productos del metabolismo de las sustancias tóxicas ingeridas. También se puede controlar incorporando adsorbentes en la reacción del ganado lechero representando

una estrategia adecuada para reducir la posible transferencia de micotoxinas del pienso a la leche (Denli *et al.*, 2006). Las industrias productoras y comercializadoras de alimentos para animales deben realizar controles de sus productos monitoreando presencia de hongos y sus toxinas. En finca el productor debe garantizar un almacenamiento adecuado de piensos, evitando la proliferación de hongos productores de micotoxinas (UERIA, 2011).

La prevención efectiva de las micotoxinas en los productos para la alimentación animal requiere de un enfoque integral. La estrategia para la prevención de micotoxinas debe empezar en el campo. Los granjeros necesitan evitar factores que provoquen estrés en los cultivos tales como los daños por insectos, daños por aves, estrés por sequía, estrés de nutrientes, cosecha tardía, y deben evitar el daño a los granos durante la cosecha, transporte, secado y almacenamiento (Channalah, 2012).

La contaminación de los piensos por la aflatoxina B1 puede constituir un problema muy grave, cuya causa se debe en parte a condiciones inadecuadas de almacenamiento. La contaminación puede verificarse también en la fase anterior a la cosecha y agravarse a causa de condiciones inadecuadas de almacenamiento. Las buenas prácticas de cultivo y el empleo de variedades de semillas producidas para resistir a la infestación fúngica de las semillas y plagas de insectos, así como el uso de plaguicidas adecuados y aprobados, representan medidas preventivas razonables para luchar contra la contaminación en el campo. Pero incluso aplicando esas prácticas, las condiciones creadas por el medio ambiente y/o las prácticas agrícolas tradicionales pueden, sin embargo, hacer fracasar cualquier medida preventiva (FAO, 2012).

Los piensos e ingredientes de piensos deben obtenerse y conservarse en condiciones estables para protegerlos de la contaminación por plagas o por contaminantes químicos, físicos o microbiológicos u otras sustancias objetables durante su producción, manipulación, almacenamiento y transporte. Los piensos deben estar en buenas condiciones y cumplir las normas de calidad generalmente aceptadas. Cuando proceda, deberán aplicarse las buenas prácticas agrícolas (BPA), las buenas prácticas de fabricación (BPF) y, si corresponde, los principios del Sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (HACCP) (CAC/RCP 1-1969).

Los medios más prácticos para evitar la infestación fúngica y la producción de la aflatoxina B1 consisten en secar y almacenar el pienso de forma apropiada antes del transporte. Los problemas que se crean por la excesiva humedad se multiplican enormemente cuando las técnicas de manipulación de los productos después de la cosecha son deficientes (OMS, FAO, 2012).

Los fabricantes de piensos e ingredientes de piensos, así como otras ramas pertinentes de la industria, deberán adoptar prácticas de autorregulación/autocontrol a fin de asegurar el cumplimiento de las normas prescritas para la producción, almacenamiento y transporte de estos productos. También será necesario establecer programas reglamentarios oficiales basados en el riesgo para comprobar si la producción, distribución y utilización de los piensos e ingredientes de piensos se realizan de tal manera que los alimentos de origen animal destinados al consumo humano resulten inocuos e idóneos. Se deben aplicar procedimientos de inspección y control para verificar que los piensos e ingredientes de piensos cumplan los requisitos establecidos, a fin de proteger a los consumidores contra los peligros transmitidos por los alimentos (CAC/GL 20-1995).

Los métodos de selección de granos de cereales y los descascarillados y posterior separación mecánica de la cáscara y el polvo del resto del cereal, resultan adecuados para una descontaminación, visto que habitualmente la mayor concentración de micotoxinas ocurre en el pericarpio de los granos y en el polvo de cereal. Sistemas que pueden ser utilizados tanto en los alimentos para animales como para humanos.

Los tratamientos térmicos que pueden aplicarse a una materia prima o a un alimento compuesto no resultan ser muy eficaces, ya que la AFB1 es resistente a temperaturas del orden de los 120°C. Aunque en los sistemas de “expandir” la temperatura que se aplica en algunos casos resulta ser superior a 120°C, el tiempo de permanencia a esa temperatura es corto e insuficiente para una reducción significativa del contenido en AFB1 (Gimeno, 2005).

Aparte de las normas de higiene y de limpieza así como las de fumigación contra insectos, roedores, bacterias y hongos en la fábrica de alimentos compuestos y en la granja, se dice que respecto a las materias primas secas es aconsejable, a ser posible, almacenarlas con humedades entre 8-9% y entre 11-11,5% para oleaginosas como el girasol integral y la soja integral, respectivamente, o entre 12-13% para amiláceas como los cereales, lo que daría a

25-30°C unas actividades de agua ( $A_w$ ) del orden de 0,65-0,70 (Gimeno & Martins, 2002), evitándose de esta forma, el crecimiento del moho y la probable producción de la micotoxina. Todo esto es posible conseguirlo aplicando a los silos verticales y/o celdas un sistema de inyección de aire frío y seco que se introduce por debajo de la masa del grano y es inyectado en los silos hacia la superficie. La aplicación es más difícil cuando se trata de silos horizontales, pero también es posible (Gimeno, 2003). Sin embargo, el problema se origina cuando las materias primas vienen ya contaminadas con AFB1 e infortunadamente no se puede devolver y/o regresar.

Respecto a los forrajes, el mayor problema se presenta en la elaboración de los ensilados, visto las excelentes condiciones de humedad y actividad de agua ( $A_w$ ) que la materia prima base tiene de una forma natural y que son ideales para el crecimiento fúngico y la posible formación de aflatoxinas y otras micotoxinas. Sin olvidar que en general, el ensilado, forma parte de la ración final en un 40 a 50% y que, para la elaboración de estos ensilados, se debe conservar esa materia prima base en las condiciones de humedad genuinas (Gimeno, 2005).

De las normas fundamentales que se deben seguir para su elaboración, sólo se destaca una de las más importantes, y que consiste en asegurarse siempre de que la materia prima a ensilar está bien empacada, con la menor cámara de aire posible y que el silo está bien cerrado para conseguir una atmósfera anaerobia. Ensilar en buenas condiciones de anaerobiosis no sólo conduce a un buen proceso de fermentación sino también, a que la ausencia de oxígeno inhibe el crecimiento fúngico y la posible formación de aflatoxinas y otras micotoxinas, dado que la mayor parte de los hongos son aerobios (Gimeno y Martins, 2002; Gimeno y Martins, 2003).

Especies como *A. chevalieri*, *A. candidus* y *A. niger*, compiten e interfieren con las especies productoras de aflatoxinas de *Aspergillus* spp. que requieren estar en cultivos puros, por lo tanto, se pueden usar como controles biológicos (OMS, 1983).

Es de gran importancia determinar las posibilidades de eliminación o inactivación de la AFM1 en la leche, según estudios realizados este procedimiento se puede realizar por dos tratamientos: químico y físico; el estudio químico tiene la habilidad de degradar la AFM1 por medio de aditivos alimentarios, como sulfitos, bisulfitos y peróxido de hidrógeno (FAO, 2001).

Cuando la leche cruda es contaminada con AFM1, esta es tratada con 0.4% de bisulfito de potasio a 25°C por 5 horas, la concentración decrece a un 45%. Una concentración mayor de bisulfito es menos efectiva. La AFM1 contaminada naturalmente en la leche no es afectada en la presencia de 1% de peróxido de hidrógeno a 30°C por 30 minutos, pero la adición de peróxido de hidrógeno a una concentración de 0,05-0,1% con lactoperoxidasas reduce una cantidad del 50%. En un estudio el efecto de radiación ultravioleta con y sin peróxido de hidrógeno, la concentración de AFM1 fue reducida de 3,6 – 100%, dependiendo del tiempo de exposición de la leche a la radiación, el volumen de la leche tratada, la presencia de peróxido de hidrógeno y otros aspectos del diseño del experimento (Combita & Mildenberg, 2009).

Además, la AFM1 es resistente al calor y no es completamente inactivado por pasteurización, esterilización u otros procesos de tratamiento de la leche (Assem *et al.*, 2011).

La AFM1 es, en general, estable en algunos quesos, yogures, leche pasteurizada, leche desnatada o entera y helados. En procesos de pasteurización a 63°C durante 30 minutos, pasteurización a 77°C durante 16 segundos, calentamientos a 64-100°C durante 15-20 minutos, calentamientos directos durante 3-4 horas y en algunos procesos de pasteurización y esterilización, la concentración de contaminación original de la leche cruda permanece prácticamente inalterada (Yousef & Marth, 1989).

Por el contrario, en calentamientos a 71-120°C durante 30 minutos, se han conseguido reducciones de contaminación del orden del 12 al 35% y hay algunos procesos de pasteurización, esterilización, evaporación, secado tipo tanto Roller como Spray, en donde se han podido conseguir en leche disminuciones de contaminación con AFM1 del orden del 32 al 86%. En algunos quesos y dentro de su proceso de elaboración y con calentamientos a 82-100°C entre 5 a 30 minutos no se han conseguido reducir las tasas de contaminación. En algunos casos hubo una reducción de un 9% a 90°C durante 30 minutos (Yousef & Marth, 1989).

En el tratamiento de la leche por parte de las centrales lecheras se puede estudiar la aplicación de alguno de los sistemas mencionados anteriormente que reduce la contaminación. Sin embargo, la mejor prevención para evitar la contaminación con AFM1 es la de no suministrar al animal raciones contaminadas con AFB1 (Gimeno, 2005).

Además de las buenas prácticas agrícolas para intentar disminuir el efecto de las micotoxinas en piensos se ha propuesto el empleo de compuestos secuestrantes o detoxificantes (considerados como nueva categoría de aditivos), que reducen la absorción de micotoxinas en el tracto gastrointestinal del animal (adsorbentes) o que modifican su estructura (biotransformadores). Los primeros (distintos tipos de arcillas y silicatos) están más extendidos y testados que los segundos (enzimas o microorganismos capaces de detoxificar algunas micotoxinas). No obstante, las diversas propiedades de las micotoxinas hacen que un adsorbente pueda ser eficaz contra una micotoxina, pero no contra el resto. Actualmente, se están investigando diversos extractos naturales, como productos derivados de la miel y compuestos organosulfurados derivados de las aliáceas, como el ajo, que podrían ser interesantes alternativas naturales a los secuestrantes habituales (Manzanares *et al.*, 2014).

El uso en general de fungistáticos eficaces y de amplio espectro, inhibe el crecimiento y proliferación fúngica y pueden evitar, si está el hongo y no la micotoxina, que ésta se forme. Caso de que coexistan el hongo y la micotoxina, evitarán que se forme más micotoxina, pero no actuarán contra ésta. Sin embargo, hay que tener muy en cuenta que el uso indebido de fungistáticos en concentraciones sub-inhedorias, puede en algunos casos ocasionar que éstos sean metabolizados por algunas especies de mohos toxicogénicos favoreciendo la producción de micotoxinas (Smith *et al.*, 1994).

La Comisión del Codex Alimentarius propone la utilización de un agente conservador idóneo aprobado (por ejemplo, ácidos orgánicos, como ácido propiónico) puede ser beneficiosa. Dichos ácidos son eficaces para eliminar los hongos y evitar así la producción de micotoxinas, en el grano destinado únicamente a la fabricación de piensos (FAO. 2012).

La adición de aditivos tales como los aglutinantes a los productos contaminados para la alimentación animal se considera una de las mejores opciones para reducir la toxicidad de las micotoxinas. Los aglutinantes se fijan a las micotoxinas específicas y se excretan generalmente fuera del cuerpo del animal, evitando así que sean absorbidas por el ganado (Channalah, 2012).

Algunos de los adsorbentes potenciales incluyen: arcilla, silicatos de aluminio, sodio y calcio hidratados (HSCAS), bentonita, zeolita, montmorillonita, filosilicatos, carbón

activado, celulosa, polisacáridos (componentes de la pared celular de la levadura), tierra de diatomeas y polímeros sintéticos como la polivinilpirrolidona (Channalah, 2012). Estos aditivos (agregados al alimento) deben ser capaces dentro del animal de formar compuestos estables e irreversibles con los grupos beta-cetolactona y alfa-bislactona contenidos en la molécula de AFB1. Complejos tales no tóxicos, que después serán eliminados por las heces (Gimeno, 2005).

Sin embargo, el uso de aditivos en los alimentos (productos aglutinantes) no está aprobado por la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos de EUA) a fin de prevenir los efectos adversos de las micotoxinas. Además del patógeno bacteriano y las micotoxinas, los productos para la alimentación animal pueden estar contaminados con priones, dioxinas tales como PCDD, PCDF y metales (Channalah, 2012).

En lo que respecta a la detoxificación, está muy difundido el uso en el alimento compuesto y en la ración final de aditivos quimi-adsorbentes (arcillas, arcillas filosilicatos-HSCAS y glucomananos esterificados). En el caso de las aflatoxinas, estos aditivos quimi-adsorbentes estables e irreversibles, después serán excretados por las heces, reduciendo significativamente de esta forma la transformación de la AFB1 en AFM1, y también evitando o reduciendo los problemas tóxicos que la AFB1 pueden ocasionar al animal (Phillips *et al.*, 1995; Ramos y Hernández, 1996; Ramos *et al.*, 1996; Phillips, 1999; Taylor, 1999; Gimeno y Martins, 2000; Phillips *et al.*, 2002).

El tratamiento de maíz quebrado con NaOH disminuye significativamente el contenido de aflatoxina, pero la preparación del grano entero con Ca (OH)<sub>2</sub> reduce sólo un 40% de la misma. La mayor cantidad de toxina suele estar concentrada en unos pocos granos y si se logra separarlos, se disminuye la proporción en los subproductos (Smith & Henderson, 1991).

Orlando *et al.*, (2014). Evaluaron la acción del didecil dimetil cloruro de amonio aplicado por aspersión sobre granos de maíz almacenado como un posible agente reductor de los contenidos de aflatoxinas. Tomaron muestras de maíz comercial de 200 g cada una, con presencia de aflatoxinas y fueron tratadas con el producto. Se utilizaron las siguientes diluciones (2,5%; 5%; 7,5% y 10%) las cuales se aplicaron por aspersión sobre los granos de maíz. Los análisis de contenidos de aflatoxinas totales fueron efectuados mediante

cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). El mejor resultado obtenido fue con el tratamiento con el didecil dimetil cloruro de amonio al 2,5 % que mostró un efecto reductor de aflatoxinas del orden del 15%, cabe anotar que no tiene ninguna restricción de uso sobre alimentos.

Hasta la fecha no se ha registrado ninguna aceptación oficial generalizada de un tratamiento de descontaminación destinado a reducir los niveles de la aflatoxina B1 presente en piensos contaminados. Al parecer la amoniación constituye la aplicación más práctica para la descontaminación de productos agrícolas, por lo que se le ha dado autorización limitada para poder emplearla en los piensos en condiciones especificadas (por ejemplo: tipo de producto, cantidad, animal). Tras investigaciones preliminares se ha sugerido también que añadiendo a los piensos contaminados por aflatoxinas el antiaglutinante "aluminosilicato cálcico sódico hidratado" pueden reducirse considerablemente los residuos de AFM1 presentes en la leche, según sea la concentración inicial de AFB1 presente en el pienso (FAO, 2012).

## 1.6. Estudios sobre aflatoxinas M1.

**1.6.1. Estudios sobre Aflatoxinas M1 a nivel mundial.** La FAO (Food and Agriculture Organization) estima que más de un 25% de la producción de alimentos en el mundo está contaminada en un cierto grado con micotoxinas (Lawlor & Lynch, 2001).

En la Tabla 15 se presenta la mayor incidencia de micotoxinas a nivel mundial.

Tabla 15. Incidencia de micotoxinas por zonas geográficas.

<i>Localizacion</i>	<i>Micotoxina</i>
Europa occidental	Ocratoxina, Vomitoxina, Zearalenona
Europa (Este)	Zearalenona, Vomitoxina
América del Norte	Ocratoxina, Vomitoxina, Zearalenona, Aflatoxina
América del Sur	Aflatoxina, Fumonisina, Ocratoxina, Vomitoxina, T-2 Toxina
África	Aflatoxina, Fumonisina, Zearalenona
Asia	Aflatoxina
Australia	Aflatoxina, Fumonisina

Fuente: (Devegowda *et al.*, 1998).

Estudios a nivel mundial han revelado que por años las moléculas de aflatoxinas interaccionan con el ADN, como lo reportan Wang *et al.*, (2016) con los aductos del ADN de las personas que consumen alimentos en los cuales están presentes como cereales (maíz, arroz, sorgo y cebada, entre otros), especias (chile), lácteos (leche y quesos), cárnicos y sus

derivados (pollo, huevo), oleaginosas (cacahuates, nueces) y frutas secas; y en aquellas personas susceptibles con antecedentes familiares, que pueden desarrollar diferentes tipos de cáncer (hígado, colorrectal, de páncreas y de pulmón) (Gimeno *et al.*, 2011).

Se calcula que la mayoría de las aflatoxinas que se consumen se desechan de forma natural, pero el 17% interaccionan con el ADN y se acumulan a lo largo de los años por el consumo cotidiano de gran cantidad de alimentos contaminados, y el riesgo de padecer enfermedades después de los 40 o 50 años aumenta. También, explican, causan mutaciones (denominadas “puntuales”) en un punto del ADN, y hacen que los proto-oncogenes se activen como oncogenes. Carvajal *et al.*, (2012) encontraron estas sustancias en diferentes tumores de cáncer (de hígado, colorrectal, pulmón y páncreas), así como en orina de enfermos con cirrosis viral, hepatitis B y C.

Se ha afirmado, que la contaminación de la leche y productos lácteos con AFM1 varía de acuerdo a la geografía, país, estación, condiciones ambientales, incapacidad de ciertos sistemas agrícolas, baja disponibilidad de forraje verde, uso excesivo de alimentos concentrados, torta de semilla de algodón, maíz, soja, paja de trigo trillado, paja de arroz, salvado de trigo, grano con aflatoxinas durante el almacenamiento (Oliveira *et al.*, 2012).

Signorini *et al.* (2012), desarrollaron un modelo para evaluar diferentes parámetros en la alimentación del ganado y cómo influye en la presencia de las aflatoxinas B1, obteniendo como resultado incidencia alta en la alimentación de concentrado y semilla de algodón (78,9%). La época del año también es otro factor asociado con su presencia. La concentración promedio de AFM1 en la leche de vaca varía teniendo en cuenta la ecuación de velocidad de arrastre aplicado.

Han *et al.*, (2013), observaron que, aunque todas las muestras de alimentos analizadas destinadas al ganado estaban dentro de los niveles de AFB1 permitidos por la Comisión Europea CE (5 µg / kg), el contenido de AFM1 en 3 de 200 muestras de leche estaba por encima de los niveles máximos establecidos por la CE (0,050/ µg /L).

En la China, Xiong *et al.*, (2013), evaluaron la incidencia de AFM1 en muestras de leche cruda de 18 granjas de productos lácteos en la región del Delta del río Yangtze durante cuatro temporadas diferentes. Recolectaron un total de 72 muestras de leche de tanque con 18

muestras para cada temporada. La AFM1 se detectó utilizando LC-MS/MS, en 43 muestras de leche (59,7%) que variaban en concentraciones desde 10 hasta 420 ng/L. La concentración de AFM1 en leche fue significativamente mayor durante el invierno (123 ng/L) que en otras temporadas ( $P < 0.05$ ), no hubo diferencias significativas entre la primavera (29,1 ng/L), verano (31,9 ng/L) y otoño (31,6 ng/L) ( $P > 0.05$ ). Esto indicó que la leche cruda recogida durante el invierno es de alto riesgo para AFM1 y que deben considerarse factores estacionales para la gestión de las aflatoxinas en el pienso y la leche.

Zafar *et al.*, (2013), analizaron un total 221 muestras de leche y productos lácteos para determinar la presencia de aflatoxina M1 (AFM1) por HPLC que se recolectaron durante el invierno y verano en Punjab, Pakistán. Los resultados revelaron presencia de AFM1 en invierno, el 40% de la leche cruda, el 51% de leche UHT, el 37% de yogurt, 60% de mantequilla y 43% de las muestras de helado y 27, 24, 25, 34 y 17% de las muestras se encontraron por encima del límite recomendado para AFM1, respectivamente. Sin embargo, a partir del verano el 36% de la leche cruda, el 31% de la leche UHT, 29% de yogurt, 40% de la mantequilla y el 24% de helado y 23, 23, 18, 20 y 5% de las muestras se encontraron por encima del límite permisible de AFM1, respectivamente. La ocurrencia de AFM1 en leche y productos lácteos fueron superiores en época de invierno que, en la época de verano, lo que exige implementar regulaciones estrictas y también la necesidad de monitoreo continuo de la leche y productos lácteos para reducir al mínimo los riesgos para la salud.

En un estudio realizado en Portugal, los niveles más altos de AFM1 se detectaron en muestras de leche producidas en las islas de las Azores que en muestras continentales (Duarte *et al.*, 2013). Según los autores, esto sugiere la existencia de factores locales relacionados con el tiempo y las condiciones de almacenamiento del alimento que merecen mayor atención y pueden influir en el análisis.

Pakistán es el quinto país productor de leche en el mundo, con 29 millones de toneladas anuales, siendo Punjab la provincia con mayor producción (67%); el 98% de leche se vende en forma cruda y el 2% procesada. Se realiza un estudio para comprobar si la producción tiene un control sobre las aflatoxinas; en 40 familias, 175 tiendas de leche, 17 granjas de leche, distribuidas en 36 distritos de Punjab. Se utilizó un kit de inmunoensayo enzimático. Se

analizaron 232 muestras de leche, el 76,3% dio positivo, de los cuales el mayor porcentaje lo cubren la leche de casas, en menor rango leche de tiendas y granjas lecheras (Sadia, 2012).

Zafar & Rafique (2012), investigaron la incidencia y presencia de aflatoxina M1 (AFM1) en leche y productos lácteos producidos en la provincia de Punjab, Pakistán, se analizaron mediante cromatografía líquida de alto rendimiento equipada con detector de fluorescencia en 107 muestras. Los resultados mostraron que la AFM1 se detectó en el 71% de las muestras de leche, el 61% de yogurt, 78% en los quesos blancos, 59% en la crema de queso y 45% en mantequilla, pero solo el 15% de las muestras de yogurt, el 11% queso blanco, el 47% de las muestras de queso crema y el 52% de mantequilla, se encontraron por encima del límite recomendado de UE.

Fallah (2010), realizó un estudio para detectar AFM1 en 225 muestras compuestas por 116 leche pasteurizada y 109 UHT, recolectadas en el parque central de Irán; utilizando el método de inmunoensayo enzimático y detectó 151 muestras: 83 pasteurizadas con una concentración de 52,8 ng/L y 68 UHT con 46,4 ng/L como media; sin embargo, 2 muestras de pasteurizada y 3 de UHT superaron la tolerancia máxima, límite que es de 500 ng/L, siendo esto un riesgo para la salud pública.

En Croacia, Bilandzic *et al.*, (2010), verificaron la distribución de concentración de AFM1 en la leche durante las diferentes estaciones del año y encontraron que la concentración fue estadísticamente más alta entre enero y abril (0,036 a 0,059 µg/L), correspondiente al invierno y primavera, que entre Junio y Septiembre (0.012 a 0.015 µg/L), correspondiendo al verano y al otoño.

Kav *et al.*, (2011), analizaron 127 muestras de queso Urfa-salmuera blanco producido principalmente en el sureste de Turquía con leche de ovinos y bovinos para determinar la AFM1 con el método de ELISA. Se detectaron 36 muestras que excedían los límites legales de 250 ng/Kg, concluyendo que se considera un riesgo potencial para la población sobre todo la infantil.

Martínez *et al.*, (2009), realizaron un estudio de trazabilidad con el fin de comprobar el origen de la AFM1 presente en la leche de oveja en un silo de quesería y en la cuajada elaborada a partir de esta en España. Para ello, se recogieron muestras individuales de los

productores que suministraban leche a la industria quesera y de los alimentos que consumían los animales, que se analizaron con dos métodos inmunoenzimáticos (ELISA). Los resultados mostraron presencia de AFM1 en algunos productores, aunque al analizar los alimentos correspondientes no fue posible detectar la presencia de AFB1.

Ardic *et al.*, (2008) en Turquía utilizaron el método de ELISA (AFM1 Ridascreen Art no: R1101) de acuerdo al procedimiento descrito por R-Biopharm GmbH; para determinar la presencia y niveles de AFM1 en 193 muestras de queso, encontrando 50 ng/Kg en el 82,4% de las muestras; 26,4% a 250 ng/Kg. Se concluyó que la aparición generalizada de AFM1 en queso salmuera blanco es peligrosa especialmente para la población infantil.

Zinedine *et al.*, (2007), en Marruecos recolectaron cincuenta y cuatro muestras de leche pasteurizada y se determinó la presencia de AFM1, utilizando el método de cromatografía líquida, obtuvieron 88,8% de presencia y un promedio de ingesta diaria de 3,26 ng/persona/día. Este valor es similar al de la dieta en América Latina y es considerada 32 veces superior a la ingesta diaria en África.

**1.6.2. Estudios sobre Aflatoxinas a nivel de América Latina.** Alpízar (2015), en Costa Rica recopila los resultados de diversas investigaciones que identificaron hongos y micotoxinas con riesgo conocido en ensilajes de diversos materiales en varias regiones del mundo utilizados para alimentar rumiantes. Los principales efectos en rumiantes de las micotoxinas encontradas en los ensilajes se asocian a alteraciones reproductivas y del sistema inmunológico, así como del sistema digestivo. Los principales géneros identificados en los estudios revisados alrededor del mundo son *Penicillium* spp., *Fusarium* spp. y *Aspergillus* spp. Diversos estudios reportan la contaminación de ensilajes principalmente con aflatoxinas (AFB1), fumonisinas (FB1), tricotecenos (DON, T2) y zearalenona. Factores como la presencia de oxígeno durante el ensilaje, la temperatura ambiental, el embalado y el manejo postcosecha de los forrajes tienen una importancia notable como facilitadores del desarrollo de los hongos y la consecuente producción de toxinas.

Sartori *et al.*, (2015), detectaron presencia de AFM1 respectivamente, 17 (24%) de las muestras de leche en polvo (> 0,08 µg/Kg) y 3 (18%) de las muestras de leche UHT (> 0,009 µg/Kg) comercializadas en Brasil.

Se determinó el grado de contaminación de AFM1 en 78 muestras de leche materna de madres lactantes provenientes de doce comunidades del cantón Nabón, provincia del Azuay en el Ecuador, y su relación con la fuente dietaria susceptible a estar contaminada por aflatoxinas. Se realizaron encuestas de consumo a las madres lactantes para recopilar información acerca de sus hábitos alimentarios y frecuencia de consumo de alimentos propensos a la contaminación por micotoxinas (lácteos, cereales, huevos de gallina y frutos secos). El análisis de AFM1 se realizó por HPLC, nueve muestras resultaron positivas para AFM1 (11,5%) y cuatro para AFB1 (5,12%). Se observó una relación estadísticamente significativa ( $P < 0,001$ ) entre el consumo de queso tierno y la contaminación de la leche materna con AFM1 y AFB1 (OR= 1,04 y 1,05 respectivamente) (Ballesteros, 2014).

Capelli (2014), evaluó la prevalencia de aflatoxinas totales en alimentos destinados al consumo de vacas lecheras y aflatoxina M1 en la leche cruda de esos animales. Monitoreó 18 establecimientos lecheros comerciales, colectando los alimentos que estaban consumiendo ( $n=37$ ) y leche ( $n=18$ ). Los niveles de aflatoxinas se determinaron mediante la técnica de inmunoensayo enzimático competitivo (ELISA). Se midieron pH, materia seca y humedad de todos los alimentos. En 34 de las 37 muestras de alimentos se encontraron niveles entre 2.17 a 44.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de aflatoxinas totales. Del total de las muestras contaminadas, 5.8% tuvieron valores superiores a los recomendados en Uruguay (20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). En las 18 muestras de leche se encontraron niveles entre 0.005 a 0.08  $\mu\text{g}/\text{L}$  de aflatoxina M1, ninguna superó los niveles permitidos para Uruguay (0.5  $\mu\text{g}/\text{L}$ ). De éstas muestras, dos superaron los valores permitidos para la exportación a la Comunidad Económica Europea (0.05  $\mu\text{g}/\text{L}$ ). Se concluyó que en la mayoría de los alimentos muestreados se encontraron niveles de aflatoxinas totales. En todas las muestras de leche se encontraron niveles de aflatoxina M1 bajos. Si bien los niveles de contaminación son bajos, mostrarían la importancia de realizar monitoreos de estas micotoxinas.

De Oliveira & Ferreira (2013), analizaron la presencia de AFM1 en 75 muestras de leche (UHT) comercializada en Minas Gerais, Brasil entre julio a noviembre de 2009, utilizando el método de HPLC. Los resultados mostraron que 23 (30,7%) muestras positivas para la AFM1 en los niveles de 1000 a 4100  $\text{ng}/\text{L}$ , estaban por encima del límite de tolerancia para la AFM1 en la leche, aprobado por las regulaciones brasileñas.

Urbán *et al.*, (2009), evaluaron el contenido de AFM1 en quesos frescos tipo panela producidos en varias zonas de México. Las muestras se tomaron durante el periodo de agosto del 2007 a abril del 2008 en supermercados de la ciudad de México, donde se ofertan quesos provenientes de diversas industrias y zonas de México. Las muestras se procesaron y analizaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) bajo las directrices de métodos propuestos por la AOAC. Los resultados evidenciaron que todas las industrias queseras presentaron incidencia de AFM1. El 27% de las muestras positivas estuvieron por encima del nivel de tolerancia establecido por algunos países (0.25 µg/Kg) como Austria, Honduras, Suiza y Turquía.

Reyes *et al.*, (2009), determinaron los niveles de aflatoxinas totales (AFT) en alimentos y AFM1 en leche cruda en 40 hatos lecheros del estado de Jalisco. Se obtuvieron muestras de raciones de bovinos (n=40) y se analizó AFT mediante ELISA de tipo competitivo directo. Los resultados mostraron contaminación con AFT en el 92.5 % de las raciones, con niveles entre 4.82 a 24.89 µg/Kg (media = 10.84 ± 5.84 µg/Kg). Del total de las muestras contaminadas, 9.3 % contenían niveles superiores al valor permitido por las Normas Oficiales de mexicanas (20 µg/Kg). AFM1 se presentó en el 80% de las muestras de leche, los niveles detectados fluctuaron de 0.006 a 0.065 µg/L (media = 0.023 ± 0.016 µg/L). Se concluye que, en la región en estudio, se encontró contaminación con AFT en las raciones, si bien los niveles de AFM1 en leche no representan un riesgo a la salud, es importante continuar realizando estudios considerando diferentes sistemas de explotación animal, épocas del año y áreas geográficas para evaluar los niveles de contaminación en una región más amplia de México.

Ortiz (2009), evaluó la presencia de aflatoxinas M1 en muestras de leche fresca de establos de la cuenca de Arequipa. Se colectaron muestras de 10 establos lecheros de las irrigaciones de Santa Rita, Majes, La Joya y Lluta en 2 periodos (verano e invierno) del año 2008. Los establos se clasificaron en intensivos y extensivos de acuerdo al sistema productivo empleado. No se obtuvo ninguna muestra de leche contaminada con aflatoxina M1, siendo un indicativo de que la presencia de este metabolito en leche no constituye un problema en la zona de estudio.

En ciudad de México y Texcoco, se llevó a cabo un estudio de contaminación de Aflatoxina M1 en leche cruda, ultrapasteurizada y orgánica. Un total de 35 muestras de leche ultra pasteurizada de las cuales 15 fueron orgánicas, se obtuvieron en diferentes supermercados de la ciudad de México durante el periodo de octubre del 2006 a febrero del 2007, además 9 muestras de leche cruda se colectaron. Los resultados mostraron que el 59% de las muestras presentaron niveles de aflatoxina M1 y todos los casos se encontraron por encima del límite máximo de residuo de 0.05 µg/Kg propuesto por la Unión Europea. Las medianas de aflatoxina M1 encontradas en muestras de leche cruda, ultrapasteurizada y orgánica fueron 16.21; 16.1 y 23.1 µg/Kg, respectivamente. El porcentaje de muestras por encima del límite máximo de residuo fue menor en leche de producción orgánica (20%) comparada con las leches crudas y ultrapasteurizadas que estuvieron por encima del 50 y 60%, respectivamente (Pérez *et al.*, 2008).

Estudios realizados por Pérez *et al.*, (2008), encontraron niveles elevados de aflatoxina M1 en las muestras de leches cruda, ultrapasteurizada y orgánica producidas y comercializadas en el Altiplano Mexicano, donde el 59.1% de todas las muestras presentaron niveles de aflatoxina M1 superior al LMR establecido por la UE. El 20% de las muestras de leche orgánica presentaron niveles superiores al valor establecido por la UE y la FDA, mientras que los porcentajes de las muestras de leche cruda y ultrapasteurizada fueron 50 y 60%, respectivamente.

Oliveira & Ferraz (2007), tomaron 36 muestras de leche entera, UHT y leche en polvo de cabra para determinar la presencia de AFM1 en la ciudad de Campina, Brasil; utilizando la técnica de Aflatest para determinar su presencia y HPLC para cuantificarla. Encontraron que a diferencia de la leche de vaca no es significativa su presencia, sin embargo, por ser un potente hepatocarcinógeno no se debe descuidar su estudio ya que afecta la población infantil.

**1.6.3. Estudios sobre Aflatoxinas a nivel de Colombia.** Con anterioridad a la década de los 80 no se realizó ningún aporte importante al conocimiento de las micotoxinas en Colombia. Fue sólo hasta la década de los 90 cuando se abordó el problema de una manera sistemática y se iniciaron los primeros estudios tendientes a determinar la problemática real de las aflatoxinas en nuestro país, por parte del Grupo de Investigación en Toxicología y

Nutrición Aviar de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia. Basando sus estudios en el desarrollo, estandarización y validación de técnicas analíticas para la determinación de micotoxinas; realización de estudios de monitoreo de micotoxinas en materias primas y alimentos de consumo humano y animal y la caracterización del cuadro toxicológico producido por las micotoxinas prevalentes en nuestro medio.

En Colombia hay estudios que reportan la presencia de aflatoxina B1 en alimentos para consumo animal y para consumo humano. En 200 muestras de materias primas y alimentos terminados empleados en nutrición animal que se analizaron para determinar la presencia de AFLAS, se encontró que la AFB1 fue el mayor contaminante con una incidencia del 29% (58 de 200 muestras), con concentraciones de hasta 66.1 µg/kg (Céspedes, 1997).

Los estudios de monitoreo realizados en Colombia han demostrado una incidencia relativamente alta de aflatoxina B1. La importancia del monitoreo permanente de aflatoxinas en los granos susceptibles a contaminación quedó demostrada cuando prácticamente la totalidad de la cosecha de maíz de Cereté resultó contaminada con aflatoxinas. Esta cosecha se recolectó en septiembre del año 2001 y correspondió a 50.000 Ha de maíz. La totalidad de las muestras analizadas de diferentes lotes de esta cosecha resultó positiva a aflatoxinas, con niveles que oscilaron entre 15.2 – 282.6 ppb de aflatoxina B1 (Acuña & Díaz, 2005).

En 280 muestras de alimentos para consumo humano (granos, cereales y oleaginosas), la incidencia de AFB1 fue del 8.9%, las concentraciones encontradas fueron elevadas, con un rango de 1.0 a 103.3 µg/kg, y una media de 12.6 µg/kg (Díaz *et al.*, 2001).

Urrego (2005), desarrolló una investigación para establecer la prevalencia y distribución de aflatoxinas y ocratoxina A en cereales para consumo humano utilizando para el análisis cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). En este trabajo de investigación se obtuvo una ocurrencia para AFB1 del 6%. Estos estudios demuestran la presencia de Aflatoxinas en alimentos para consumo humano, sin embargo hasta el momento en el país no se ha realizado investigación para determinar el impacto de esta posible exposición en seres humanos.

Díaz *et al.*, (2009), realizaron estudios acerca de la prevalencia de la contaminación de alimentos por el hongo del género *Aspergillus spp.*, el cual evidenció contaminación en el

54.5% de las muestras. El substrato más contaminado fue el maíz (100%), se aislaron 50 cepas de *Aspergillus spp.*, de las cuales el 56% pertenecían a la especie *A. flavus*, en estos últimos se midió la capacidad para producir Aflatoxinas y el 76.5% eran productores de AFB1 y aflatoxina B2 (AFB2).

Rojas & Wilches (2009), analizaron 30 muestras de alimentos de consumo infantil comercializadas en Pamplona, Norte de Santander; utilizando cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para determinar la presencia de diferentes aflatoxinas, arrojando como resultado el 10% de las muestras detectable para AFB1, obteniendo el nivel más alto la colada para teteros; no se evidenció la presencia de aflatoxinas B1, G1 y G2.

En cuanto a los estudios de cuantificación de AFM1 se reportan muy pocos a nivel nacional:

Vásquez (2006), evaluó la presencia de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en suplementos de ganado lechero en la Sabana de Bogotá y la presencia de AFM1 en la leche de 20 fincas analizadas por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). De los 29 suplementos el 44,8% mostraron presencia de aflatoxinas totales entre 0,8 y 64,1 ppb, con un promedio de 16,3 ppb. El 15,3% superó los límites máximos permitidos por ICONTEC y FDA. De las 20 muestras analizadas el 100% se encontraron contaminadas con AFM1 con niveles entre 8,5 – 327,9 ppt. Ninguna muestra superó los límites máximos permitidos por ICONTEC (0,4 ppb o 400 ppt), pero el 45% mostró niveles superiores a los permitidos en la Unión Europea (0,05 ppb).

Se recolectaron 8 muestras de 5 hatos diferentes correspondientes a distintas regiones del Valle del Cauca (Cómbita & Mldenber, 2009). La determinación y cuantificación de AFM1 se realizó por medio de la técnica de Elisa competitivo (RIDASCREEN Aflatoxin M1 30/15). De las 40 muestras analizadas el 20% sobrepasó la concentración máxima de AFM1 reglamentada por la Unión Europea, pero no sobrepasó los parámetros establecidos por la FAO. Los valores medios de la concentración para este estudio fueron de 15,6 ppt.

Asimismo, se han realizado estudios para evaluar la presencia de AFM1 en muestras de leches para consumo humano en la ciudad de Bogotá por un periodo de dos años. La prevalencia de niveles detectables de AFM1 durante el primer y segundo año fue de 69.2%

y 79.4% respectivamente, lo que sugiere que la mayoría de las muestras presentan contaminación y que esta puede deberse a consumo de alimentos contaminados con AFB1 por parte los bovinos (Díaz *et al.*, 2006).

Se realizó un estudio de quesos frescos provenientes del municipio de Yopal (Casanare), en el cual se tuvieron en cuenta 3 importantes proveedores de quesos frescos, se tomaron 9 muestras de cada uno para ser procesadas y detectar la presencia o ausencia de la AFM1 mediante la técnica de ELISA utilizando el kit comercial Ridascreen Aflatoxin M1 30/15. En el proveedor 1 se encontró un valor promedio de AFM1 de 8.46 ppt, resultando una concentración baja para causar patologías hepáticas y alteraciones en la mutación genética de los consumidores de estos quesos; por el contrario, los proveedores 2 y 3, correspondientes al 67% de las muestras analizadas arrojaron valores de AFM1 superiores a 240 ppt, lo que supone un riesgo en la salud y calidad de vida de los consumidores (Aranguren & Arguelles, 2009).

Zambrano & Martínez (2009), evaluaron reducción de aflatoxina M1 con dos tratamientos térmicos respecto a leche cruda en hatos de la sabana de Bogotá. Encontraron resultados donde la mayoría de hatos evaluados por la prueba Charm SL Aflatoxina presentaban altos niveles de aflatoxina M1 en leche cruda, sin embargo, ninguno superó la regulación colombiana establecida por ICONTEC (400ng/ml). Se encontraron diferencias altamente significativas en relación a la leche cruda frente a los dos tratamientos térmicos, y se observó que la leche tratada térmicamente con ultra pasterización reduce la presencia de aflatoxina M1 comparada con la leche cruda y la leche termizada.

Díaz & Sánchez (2015), realizaron un estudio para determinar los niveles de AFM1 en la leche materna humana usando la técnica de HPLC. Se obtuvieron muestras de leche materna de 50 madres lactantes. Un total de 90% de las muestras probadas arrojaron positivo para AFM1, con una media de 5,2 ng/L y un rango de 0,9-18,5 ng/L. El estudio demostró una alta frecuencia de exposición de madres y neonatos a AFB1 y AFM1 en Colombia, y señala la necesidad de regular y monitorear continuamente la presencia de aflatoxinas en alimentos humanos. Se necesitan más investigaciones para determinar la presencia de otras micotoxinas en los alimentos y en las muestras humanas, así como para elaborar estrategias de protección en un país donde las micotoxinas se encuentran comúnmente en los alimentos humano.

## 2. Objetivos

### 2.1. General

Cuantificar los niveles de Aflatoxina M1 presentes en la materia prima (leche cruda) y leche UAT comercializada por Freskaleche S.A.S. Aguachica, Cesar.

### 2.2. Específicos

Evaluar la presencia del género *Aspergillus* en los piensos de los hatos lecheros de los proveedores de leche cruda de Freskaleche S.A.S.

Detallar las variables microbiológicas y físicoquímicas de la leche cruda en épocas de lluvia y sequía.

Detectar la presencia de la Aflatoxina M1 en leche cruda y leche UAT comercializada por Freskaleche S.A.S., en Aguachica – Cesar.

Estimar los niveles promedio de Aflatoxina M1 en leche cruda y leche UAT comercializada por Freskaleche S.A.S., en Aguachica – Cesar.



<i>Código</i>	<i>Ruta</i>	<i>Hato lechero</i>	<i>Proveedor</i>
004	Tulcan	Los Cocos	Jaime Buenahora Loza
005	Buenos Aires	El Turpial	Jaime Antonio Sánchez Sánchez
006	El Tesoro	La Esperanza	Neftali Gutiérrez Jerez
007	Melendez	La Fortuna	Hugo Jacome Baños
008	Pelaya 1	Alejandria	Kelly Alejandria Guzmán Cruz
009	Pelaya 1	La Esperanza	Jesus Hernando Pallares Pacheco
010	Pelaya 1	El Silencio	Jose De Dios Picon Manzano
011	Pelaya 1	La Primavera	Hugo Alonso García Bayona
012	Pelaya 1	Los Popochos	Sandra Patricia Torrado Caceres
013	Pelaya 1	Villa Graciela	Mansur Meneses López
014	Cascabela	El Paraiso	Adalberto Osorio Mantilla
015	Cascabela	San Antonio	Tobias Alberto Osorio Sánchez
016	Cascabela	La Margarita	Anibal Osorio Mantilla
017	Cascabela	La Primavera	Baron de Monsalve Teresa
018	Cascabela	La Esmeralda	Luis Alfredo Serrano Acevedo
019	Mahoma	Maria Margarita	Ciro Densio Castillo
020	Mahoma	Villa Diana	Rito Antonio Zambrano Pinto
021	Los Plata	Costa Rica	Sol Mery Plata Pabón
022	Los Plata	La Esmeralda	Mery Maldonado de Angarita
023	Mosquito	Zulia	Fernando Arevalo Reyes
024	Besote	La Patricia	Alicia Ayala de Gómez
025	Planta	La Union	Olga Lucía Quintero Montoya
	Aguachica 1		
026	Tqs De Enfriamiento	Bonanza	Nubia Londoño Carvajal
027	Tqs De Enfriamiento	Santa Helena	Félix Antonio Lozano Gualdrón
028	Tqs De Enfriamiento	San Daniel	Humberto Polania García
029	Pelaya	Los Cerritos	Orlando Consuegra Orozco
030	El Faro	La Alegría	German Orozco González
031	Alejandria	Santa Isabel	Multicárnicos S.A
032	Pitalimon/ Pelaya 2	Galilea	Alvarez Ascanio Fernel

<i>Código</i>	<i>Ruta</i>	<i>Hato lechero</i>	<i>Proveedor</i>
033	Pitalimon/ Patiño	Buenos Aires	Gabriel Angel Pacheco Arevalo
034	Alejandro	Alejandro	Mary Julieth Vila Forero
035	Pelaya 1	La Fé De Dios	Lazaro Navarro Marina
036	Pelaya 1	Cerro Verde	Alirio Lazaro Navarro
037	Pelaya 1	Grano De Oro	Jose Del Carmen Vergel
038	Pelaya 1	El Paraiso	Jose Dominguez Tarazona
039	Osorio-Loza	El Peru Ii	Josue Vladimir Prada Osorio
040	Los Plata	La Esmeralda	Yuleima Quintero López

Fuente: Autor.

**3.1.2. Muestra.** Se aplicó un muestreo no probabilístico, ya que la muestra fue seleccionada de manera intensional bajo los criterios de selección que a continuación se describe: Los hatos lecheros seleccionados de la región sur del departamento del Cesar fueron aquellos que manejaron ensilados para la alimentación del ganado. Para llevar a cabo la cuantificación de la AFM1, se seleccionaron 25 muestras entre leche cruda (cantidad 250 ml) y leche entera UAT (presentaciones de 1100, 900, 400 ml) como lo muestran las Tablas 16 y 17, con las cuales también se probaría la confiabilidad de la prueba rápida en la determinación de la presencia de AFM1.

A fin de llevar a cabo los objetivos de la investigación, se tomaron 40 muestras en época de sequía y 40 muestras en época de lluvia durante el año 2016, y se escogió el mes de mayo para realizar la toma de muestra, teniendo en cuenta que el fenómeno del niño inició en el trimestre de febrero, marzo y abril del 2015, cuando las temperaturas se ubicaron en +0,5 °C. En marzo-abril-mayo subieron a +0,7 °C; en abril-mayo-junio, a +0,9 °C, y llegaron a +1,0 °C en el trimestre mayo-junio-julio; se intensificaría en los últimos meses del año hasta el primer trimestre del 2016, (Henriquez, 2015). Y además fue uno de los más fuertes en la historia del planeta “El fenómeno del niño”. En la figura 10 se muestra el jagüey seco en un hato lechero de la región.



Figura 10. Fotografía de jagüey seco en hatos lecheros de la región.

Fuente: Autor.

De acuerdo con el Ideam, la temperatura aumento  $2,5^{\circ}\text{C}$  en promedio en el 80% de las zonas con influencia de El Niño, por lo tanto en estos meses las lluvias se redujeron entre el 30 y 40 %. Los ganaderos de la región del Sur del Cesar se vieron obligados a modificar la alimentación del ganado, reemplazando el pastoreo por diferentes tipos de piensos. A diferencia del segundo muestreo se realizó en época de lluvia en el mes de agosto.

De los 40 proveedores escogidos se tomaron 13 para realizar la prueba de cuantificación de AFM1 en la leche cruda por HPLC, como se observa en la Tabla 17.

Tabla 17. Hatos lecheros de proveedores para cuantificación de AFM1.

<i>Muestra</i>	<i>Código</i>	<i>Proveedor</i>
001	030H	Richard Elias Pérez Sánchez
002	030C	Cediel Forero Ojeda
003	030 <sup>a</sup>	Jose del Carmen Osorio Mantilla
007	030K	Hugo Jacome Baños
008	030Ñ	Kelly Alejandría Guzmán Cruz
009	030N	Jesús Hernando Pallares Pacheco
016	030I	Anibal Osorio Mantilla
017	030M	Barón de Monsalve Teresa
025	030B	Olga Lucía Quintero Montoya

027	030E	Félix Antonio Lozano Gualdrón
028	030D	Humberto Polanía García
030	030L	German Orozco González
040	030G	Yuleima Quintero López

Fuente: Autor

Las muestras de leche cruda de dichos proveedores fueron tomadas dos veces en el año 2016 para la cuantificación de la AFM1, en época de sequía y época de lluvia. Además, se tomaron muestras de la leche en los silos de almacenamiento y producto terminado leche entera UAT, como se observa en la Tabla 18.

Tabla 18. Muestras de leche en silos y producto terminado leche UAT.

<b>Código</b>	<b>Fecha de Muestreo</b>	<b>Descripción</b>	<b>Lote</b>	<b>Fecha de Vencimiento</b>	<b>Presentación</b>
<b>041</b>	Sequía	Tanque De Almacenamiento Leche Cruda 7	7	-	-
<b>042</b>	Lluvia	Tanque De Almacenamiento Leche Cruda 2	2	-	-
<b>043</b>	Lluvia	Tanque De Almacenamiento Leche Cruda 6	6	-	-
<b>044</b>	Lluvia	Tanque De Leche Termizada	7265	-	-
<b>045</b>	Sequía	Bolsa UAT	Lote R92616136	Vence 29/05/16	( 1100 MI)
<b>046</b>	Sequía	Bolsa UAT	Lote R 1013 8	Vence 27/05/16	(400 MI)
<b>047</b>	Sequía	Bolsa UAT	Lote R 1013 5	Vence 27/05/16	( 400 MI)
<b>048</b>	Sequía	Bolsa UAT	Lote R 813 5	Vence 27/05/16	( 400 MI)
<b>049</b>	Sequía	Bolsa UAT	Lote R 865 4	Vence 29/04/16	( 900 MI)

<b>Código</b>	<b>Fecha de Muestreo</b>	<b>Descripción</b>	<b>Lote</b>	<b>Fecha de Vencimiento</b>	<b>Presentación</b>
050	Sequía	Bolsa UAT	Lote R891413 5	Vence 05/06/16	( 400 MI)
051	Sequía	Bolsa UAT	Lote R 019b4	Vence 11/04/16	( 900 MI)
052	Sequía	Bolsa UAT	Lote R91016	Vence 18/04/16	(900 MI)
053	Sequía	Bolsa UAT	Lote R961416134	Vence 26/05/16	(900 MI)
054	Sequía	Bolsa UAT	Lote R 813 5	Vence 27/05/16	(400 MI)
055	Lluvia	Bolsa UAT	Lote 142613 9 B8	Vence 09/09/16	400 MI)
056	Lluvia	Bolsa UAT	Lote 1416613 5 B2	Vence 18/09/16	(400 MI)
057	Lluvia	Bolsa UAT	Lote 1416613 5 B2	Vence 19/09/16	(400 MI)
058	Lluvia	Bolsa UAT	Lote 216613 9 B8	Vence 20/09/16	(900 MI)
059	Lluvia	Bolsa UAT	Lote 1451317532 B3	Vence 23/09/16	(400 MI)
060	Lluvia	Bolsa UAT	Lote 7214616 3 B4	Vence 22/09/16	(1100 MI)
061	Lluvia	Bolsa UAT	Lote 92161413 4 B4	Vence 17/09/16	(1100 MI)
062	Lluvia	Bolsa UAT	Lote 1416613 4 B6	Vence 18/09/16	(900 MI)

Fuente: Autor

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Evaluación de la presencia del género *Aspergillus* en los piensos de los hatos lecheros.

**3.2.1.1. Muestreo de piensos.** Se analizaron un total de 40 muestras compuestas de piensos en los meses de marzo-mayo de 2016 (época de sequía), de hatos lecheros propiedad de

diferentes proveedores. Se tomaron las muestras de piensos teniendo en cuenta el reglamento (CE) No. 152/2009 de la comisión de 27 de enero de 2009. Por el que se establecen los métodos de muestreo y análisis para el control oficial de los piensos según la comisión de la Comunidad Europea.

- Las muestras de los piensos se tomaron de forma manual utilizando un instrumento de muestreo (Pala de fondo plano y bordes verticales), recomendado para el muestreo de piensos sólidos por el reglamento (CE) No. 152/2009.
- Se tomaron 7 muestras elementales (30 g) por cada pienso para obtener una muestra global (210 g) a analizar, estas se recolectaron en bolsas plásticas estériles (Whirl pak).
- Las muestras de piensos se transportaron al laboratorio de Microbiología de la planta de Freskaleche S.A.S. (Aguachica) en cavas refrigeradas  $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ .

### ***3.2.1.2. Análisis microbiológicos de piensos (Método de referencia NTC 4491:2004).***

(Ver anexo 1. Análisis microbiológicos de piensos).

- Una vez realizado el muestro de los piensos, se procedió a ejecutar el análisis microbiológico para determinar la presencia de hongos aflatoxigénicos.
- Se pesaron 30 g de cada pienso para agregarlos al frasco de vidrio tapa azul que contiene 270 ml de agua peptonada previamente esterilizado; para obtener una dilución  $10^{-1}$ . Se agitó la muestra y se dejó reposar 15 minutos aproximadamente.
- Se tomó con ayuda de la transferpipeta marca Brand calibrada a 1 ml la dilución anterior y se pasó al tubo de ensayo tapa rosca con 9 ml de agua peptonada previamente esterilizada, para obtener una dilución  $10^{-2}$ . Se agitó y se dejó reposar.
- De cada dilución anterior, se tomó 0,1 ml con la transferpipeta calibrada y se sembró utilizando la técnica de superficie en las cajas de Petri con el medio de cultivo PDA previamente esterilizado.
- Se llevaron a incubación a  $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 5 días.

- Luego de este periodo, se revisaron todas las muestras escogiendo crecimiento de micelios para replicarlos en los medios de cultivo PDA y Agar Rosa de Bengala, con el fin de obtener una colonia axénica.
- Posteriormente, se identificó si las colonias tenían características propias del género *Aspergillus* utilizando las claves taxonómicas Según Carrillo & Audisio (2007).
- De las colonias anteriormente clasificadas se tomaron muestras de micelios utilizando la técnica de cinta adhesiva transparente: Después de haber adherido una cinta adhesiva transparente sobre la colonia para tomar una porción del micelio aéreo; se colocó una gota de azul de lactofenol sobre el portaobjetos; se pegó un extremo de la cinta adhesiva cargada con el micelio en el extremo del porta; se presionó la cinta sobre el colorante para permitir que el micelio se empapara en la solución con cuidado de que no se formaran burbujas de aire; se observó al microscopio.

### **3.2.2. Evaluación de las variables microbiológicas y fisicoquímicas de las muestras de leche cruda.**

**3.2.2.1. Muestreo de leche cruda en hato.** Se tomaron un total de 80 muestras de leche: 40 entre los meses de marzo-mayo de 2016 (época de sequía) provenientes de los hatos lecheros donde las vacas consumieron los piensos que fueron muestreados con anterioridad el mismo día; los mismos 40 proveedores se muestrearon en el mes de agosto de 2016 (época de lluvia); las muestras se tomaron en frascos previamente esterilizados y se llevaron al laboratorio refrigeradas en cava. Teniendo en cuenta la norma GTC 263:2016.

Antes de tomar la muestra se lavaron y desinfectaron las manos para realizar el siguiente procedimiento:

- Se tomó el agitador, se lavó con agua y jabón posteriormente se desinfectó (alcohol o flamear con llama directa).
- Se introdujo el agitador en cada cantina, se agitó vigorosamente y se dejó reposar.
- Se tomó una muestra de cada cantina, y se realizó un pool y de este último se tomó 40 ml de leche. Se tuvo en cuenta las siguientes observaciones: El volumen de la muestra no debía ser inferior al límite que se indica en el recipiente empleado; no

debía quedar al borde de la boca del recipiente; se debe dejar un espacio que permita la agitación del contenido.

- Se rotuló la muestra con el código asignado al proveedor, este código debía coincidir con la lista de la ruta, se rotuló con cinta de enmascarar y teniendo en cuenta que el respectivo código debía ser único e irrepetible en la ruta.
- Se depositaron las muestras en una cava con un cojín multiuso frío en su interior; el cojín debió ser refrigerado antes del muestreo para que se garantice el almacenamiento de las muestras durante el recorrido a una temperatura que no supere los 4°C hasta el momento de entrega en el laboratorio.

**3.2.2.2. Análisis microbiológico.** Recuento de mesófilos oxigénicos para las muestras de leche cruda. Método de referencia: AOAC método oficial 986.33.

Se determinó el número de Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/ml) de microorganismos mesófilos aerobios provenientes de células viables en leche cruda empleando Placas 3M Petrifilm (CORPOICA, 2013).

Preparación de diluciones.

- Dilución  $10^{-1}$

Se transfirió 10 ml de la muestra de leche cruda con una transferpipeta a un frasco tapa azul que contenía 90 ml de agua peptonada 0,1%. Se descartó la punta; se mezcló muy bien la muestra, asegurando su homogenización; se dejó en reposo un minuto.

- Dilución  $10^{-2}$

Empleando la transferpipeta, se tomó 1 ml de la dilución  $10^{-1}$ , se adicionó a un tubo que contenía 9 ml de agua peptonada, se agitó, se dejó reposar y se descartó la punta.

- Dilución  $10^{-3}$

Empleando la transferpipeta, se tomó 1 ml de la dilución  $10^{-2}$ , se adicionó a un tubo que contenía 9 ml de agua peptonada, se agitó, se dejó reposar y se descartó la punta.

- Dilución  $10^{-4}$

Empleando la transferpipeta, se tomó 1 ml de la dilución  $10^{-3}$ , se adicionó a un tubo que contenía 9 ml de agua peptonada, se agitó, se dejó reposar y se descartó la punta.

- Dilución  $10^{-5}$

Empleando la transferpipeta, se tomó 1 ml de la dilución  $10^{-4}$ , se adicionó a un tubo que contenía 9 ml de agua peptonada, se agitó, se dejó reposar y se descartó la punta.

Inoculación de diluciones.

- Se sirvió 1 ml de la última dilución en la placa 3M Petrifilm previamente identificada con el código de la muestra.
- Se colocó la placa 3M Petrifilm en una superficie plana y se levantó la película superior.
- Se colocó 1 ml de la dilución en el centro de la película cuadrículada inferior empleando la pipeta.
- Se liberó la película superior dejando que cayera sobre la dilución y asegurándose de que no quedaran burbujas entre la película y la muestra.
- Se tomó el dispersor o espaciador con el lado rugoso hacia abajo y se colocó sobre la película superior de la placa, cubriendo totalmente la muestra; se presionó suavemente para distribuir la muestra sobre el área circular.
- Se levantó el dispersor o esparcidor y se esperó un minuto a que se solidifique el gel y se procedió a la incubación.
- Se repitió este procedimiento para cada una de las muestras.
- Se incubó cada una de las placas cara arriba en grupos de no más de 20 piezas, a una temperatura de  $32^{\circ}\text{C}$  durante  $48\pm 3$  horas.
- Se realizó el conteo de colonias con el equipo lector de colonias marca 3M para poder realizar la caracterización (MPS, 2013).

**3.2.2.3. Análisis fisicoquímicos.** Las determinaciones fisicoquímicas se realizaron por duplicado, atendiendo las especificaciones de la NTC 399:2002.

- Determinación de pH.

Se realizó la prueba de pH utilizando un pHmetro digital INDULAB.

- Determinación de densidad, grasa, proteína, S.N.G y S.T.

Se realizaron los análisis de grasa, proteína y sólidos totales utilizando el método automatizado infrarrojo por espectrofotometría de análisis infrarrojo según la norma internacional AOAC 972.16. (MPS, 2013), en el equipo Milkoscan Minor 6.

Preparación de la muestra.

- Se llevó el frasco de muestra de leche cruda a un baño de agua a 45°C durante 15 minutos, hasta alcanzar una temperatura de 39°C.
- Se agitó la muestra manualmente durante 30 segundos, para obtener una distribución homogénea de la grasa.
- Se agitó con movimientos de mano formando un arco de 45° tres veces.
- Se comprobó la temperatura con el termómetro digital ( $T 39 \pm 1^\circ\text{C}$ ).
- Se revisó que las muestras no tengan coágulos, suciedades o partículas ajenas.

Análisis de la muestra.

- Se analizaron las muestras preparadas operando el instrumento de acuerdo al instructivo del fabricante.
- Los resultados de los análisis fueron arrojados por el software del equipo.

### **3.2.3. Detección de la presencia de Aflatoxina M1 en muestras de leche cruda.**

**3.2.3.1. Muestreo de leche cruda en hatos.** Se tomaron un total de 80 muestras de leche: 40 entre los meses de marzo-mayo de 2016 (época de sequía) provenientes de los hatos lecheros donde las vacas consumieron los piensos que fueron muestreados con anterioridad; 40 en el mes de agosto de 2016 (época de lluvia), correspondientes a los proveedores muestreados en los meses de marzo-mayo; las muestras se tomaron en frascos previamente esterilizados y se llevaron al laboratorio refrigeradas en cava. Teniendo en cuenta la norma GTC 263:2016.

El procedimiento es el mismo que el llevado a cabo para toma de muestra para análisis microbiológicos y fisicoquímicos.

**3.2.3.2. Muestreo de Leche en Silos.** En época de sequía se tomó una muestra de la leche en tanque de almacenamiento, mezcla de las leches analizadas individualmente por proveedor.

En época de lluvia, se analizaron dos tanques de almacenamiento de leche cruda y un tanque de almacenamiento de leche termizada, que fue la leche que se procesó para UHT.

- Se lavó cuidadosamente el toma muestras de cada uno de los tanques con agua y jabón.
- Se aplicó alcohol al 70% y flameó.
- Se abrió el toma muestras y se dejó descartar la primera porción de leche.
- Se tomó un volumen aproximado de 1000 ml en una jarra previamente lavada y de allí se tomó la muestra de 300 ml en un frasco estéril.

**3.2.3.3. Muestreo de Bolsas de leche entera UAT.** Se tomaron las bolsas de leche entera UAT de diferentes presentaciones, se analizaron un total de 18 bolsas de leche entera UAT marca Freskaleche S.A.S., distribuida de la siguiente manera: 10 en época de sequía y 8 en época de lluvia.

- Se descartó en el arranque de producción la primera caja de leche empacada de cada una de las bocas.
- Se tomó para determinar la presencia de AFM1 una bolsa a las 2 horas de haber iniciado la etapa de empaque, para obtener una mejor trazabilidad.

#### **3.2.3.4. Preparación del test.**

(Ver Anexo 2. Prueba rápida de inmunoensayo para determinar AFM1).

- Se utilizó la prueba rápida de REVEAL AFLATOXINA M1.
- Se aseguró de que el bloque calentador tenía una temperatura de  $47,5 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ .
- El kit se retiró de la nevera y se dejó atemperar entre 15 a  $30^{\circ}\text{C}$  durante 10-15 min antes de la apertura para evitar la condensación.
- Se retiró solamente los viales que se utilizaron e inmediatamente se devolvió el kit para el refrigerador.
- Se verificó que las tiras inmunocromatográficas de la prueba estaban limpias y secas dentro del tubo.

- Se etiquetó cada vial y cada tira de prueba por cada muestra de ensayo.
- Se hicieron un máximo de seis pruebas al mismo tiempo. Para esto todas las muestras tenían que estar preparadas antes de ser insertadas en el bloque calentador y de iniciar el período de incubación.

#### **3.2.3.5. Análisis de la muestra**

- Se agitó la muestra de leche a fondo para asegurar una mezcla homogénea.
- Se golpeó suavemente el vial con reactivos de partículas de oro liofilizados en una superficie dura con el fin de asegurar que todo el material sólido esté en el fondo del frasco.
- Se retiró con cuidado la tapa y el tapón de goma del vial.
- Se pipeteó 200 µl de muestra de leche en el vial y se colocó el tapón de goma.
- Se mezcló la leche y los reactivos bien, invirtiendo el vial y realizando un movimiento circular hasta que todos los sólidos estén en solución.
- Se retiró el tapón del frasco y se colocó el vial en el bloque calefactor para su incubación a  $47,5^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$  durante tres minutos.
- Al terminar este tiempo, se colocaron las tiras de prueba etiquetadas en el vial en el bloque calentador. Se tuvo cuidado que las flechas se encontrasen orientadas hacia abajo en él.
- Al finalizar la incubación de dos minutos, se retiró la tira del vial.

#### **3.2.3.6. Interpretación de resultados**

(Ver anexo 3. Resultados de la prueba de inmunoensayo para determinar presencia de AFM1).

La tira de prueba se leyó dentro de los tres minutos siguientes y se tuvo en cuenta las siguientes indicaciones:

Sensibilidad del test rápido 350 ppt (0.35 µg/Kg).

- Negativa: Si la línea de prueba es igual o más oscura que la línea de control, la prueba es negativa.  
No se detecta residuo de Aflatoxina M1.
- Positiva: Si la línea de prueba es visualmente más ligera que la línea de control, la prueba es positiva.

Se detecta residuo de Aflatoxina M1.

- Positiva severa: Si la línea de prueba no aparece y la de control si, la prueba es positiva severa.

Se detecta residuo de Aflatoxina M1.

- Dudosa: Si no aparece diferencia clara entre las dos líneas.

No se puede determinar el resultado de positivo o negativo.

### **3.2.4. Estimación de los niveles de Aflatoxina M1 en muestras de leche cruda y leche UAT.**

**3.2.4.1. Método de referencia NTC 5219:2003.** Cuantificación de Aflatoxina M1 por Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). (Ver anexo 4. Cuantificación de AFM1 por cromatografía HPLC).

**3.2.4.2. Extracción y purificación de la AFM1.** De acuerdo a lo establecido en el método oficial propuesto por la ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS AOAC (2000).

- Se tomaron 120 ml de cada una de las muestras, tanto de leche cruda, como muestras de silos y leche entera UHT; se pasaron a un erlenmeyer con capacidad de 250 ml.
- Se calentaron las muestras hasta obtener una temperatura de 37°C.
- Se pasaron 50 ml a los tubos para la centrifuga, se taparon.
- Las muestras se descremaron mediante el centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos.

Pasado este tiempo, las muestras se filtraron, primero con ayuda de una espátula se retiró el restante de grasa y luego se pasó por un embudo provisto de papel filtro, se dejó allí decantar, hasta que se obtuvo la muestra descremada en erlenmeyer de 100 ml. Para la extracción de la AFM1 de las muestras de leche ya descremadas, se tuvieron en cuenta las siguientes etapas:

**3.2.4.3. Etapa de acondicionamiento.** Se colocaron las columnas de fase sólida C18 en el equipo de extracción de fase sólida, para la activación del adsorbente y de los grupos funcionales (para desnaturalizar los anticuerpos), se consiguió al pasar metanol: acetonitrilo

en proporción 2:3, volumen 6,25 µL. Con lo anterior, se obtuvo que los filtros se solvataran convenientemente.

**3.2.4.4. Etapa de cargar la muestra.** Con ayuda de una jeringa se dejó pasar a través de la columna 50 ml poco a poco, teniendo cuidado de no dejarla secar. Los contaminantes pudieron pasar por la columna sin ser retenidos y el resto de componentes se retuvo más o menos fuertemente en la superficie del adsorbente. Se tuvo en cuenta el caudal de la muestra para una mayor eficacia.

**3.2.4.5. Etapa de lavado.** Se utilizó 1 ml de agua desionizada tipo HPLC para lavar la columna se abrió la llave totalmente, esto se realizó dos veces con el fin de eliminar cualquier resto de compuestos que pudieran interferir manteniendo los analitos en el lecho de adsorbente.

**3.2.4.6. Etapa de secado.** Antes de bajar las columnas del extractor de fase sólida, se utilizó una jeringa provista de un corcho para generar vacío con el fin de extraer las trazas de solvente, con esto se mejora el rendimiento de extracción.

Se desmontaron las columnas del extractor de fase sólida y se secaron con mucho cuidado con ayuda de una toalla de papel, para no tocar la muestra.

**3.2.4.7. Etapa de elución.** En un vial de 2 ml, se colocó la columna con la muestra y se adicionó Metanol: acetonitrilo 2:3, 6,25 µl. Con ayuda de la jeringa provista del corcho, se hizo presión positiva para eliminar la interacción analito-solvente y eluir el 110% de la AFM1. Se realizó este procedimiento dos veces.

- Luego se adicionó 6,25 µl de agua tipo HPLC dos veces, se dejó correr por las paredes de la columna.
- Se recolectó en los viales de 2 ml provistos de tapa plástica. Todos los viales se pasaron por el Vortex para asegurar una buena homogenización de la muestra; se pasaron al ultrasonido durante 2 minutos y luego nuevamente al Vortex.
- Se pasó 1 ml de los viales anteriores por una jeringa de vidrio provista de filtro a un vial de 1,5 ml, haciéndole presión positiva y se obtuvieron las muestras para pasar al cromatógrafo.

- Se guardaron en la nevera hasta el otro día.
- Todos los viales se pasaron por el Vortex para asegurar una buena homogenización de la muestra; se pasaron al ultrasonido durante 2 minutos y luego nuevamente al Vortex.

**3.2.4.8. Análisis cromatográfico.** Cromatógrafo Shimadzu Prominence sistema HPLC Fluorescence detector RF-20A xc. Los viales de 1 ml se colocaron en el cromatógrafo HPLC provisto de un detector de fluorescencia con longitud de onda de excitación y emisión de 365 y 425 nm, respectivamente; acoplado a un cromatógrafo de líquidos de alta resolución, empleando una columna de fase reversa C18.

- Se utilizó como fase móvil: metanol-acetonitrilo-agua (20:20:60) a flujo continuo de 1 ml/min.
- Volumen de inyección de la muestra fue de: 50 µL.
- Tiempo de retención 8 a 24 minutos (Ver Anexo 7. Cromatogramas).

**3.2.5. Análisis estadístico.** Los datos obtenidos en esta investigación se analizaron con las herramientas estadísticas Statistix 10 y Microsoft Excel.

Los datos obtenidos en la evaluación de la presencia del género *Aspergillus spp.* en los piensos de los hatos lecheros, se graficaron con el fin de mostrar los tipos de piensos más utilizados en el área de estudio y realizar una identificación preliminar de las presuntivas especies presentes en los piensos analizados.

Para evaluar la variación de cada una de los parámetros fisicoquímicos de la leche en épocas de sequía y lluvia, al dar cumplimiento al segundo objetivo, se aplicó la técnica estadística ANOVA DE UN FACTOR, donde la variable dependiente la constituye cada una de las variables físicoquímicas (pH, densidad, grasa, S.N.G, proteína, S.T) y el factor se llama TIEMPO, cuyos niveles son sequía y lluvia. Tomando como ejemplo una de las variables fisicoquímica de la leche como el pH, el modelo en este caso es:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij}$$

Donde  $Y_{ij}$ , representa la variable aleatoria dependiente, es decir el pH, bajo el  $i$ -ésimo factor, en otras palabras, bajo las dos épocas contempladas.

$\mu$ : Representa la respuesta promedio total del pH en las muestras

$\tau_i$ : Representa el efecto de variación en el pH de la leche cruda en época y lluvia y sequía.

$\epsilon_{ij}$ : Es un error aleatorio

Y el contraste de hipótesis a probar es:

$$\begin{cases} H_0: \mu_S = \mu_{LL} \\ H_1: \mu_S \neq \mu_{LL} \end{cases}$$

$H_0$ : Niveles iguales en el pH de la leche en época de lluvia y sequía

$H_1$ : Diferencia del pH de la leche en época de lluvia y sequía

En la detección de la presencia de Aflatoxina M1 en muestras de leche cruda, con los datos obtenidos se realizó una tabla donde se muestra la presencia o ausencia de la Aflatoxina M1.

Además, en la evaluación de los niveles promedio de Aflatoxina M1 en leche cruda y leche UAT, se realizó la respectiva curva de regresión lineal con su modelo matemático.

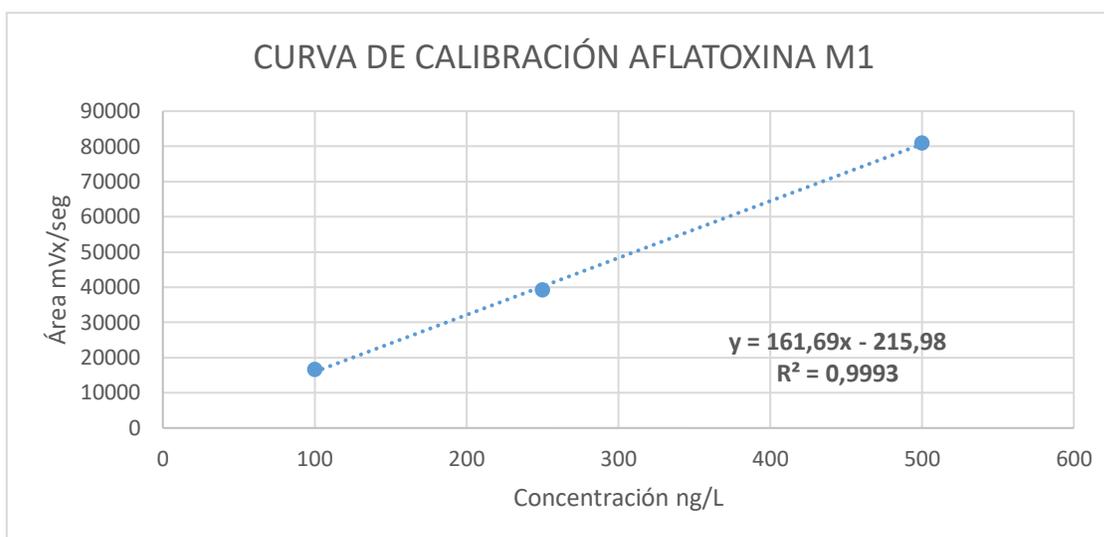
En la Tabla 19, se presenta la curva de calibración de AFM1, sus correspondientes concentraciones, tiempos de retención y área correspondiente.

Tabla 19. Calibración de la curva de Aflatoxina M1.

Concentración ng/L	Tiempo de retención	Área mVx/seg
100	8,252	16581
250	8,247	39201
500	8,245	81005

Fuente: Autor.

En la Gráfica 2 se presenta la curva de calibración aflatoxina M1.



Gráfica 2. Curva de calibración aflatoxina M1.

Fuente: Autor.

Se realizó la prueba **t-student** para contrastar hipótesis de comparación, de los intervalos de AFM1 determinados por el método de HPLC, con los permitidos por legislación vigente, con un nivel de significancia del 5%.

## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Evaluación de la presencia del género *Aspergillus* en los piensos de los hatos lecheros.

#### 4.1.1. Muestreo de piensos.

En los hatos lecheros se tomaron las muestras de los diferentes piensos en época de sequía y época de lluvia, como se aprecia en la Tabla 20.

Tabla 20. Tipos de piensos utilizados en los hatos lecheros.

<i>Piensos</i>	<i>Sequía</i>	<i>Lluvia</i>
Pastoreo	0	27
Pollinaza + Palmiste	1	0
Pasto De Corte	1	0
Silo De Millo	1	0
Pollinaza + Corozo	1	0
Palmiste + Melaza	2	0
Heno	3	0
Palmiste	4	1
Ensilado de Maiz	27	12

Fuente: Autor

Para la época de sequía se presentó un drástico aumento de temperatura en la región, el mayor consumo de alimento para ganado fue el ensilado de maíz, el cual se encontró en los hatos lecheros almacenado de diferentes maneras como canecas, bultos de 25 Kg, silo pack, entro otras. Como se puede apreciar en la Figura 11. Presentaciones de ensilados de maíz. Seguido de palmiste y heno. Por ser una región donde se cultiva maíz, palma africana; es muy común en estas épocas del año encontrar aprovechamiento de dichos cultivos para la alimentación del ganado, al igual que el pasto deshidratado para construir los bloques de heno.



Empacado en Bulto



Silopack



Almacenado los bultos en bodegas



Empacado en caneca



Montón

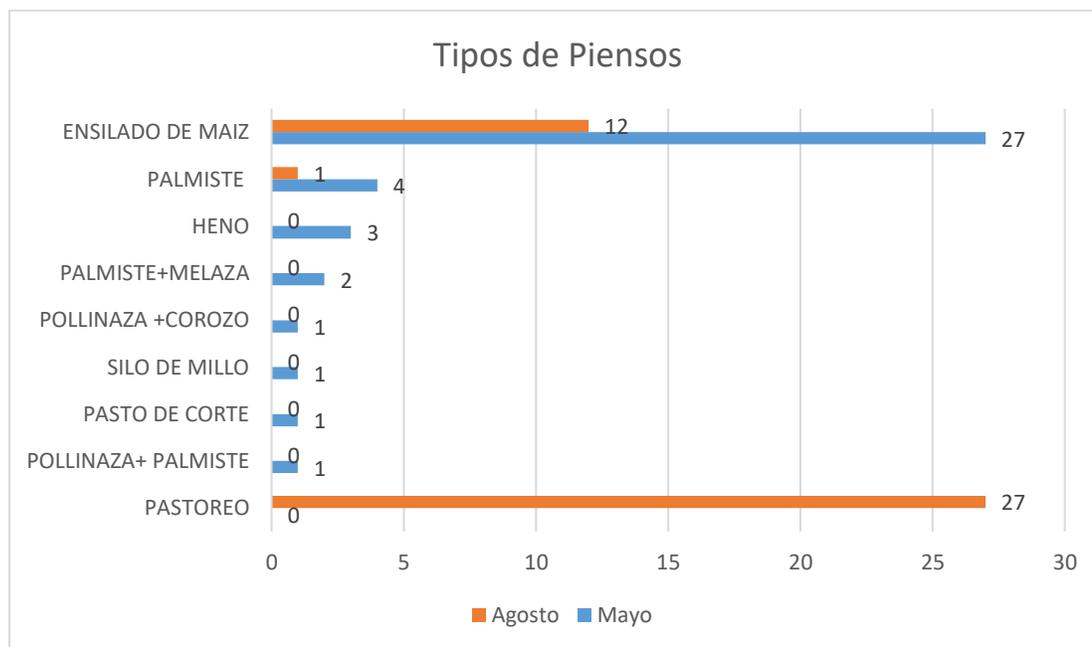


Pollinaza con corozo

*Figura 11.* Presentaciones de ensilados de maíz.

Fuente: *Autor*

Por otra parte, en época de lluvia, sobresalió el pastoreo, puesto que los ganaderos de la región prefieren esta técnica de alimentación por el sobre costo que les genera la alimentación con otro pienso. Ver gráfica 3. Tipos de piensos.



Gráfica 3. Tipos de piensos en época de sequía.

Fuente: Autor

**4.1.2. Análisis microbiológicos de piensos.** (Método de referencia NTC 4491:2004. Se realizó una identificación del género *Aspergillus* utilizando la clave taxonómica recomendada por Carillo & Audisio (2007), se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 21).

Tabla 21. Posibles candidatos a especies de *Aspergillus* aislados de los diferentes piensos.

Muestras	Descripción	Identificación	Cantidad
001-002-003-007-008-009-019-020-021-024-026-027-028-029-032-033-034-038	<p>*Cabezas conidiales verde amarilla a tonalidades olivo-carmelita fuerte, a veces, se vuelven verde grisáceo.</p> <p>*Conidioforos largos, cenocíticos, por lo general rugosos e incoloros.</p> <p>*Las vesículas son esféricas, cubiertas en 360° y contienen de 1 a 2 series de fialides.</p> <p>*Micelio septado, macrosinfonado, hialino, ramificado,</p> <p>*Colonias de crecimiento rápido, de 3 a 5 días.</p> <p>*Colonias con color blanco-amarillento, algodonoso y con tonalidades verdosas o verde-amarillentas.</p>	<i>A. flavus</i>	18

<b>Muestras</b>	<b>Descripción</b>	<b>Identificación</b>	<b>Cantidad</b>
	*Las colonias a medida que envejecen se vuelven verdosas y de textura pulverulenta.		
030-031	*Conidios amarillos o verde amarillentos. *Cabezas conidiales casi siempre con métulas y fiálides. *Conidios de paredes finas, lisas o apenas rugosas. *Conidios de paredes gruesas rugosas.	<i>A. parasiticum</i>	1
04	*Cabezas conidiales con métulas. *Conidios cilíndricos o con forma de barril, en columnas.	<i>A. restrictus</i>	1
05-017-031	*Cleistotecios color blanco. *Colonias de crecimiento rápido, ilimitadas, planas y aterciopeladas, comienzan de color verde con halo blanco y con el tiempo se vuelven grisáceas oscuras. *Cabeza conidial con fiálides sobre la mitad de la vesícula piriforme, subclavica. *Micelio macrosifonado, septado, hialino, conidios cortos cenocíticos.	<i>A. fumigatus</i>	3
006-010-013-014-022-023-036-037	*Crecimiento abundante gris a 25°C ó 37°C. *Vesículas con métulas y fiálides. *Micelio macrosifonado, septado, hialino, presenta cabezas aspergilaes subesféricas. *Conidios redondos esquinulados negros.	<i>A. niger</i>	8
012	Ver características de <i>A. flavus</i> y <i>A. fumigatus</i> .	<i>A. flavus</i> + <i>A. fumigatus</i>	1
016-025-040	Ver características de <i>A. flavus</i> y <i>A. niger</i> y <i>A. fumigatus</i> .	<i>A. flavus</i> + <i>A. niger</i> + <i>A. fumigatus</i>	3
011-035	*Colonias de color blanco o crema. *Vesícula toda rodeada de métulas con más de 10µm de largo.	<i>A. candidus</i>	2

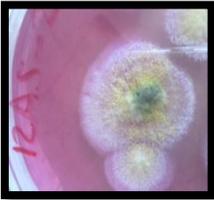
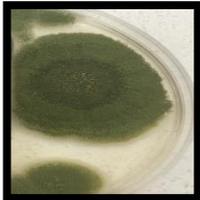
Muestras	Descripción	Identificación	Cantidad
015-018-039		Ausencia de <i>Aspergillus</i>	3

Fuente: Autor.

En la Tabla 21, se presentan las características tanto microscópicas como macroscópicas que se tuvieron en cuenta para determinar la presencia del género *Aspergillus* en las 40 muestras de piensos que se tomaron de los diferentes hatos lecheros que proveen leche cruda al centro de acopio de Freskaleche S.A.S. No se encontró en ninguna de las muestras la presencia de *A. nomius*, y en tres muestras hubo presencia de otros hongos pero no de *Aspergillus* spp.

Después de haber comparado con la clave taxonómica según Carillo (2007), se determinó la presencia de 6 especies posibles candidatos de *Aspergillus* en las muestras de los piensos analizadas. Entre ellas se encontró *A. flavus*, *A. parasiticum*, *A. restricta*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. candidus*. Como se muestra en la Tabla 22.

Tabla 22. Especies de posibles candidatos de *Aspergillus* encontradas en los diferentes piensos.

Especie de <i>Aspergillus</i>	En medio de cultivo PDA ó Rosa de Bengala a 7 día / 25°C.		Microscópicamente en 100 x.
	Rosa de Bengala	PDA	
<i>A. flavus</i>			

<i>Especie de Aspergillus</i>	<i>En medio de cultivo PDA ó Rosa de Bengala a 7 día / 25°C.</i>	<i>Microscópicamente en 100 x.</i>
-------------------------------	--	------------------------------------

*A. parasiticum*



*Agar PDA*

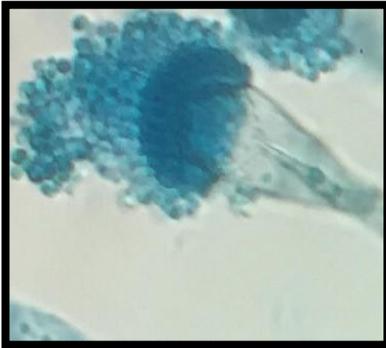
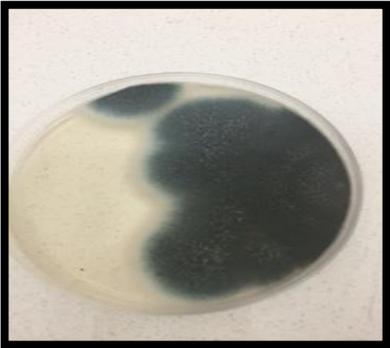
*A. restricta*



*Agar PDA*

40x.

*A. fumigatus*



*Agar PDA.*

<i>Especie de Aspergillus</i>	<i>En medio de cultivo PDA ó Rosa de Bengala a 7 día / 25°c.</i>	<i>Microscópicamente en 100 x.</i>
-------------------------------	--	------------------------------------

*A. niger*



Agar PDA.



40x.

*A. candidus*



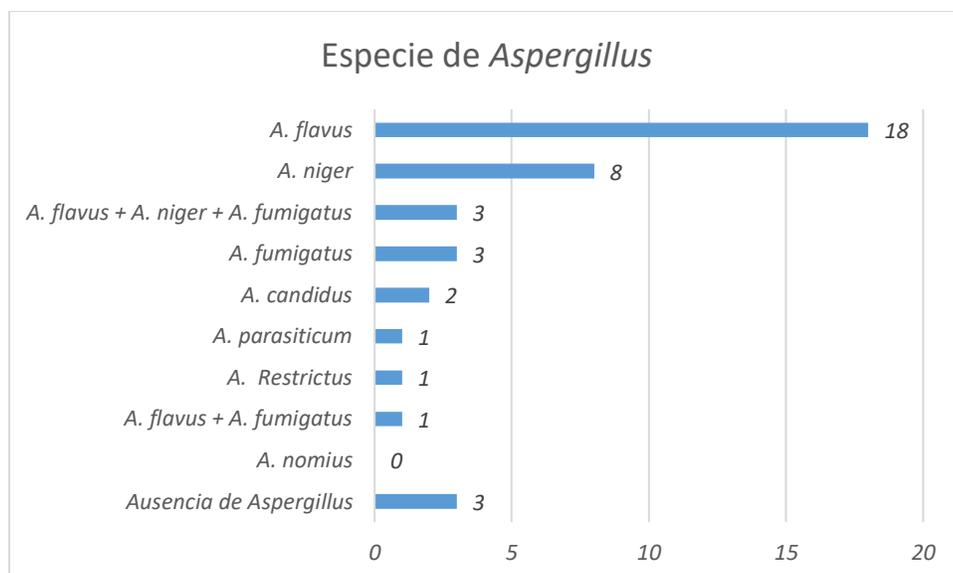
Agar PDA.



Fuente: Autor

En la Gráfica 4. Se puede apreciar que en un 45% (18 de las 40 muestras analizadas) se encontró *A. flavus* como la especie más predominante, seguida de *A. niger* ( posible candidato); es de resaltar que la presencia de varias especies de *Aspergillus* en una sólo muestra también resultó significativa.

En el 92,5% de las 40 muestras de piensos tomados en los hatos lecheros en la época de sequía y analizadas se determinó la presencia del género *Aspergillus*, objetivo de la investigación. De los cuales el 47,5% son posibles candidatos a las especies de *A. flavus*, *A. parasiticum* y se encontraron con mayor frecuencia en los piensos de ensilados de maíz, heno, palmiste y pollinaza + palmiste.



Gráfica 4. Posibles candidatos a especies de *Aspergillus* encontradas en los diferentes piensos.

Fuente. Autor.

## 4.2. Características microbiológicas y fisicoquímicas de las muestras de leche cruda.

**4.2.1. Análisis microbiológicos de las muestras de leche cruda.** En la Tabla 23 se presentan los resultados de los análisis microbiológicos de las muestras de leche cruda tomadas en los hatos lecheros en las dos épocas del año, tanto en sequía como en época de lluvia.

Tabla 23. Resultados de los análisis microbiológicos de la leche cruda.

Muestra	Log UFC/ml (Sequía)	Log UFC/ml (Lluvia)	Muestra	Log UFC/ml (Sequía)	Log UFC/ml (Lluvia)
1	4,46	4,98	10	5,82	4,66
2	4,78	3,99	11	5,76	4,99
3	5,29	6,69	12	4,95	4,76
4	4,74	6,17	13	6,10	5,88
5	4,08	3,71	14	4,00	4,37
6	4,76	4,89	15	4,36	5,22
7	6,07	5,64	16	4,87	4,91
8	4,18	6,14	17	4,49	4,02
9	5,15	5,43	18	5,29	5,62

<b>Muestra</b>	Log UFC/ml (Sequía)	Log UFC/ml (Lluvia)	<b>Muestra</b>	Log UFC/ml (Sequía)	Log UFC/ml (Lluvia)
<b>19</b>	4,48	6,74	<b>30</b>	5,57	4,92
<b>20</b>	4,30	4,66	<b>31</b>	5,28	6,30
<b>21</b>	4,56	5,11	<b>32</b>	5,33	6,84
<b>22</b>	4,04	4,67	<b>33</b>	4,57	4,55
<b>23</b>	5,39	4,51	<b>34</b>	4,52	5,21
<b>24</b>	5,43	6,30	<b>35</b>	5,76	4,99
<b>25</b>	4,71	5,92	<b>36</b>	4,34	4,67
<b>26</b>	4,66	5,52	<b>37</b>	4,95	4,76
<b>27</b>	5,14	4,78	<b>38</b>	5,82	4,66
<b>28</b>	4,96	5,13	<b>39</b>	5,37	4,79
<b>29</b>	5,94	5,68	<b>40</b>	4,64	5,11

Fuente: Autor

En la mayoría de los hatos lecheros en la época de lluvia se aumenta notablemente el recuento de mesófilos oxigénicos; en un 60% de las muestras los recuentos fueron más altos en comparación a la época de sequía. La muestra 19 que pertenece a la finca María Margarita, proveedor Ciro Densio Castilla, presentó una diferencia notable en las dos épocas del año, esto se pudo presentar debido a que la vaquera es de techo y empedrada lo que no genera problema en época de sequía, pero en época de lluvias los alrededores se encuentran con empozamientos de agua, embarrados; lo cual permite que los pesones de las vacas se contaminen más fácilmente. En la Tabla 24, se presenta el análisis estadístico del recuento de mesófilos oxigénicos.

Tabla 24. Resultados estadísticos descriptivos - Recuentos microbiológicos.

<i>Variable microbiológica</i>	<i>Época</i>	<i>Media</i>	<i>Desviación Estándar</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Mediana</i>	<i>Rango</i>
Mesófilos oxigénicos (UFC/ml)	Sequía	222850	312137,26	10000	1248000	81500	1238000
	Lluvia	735834,425	1550326,87	5119	6850781	97365	6845662

Fuente: Autor.

Al realizar el análisis de los datos de los recuentos microbiológicos, estos están muy dispersos. A pesar de ello se evidencia notablemente las diferencias entre la época de sequía

y la época de lluvia. En época de lluvia se aumenta el recuento de mesófilos oxigénicos; esto puede ser debido a que cuando la leche se obtiene en condiciones higiénicas, y procede de animales sanos, contiene pocos microorganismos provenientes de la ubre. Sin embargo, una vez extraída, ésta se puede contaminar inicialmente en la producción primaria. En la época de lluvia aumentan en los hatos lecheros el riesgo de los contaminantes y los factores de contaminación externa como las heces del animal, el ambiente que lo rodea (barro, charcos), los utensilios usados durante el proceso de ordeño, el transporte y la comercialización, así como el manipulador y el agua utilizada para los procesos de lavado y desinfección en las etapas de ordeño.

En Colombia, existen hatos que entregan leches con menos de 20000 UFC/ml de mesófilos oxigénicos y aún con menos de 10000 UFC/ml, esto se logra con el cumplimiento de las normas de higiene durante el ordeño, un eficiente programa de prevención de mastitis y una adecuada y oportuna refrigeración de la leche (Cotrino, 2001). En realidad, un alto recuento de UFC en un alimento indica que, probablemente, ha estado conservado en condiciones de tiempo y temperatura que han permitido el desarrollo de microorganismos (Frazier y Westhoff 1993).

**4.2.2. Análisis fisicoquímicos de las muestras de leche cruda.** En la Tabla 25 se presentan los resultados de los análisis fisicoquímicos de las muestras de leche cruda tomadas en los hatos lecheros.

Tabla 25. Análisis fisicoquímicos de la leche cruda.

Cód	pH		Densidad (g/ml)		Grasa (%)		SNG(%)		Proteína (%)		ST (%)	
	Seq	Lluv	Seq	Lluv	Seq	Lluv	Seq	Lluv	Seq	Lluv	Seq	Lluv
1	6,8	6,8	1,032	1,033	3,42	3,5	8,39	8,85	2,94	3,34	11,81	12,35
2	6,8	6,8	1,033	1,033	4,74	3,94	8,12	8,8	3,11	3,32	12,86	12,74
3	6,8	6,8	1,032	1,033	3,81	3,43	8,61	8,9	3,26	3,42	12,42	12,33
4	6,8	6,8	1,033	1,033	4,04	4,23	8,44	9,02	3,28	3,57	12,58	13,25
5	6,8	6,8	1,033	1,033	4,35	3,76	8,22	8,65	3,02	3	12,57	12,41
6	6,8	6,8	1,032	1,031	3,89	3,68	8,66	9,13	3,34	3,55	12,55	12,81
7	6,7	6,8	1,032	1,033	3,78	4,51	8,56	8,09	3,27	3,31	12,34	12,6
8	6,8	6,8	1,03	1,033	2,29	4,38	8,33	8,17	2,88	3,45	10,62	12,55
9	6,8	6,7	1,033	1,033	4,02	4,06	8,61	9,07	3,32	3,56	12,63	13,13
10	6,8	6,7	1,032	1,033	3,42	3,97	8,47	9,23	3,14	3,82	11,89	13,2
11	6,8	6,7	1,032	1,033	3,77	4,25	8,49	8,92	3,22	3,56	12,26	13,17

Cód	pH		Densidad (g/ml)		Grasa (%)		SNG(%)		Proteína (%)		ST (%)	
	Seq	Lluv	Seq	Lluv	Seq	Lluv	Seq	Lluv	Seq	Lluv	Seq	Lluv
12	6,8	6,7	1,033	1,033	4,33	4,42	8,21	8,94	3,22	3,6	12,54	13,36
13	6,7	6,7	1,033	1,033	4,74	4,08	8,49	8,03	3,18	3,21	13,23	13,01
14	6,8	6,8	1,032	1,032	3,53	3,5	8,5	8,92	3,27	3,38	12,03	12,42
15	6,8	6,8	1,033	1,031	4,09	3,55	8,25	8,64	3,36	3,4	12,34	12,19
16	6,8	6,8	1,032	1,033	3,32	4,22	8,39	9	3,12	3,63	11,71	13,22
17	6,8	6,8	1,03	1,032	2,59	3,63	7,29	8,88	2,67	3,5	9,88	12,51
18	6,8	6,8	1,033	1,033	4,44	4,51	8,71	8,22	3,36	3,46	13,15	12,73
19	6,8	6,7	1,032	1,032	3,24	3,71	8,86	8,85	3,28	3,41	12,1	12,56
20	6,8	6,7	1,032	1,032	3,25	3,88	8,55	9,19	3,1	3,63	11,8	13,01
21	6,8	6,7	1,031	1,032	3,17	4,38	8,56	8,85	3	3,61	11,73	13,23
22	6,8	6,8	1,032	1,033	3,38	4,25	8,43	9,09	3,07	3,67	11,81	13,34
23	6,8	6,8	1,032	1,033	3,61	4,15	8,76	9,04	3,19	3,63	12,37	13,19
24	6,8	6,8	1,032	1,032	3,98	3,89	8,59	9	3,17	3,47	12,57	12,89
25	6,8	6,8	1,033	1,032	4,37	3,86	8,53	8,61	3,18	3,26	12,9	12,47
26	6,8	6,8	1,032	1,030	3,22	2,42	8,67	9,33	3,18	3,38	11,89	11,75
27	6,8	6,8	1,032	1,033	3,27	3,54	8,75	8,83	3,21	3,4	12,02	12,37
28	6,8	6,8	1,032	1,033	3,39	3,87	8,89	9,06	3,28	3,49	12,28	12,93
29	6,8	6,8	1,032	1,033	3,91	4,65	8,14	8,29	2,95	2,64	12,05	12,94
30	6,8	6,7	1,032	1,032	3,41	4,28	8,3	9,09	2,99	3,6	11,71	13,37
31	6,8	6,8	1,031	1,031	3,09	3,7	8,59	8,74	3,19	3,39	11,68	12,44
32	6,8	6,8	1,03	1,031	2,75	4,33	8,04	8,94	2,81	3,44	10,79	13,27
33	6,8	6,8	1,03	1,032	2,58	3,29	7,87	8,8	2,87	3,32	10,45	13,01
34	6,8	6,8	1,03	1,031	2,83	3,43	8,46	8,74	3,01	3,2	11,29	12,17
35	6,8	6,7	1,032	1,033	3,77	4,25	8,49	8,92	3,22	3,56	12,26	13,17
36	6,8	6,8	1,033	1,033	4,36	4,55	8,79	9,25	3,48	3,73	13,15	13,8
37	6,8	6,7	1,033	1,033	4,33	4,42	8,21	8,94	3,22	3,6	12,54	13,36
38	6,8	6,7	1,032	1,033	3,42	3,97	8,47	9,23	3,14	3,82	11,89	13,2
39	6,8	6,8	1,032	1,032	3,66	3,82	8,38	8,83	3,13	3,38	12,04	12,65
40	6,7	6,7	1,032	1,033	4,16	5,35	8,81	9,71	3,36	4,21	12,97	13

Fuente: Autor

Al comparar los resultados del porcentaje de grasa de las dos épocas del año, la muestra 002 arrojó un resultado más alto en época de sequía que en época de lluvia, debido al tipo de alimentación brindada al ganado, puesto que en esta finca le estaban suministrando pollinaza más palmiste que pueden aumentar más el porcentaje de grasa y en época de lluvia solamente pastoreo. Para las muestras 008, 017, 032, 033, 034 el porcentaje de grasa se encuentra por debajo de la normativa legal vigente en época de sequía; el ganado fue alimentado en todos estos hatos lecheros con ensilado de maíz, lo que pudo influir en este resultado. Al ser

directamente proporcional los valores de sólidos no grasos y sólidos totales también disminuyeron para dichas muestras. Como la Tabla 26 muestra variables físicoquímicas de la leche y estas son de tipo cuantitativo, el resumen de algunos datos estadísticos descriptivos se presentan en la tabla siguiente:

Tabla 26. Resultados estadísticos descriptivos -variables físicoquímicas.

<i>Variable Físicoquímica</i>	<i>Época</i>	<i>Media</i>	<i>Desviación Estandar</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Mediana</i>	<i>Rango</i>
pH	Sequía	6,793	0,0267	6,7	6,8	6,8	0,1
	Lluvia	6,77	0,0464	6,7	6,8	6,8	0,1
Densidad	Sequía	1,032	0,000974	1,03	1,034	1,032	0,004
	Lluvia	1,032	0,000813	1,03	1,033	1,033	0,003
Grasa	Sequía	3,643	0,5941	2,29	4,74	3,635	2,45
	Lluvia	3,99	0,4896	2,42	5,35	3,97	2,93
SNG	Sequía	8,447	0,2955	7,29	8,89	8,49	1,6
	Lluvia	8,87	0,3416	8,03	9,71	8,92	1,68
Proteína	Sequía	3,15	0,1683	2,67	3,48	3,18	0,81
	Lluvia	3,473	0,2438	2,64	4,21	3,465	1,57
ST	Sequía	12,09	0,727	9,88	13,23	12,18	3,35
	Lluvia	12,86	0,5825	11,75	15,06	12,85	3,31

Fuente: Autor

Según los valores de la desviación estándar, se puede observar que la variación en cada una de ellas tiende a cero, lo que significa que la información fue muy homogénea en los diferentes muestreos.

A continuación, en la Tabla 27 se presentan los resultados de ANOVA de las variables físicoquímicas de la leche cruda en las épocas de sequía y lluvia para las 80 muestras tomadas en los hatos lecheros de los proveedores del centro de acopio de Freskaleche S.A.S.

(Ver anexo 5. Resultado de ANOVA).

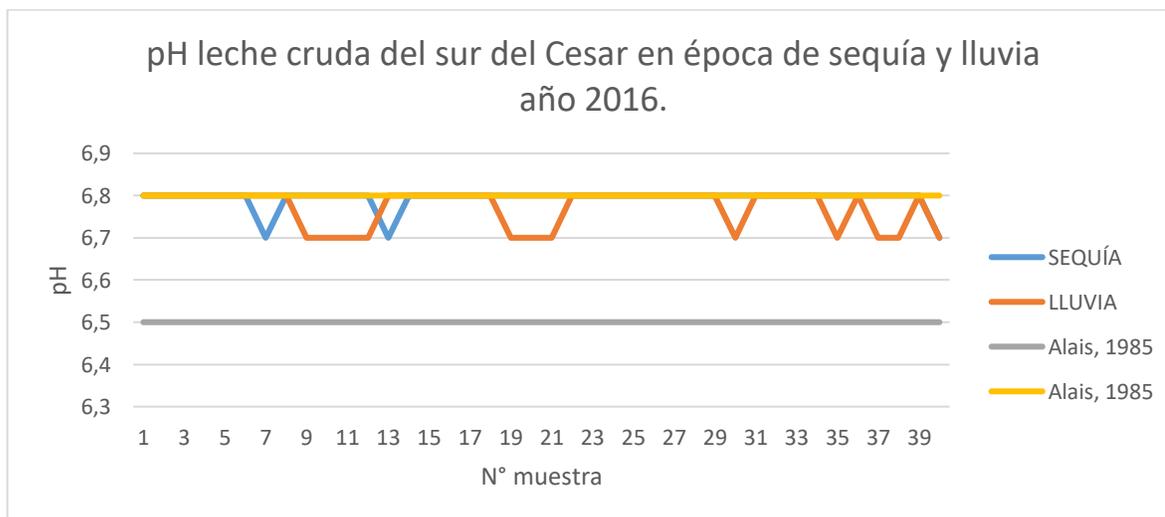
Tabla 27. Resultados de ANOVA de un factor.

<i>Variables fisicoquímicas en leche cruda época de sequía-lluvia.</i>				
<i>Nivel de significancia 5%</i>				
<i>Variable</i>	<i>Época</i>	<i>Promedio</i>	<i>P-valor</i>	<i>Interpretacion</i>
pH	Sequía	6,79	0,0095	Hay diferencias significativas
	Lluvia	6,77		
DENSIDAD (g/ml)	Sequía	1,0320	0,05	No hay diferencias significativas
	Lluvia	1,0324		
GRASA (%)	Sequía	3,6430	0,0055	Hay diferencias significativas
	Lluvia	3,9902		
SNG (%)	Sequía	8,4470	0,1857	No hay diferencias significativas
	Lluvia	8,8500		
PROTEÍNA (%)	Sequía	3,1498	0,0000	Hay diferencias significativas
	Lluvia	3,4730		
ST (%)	Sequía	12,092	0,7283	No hay diferencias significativas
	Lluvia	12,350		

Fuente: Autor.

Para una mayor ilustración se presentarán los resultados de ANOVA y las comparaciones múltiples en forma gráfica:

En la Gráfica 5, se muestran los comparativos de la variable fisicoquímica del pH.



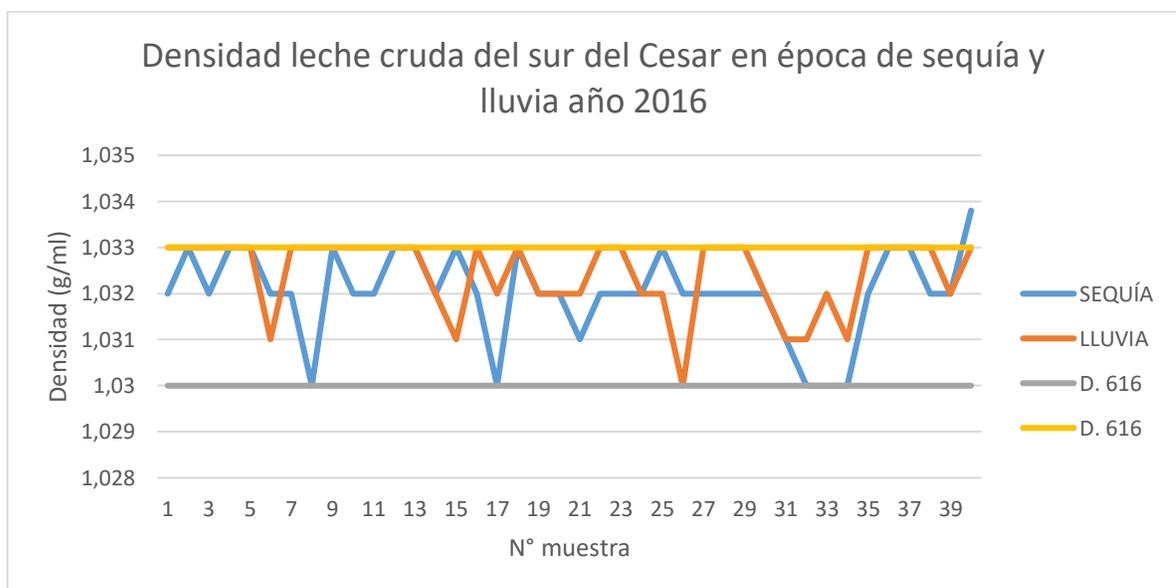
Gráfica 5. Comparativo de los valores de pH de leche cruda en las muestras tomadas en el Sur de Cesar, época de sequía y lluvia.

Fuente: Autor.

Se observa que el pH se encuentra dentro del rango normal entre 6,7 a 6,8 para ambas épocas del año; lo que significa que no se presentaron cambios drásticos para dicha variable.

La leche de vaca recién ordeñada y sana, es ligeramente ácida, con un pH comprendido entre 6,5 y 6,8 como consecuencia de la presencia de caseínas, aniones fosfórico y cítrico, principalmente (Alais, 1985; Fox y McSweeney, 1998), el pH es un parámetro de control para la industria, pero no se encuentra como parámetro dentro de la normativa legal vigente, ya que va ligado directamente a la acidez de la leche.

En la Gráfica 6, se muestran los comparativos de la variable fisicoquímica de la densidad.

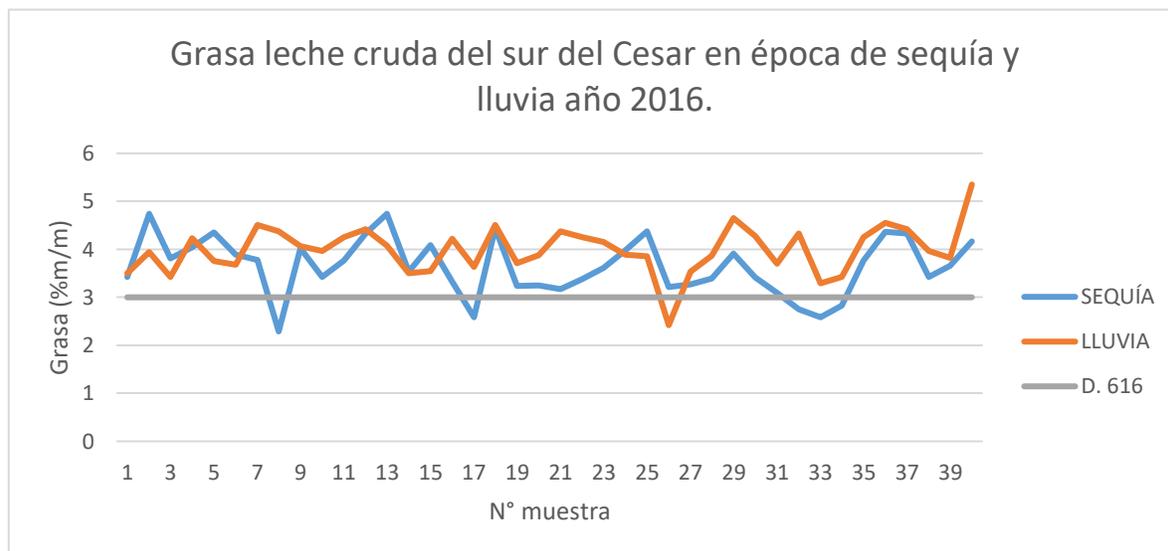


Gráfica 6. Comparativo de los valores de densidad de leche cruda en las muestras tomadas en el Sur de Cesar, época de sequía y lluvia con la normativa colombiana vigente.

Fuente: Autor

La densidad de la leche cruda en época de sequía presenta datos al límite de lo permitido por el Decreto MPS 616/06 y los valores para la época de lluvias se mantienen más altos debido a que en esta época se generan mejor calidad de pastos para el ganado.

En la Gráfica 7, se muestran los comparativos de la variable fisicoquímica del porcentaje de grasa.

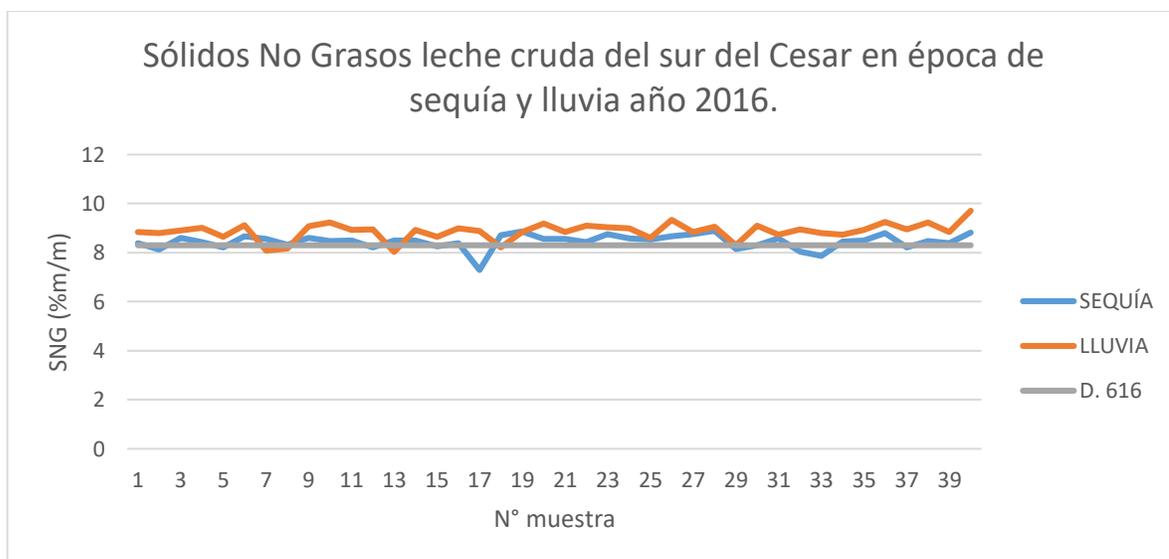


Gráfica 7. Comparativo de los valores de grasa de leche cruda en las muestras tomadas en el Sur de Cesar, época de sequía y lluvia con la normativa colombiana vigente.

Fuente: Autor

Con respecto al parámetro de la grasa se encontraron tres muestras en la época de sequía por debajo del rango permitido (3,0% m/v) en el Decreto del Ministerio de Protección 616 de 2006; y una sólo en época de lluvia. En este sentido, un 12,5% de las muestras de leche cruda en la época de sequía obtuvieron valores menores a 3,0% m/v, lo cual se puede deber a que las leches eran provenientes de ganado alimentado con fuentes pobres de fibra larga como pasto y heno. En la época de lluvias sólo el 2,5% obtuvieron valores menores a 3,0% m/v de las muestras analizadas, esto se puede deber a la disponibilidad de pastos verdes y a que el ganado presenta menos estrés calórico generando una buena proporción de grasa.

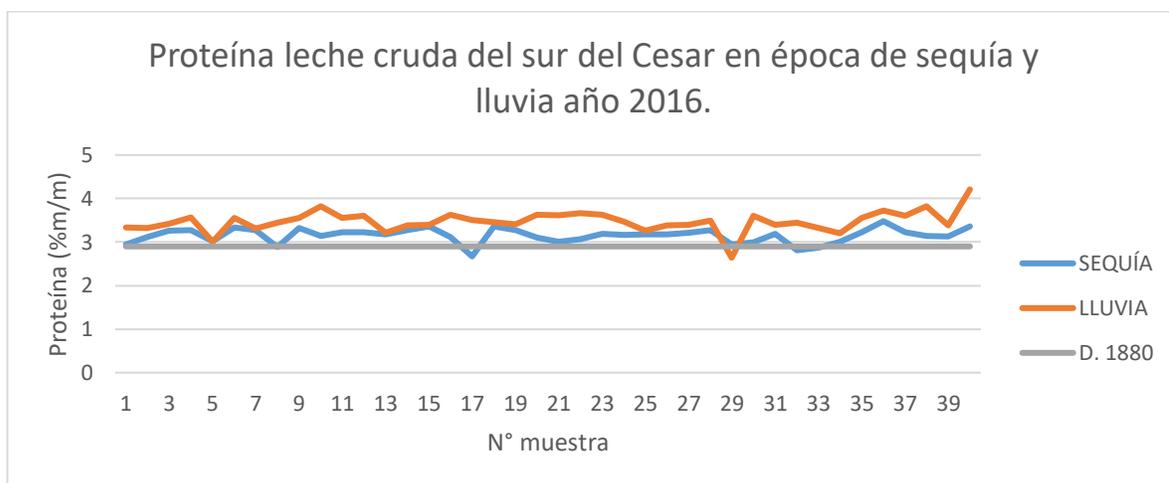
En la Gráfica 8, se muestran los comparativos de la variable fisicoquímica del porcentaje de Sólidos No Grasos.



Gráfica 8. Comparativo de los valores de SNG (%m/m) leche cruda con la norma.  
Fuente: Autor

El parámetro de los Sólidos No Grasos, se encuentra dentro del rango permitido por el Decreto MPS 616/06, salvo una muestra en la época de verano.

En la Gráfica 9, se muestran los comparativos de la variable fisicoquímica de la proteína.

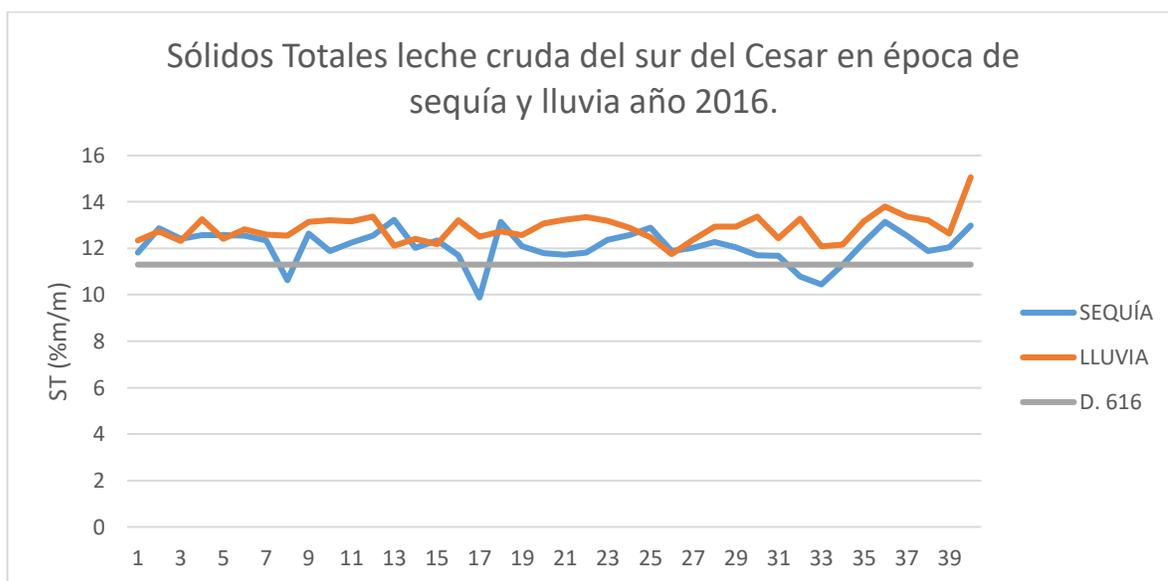


Gráfica 9. Comparativo de los valores de Proteína (%m/m) leche cruda con la norma.  
Fuente: Autor

El porcentaje de proteína para la época de sequía, 4 muestras se encuentran por fuera del parámetro estipulado por el Decreto MPS 1880/11 (2,9%) y una muestra para la época de lluvia. Una vez más, la explicación a estos resultados es la producción de leche en época de lluvia donde sobresale la alimentación con pastos largos es un constituyente que varía poco, la principal fuente para la formación de proteína láctea es la proteína ingerida por el animal,

además de todos aquellos factores que favorezcan el flujo de proteína microbiana hacia el intestino delgado.

En la Gráfica 10, se muestran los comparativos de la variable fisicoquímica del porcentaje de sólidos totales.



Gráfica 10. Comparativo de los valores de S.T (%m/m) leche cruda con la norma.  
Fuente: Autor

Con relación a la variable de Sólidos Totales, se encuentran tres muestras por debajo del rango permitido por el Decreto MPS 616/06 en época de verano por la falta de pastos en la zona, y limitar la alimentación del ganado con piensos; caso contrario en época de lluvias que se mantiene por encima de la norma, teniendo leche cruda de mejor calidad en cuanto a composición en dicha época.

#### 4.3. Detección de la presencia de la Aflatoxina M1 en leche cruda y leche UAT comercializada por Freskaleche S.A.S., en Aguachica – Cesar.

**4.3.1. Detección de la presencia de la Aflatoxina M1 en leche cruda.** En la Tabla 28 se muestra el resultado después de aplicado el test rápido para detección de AFM1 con una sensibilidad de 0,35µg/Kg para leche cruda.

Tabla 28. Detección de AFM1 en leche cruda por inmunoensayo.

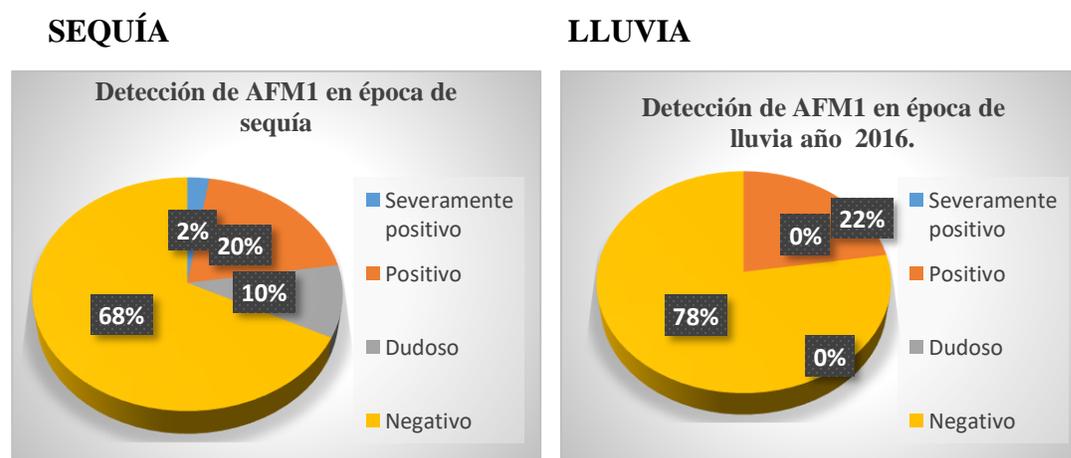
<i>Código</i>	<i>Detección de AFM1 en época de sequía</i>	<i>Detección de AFM1 en época de lluvias</i>
001	Negativo	Positivo
002	Positivo	Negativo
003	Positivo	Positivo
004	Negativo	Negativo
005	Negativo	Negativo
006	Negativo	Negativo
007	Positivo	Negativo
008	Negativo	Positivo
009	Negativo	Negativo
010	Negativo	Negativo
011	Negativo	Negativo
012	Negativo	Negativo
013	Negativo	Negativo
014	Positivo	Negativo
015	Positivo	Negativo
016	Positivo	Positivo
017	Negativo	Negativo
018	Negativo	Negativo
019	Negativo	Negativo
020	Negativo	Negativo
021	Dudosa	Negativo
022	Negativo	Negativo
023	Dudosa	Negativo
024	Dudosa	Positivo
025	Severamente positivo	Negativo
026	Dudosa	Negativo
027	Positivo	Positivo
028	Positivo	Negativo
029	Negativo	Negativo
030	Negativo	Positivo
031	Negativo	Negativo

<b>Código</b>	<b>Detección de AFM1 en época de sequía</b>	<b>Detección de AFM1 en época de lluvias</b>
032	Negativo	Negativo
033	Negativo	Negativo
034	Negativo	Negativo
035	Negativo	Negativo
036	Negativo	Negativo
037	Negativo	Negativo
038	Negativo	Negativo
039	Negativo	Negativo
040	Negativo	Positivo

Fuente: Autor

De acuerdo a la Tabla 28 las muestras 002-003-007-014-015-016-025-027-028, presentan rangos de AFM1 por encima de 0,35 µg/Kg para la época de sequía; pero esta prueba rápida no específica si cumple la normativa colombiana, puesto que la Resolución del MPS 4506/13 habla de 0,5 µg/Kg. Se presentaron resultados dudosos en las muestras 021-023-024-026, Para la época de lluvias se detectó la presencia de la AFM1 en las muestras 001,003,008,016,025,027,030,040,041.

En la Gráfica 11 se comparan los resultados de la determinación de la AFM1 por método de inmunoensayo en las épocas de sequía y lluvia.



Gráfica 11. Comparación de los resultados cualitativos de AFM1.

Fuente: Autor

De acuerdo a la Gráfica 11, se comparan los resultados de las muestras de leche cruda para determinar la presencia de AFM1 con una concentración superior 350 ppt (0,35 µg/Kg) donde se muestra que un 68% de los resultados son negativos para AFM1 en época de sequía frente a un 78% en época de lluvia es decir, menos de 350 ppt (0,35 µg/Kg); a su vez los resultados positivos fueron en un 20% y 2% severamente positivo en época de sequía frente a 22% positivos, en época de lluvia; con una diferencia de 10% en época de sequía que no arrojaron resultados claramente definidos para poder determinar si eran positivos o negativos. En comparación con el estudio realizado por Capelli (2014), que utilizando también una técnica de inmunoensayo obtuvo que en las 18 muestras de leche se encontraron niveles entre 0.005 a 0.08 µg/L de aflatoxina M1, son niveles mucho más altos, pero es importante corroborar los resultados con métodos más confiables como la cromatografía.

**4.3.2. Detección de la presencia de la Aflatoxina M1 en leche en silo y leche UAT comercializada por Freskaleche S.A.S., en Aguachica – Cesar.** A continuación, en la Tabla 29 se presentan los resultados después de aplicado el test rápido para detección de AFM1 con una sensibilidad de 0,35µg/Kg para la leche almacenada en silo y leche entera en bolsa UAT de diferentes presentaciones.

Tabla 29. Muestras de leche en silo y leche entera UAT en la época de sequía y época de lluvia.

<i>Código</i>	<i>Deteccion de AFM1 en Época de sequía</i>	<i>Deteccion de AFM1 en Época de lluvia</i>
041	Negativo	Negativo
042	-	Negativo
043	-	Negativo
044	-	Negativo
045	Positivo	-
046	Negativo	-
047	Negativo	-
048	Positivo	-
049	Negativo	-
050	Negativo	-
051	Positivo	-
052	Negativo	-

<i>Código</i>	<i>Deteccion de AFM1 en Época de sequía</i>	<i>Deteccion de AFM1 en Época de lluvia</i>
053	Negativo	-
054	Positivo	-
055	-	Positivo
056	-	Positivo
057	-	Positivo
058	-	Positivo
059	-	Positivo
060	-	Positivo
061	-	Positivo
062	-	Positivo

Fuente: Autor

La muestra de leche cruda tomada del tanque de almacenamiento número 7 (silo) para la época de sequía arrojó como resultado negativo para la presencia de AFM1. De 10 bolsas de leche entera UAT analizadas en época de sequía, 4 arrojaron resultado positivo para la presencia de AFM1 con una concentración superior a 350 ppt ( 0,35 µg/Kg); a diferencia de la época de lluvia que las muestras de leche cruda y termizada tomadas de los tanques de almacenamiento 2, 6 y el destinado para leche termizada, todas arrojaron negativo; al comparar con los resultados obtenidos por este mismo método para determinar la presencia de la AFM1 en las 8 muestras de leche entera empacada en bolsa UAT utilizando esta misma leche las cuales arrojaron resultados positivos indicando concentraciones superiores 350 ppt (0,35 µg/Kg), no arrojan un resultado acorde con el obtenido en la leche cruda.

#### **4.4. Estimación de los niveles de Aflatoxina M1 en leche cruda y leche UAT comercializada por Freskaleche S.A.S., en Aguachica – Cesar.**

(Ver Anexo 6. Informe de resultados de análisis de Aflatoxina M1, mes de mayo y agosto de 2016 y Anexo 7. Cromatogramas).

**4.4.1. Estimación de los niveles de Aflatoxina M1 en leche cruda.** En la Tabla 30 se muestra el resultado de la cuantificación de la AFM1 para leches crudas tomadas en los hatos lecheros por el método de cromatográfico HPLC.

Tabla 30. Cuantificación de la AFM1 en leche cruda.

<i>Código</i>	<i>AFM1 HPLC (µg/kg) Época de sequía</i>	<i>AFM1HPLC (µg/kg) Época de lluvia</i>
001	0,1087	N.D
002	0,012	N.D
003	0,0033	0,0172
007	0,0135	0,0065
008	0,0198	0,0086
009	0,0184	0,0079
016	0,0069	N.D
017	0,0091	N.D
025	N.D	0,1
027	0,0596	N.D
028	0,015	N.D
030	0,0117	0,011
040	0,0874	N.D

N.D: No Detectable.

Fuente: Autor

En la muestra 025 en época de sequía no se detectó concentración alguna de AFM1, siendo para este mes la muestra de leche cruda con mayor concentración la 001 con 0,1087 µg/Kg; la alimentación del ganado en este hato lechero fue con heno y se identificó *Aspergillus flavus*. Pero aún así sigue cumpliendo con la normativa colombiana 0,5 µg/Kg.

Respecto a la normativa de la Unión Europea 0,05 µg/Kg, no cumplen las muestras 001 y la muestra 027 donde la leche cruda en el hato para la época de sequía se encontró almacenada en tanque de enfriamiento y la alimentación para el ganado fue con ensilado de maíz empacado en bultos de fibra, y se encontró *A. flavus*; la muestra de leche cruda 040, el ganado fue alimentado con la mezcla de pollinaza más corozo, el cual fue preparado en el mismo hato lechero, utilizando un molino de martillo para triturar el corozo y luego mezclarlo con la pollinaza y empacarlo en sacos de fibra los cuales mantenían almacenados en una bodega que permanecía con las puertas abiertas.

El resto de muestras para la época de sequía, presentaron concentraciones de AFM1, pero sin superar ninguna de las dos normativas (La normativa colombiana 0,5 µg/Kg y la

normativa de la Unión Europea 0,05 µg/Kg); en los hatos lecheros de las muestras 003, 007, 008, 009, 017, 028, 030, el común denominador fue la alimentación con ensilado de maíz y la identificación de *A. flavus* a excepción de las muestras 017 donde se identificó *A. fumigatus* y la 030 con *A. parasiticum*. Para la muestra 002 la alimentación del ganado fue pollinaza más palmiste y se identificó *A. flavus*; para la muestra 016 la alimentación fue heno y se identificaron tres especies de *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus*).

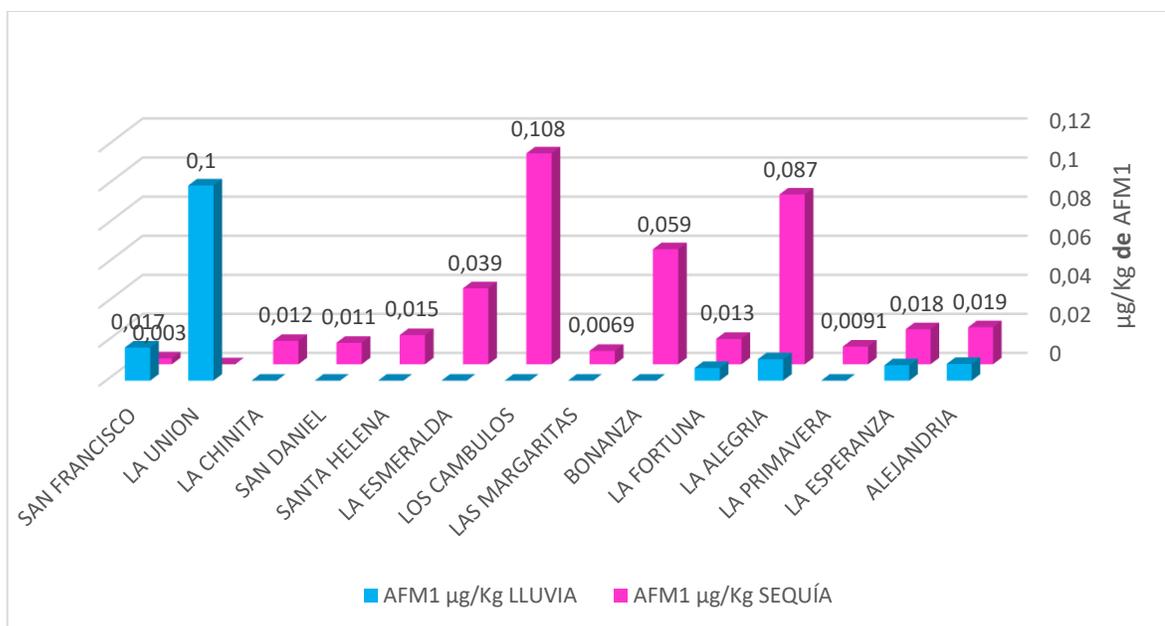
En la época de lluvias no se detectó concentración alguna de la AFM1 por el método de cromatografía HPLC en las muestras de leche cruda 001-002-016-017-027-028-040 de los hatos donde la alimentación fue exclusiva con pastoreo, no se utilizó ningún suplemento alimenticio, puesto que los pastos para esta época del año ya se encontraban verdes.

A pesar de que en la muestra 025 no se detectó la concentración de AFM1 en la época de sequía, fue la muestra de leche cruda que mayor concentración presentó en la época de lluvia, con una concentración de 0,1 µg/Kg, pero aun así sigue cumpliendo con la normativa colombiana 0,5 µg/Kg pero no cumple con la normativa de la Unión Europea 0,05 µg/Kg. En este hato lechero se caracterizó por seguir alimentando en época de lluvia con palmiste que almacenaron de la época de sequía más la técnica de pastoreo.

Al igual que la muestra 003 que aumentó 42% la concentración de AFM1 de la obtenida en la época de sequía donde su alimentación se caracterizó por ensilado de maíz y se identificó *A. flavus* en el mismo; con respecto a la época de lluvia donde se administró el ensilado de maíz restante que estaba empacado en sacos de fibra y se mezcló con pastoreo.

Las muestras de leche cruda 007-008-009-030 en época de lluvias presentaron concentración de AFM1 cumpliendo con la normativa colombiana 0,5 µg/Kg y la normativa de la Unión Europea 0,05 µg/Kg. Cabe resaltar que el ganado fue alimentado con mezclas de pastoreo más ensilado de maíz almacenado desde el primer trimestre del año.

Se nota una reducción considerable de la concentración de la AFM1 en las muestras de leche cruda época de sequía a época de lluvia y el consumo de los piensos fue reemplazado por el pasto fresco.



Gráfica 12. Comparativo de los resultados de la concentración de AFM1 en leche cruda en época de lluvia y sequía.

Fuente: Autor

En la cuantificación de las aflatoxinas hay una diferencia marcada en la concentración en la época de lluvia con respecto a la época de sequía. Sin embargo, existieron casos como en el hato lechero LA UNIÓN donde la concentración de la aflatoxina en época de lluvia fue mayor que muchas en época de sequía.

**4.4.2. Estimación de los niveles de Aflatoxina M1 en muestras en silos y leche UAT comercializada por Freskaleche S.A.S., en Aguachica – Cesar.** En la Tabla 31, se muestra el resultado de la cuantificación de AFM1 para la muestra de leche almacenada en tanques (silos) y la leche entera UAT comercializadas por Freskaleche S.A.S. en Aguachica-Cesar, por el método de cromatografía HPLC en la época de sequía.

Tabla 31. Cuantificación de AFM1 en leche en silo y leche entera UAT. Época de sequía.

<i>Código</i>	<i>AFM1 HPLC (µg/kg)</i>
041	0,0283
045	0,0269
046	0,0369
047	0,0255
048	0,0232

<b>Código</b>	<b>AFM1 HPLC (µg/kg)</b>
049	0,0312
050	0,038
051	0,0111
052	0,0266
053	0,0494
054	0,0474

Fuente: Autor

En la época de sequía, tanto la muestra tomada del tanque de almacenamiento número 7 de leche cruda (041), como las muestras de las bolsas de leche entera UAT, se encuentran dentro del rango establecido por la Resolución MPS 4506/13, teniendo el valor más alto en producto terminado la muestra 053 con 0,0494 µg/Kg que al aproximarla no cumple con la normativa de la Unión Europea (0,05 µg/Kg) que es más exigente que la colombiana.

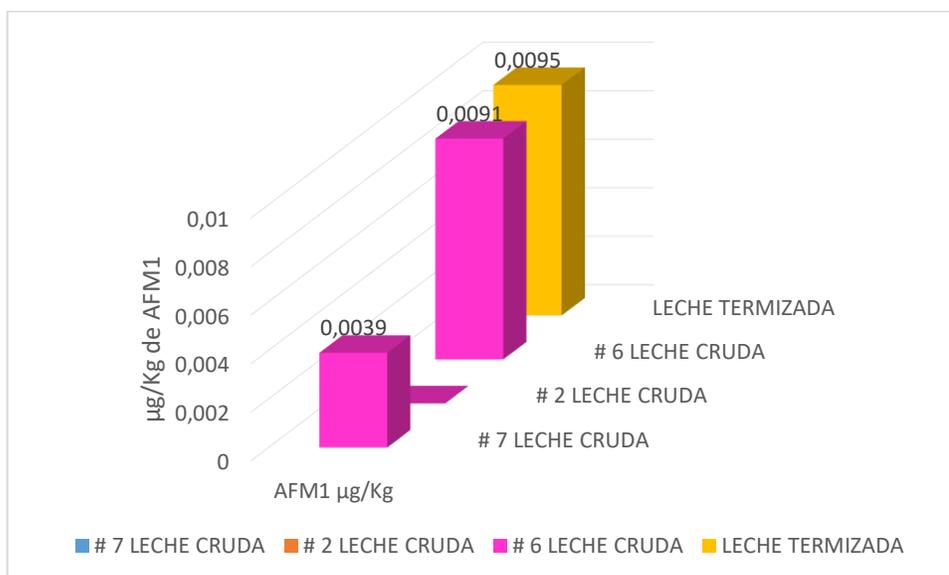
En la Tabla 32, se muestra el resultado de la cuantificación de AFM1 para las muestras de leche almacenada en tanques (silos) tanto leche cruda como leche termizada, además de la leche entera UAT comercializadas por Freskaleche S.A.S. en Aguachica-Cesar, por el método de cromatografía HPLC en la época de lluvia.

Tabla 32. Cuantificación de AFM1 en leche en silo y leche entera UAT. Época de lluvia.

<b>Código</b>	<b>AFM1 HPLC (µg/kg)</b>
041	0,0039
042	N.D
043	0,0091
044	0,0095
055	0,0117
056	0,0073
057	0,0088
058	0,0079
059	0,0089
060	0,004
061	N.D
062	0,0087

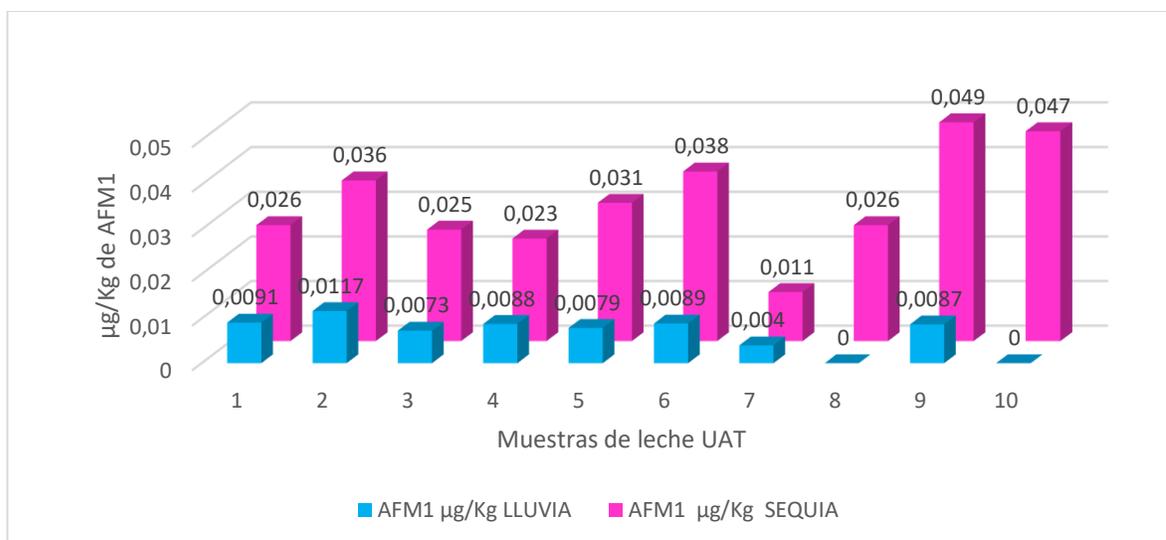
N.D.: No detectable Fuente: Autor

En la época de lluvia, tanto la muestra de silo de leche cruda y leche termizada, como las bolsas de leche entera UAT, se encuentran dentro del rango de la norma según la Resolución MPS 4506/13, teniendo el valor más alto en producto terminado la muestra 055 con 0,0117  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  pero alcanza a cumplir la normativa de la Unión Europea 0,05  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ . Cabe resaltar que no se detectó presencia de AFM1 en las muestras 042 que pertenece al tanque de almacenamiento número 2 de leche cruda, lo que reduce el peligro de tener presencia en el producto terminado; y tampoco en la muestra de leche entera UAT 061.



Gráfica 13. Trazabilidad de las concentraciones de AFM1.  
Fuente: Autor

En la Gráfica 13, se observa el comportamiento de las muestras que fueron tomadas de tanques de almacenamiento donde se mezcló la leche de todos los hatos lecheros, y es evidente que al aplicar un tratamiento térmico leve como es la termización, la concentración de la AFM1 en la leche no disminuyó.



Gráfica 14. Comparativo de los resultados de la concentración de AFM1 en leche UAT.

Fuente: Autor

En la Gráfica 14 se puede observar que no hay diferencias significativas en la concentración de la AFM1 en la leche cruda y después de realizarle un tratamiento térmico severo como lo es el de UAT. Si se observa diferencia en los resultados en las dos épocas del año, siendo la concentración mayor en época de sequía, pero continua cumpliendo con la norma.

En la Tabla 33, se presentan los intervalos de los niveles de AFM1 para las muestras tanto de leche cruda como de leche entera UAT, comparados con la normativa tanto colombiana como de la Unión Europea. (Ver anexo 8. t-student).

Tabla 33. Niveles de AFM1 para las muestras de leche cruda y leche entera UAT FRESKALECHE S.A.S comercializada en Aguachica –Cesar. Época de sequía y época de lluvia 2016.

Muestras	Intervalo de AFM1	Resolución MPS 4506/13 µg/kg	Unión Europea µg/kg
Época de sequía leche cruda	$0,0143 \leq \mu \leq 0,0435$	0,5	0,05
Época de lluvia leche cruda	$0,00045 \leq \mu \leq 0,01995$	0,5	0,05
Época de sequía leche uat	$0,02488 \leq \mu \leq 0,03832$	0,5	0,05

Época de lluvia	$0,00475 \leq \mu \leq 0,009571$	0,5	0,05
leche uat			

Fuente: Autor

Con un 95% de confianza, se asegura que la concentración de AFM1 promedio para época de sequía en leche cruda está entre  $0,0143 \leq \mu \leq 0,0435 \mu\text{g/Kg}$ , con lo cual se garantiza que las muestras tomadas en esta época están cumpliendo con la normativa colombiana vigente como la europea. Igualmente, se hizo para las demás muestras.

Al comparar los resultados obtenidos respecto a la concentración de la AFM1 en leche cruda se tiene que, a diferencia del estudio realizado para leche cruda en Croacia, por Bilandzic *et al.*, (2010), donde encontraron que la concentración fue estadísticamente más alta entre enero y abril (0,036 a 0,059  $\mu\text{g/L}$ ), correspondiente al invierno y primavera, que entre Junio y Septiembre (0.012 a 0.015  $\mu\text{g/L}$ ), correspondiendo al verano y al otoño. En la región del Sur del Cesar, los resultados de las muestras en época de sequía para la concentración de la AFM1 son superiores (0,0143 a 0,0435  $\mu\text{g/Kg}$ ) y en la época de lluvia son muy inferiores (0,00045 a 0,01995  $\mu\text{g/Kg}$ ).

A diferencia del estudio realizado en la China, por Xiong *et al.*, (2013), donde encontraron que la concentración de AFM1 en leche fue significativamente mayor durante el invierno (0,123  $\mu\text{g/Kg}$ ). Esto indicó que la leche cruda recogida durante el invierno es de alto riesgo para AFM1 y que deben considerarse factores estacionales para la gestión de las aflatoxinas en el pienso y la leche. En las muestras de leche cruda de este estudio, el 88,5% cumplió con la normativa propuesta por la Unión Europea (0.05  $\mu\text{g/Kg}$ ).

En cuanto a los resultados obtenidos para la concentración de AFM1 en leche entera UAT en las dos épocas del año, a pesar de ser mayor en la época de sequía (0,02488 a 0,03832  $\mu\text{g/Kg}$ ) que la época de lluvia (0,00475 a 0,009571  $\mu\text{g/Kg}$ ) se cumple con la normativa propuesta por la Unión Europea (0.05  $\mu\text{g/Kg}$ ) en un 90,9% a diferencia del estudio realizado en la ciudad de México y Texcoco por Pérez *et al.*, (2008), donde el 59% de las muestras presentaron niveles de aflatoxina M1 y todos los casos se encontraron por encima del límite máximo (0.05  $\mu\text{g/Kg}$ ) siendo la media de 16,1  $\mu\text{g/Kg}$  para leche ultrapasteurizada.

Asímismo, los resultados de los niveles de AFM1 para la leche entera UAT de Freskaleche S.A.S. comercializada en Aguachica, Cesar, se encuentran muy por debajo de lo revelado en

el estudio realizado por De Oliveira & Ferreira (2013), donde analizaron la presencia de AFM1 en 75 muestras de leche (UHT) comercializada en Minas Gerais, Brasil donde los resultados mostraron que 30,7% de las muestras tenían niveles entre 1 a 4.1  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  AFM1 encontrándose por encima del límite de tolerancia para la AFM1 en la leche, aprobado por las regulaciones brasileñas y convirtiéndose en un riesgo para la salud del consumidor.

En Colombia, son pocos los estudios realizados para determinar los niveles de AFM1 en la leche comercializada, pero al comparar el estudio realizado por Díaz *et al.*, (2006), donde se realizó la evaluación de la presencia de AFM1 en muestras de leches para consumo humano en la ciudad de Bogotá por un periodo de dos años y arrojó como resultado la prevalencia de niveles detectables de AFM1 durante el primer y segundo año: 69.2% y 79.4%, respectivamente, lo que sugiere que se presenta una mayor contaminación en la Sabana de Bogotá que en la región del Sur de Cesar, y esto puede deberse a consumo de alimentos contaminados con AFB1 por parte los bovinos en esta zona del país.

A diferencia de los resultados obtenidos por Zambrano & Martínez (2009), donde encontraron que el tratamiento térmico más efectivo en la reducción de AFM1 es la ultrapasteurización (138 – 142°C/15 seg), en el presente estudio no se encontró diferencia significativa entre la concentración de AFM1 de las muestras de leche cruda respecto a las muestras de leche entera UAT. Pero si coincide con OMS (1983), donde afirman que las aflatoxinas no se rompen con la ultrapasteurización, cocción, freido o hervido, fermentación, ni nixtamalización, pero se pueden destruir si se calientan en autoclave con amonio o hipoclorito de sodio. Actúan en trazas de millonésimas de gramo (microgramos por kilogramo =  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) o menos.

La detección de la AFM1 para la leche cruda se realizó utilizando dos métodos diferentes, donde se pudo observar como lo muestra la Tabla 34, que no coinciden los resultados de ambos métodos en las muestras 002-003-007-016-027-028, donde arrojó la prueba de inmunoensayo positivo con sensibilidad de  $\geq 0,35 \mu\text{g}/\text{Kg}$ , pero al realizar la cromatografía con HPLC los valores están por debajo de este valor. Asimismo, la muestra 025 arroja un resultado severamente positivo con el método de inmunoensayo cuando por cromatografía HPLC no se detectó presencia de la AFM1. La muestra 041 se reportó como dudosa en el

método de inmunoensayo puesto que no se logró diferenciar si había presencia o no, por no evidenciar ninguna de las dos opciones como indicaban las instrucciones del test.

En la Tabla 34 se presenta el comparativo de los resultados de AFM1 de la leche cruda muestreada en la época de sequía por ambos métodos.

Tabla 34. Comparativo Resultados de AFM1 en la leche cruda con Método Cromatográfico – Método Inmunoensayo en época de sequía.

Muestra	Hato lechero	HPLC ( $\mu\text{g/Kg}$ )	Inmunoensayo
001	Cambulos	0,1087	Negativo
002	La Chinita	0,0128	Positivo
003	San Francisco	0,0033	Positivo
007	La Fortuna	0,0135	Positivo
008	Alejandro	0,0198	Negativo
009	La Esperanza	0,0184	Negativo
016	La Margarita	0,0069	Positivo
017	La Primavera	0,0091	Negativo
025	La Union	ND	Severamente Positivo
027	Santa Helena	0,015	Positivo
028	San Daniel	0,0117	Positivo
030	La Alegria	0,0874	Negativo
040	La Esmeralda	0,0394	Negativo
041	Tanque De Alm. 7.	0,0283	Dudoso

Positivo:  $\text{AFM1} \geq 0,35 \mu\text{g/Kg}$ ; Negativo:  $\text{AFM1} < 0,35 \mu\text{g/Kg}$  ND: No Detectable.

Dudoso: No se define claramente si es positivo o negativo.

Fuente: Autor

Asímismo se realizó para la época de lluvia como lo indica la Tabla 35, donde se pudo observar que no coinciden los resultados de los dos métodos en las muestras 001,003,008,016,025,027,030,040,041, donde arrojó la prueba de inmunoensayo positivo con sensibilidad de  $\geq 0,35 \mu\text{g/Kg}$ , pero al realizar la cromatografía con HPLC los valores están por debajo de este valor.

En la Tabla 35 se presenta el comparativo de los resultados de AFM1 de la leche cruda muestreada en la época de lluvia por los métodos aplicados.

Tabla 35. Resultados de AFM1 en la leche cruda con Método Cromatográfico – Método Inmunoensayo en época de lluvia.

Muestra	Hato lechero	HPLC ( $\mu\text{g/Lt}$ )	Inmunoensayo
001	Cambulos	N.D	Positivo
002	La Chinita	N.D	Negativo
003	San Francisco	0,0172	Positivo
007	La Fortuna	0,0065	Negativo
008	Alejandría	0,0086	Positivo
009	La Esperanza	0,0079	Negativo
016	La Margarita	N.D	Positivo
017	La Primavera	N.D	Negativo
025	La Unión	0,1	Positivo
027	Santa Helena	N.D	Positivo
028	San Daniel	N.D	Negativo
030	La Alegría	0,011	Positivo
040	La Esmeralda	N.D	Positivo
041	Tanque de alm. 7.	0,0039	Positivo

Positivo:  $\text{AFM1} \geq 0,35 \mu\text{g/Kg}$ ; Negativo:  $\text{AFM1} < 0,35 \mu\text{g/Kg}$  ND: No Detectable.

Dudoso: No se define claramente si es positivo o negativo.

Fuente: Autor

## Conclusiones

El manejo y almacenamiento inadecuado de los piensos, por parte de los proveedores pudo permitir el crecimiento del género *Aspergillus*, teniendo en cuenta que los factores extrínsecos de la zona favorecen el desarrollo del mismo.

La evaluación de los piensos en los diferentes hatos lecheros muestreados de los proveedores de leche cruda de Freskaleche S.A.S, permitió conocer que las especies que se encuentran más comúnmente del género *Aspergillus* son: *A. flavus* (45%), *A. parasiticum* (2,5%), *A. restrictus* (2,5%), *A. fumigatus* (7,5%), *A. niger* (20%), *A. candidus* (5%).

La calidad higiénica está relacionada con el contenido microbiano de la leche cruda utilizada en la elaboración de la leche entera UAT comercializada por Freskaleche S.A.S, la cual incide en la vida útil de la misma; los resultados de los análisis microbiológicos indican que un 92,5% de las muestras analizadas en la época de sequía, cumplen con los parámetros microbiológicos estipulados por el Decreto del Ministerio de Protección 1880/11 y la Norma Técnica Colombiana 399, 2002-10-30; a diferencia de la época de lluvia, que sólo alcanza el 77,5% de cumplimiento en las muestras analizadas respecto a la norma. Esto se pudo presentar porque en la época de lluvia aumentan en los hatos lecheros el riesgo de los contaminantes y las vacas se exponen a contaminación ambiental (barro, estiércol, charcos) antes y durante el ordeño.

Se encontró que las muestras de leche cruda analizadas de los hatos lecheros de los proveedores de Freskaleche S.A.S. en Aguachica- Cesar cumplen con los parámetros fisicoquímicos establecidos por el Decreto del Ministerio de Protección 616 de 2006 en cuanto a densidad, grasa, proteína, sólidos no grasos y sólidos totales, la calidad composicional de la leche cruda varió en la época de sequía por la escases de alimentación para el ganado, además de las altas temperaturas que afectan el estado de salud.

De acuerdo a los resultados obtenidos con el método de inmunoensayo para determinar la presencia de la AFM1 en las muestras de leche cruda, leche almacenada en silos y finalmente

la leche UAT, al analizar la trazabilidad de los mismos, no se logró tener una certera confiabilidad de los datos, puesto que no concuerdan de forma lógica entre sí.

Es importante tener en cuenta que el kit utilizado tenía una sensibilidad de 0,35  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ , y debería determinar el cumplimiento de la legislación colombiana vigente (Resolución del Ministerio de Protección 4506/13 0,5  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ). Este método tiene como desventajas la aparición de reacciones cruzadas con micotoxinas del mismo grupo o las interferencias con la matriz; errores en el momento de la lectura por ser un método subjetivo.

Al realizar la cuantificación de la AFM1 en la leche cruda, leche en silos y leche entera UAT en las muestras analizadas en el presente proyecto, se pudo determinar que la totalidad cumplen con la normativa legal vigente, Resolución del Ministerio de Protección 4506/13 0,5  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ . Su presencia no es significativa, sin embargo, por ser un potente hepatocarcinógeno no se debe descuidar su estudio ya que afecta la población infantil.

En la época de sequía se presentó para la leche cruda un rango de 0,0143 a 0,0435  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  para la AFM1, pero el 23% no cumple con los valores permitidos para la exportación a la Comunidad Económica Europea (0.05  $\mu\text{g}/\text{L}$ ). Cabe resaltar que los valores son más altos al compararlos con los resultados de la época de lluvias. Esto se debe al incremento en el suministro de alimentos para el ganado como ensilados de maíz, heno y palmiste contaminados con *A. flavus* y *A. fumigatus* que se evidenciaron en el presente estudio y pudieron llegar a producir la aflatoxina B1 en los piensos para luego ser transformada en AFM1.

Para las muestras de leche en silos y leche entera UAT tomadas en la época de sequía, el rango estuvo 0,02488 a 0,03832  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  para la AFM1, sólo 1 de las 11 muestras analizadas no cumple con los valores permitidos para la exportación a la Comunidad Económica Europea (0.05  $\mu\text{g}/\text{L}$ ). Pero superior a los obtenidos en época de lluvia, 0,00475 a 0,009571  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  para la AFM1. Esta disminución en los niveles se pudo presentar debido al cambio de alimentación por la época, utilizando la técnica de pastoreo en la mayoría de los casos, que disminuye el riesgo de contaminación por la alimentación.

Los resultados indican que, a pesar de que se detectó contaminación por AFM1 en la mayoría de las muestras analizadas, los niveles fueron inferiores al límite máximo permitido

por la Resolución del Ministerio de Protección 4506/13 (0,5 µg/Kg). Indicando que la leche entera UAT de la empresa Freskaleche S.A.S comercializada en Aguachica, Cesar es apta para el consumo humano.

## Recomendaciones

La alimentación del ganado lechero se debe fundamentar en una fuente de forraje, que le asegure al animal una dieta sana para el correcto funcionamiento de su sistema digestivo, pero es importante tomar medidas preventivas en la elaboración de ensilados para evitar el incremento de hongos aflatoxigénicos.

Para garantizar unos forrajes adecuados (con buena mineralización de la planta) durante todo el año, se debe incentivar al ganadero de la zona con proyectos como el mejoramiento de la actividad microbiológica del suelo, donde se logre una simbiosis entre el animal-suelo-planta y así disminuir el riesgo de la producción de AFB1 en el ganado y garantizar la productividad sin importar la época del año.

Es importante realizar un seguimiento sistemático de la contaminación de la leche y sus productos, para asegurar que los niveles de AFM1 no excedan los LMR establecidos por la normatividad vigente.

Al ser el primer estudio realizado en la zona del Sur del Cesar a cerca de la cuantificación de AFM1 en la leche, es importante continuarlos para controlar dicho riesgo, ya que es una región de Colombia que sobresale por su ganadería lechera y distribuye a las demás zonas del país.

Reemplazar la técnica de kit de prueba rápida para determinar la presencia de AFM1, por el análisis en un laboratorio acreditado con el método de columna de inmunoafinidad y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) acoplado a un detector de fluorescencia; para garantizar la confiabilidad en los resultados.

La empresa Freskaleche S.A.S. se encuentra habilitada para la exportación de sus productos a países como Rusia, México, Cuba, Canadá, por lo tanto, es indispensable cumplir con la normativa de todos estos países, y dentro de ellos se encuentra cumplir con la concentración permisible de la AFM1. Por lo tanto, es importante seguir realizando seguimientos con el fin de disminuir las concentraciones de AFM1 encontradas en este estudio.

## Referencias bibliográficas

- Abarca, M., Bragulat, M., Castellá, G., Accensi, F. & Cabañes, F. (2000). Hongos productores de micotoxinas emergentes. Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España. *Rev Iberoam Micol*; 17: S63-S68.
- Acuña, A. & Diaz, G.J. (2005). Aflatoxinas en maíz: Reporte de un caso en la Costa Atlántica colombiana. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional* (en prensa).
- Adams, M. & Moss, M. (1997). *Microbiología de los alimentos*. Editorial Acribia. 130 -139.
- Afanador, J. (1997). Efecto de las aflatoxinas sobre la salud y producción porcina. Trabajo de grado. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- Allcroft, R., Rogers, H., Lewis, O. & Nabney, E. (1966). Metabolism of aflatoxin in sheep. Excretion of the “milk-toxin”. *Nature*, 209,154-155.
- Alais, Ch. (1985). *Ciencia de la leche*. Reverté, Barcelona, 873.
- Alpízar, C. (2015). Presence of molds and contamination with mycotoxins in silages for ruminant feeding: Review. Costa Rica. *Rev. Ciencias Veterinarias*, 33 (1), 7-31, ISSN: 2215-4507.
- Alvarenga, A., Martinez, E., Quezada, M., Lara.J., Vásquez, M. & Florez, A. (2012). *Aspergillus* aflatoxigénicos: enfoque taxonómico actual. Texcoco. *Revista Mexicana de ciencias agrícolas*, 3(5).
- Amiot, J. (1991). *Ciencia y tecnología de la leche*. Editorial Acribia, 3- 55-99.
- AOAC. Official Methods Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 972.16.1998. 16 Edición, 4 revisión. Capítulo 33, 972, 16. ISO –IDF.
- AOAC. Official Methods Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 986,33. Leche y productos lácteos.
- Aranguren, R. & Arguelles, M.J. (2009). *Detección de Aflatoxina M1 en quesos frescos comercializados en el municipio de Yopal, Casanare, mediante la técnica de Elisa*. (Tesis de Pregrado Bacteriología). Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia.
- Ardic M., Karakaya, Y., Atasever M. & Adiguzel G. (2008). Aflatoxin M1 levels of Turkish white brined cheese. *Journal food control*. 196-199.

- Argueta, R. (2005). Alternativas nutricionales para la época seca. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Secretaría de Agricultura y Ganadería. SAG. Agencia Española de Cooperación Internacional. AECI y Proyecto Especial para la Seguridad Alimentaria. Serie: Divulgativa.
- Arias, E. & Piñeros, P. (2008). *Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los páramos de Guasca y Cruz Verde*. (Tesis de pregrado Microbiología), Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- Arteaga, G.E., Vásquez-Arteaga, M.C. & Nakai S. (1994). Dynamic optimization of heat treatment of milk. *Food res inst.* 27,77-82.
- Assem, E., Mohanmad, A. & Oula, E.A. (2011). A survey on the occurrence of Aflatoxin M1 in raw and processed milk samples marketed in Lebanon. *Food Control* 22, 1856-1858. doi:10.1016/j.food cont.2011.04.026.
- Association of Official Analytical Chemists. (2000). Aflatoxins M1 y M2 in fluid milk. Liquid Chromatographic Method 986.16. In: Official Method of Analysis of AOAC International 17th Edition Volume II Ed Patricia Cinnif Cap 49(49306 E) Natural Toxins Peter M Scott .40-41.
- Ballesteros, A. (2014). *Evaluación de la prevalencia de aflatoxina M1 (AFM1) en la leche materna y su relación con la fuente dietaria de aflatoxinas. caso estudio: Nabón, Ecuador*. (Tesis de maestría Ciencias agroalimentarias). Universidad del Tolima.
- Bargo, F., Muller, L.D., Kolver & Delahoy, J.E. (2002<sup>a</sup>). Ruminant digestion and fermentation of high-producing dairy cows with three different feeding systems combining pasture and total mixed rations. *J. Dairy sci.* 85,2964-2973.
- Bargo, F., Muller, L.D., Kolver & Delahoy, J.E. (2003). Invited review: production and digestion of supplemented dairy cows on pasture. *J. Dairy sci.* 86,1-42.
- Beaver, E. A., Burbidge, E. M., Cohen, R.D., Junkkarinen, V.T., Lyons, R.W., Rosenblatt, E. I., Hartig, G.F., Margon, B. & Davidsen, A. F. (1991). Far-ultraviolet spectroscopy of the quasar UM 675 with the faint object spectrograph on the Hubble Space Telescope. California.
- Bethancourt, H. & Garcia, L. (2009). Identificación e inoculación de bacterias, uso de aditivos y su efecto en parámetros de calidad de ensilaje. (Tesis de maestría en Biotecnología). Universidad ISA, Santiago, DO.
- Bilandzic, N., Varenina, I. & Solomun B. (2010). Aflatoxin M1 in raw milk in Croatia. *Food Control*, 21,1279–1281.

- Blunden, G., Roch, O.G., Rosers, D.J., Coker, R.D., Bradburn, N. & John, A.E. (1991). Mycotoxins in Food. *Medical Laboratory Sciences*, 48,271–282.
- Bogante, P., Bogantes, D. & Bogantes, S. (2004). Aflatoxinas. *Acta méd costarric*. San José. 46 (4).
- Bolger, M., Coker, R., Dinovi, M., Gaylor, D., Gelderblom, W., Olsen, M., Paster, N., Riley, R., Shephard, G. & Speijers, G. (2001). Fumonisin. JECFA n°47, Ginebra.
- Burton, H. (1988). UHT processing of milk and milk products. Elsevier applied science. London.
- CAC/RCP 1-1969. Hazard Analysis and Critical Control Point, as defined in the Annex to the Recommended International Code of Practice on General Principles of Food Hygiene.
- CAC/GL 20-1995. Principles for Food Import and Export Inspection and Certification.
- Capelli, M.A. (2014). *Determinación de aflatoxinas totales en alimentos destinados al consumo de vacas lecheras y aflatoxina M1 en leche*. (Tesis de grado Doctorado en Ciencias Veterinarias Orientación: Tecnología de los alimentos). Universidad de la República, Facultad de Veterinaria. Montevideo. Uruguay.
- Cárdenas, N. C., Pérez, S., Zavala, M. A., Aguirre, J. R., & Pérez González, C. (2005). Actividad antifúngica de seis plantas sobre *Aspergillus flavus* Link. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 36(3).
- Carrillo, L. (2003). Microbiología Agrícola. Capítulo 6. 7. Universidad Nacional de Salta. ISBN 987-9381-16-5. Recuperado de <https://es.scribd.com/doc/164257947/CARRILLO-LEONOR-Microbiologia-Agricola-Completo>.
- Carrillo, L. & Audisio, M.C. (2007). Manual de microbiología de los alimentos. San Salvador de Jujuy. Capítulo 9,89-101.
- Carvajal, M., Berume, J. & Guardado, M. (2012). The presence of aflatoxin B1- FAPY adduct and human papilloma virus in cervical smears from cancer patients in México. In: *Journal food additives and contaminants*. 29 (2), 258-268.
- Carvajal, M. (2013). Transformación de la aflatoxina B1 de alimentos, en el cancerígeno humano, aducto AFB1-ADN. DR c) TIP Revista especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 16(2),109-120.
- Castillo, U.P. & Durán De Bazúa, M.C. (2006). Las micotoxinas: metabolitos secundarios de los hongos filamentosos. *Ciencia, Tecnología y Sociedad*. Ed. Quím. 17(2):122-128.

- Céspedes, A. (1997). *Desarrollo y estandarización de tres técnicas analíticas por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y determinación de los niveles de contaminación con aflatoxinas, zearalenona y ocratoxina A en materias primas y alimento terminado empleado para la nutrición de aves y cerdos en Colombia.* (Trabajo de grado Salud y producción animal). Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- Céspedes, A. (1997). Analysis of aflatoxins in poultry and pig feeds and feedstuffs used in Colombia. *J AOAC*; 80(6),1215-9.
- Chamberlain, A.T. & Wilkinson, J.M. (2002). *Feeding the dairy cow.* Editorial Acribia. España. 17.
- Channalah, L. (2012). Inocuidad de los alimentos balanceados para animales, riesgos y desafíos. V Congreso CLANA – Colegio Latinoamericano de Nutricion Animal. Puerto Vallarta, México.
- Combata, A.P. & Mldenber, S. (2009). *Detección de Aflatoxina M1 en leches frescas comercializadas en la zona del Valle del Cauca (Colombia) mediante la técnica de Elisa.* (Tesis de grado Microbiología Industrial). Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia.
- Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. CORPOICA, (2013). Metodología de análisis normalizadas para la red de laboratorios lácteos que hacen análisis de leche cruda para pago por calidad. Bogotá, Colombia, 36.
- Council for Agricultural Science and Technology. CAST. (1989). *Mycotoxins: Economic and health risks.* Ames, L.A. Task Force Report No.116,1-91.
- Cowell, N.D. (1995). Who invented the tin can? A new candidate. *J AOAC*, 78, 61-64.
- Creppy, E.E. (2002). *Toxicology letters*, 127, 19-28.
- Dalta, M., Eliott, A., Pekins, M. & Deeth, H. (2002). Ultra –high-temperature (UHT) treatment of milk: Comparison of direct and indirect modes of heating. *The Australian Journal of dairy tecnhnology*, 57(3), 211-227.
- Decastelli, L., Lai, J., Gramaglia, M., Monaco, A., Nachtmann, C. & Oldano, F. (2007). Aflatoxins ocurrence in milk and feed in Northern Italy during 2004-2005. *Food Control*. 18(10),1263-1266.
- De Jimeno, M.C., Ruiz, N. & Peña, N.E. (1980). Incidence of Aflatoxins in Animal Feedstuffs: A Decade's Scenario in India. *Journal of AOAC International*, 78 (3), 693 – 698.

- Delaby, L., Peyraud, J.L & Delagaroe, R. (2003). Faut-il compléter les vaches laitières au pâturage? INRA. Prod. Anim., 16 (3),183-195.
- Delahoy, J.E., Muller, L.D., Bargo, F., Cassidy, T.W. & Holden, I.A. (2003). Supplemental carbohydrate sources for lactating dairy cows on pasture. J. Dairy. Sci, 86, 906-915.
- Denli, M. & Pérez. J., 2006. Contaminación por micotoxinas en los piensos: Efectos, tratamiento y prevención. Departamento de ciencia animal y de los alimentos. Facultad veterinaria UAB. Barcelona.
- Dennis, P. & Hsieh, H. (1981). Metabolism and Transmission of Mycotoxins. International Symposium and Workshop on Mycotoxins, September 6-16, Cairo, Dokki, Egypt, Proceedings International Symposium on Mycotoxins (1983),151-165.
- De Oliveira & Ferreira. (2013). Influence of climate conditions on AFM1 contamination in raw milk from Minas Gerais / Brazil. Journal Food Control, 31,419-424.
- Detroy, R.W. (1971). Aflatoxin and related compounds. p. 4-178. En: Microbial Toxins vol. 6. Ciegler, A. *et al.*, editores. Academic Press, New York.
- Devegowda, G., Raju, M., Afzali, N. & Swamy, H. (1998). Mycotoxin picture worldwide: Novel solutions for their counteraction. En: Biotechnology in the feed Industry, Proceedings of Alltech's 14<sup>th</sup> Annual symposium (T.P. Lyons and K.A. Jacques, eds). Nottingham University Press, UK, 241.
- Díaz, G.J. (1995). Regulación de niveles máximos tolerables de micotoxinas en materias primas y alimentos terminados. Veterinaria al día, 1(3),22-27.
- Díaz, G.J., Perilla, N.S. & Rojas, Y. (2001). Occurrence of aflatoxins in selected Colombian foods. Mycotoxin Res. 2001; 17(1):15-20.
- Díaz, G.J., Perilla, N.S. & Espitia, E. (2004). First Colombian interlaboratory study for the determination of aflatoxin B1 in yellow corn. Mycotoxin Research, 20,11-18.
- Díaz, G.J. (2005). Micotoxinas y micotoxicosis de importancia en salud humana en Colombia. VII Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de Alimentos COLMIC. Mayo 18–21, 2005. Bogotá, Colombia, 4.
- Díaz, G.J. (2005). Aflatoxina M1: un carcinógeno de potencial presencia en la leche. Seminario Nacional de Producción y Sanidad Bovina. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Bogotá, Colombia.
- Díaz, G.J. & Espitia, E. (2006). Occurrence of aflatoxin M1 in retail milk samples from Bogotá, Colombia Food Addit Contam, 23(8),811-5.

- Díaz, G.J., Lozano, M.C. & Acuña, A. (2009). Prevalence of *Aspergillus* species on selected Colombian animal feedstuff and ability of *Aspergillus* section Flavi to produce aflatoxins. *World Mycotoxin Journal*, 2(1),31-34.
- Díaz, G.J. & Sanchez, M.P. (2015). Determination of aflatoxin M1 in breast milk asbiomarker of maternal and infant exposure in Colombia, *Food Additives & Contaminants: Part A*, DOI: 10.1080/19440049.2015.1049563.
- Doyle, M.P., Beuchat, L.R & Montuile, T.J. (1997). *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. ASM Press, Washington, 393, 406, 419.
- Dreher, R.M. & Usleber, E. 1996. "Comparison study of a fumonisin enzyme Immune assay and high-performance liquid chromatography." In "Immunoassays for Residue analysis: food safety". Proceedings of a symposium, Anaheim, April 1995. Beier, R.C. & Stanker, L.H. (Eds.), 341-48, Washington D.C., ACS.
- Driessen, F.M. (1983). Lipases and proteinases in milk. Ocurrance, heat inactivation and importance for the keeping quality products. *Agriculture University Wageningen*. Netherlands.
- Duarte, S. & Villamil, L. (2006). Micotoxinas en la salud pública. *Revista de Salud pública*, vol 8. Bogotá.
- Duarte, S.C., Almeida, A.M., Teixeira, A.S., Pereira, A.L., Falcao, A.C., Pena, A. & Lino, C.M. (2013). Aflatoxin M1 in marketed milk in Portugal: assessment of human and animal Exposure. *Food Control*, 30,411-7.
- Eaton D.I., Ramsdell H.S. & Neal G.E. (1993). The toxicology of aflatoxins. *Human Health, Veterinary and Agricultural Significance*, 45-72
- Edds, G.T. (1979). Aflatoxins in Conference on Mycotoxins in Animal Feeds Grains Related to Animal Health, W. Shimoda (Ed.) PB-300 300. Sponsored by: Bureau of Veterinary Medicine, Food Drug Administration, June 8, Rokville, Maryl (USA), 80-164.
- Edwards, S.G., O'Callaghan, J. & Dobson A.D.W. (2002). *Mycological Research* 106: 1005.
- Eley, R. (1992). *Intoxicaciones Alimentarias de Etiología Microbiana*. Editorial Acribia. Zaragoza. España, 232.
- El fenómeno del niño le costo al país 1,6 billones de pesos. (2016, junio 2). *El Tiempo*. Recuperado de <http://www.eltiempo.com/archivo/documento/CMS-16609985>.
- Elliott, A.J., Data, N., Amenu, B. & Deeth, H. C. (2005). Heat-induced and other chemical changes in commercial UHT milks. *Journal of Dairy Research*, 72, 1-5.

- Ellis, W.O., Smith, J.P., Simpson, B.K. & Oldham, J.H. (1991). Aflatoxins in Food: Ocurrente, Biosíntesis, Effects on Organisms, Detection and Methods of Control. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 30 (3), 403 – 439.
- El niño devasto por incendios área equivalente a tres veces Cali. (2016, junio 3). El Tiempo. Recuperado de <http://www.eltiempo.com/archivo/documento/CMS-16610226>.
- Escuela Superior Integral de Lechería. ESIL. 2005. Memorias de Curso de capacitación tecnológica de leche en polvo. Freskaleche. Aguachica.
- Eriksen, G.S., Pennington, J. & Schlatter, J. (2000). Zearalenone. WHO Food Additives Series n° 44, JECFA, Ginebra.
- European Food Safety Authority, EFSA, (2004). Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Aflatoxin B1 as undesirable substance in animal feed, The EFSA Journal (2004), 39,1-2 (Request N° EFSA-Q-2003-035). Recuperado de [http://www.efsa.eu.int/science/contam/contam\\_opinions/294/opinion\\_contam\\_02\\_en\\_final1.pdf](http://www.efsa.eu.int/science/contam/contam_opinions/294/opinion_contam_02_en_final1.pdf).
- European Food Safety Authority. EFSA. (2008). Evaluación de riesgos microbiológicos (MRA) en alimentos para consumo animal (de animales de abasto).
- Evans, L.B. (1982). Optimization theory and its application in food processing. *Food Technology*, 36(7), 88-92.
- Fallah, A. A. (2010). Assessment of aflatoxin M1 contamination in pasteurized and UHT milk marketed in central part of Iran: *Food and Chemical Toxicology*, 48 (3), 988-991.
- Fink, G.J. (2008). The role of mycotoxins in the health and performance of dairy cows. *The Veterinary Journal*, 176(1), 84-92.
- Fink, G.J. (2008). Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk. *Food additives and contaminants*, 25(02), 172-80.
- Filippi, R. (2011). Conceptos básicos en la elaboración de ensilaje. Universidad de la frontera. Chile, 1-95.
- Fox, P.F. (1981). Proteinases in dairy technology. *Netherlands Milk Dairy Journal*, 35, 233-253.
- Frazier, W.C. & Westhoff, (2003). Microbiología de los alimentos. 4a ed. Editorial Acribia. Zaragoza. España, 371-372.
- García, O. (2002). Boletín informativo, 1(2).

- García, L. & Verástegui, L. *Determinación de metabolitos secundarios a partir de una cepa nativa de Aspergillus sp. Aislada del páramo del tablazo, departamento de Cundinamarca.* (Trabajo de grado Microbiología Industrial). Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. 72.
- Gimeno, A. & Martins, M.L. (2000<sup>a</sup>). Residuos de micotoxinas en leche, huevos y tejidos comestibles de aves, cerdos y rumiantes (parte II). *Albéitar*, 37, 44-46.
- Gimeno, A. & Martins, M.L. (2002). “Micotoxicosis en Ganado Lechero”. Primer Encuentro Técnico Sobre la Nutrición y Control de la Micotoxicosis en el Ganado Lechero. Abril de 2002. Miami, Florida, USA, 1-19 (Libro del Symposium).
- Gimeno, A. & Martins, M.L. (2003). “Micotoxinas y Micotoxicosis en Animales y Humanos”. Special Nutrients, Inc. USA (Ed.). Talleres graficos del SRL, Buenos Aires (Argentina), 1-160.
- Gimeno, A. (2005). Aflatoxina M1 en la leche riesgo para la salud pública, prevención y control. Recuperado de <http://www.engormix.com/micotoxinas/articulos/aflatoxina-leche-riesgo-salud-t26093.htm>.
- Gimeno, A. (2011). El impacto negativo de algunas micotoxinas en el ganado vacuno lechero. Recuperado de <http://www.engormix.com> consultado el 13 de febrero de 2017. 6:06 a.m.
- Gimeno, A. & Martins, M. (2011). Micotoxinas y micotoxicosis en animales y en humanos. Special nutrients, inc.
- Han RW, Zheng N, Wang JQ, Zhen YP, Xu XM, Li SL. 2013. Survey of aflatoxin in dairy cow feed and raw milk in China. *Food Control* 34:35–9.
- Han, R.W., Zheng, N., Wang, J.Q., Zhen, Y.P., Xu, X.M. & Li, S.L. (2013). Survey of aflatoxin in dairy cow feed and raw milk in China. *Food Control*, 34, 35–9.
- Henry, S.H., Whitaker, T.I., Bowers, J., Park, D., Bosc, W. F. X., Pennington, J., Verger, P., Yoshizawa, T., Van Egmond, H., Jonker, M.A & Coker, R. (2001). Aflatoxin M1. Join Expert Comité on food additives-JECFA 47.
- Henriquez, M., ( 2015, Agosto 29). ¿El niño más fuerte de la historia afectará a Colombia?. El tiempo. Recuperado de <http://www.eltiempo.com/archivo/documento/CMS-16305958>.
- Herrera, T. Y Ulloa, M. (1998). El reino de los hongos. Segunda Edición. Universidad Nacional Autónoma de México, 183-184.

- Holmes, C.W., Brookes, I.M., Garrick, D.J., Mackenzie, D.D.S., Parkinson, T.J & Wilson G.F. (2002). Milk production from pasture. Principles and practices. Massey University. New Zealand, 601.
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas ICONTEC. (2002). Leche cruda. Norma Técnica Colombiana (NTC 399) Bogotá, Colombia.
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas ICONTEC. (2003). Leche y leche en polvo. Determinación del contenido de aflatoxina M1, purificación mediante columna de inmunoafinidad y determinación por cromatografía líquida de alta eficiencia. Norma Técnica Colombiana (NTC 5219) Bogotá, Colombia.
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas ICONTEC. (2004). Microbiología de los alimentos y alimentos para animales. Preparación de muestras para ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para análisis microbiológicos. Norma Técnica Colombiana (NTC 4491) Bogotá, Colombia.
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas ICONTEC, GTC 263:2016. Leche y productos lácteos. Guía para muestreo.
- International Agency for research on Cancer, IARC. (2012). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 1-104.
- Jay, J. (2000). Microbiología moderna de los alimentos. 4a ed. Editorial Acribia. Zaragoza. España, 110-111.
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives JECFA. (1996). Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants. WHO food additive serie 35. World Health Organization.
- Jonsyn, F.E., Maxwell, S.M, & Hendrickse, R.G. (1995). Ochratoxin A and aflatoxins in breast milk samples from Sierra Leone. Mycopathologia. 131(2):121–6.
- Jouany J.P. (2001). The impact of mycotoxins on performance and health of dairy cattle. In: Alltech's 17th Annual Symposium. Proceeding, 191–222.
- Kalac, P. (2011). The effects of silage feeding on some sensory and health attributes of cow's milk: a review. Food Chem, 125, 307–17.
- Kav, K., Col, R. & Kaan, K. (2011). Detection of aflatoxin M1 levels by ELISA in white-brined Urfa cheese consumed in Turkey: Food Control, 22(12),1883-1886.
- Keating, P. (2011). Introducción a la lactología. 2a. ed. Editorial Limusa. México, 22-23.
- Kimblas, M.E. (2004). Los compuestos químicos en alimentos desde la perspectiva de la seguridad alimentaria. España. ISBN 84-95393-46-8.

- Klich, M.A. & Somson, R.A. (2007). *Aspergillus* reference culturales. International commission on *Penicillium* and *Aspergillus* (ICPA). Recuperado de <http://www.aspergilluspenicillium.org/ASPREFINTRO.htm>.
- Klich, M.A. (2009). Health effects of *Aspergillus* in food and air. *Toxicol ind healt*, 9(25),657-667.
- Kurtzman, C.P., Horn, B.W. & Hesseltine, C.W. (1987). *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 53(3), 47-158.
- Lawlor, P.G & Lynch, P.B, ( 2001). *Peer Review*, 54, 17-120.
- Manzanares, N., Huertas, J., Gázmin, L. & Garcia, A. (2014). Control de micotoxinas en alimentos. BOLETÍN GRASEQA N° 7. UNIVERSIDAD DE GRANADA, Departamento de Química Analítica, Grupo de Investigación FQM-302-Calidad en Química Analítica Alimentaria, Ambiental y Clínica. 26.
- Martínez, M.M., Vargas del Rio, L.M. & Gómez, V.M. (2013). Aflatoxinas: Incidencia, impactos en la Salud, *Control y Prevención*,12(2), 89-109.
- Martínez, R., Fernández, B., Esteban, R., Pons, M. & Casanova, M. (2009). Estudio de la trazabilidad de la contaminación por aflatoxinas en la elaboración de queso de oveja. Valencia. España.
- Mazzeo, M. (2007). *Tecnología de lácteos. Guía de aprendizaje. Primera Edición. Editorial Universidad de Caldas. Manizales. Colombia*, 38-39.
- Miller, D.M. & Wilson, D.M. (1994). In: *The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary and agricultural significance*. *Faton. D.L and groopman. J.D (fols)*. Academic press N.Y, 347-364.
- Ministerio de Agricultura, CORPOICA. (2013). *Metodologías de análisis normalizadas para la red de laboratorios lácteos que hacen análisis de leche cruda para pago por calidad*. Colombia.
- Ministerio de Salud y Protección Social, Decreto 616 de 2006. Por el cual se expide el Reglamento Técnico sobre los requisitos que debe cumplir la leche para el consumo humano que se obtenga, procese, envase, transporte, comercializa, expendo, importe o exporte en el país. Colombia.
- Ministerio de Salud y Protección Social, Decreto 1880 de 2011. Por el cual se señalan los requisitos para la comercialización de leche cruda para consumo humano directo en el Territorio Nacional.

- Ministerio de Salud y Protección Social, (2011). UERIA (Unidad de Evaluación de Riesgos para la Inocuidad de los Alimentos). Identificación de riesgos químicos asociados al consumo de leche cruda bovina en Colombia. 13.
- Ministerio de Salud y Protección Social, resolución 4506 de 2013. Por el cual se expide los niveles máximos de contaminantes en los alimentos destinados al consumo humano. Colombia.
- Méndez, L. (2015). Aspergilosis. Departamento de microbiología y parasitología-recursos en micología. Universidad Autónoma de México. Recuperado de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiología/micología/aspergilosis.html>.
- Molina, J. (2001). La industria lechera en Puerto Rico. LALECHERAWordPress.com. Recuperado de <http://lalechera12.wordpress.com/la-lechera-y-su-historia/>.
- Muller, L. (1999). Programa de suplementación de vacas lecheras de alto potencial genético en pastoreo. Universidad Austral de Chile. Facultad de Cs. Agrarias. Instituto de Producción Animal. En: Curso de actualización en producción animal. Serie B-22, 1-19.
- Muller, L., Delahoy, J. & Bargo, F. 2003. Supplementation of lactating cows on pasture. Penn State University 5. Recuperado de <http://www.das.psu.edu/dcn/CATEORG/pasture/pdf/supplementation.pdf>.
- Neira, E. & López, J. (2016). Guía técnica para la elaboración de productos lácteos. Editorial Prisma Impresiones. Edición Sexta, 3.
- Oliveira, C., & Ferraz, J. (2007). Occurrence of aflatoxin M1 in pasteurised, UHT milk and milk powder from goat origin. *Journal Food Control*, 18(4),375-378.
- Oliveira, C., (2012). Aflatoxin M1 occurrence in ultra high temperature (UHT) treated fluid milk from Minas Gerais/Brazil. *Journal Food Control*, 30, 90-92.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura FAO, (1991). Alimentación y nutrición. Manual para el control de calidad de los alimentos. 10: Capacitación en análisis de micotoxinas, 144.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura FAO, (1995). Manual para el personal auxiliar de sanidad animal primaria. Roma.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Organización Mundial de la Salud, Programa Mundial de Alimentos, FAO/OMS/PMA. (1999). Sobre micotoxinas. Tercera conferencia internacional. Túnez, Túnez, 3-6 de marzo de 1999.

- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura FAO, (2000). Inocuidad y calidad de los alimentos en relación con la agricultura orgánica. 22<sup>a</sup> Conferencia Regional de la FAO para Europa. Oporto, Portugal, 24 – 28.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura FAO, (2001). Safety evaluation of certain mycotoxins in food, 1-103.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura FAO, (2001). Mannetje, L. Uso del ensilaje en el trópico privilegiando opciones para pequeños campesinos. Memorias de la Conferencia Electrónica de la FAO sobre el Ensilaje en los Trópicos 1 septiembre a 15 diciembre 1999. Roma.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura FAO, (2004). Reglamento a nivel mundial para las micotoxinas en alimentos y en las raciones en el año 2003. Roma, 21.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura FAO, Codex Alimentarius. (2012). Prevención y reducción de la contaminación de los alimentos y piensos. Primera edición. Roma.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura FAO, Federación Internacional de la Industria de Piensos IFIF. (2014). Buenas prácticas para la industria de piensos – Implementación del Código de Prácticas Sobre Buena Alimentación Animal. Manual FAO de producción y sanidad animal. No 9. Roma. FAO. Dairy Animals. Available from: <http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/milk-production/dairy-animals/en/#.VS6myfB5JOY>. Accessed 2015 April 5.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura FAO, (2015). Dairy Animals. Recuperado de: <http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/milk-production/dairy-animals/en/#.VS6myfB5JOY>.
- Organización Mundial de la Salud OMS. (1983). Criterios de salud ambiental 11. Micotoxinas. Publicación científica N° 453. Washington, D.C. USA, 131.
- Organización Mundial de la Salud OMS. (2012). 10 datos sobre el envejecimiento de la población. Recuperado de: <http://www.who.int/features/factfiles/ageing/es/>.
- Orlando, C., Fernández, M., Monserrat, S. & Sluka, E. (2014). Efecto de la aplicación de virukill sobre granos de maíz con aflatoxinas. Rev. agron. noroeste argent, 34 (2), 15-16.
- Ortega, L. (2002). *Determinación de hongos filamentosos asociados a cráneos de colección del Instituto Alexander Van Humbolt, y evaluación in vitro de sustancias biocidas para su control. (Tesis de grado Microbiología Industrial)*. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. 72.

- Ortiz, C. (2009). Análisis de aflatoxina M1 en leche fresca de establos lecheros de Arequipa. *Rev Inv Vet Perú* 2009, 20 (1),139-14.
- Orv, H. (1987). Nicolas Appert and food preservation,128 (2), 100-101.
- Pagliarini, E., Fortina, M.G. & Vernil, E.N. (1991). Study on optimizing condition for the thermal stabilization o milk. *Lenbencm. Wiss U. Technol*, 24,334-337.
- Patterson, D.S., Glancy, E.M. & Roberts, B.A. (1980). The carry-over of aflatoxin M1 into the milk of cows fed rations containing a low concentration of aflatoxin B1. *Food Cosmet. Toxicol*, 18,35-37.
- Pattono, D., Gallo, PF. & Civera, T. (2011). Detection and quantification of Ochratoxin A in milk produced in organic farms. *Food Chemistry*, 127(1), 374-7.
- Peraica, M., Radic, B., Lucic, A. & Pavlovic. (1999). Toxic effects of mycotoxins in human. *Bulletin of the World Health Organization*, 77(9), 754 - 766.
- Pérez J.R., Gutiérrez, S., Vega, G., Díaz, G., Urbán, M., Coronado, Y. & Escobar, A. (2008). Ocurrencia de aflatoxina M1 en leches cruda, ultrapasteurizada y orgánica producidas y comercializadas en el altiplano mexicano. *Rev. Salud Anim*, 30 (2),103-10.
- Perking, A. 1985. Review of UHT processing methods. *Journal of the Society of Dairy Technology* 38(3):69-73.
- Perrone, G., Susca, A., Cozzi, G., Erlinch, K., Vargas, J., Frisuad, J., Meijer, M., Noonim, P., Warapa, M. & Samson, R. (2007). Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. *Studies Mycol*, 59,53,66.
- Peterson, S.W. (2000). Phylogenetic relationships in *Aspergillus* based on r DNA sequence analysis, In: *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*. Amsterdam (NL): Harward Academic Publishers,323-355.
- Philips, C. (1988). The use of conserved forage as a supplement for grazing dairy cows. *Grass and forage science*, 43, 215-230.
- Phillips, T., Sarr, A. & Grant, P. (1995). Selective Chemisorption and Detoxification of Aflatoxins by Phyllosilicate Clay. *Natural Toxins*, 3, 204-213.
- Phillips, T.D. (1999). Dietary clay in the chemoprevention of aflatoxin-induced disease. *Toxicological Sciences*, 52, 118-126.
- Phillips, T., Lemke, S. & Grant, P. (2002). Characterization of clay-based enterosorbents for the prevention of aflatoxicosis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 504, 157-171.

- Pitt, J. & Samson, R. (2007). Nomenclatural considerations in naming species of *Aspergillus* and its teleomorphs. *Studies Mycol*, 59, 67,70.
- Pittet, A. (1998). Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds – an updated review. *Rev. Med. Vet.* 149, 479–492.
- Poffe, R. & Metens, W. (1988). Heat\_Stable proteases of psychrotrophic bacteria isolated from cooled raw milk. *Applied microbiology ad biotechnology.* 27(5/6): 437-442.
- Quevedo, J.M. (1912). Estudio de un *Aspergillus* patógeno. *Agronomía* 3: 3-36.
- Quiroz, M. (2009). *Caracterización del valor nutritivo y estabilidad aeróbica de ensilados en forma de microsilos para maíz forrajero.* (Tesis de grado de maestría en zootecnia y gestión sostenible). Universidad de Córdoba. ES.
- Ramos, A., Gremmels, J. & Hernández, E. (1996). Prevention of toxic effects of mycotoxins by means of nonnutritive adsorbent compounds. *Journal of Food Protection*, 59, 631-641.
- Ramos, A.J. & Hernández, E. (1996). In vitro adsorption by means of montmorillonite silicate. A study of adsorption isotherms. *Animal Feed Science Technology*, 62, 263-269.
- Ray, B & Bhunia, A. (2010). *Fundamentos de microbiología de los alimentos.* 4ª ed. Editorial Mc Graw Hill. México, 51.
- Reglamento (CE) No152/2009 de la comisión de 27 de enero de 2009. Por el que se establecen los métodos de muestreo y análisis para el control oficial de los piensos. *Diario Oficial De La Unión Europea.*
- Rendón, N. (2007). *Determinación de la presencia de gen codificador de la Aflatoxina producida por Aspergillus flavus en la castaña (Bertholletia excelsa), mediante la técnica Reacción En Cadena De La Polimerasa (PCR).* (Tesis de grado). Universidad Mayor de San Andrés. Bolivia.
- Reyes, W., Martínez, V., Espinosa, M., Vera, E. & Palacios, F. (2009). Aflatoxinas totales en raciones de bovinos y AFM1 en leche cruda obtenida en establos del estado de Jalisco, México. *Téc Pecu Méx*, 47(2),223-230.
- Richardson, B. (1981). The purification and characterization of a heat stable protease from *Pseudomonas fluorescens* B-52. *New Zeland Journal Dairy Science and Technology.* 13,172-176.
- Robinson, R. (1987). *Microbiología lactológica. Microbiología de la leche.* Zaragoza, España. Editorial Acribia S.A. 1(1).

- Rodricks J. & 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., 67-79.
- Rodríguez, A. (2008). Historia de la leche. La Vanguardia. Editorial CREA. Impresiones de Catalunya, S.I. España.
- Rodríguez, P., Soarces, C., Kozakiewicz, Z., Paterson, R., Lima, N. & Venancio, A. (2007). Identification and characterization of *Aspergillus flavus* and aflatoxins. Communicating current research and educational. Topics a trends in applied microbiology. Méndez- Villas (Eds), 527-534.
- Rojas, O. & Wilches, A. (2009). Determinación de aflatoxinas en alimentos de mayor consumo infantil comercializadas en la ciudad de Pamplona, Norte de Santander. Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas. Pamplona, 17(1).
- Romero, A. & Rojas M. (1984). Desarrollo de lipólisis en leche cruda refrigerada. Revista Alimentos. 9(2), 5-8.
- Sadia, A. (2012). A survey of aflatoxin M1 in milk and sweets of Punjab, Pakistan. Journal food control, 26, 235-240.
- Samson, R.A. & Pitt, J. (2000). Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. CRC PRESS, 510.
- Samson, R., Varga, J., Witiak, S. & Geiser, D. (2007). The species concept in *Aspergillus*: recommendations of international panel. Studies Mycol, 59,71-73.
- Sanchis, V., Marín, S. & Ramos, A. (2000). Control de micotoxinas emergentes. Situación legislativa actual. Rev iberoam micol,17, 569-575.
- Sartori, A., Matos, J., Morales, M. & N´Obrega, A. (2015). Determination of aflatoxins M1, M2, B1, B2, G1, and G2 and ochratoxin A in UHT and powdered milk by modified QuEChERS method and ultra-high-performance liquid chromatography tandem Mass spectrometry. Food Annual Methods, 8, 2321–30.
- Serrano, H. & Cardona, N. (2015). Micotoxicosis y micotoxinas: Generalidades y Aspectos básicos. Rev CES Medicina. 29(1). 152.
- Shephard, G.S., Thiel, P.G., Stockenstram, S. & Sydenham, E.W. (1996). Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn –based products. Journal of AOAC International, 79, 671-687.

- Sieber, R., & Blanc, B. (1978). Zur Ausscheidung von Aflatoxin M1 in die Milch und dessen Vorkommen in Milch und Milchprodukten – eine Literaturübersicht. *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmittel-untersuchung un Hygiene*, 69,477-491.
- Signorini, M., Gaggiotti, M., Molineri, A., Chiericatti, C.A., Zapata de Basílico, M.L., Basílico, J. C. & Pisani, M. (2012). Exposure assessment of mycotoxins in cow milk in Argentina: *Food and Chemical Toxicology*, 50(2), 250-257.
- Simpson, R., Jimenez, M., Vega, M., Romero, A. & Costa, M. 2000. Evaluación de leches UHT comercializadas y optimizacion del proceso industrial. Universidad técnica Federico Snta Maria- Valparaiso. Uviersidad Católica de Valparaiso. Alan us 50 n4. Caracas.
- Smith, J., Solomons, G., Lewis, C. & Erson, J. (1994). “Mycotoxins in Human Nutrition Health”. Directorate-General XII Science, Research Development (ed.), European Commision, 1-300.
- Smith, J. & Henderson, R. (1991). *Mycotoxins and Animal Foods*. CRC Press, Boca Ratón, 1, 37, 141, 341, 455, 489.
- Skoog, D.A., Holler, F.J. & Nieman, T.A. (2001). *Principios de Análisis Instrumental*. Quinta Edición. Editorial Mc Graw Hill. España.
- Snoeren, T., Van, D., Dekker, R. & Both, P. (1979). Proteolysis during the storage of UHT sterilized whole milk. Experiments with heated by the direct system for 4 second at 142°C. *Netherlands Milk Dairy Journal*, 33(1), 31 -39.
- Spreer, E. (1991). *Lactología Industrial*. 2ª ed. Editorial Acribia. Zaragoza. España. 617.
- Sosa, J., Cartes, I., Beltran, J., Cabrera, P., Arqueda, R., Conrado, G. Galeco, W. & Flores, G. (2005). *Alternativas nutricionales para época seca*.
- Stoloff, L., Van Egmond, H. & Park, D. (1991). Rationales for the establishment of limits and regulations for mycotoxins. *Food Additives and Contaminants* 8, 213-222.
- Summerell B., Leslie J., Backhouse D., Bryden W. & Burgess L. eds. *Fursarium*: Paul E. Nelson Memorial Symposium. APS Press, St Paul, Minnesota (2001). 310-360.
- Swanson, B. (1987). *Acta Horticulturae* 207, 49.
- Szymanska, K., Lesi, O., Kirk, G., Sam, O., Taniere, P. & Scoazec, J. (2004). Ser-249TP53 mutation in tumour and plasma DNA of hepatocellular carcinoma patients from a high incidence area in the Gambia, West Africa. *Int. J. Cancer*, 110(3), 374-379.
- Tam, E.W., Chen, J.H., Lau, E.C., Ngan, A.H., Fung, K.S., Lee, K.C., Lam C.W., Yuen, K.Y., Lau, S.K., & Woo, P.C. (2014). Misidentification of *Aspergillus nomius* and

- Aspergillus tamaris* as *Aspergillus flavus*: Characterization by Internal Transcribed Spacer,  $\beta$ -Tubulin, and Calmodulin Gene Sequencing, Metabolic Fingerprinting, and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 52 (4), 1153-1160. doi: 10.1128/JCM.03258-13.
- Taylor, D.R. (1999). Mycotoxin binders: What are they and what makes them work? *Feedstuffs*, 18, 41-45.
- Urbán G, Pérez, J., Martínez, F., Salas, J., Díaz, G., Ramírez, M., Castro, G., Vega, G., Gutiérrez, R. & A. Escobar. (2009). Niveles de aflatoxina M1 en quesos frescos producidos en diferentes zonas de México. *Rev. Salud Anim*, 31(2), 115-121.
- Urrego, J. (2005). *Establecimiento de niveles reales de prevalencia y distribución por Aflatoxina y Ocratoxina A en cereales para consumo humano en Bogotá*. (Tesis de grado de Maestría). Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Van Egmond, H. (1989). Aflatoxin M1: Occurrence, Toxicity, Regulation" in *Mycotoxins in Dairy Products*. Hans P. Van Egmond (Ed.) Elsevier Applied Science, London and New York. 2, 11-55.
- Vargas, C & Velasquez, V. (2013). Propuesta de un método biológico para la detección de aflatoxinas en alimentos. Tesis de grado. Escuela superior politécnica del litoral. Gauyaquil – Ecuador, 11.
- Vásquez, S. (2006). *Evaluación en aflatoxinas en suplementos para vacas lecheras en la Sabana de Bogotá, y su relación con AFM1 en la leche*. (Tesis de grado de Zootecnistas). Universidad de La Salle. Colombia.
- Veisseyre, R. (1988). *Lactología técnica*. Editorial Acribia. Zaragoza. España. 3 – 38.
- Verdi, R.J. (1989). Endogenous proteases in bovine milk and effect of thermal processing on their activity. *Dissertation Abstract International*, 49(9), 3527-155.
- Villegas de Gante, A. (2009). *Manual básico para la elaboración de productos lácteos*. 1ª ed. Editorial Trillas. México. 12-13.
- Wagner, B. & Sanchez, M. (2013). *Como preparar un buen ensilado*. Publicaciones IDAF. Serie conservación de forrajes.
- Walstra, P. & Jenness, R. (1984). *Dairy chemistry and physics*. New York. John Wiley. 467.
- Walstra, P. & Jenness, R. (1987). *Química y física lactológica*. 1ª ed. Editorial Acribia. Zaragoza. España, 24.

- Wang, M., Yu, Y., Liang, C., Lu, A., & Zhong, G. (2016). Recent advances in developing small molecules targeting nucleic acid. *International journal of molecular sciences*, 17(6), 779; doi: 103390/ijms 17060779.
- Who. (1990). Selected Mycotoxins: Ochratoxins, Trichothecenes, Ergot. *Environmental Health Criteria* 105. Ginebra.
- Wilbey, R. (1993). Pasteurization of foods. Principles of pasteurization: In encyclopedia of food science. *Food technology and nutrition*. Academic press, 3437-3441.
- Wilkinson, H., Rammaswamy, A., Sim, S. & Keller, N. (2004). Increased conidiation associated with progression along the sterigmatocystin biosynthetic pathway. *Mycologia*, 96,1190-1198.
- Wong, C. (2001). El papel del ensilado en la producción de rumiantes en los trópicos húmedos. En introducción a la conferencia sobre el uso del ensilaje en el trópico, FAO. Roma. IT.
- World Cancer Research Fund. (1997). *Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: a global perspective*. American Institute for Cancer Research, Washington, 488.
- Xiong, J., Wang, Y., Mac, M. & Lui, J. (2013). Seasonal variation of aflatoxin M1 in raw milk from the Yangtze River Delta region of China, *Food Control* 34 (2013), 703 – 706.
- Yiannikouris A, Jouany JP. 2002. Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. *Anim Res* 52:81–99.
- Yiannikouris, A & Jouany, J. (2002). Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. *Anim Res*, 52,81–99.
- Yousef, A. & E.H. (1989). Stability and degradation of Aflatoxin M1. In *mycotoxins in Dairy Products*. Hans P. Van Egmond (Ed). Elsevier applied science. London and New York, 5,127-161.
- Yu, J., Chang, P., Ehrlich, K., Cary, J., Bhatnagar, D. & Cleveland, T. (2004). Clustered genes in aflatoxin biosynthesis. *Appl Environ Microb*, 70,1253-1262.
- Zafar, S., Rafique, M. & Jinap, S. (2013). Variation of aflatoxin M1 contamination in milk and milk products collected during Winter and summer seasons. *Pakistan, Food control* 34,714-718. doi: 10.1016/J.foodcont. 2013.06.009.
- Zafar, S & Rafique, M. (2012). Assessment of aflatoxin M1 in milk and milk products from Punjab, *Pakistan, Food control* 30 (2013)235-239.

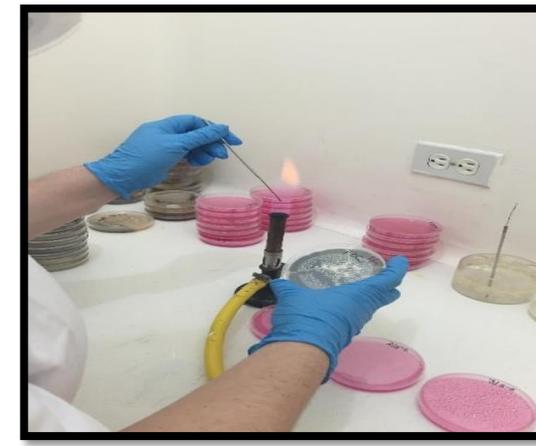
Zambrano, J. & Martinez, N. (2009). *Evaluación de la reducción de Aflatoxina M1 con dos tratamientos térmicos respecto a leche cruda en hatos de la sabana de Bogotá*. (Trabajo de grado Zootecnista). Bogotá D.C. Universidad de la Salle. Facultad de Ciencias agropecuarias. Departamento de zootecnia. Colombia.

Zinedine, A., Gonzale-Osnaya, L., Soriano, J., Moltó, J., Idrissi, L. & Manez, J. (2007). Presence of aflatoxin M1 in pasteurized milk from Morocco: International Journal of Food Microbiology, 114 (1), 25-2.

Recuperdo en [www.ars.usda.gov/southeast-area/dawson-ga/peanut-research/docs/mycotoxin-research/page-3/](http://www.ars.usda.gov/southeast-area/dawson-ga/peanut-research/docs/mycotoxin-research/page-3/).

## Anexos

### Anexo 1. Análisis microbiológicos de piensos.



Fuente: Auto

Anexo 2. Prueba rápida de inmunoensayo para determinar AFM1.



Fuente: Autor.

**Anexo 3.** Resultados de la prueba de inmunoensayo para determinar AFM1.



Fuente: Autor.

#### **Anexo 4.** Cuantificación de AFM1 por cromatografía HPLC.



**Calentamiento de muestras.**



**Centrifugado**



**Descremado de las muestras.**



**Decantación.**



**Etapa de acondicionamiento.**



**Etapa de elución.**

---



**Muestras listas para pasar por Cromatógrafo HPLC cromatógrafo.**

---

Fuente: Autor.



<b>Homogeneity of Variances</b>			
	<b>F</b>	<b>P</b>	
Levene's Test	1,03	0,3134	
O'Brien's Test	1,00	0,3197	
Brown and Forsythe Test	0,08	0,7744	

**Welch's Test for Mean Differences**

<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
EPOCA	1,0	3,98	0,0497
Error	75,6		

Component of variance for between groups 5,989E-08  
 Effective cell size 40,0

**EPOCA Mean**

LLUVIA 1,0324  
 SEQUÍA 1,0320

Observations per Mean 40

Standard Error of a Mean 1,418E-04

Std Error (Diff of 2 Means) 2,006E-04

Statistix 10,0 (30-day Trial) DENSIDAD COMPARATIVO...; 23/04/2017;

2:41:50 p. m.

**Descriptive Statistics of DENSIDAD by EPOCA**

<b>EPOCA</b>	<b>N</b>	<b>Mean</b>	<b>SD</b>	<b>Minimum</b>	<b>Median</b>	<b>Maximum</b>
LLUVIA	40	1,0324	8,130E-04	1,0300	1,0330	1,0330
SEQUÍA	40	1,0320	9,737E-04	1,0300	1,0320	1,0340

**GRASA:**

**One-Way AOV for GRASA by EPOCA**

<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
EPOCA	1	2,4117	2,41165	8,14	0,0055
Error	78	23,1177	0,29638		
Total	79	25,5294			

Grand Mean 3,8166 CV 14,26

**Homogeneity of Variances**

	<b>F</b>	<b>P</b>	
Levene's Test	1,21	0,2753	
O'Brien's Test	1,18	0,2816	
Brown and Forsythe Test	2,39	0,1265	

**Welch's Test for Mean Differences**

<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
EPOCA	1,0	8,14	0,0056
Error	75,3		

Component of variance for between groups 0,05288  
 Effective cell size 40,0

**EPOCA Mean**

LLUVIA 3,9902  
 SEQUÍA 3,6430

Observations per Mean 40

Standard Error of a Mean 0,0861  
 Std Error (Diff of 2 Means) 0,1217

Statistix 10,0 (30-day Trial) GRASA COMPARATIVA EP...; 23/04/2017;  
 2:41:11 p. m.

**Descriptive Statistics of GRASA by EPOCA**

EPOCA	N	Mean	SD	Minimum	Median	Maximum
LLUVIA	40	3,9902	0,4896	2,4200	3,9700	5,3500
SEQUÍA	40	3,6430	0,5941	2,2900	3,6350	4,7400

**SNG:**

**One-Way AOV for SNG by EPOCA**

Source	DF	SS	MS	F	P
EPOCA	1	0,15845	0,15845	1,82	0,1857
Error	39	3,40464	0,08730		
Total	40	3,56309			
Grand Mean		8,4568	CV	3,49	

**Homogeneity of Variances F P**

Levene's Test		0,15	0,6978
O'Brien's Test		M	M
Brown and Forsythe Test		0,84	0,3648

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
EPOCA	0,0	M	M
Error	M		

Component of variance for between groups 0,03601  
 Effective cell size 2,0

EPOCA	N	Mean	SE
LLUVIA	1	8,8500	0,2955S
SEQUÍA	40	8,4470	0,0467

**Descriptive Statistics of SNG by EPOCA**

EPOCA	N	Mean	SD	Minimum	Median	Maximum
LLUVIA	1	8,8500	M	8,8500	8,8500	8,8500
SEQUIA	40	8,4470	0,2955	7,2900	8,4900	8,8900

**PROTEINA:**

**One-Way AOV for PROTEINA by EPOCA**

Source	DF	SS	MS	F	P
EPOCA	1	2,08981	2,08981	47,60	0,0000
Error	78	3,42414	0,04390		
Total	79	5,51395			
Grand Mean		3,3114	CV	6,33	

**Homogeneity of Variances F P**

Levene's Test		1,75	0,1894
O'Brien's Test		1,71	0,1951

Brown and Forsythe Test 1,59 0,2109

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
EPOCA	1,0	47,60	0,0000
Error	69,3		

Component of variance for between groups 0,05115  
Effective cell size 40,0

**EPOCA Mean**

LLUVIA 3,4730  
SEQUÍA 3,1498

Observations per Mean 40  
Standard Error of a Mean 0,0331  
Std Error (Diff of 2 Means) 0,0469

Statistix 10,0 (30-day Trial) PROTEINA COMPARATIVA...; 23/04/2017;  
2:40:25 p. m.

**Descriptive Statistics of PROTEINA by EPOCA**

EPOCA	N	Mean	SD	Minimum	Median	Maximum
LLUVIA	40	3,4730	0,2438	2,6400	3,4650	4,2100
SEQUÍA	40	3,1498	0,1683	2,6700	3,1800	3,4800

**S.T:**

**One-Way AOV for ST by EPOCA**

Source	DF	SS	MS	F	P
EPOCA	1	0,0647	0,06469	0,12	0,7283
Error	39	20,6099	0,52846		
Total	40	20,6746			

Grand Mean 12,099 CV 6,01

**Homogeneity of Variances F P**

Levene's Test 0,29 0,5924  
O'Brien's Test M M  
Brown and Forsythe Test 1,13 0,2940

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
EPOCA	0,0	M	M
Error	M		

Component of variance for between groups -0,23475  
Effective cell size 2,0

EPOCA	N	Mean	SE
LLUVIA	1	12,350	0,7270
SEQUÍA	40	12,092	0,1149

**Anexo 6.** Informe de resultados de análisis de Aflatoxina M1, mes de mayo y agosto de 2016.

Laboratorio de toxicología Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá

**ANÁLISIS DE AFLATOXINA M1**

Norma: ISO14501 HPLC-espectrofluorometría Límite de detección:0,01µg/kg

Fecha de análisis: 2016-05-05

<b>Nº</b>	<b>Muestra</b>	<b>cantidad</b>	<b>AFM1</b>
<b>030ª</b>	Leche cruda Finca San Francisco	250 ml	3.3 ng/L 0,0033 µg/kg
<b>0630B</b>	Leche cruda Finca La unión	250 ml	N.D
<b>030C</b>	Leche cruda Finca La Chinita	250 ml	12.8 ng/L 0,0128 µg/ kg
<b>030D</b>	Leche cruda Finca San Daniel	250 ml	11.7ng/L 0,0117 µg/ kg
<b>030E</b>	Leche cruda Finca Santa Helena	250 ml	15.0 ng/L 0,015 µg/ kg
<b>030F</b>	Leche cruda Tanque almacenam	250 ml	28.3 ng/L 0,0283 µg/ kg
<b>030G</b>	Leche cruda Finca La Esmeralda	250 ml	39.4 ng/L 0,0394 µg/ kg
<b>030H</b>	Leche cruda Finca Los Cambulos	250 ml	108.7 ng/L 0,1087µg/ kg
<b>030I</b>	Leche cruda Finca Margaritas	250 ml	6.9 ng/L 0,0069µg/ kg
<b>030J</b>	Leche cruda Finca Bonanza	250 ml	59.6 ng/L 0,0596 µg/ kg
<b>030K</b>	Leche cruda Finca La Fortuna	250 ml	13.5 ng/L 0,0135 µg/ kg
<b>030L</b>	Leche cruda Finca La Alegría	250 ml	87.4 ng/L 0,0874 µg/ kg
<b>030M</b>	Leche cruda Finca La primavera	250 ml	9.1 ng/L 0,091µg/ kg
<b>030N</b>	Leche cruda Finca La Esperanza	250 ml	18.4 ng / L 0,0184 µg/ kg
<b>030Ñ</b>	Leche cruda	250 ml	19.8 ng /L

	Finca Alejandría		0,0198µg/ kg
<b>030°</b>	UHT LOTE: R92616136 VENCE: 29/MAY/16	1100 ml	26.9 ng/L
<b>030P</b>	UHT LOTE: R10138 VENCE: 27/MAY/16	400 ml	0,0269µg/ kg 36.9 ng/L
<b>030Q</b>	UHT LOTE: R10135 VENCE: 27/MAY/16	400 ml	0,0369µg/ kg 25.5 ng /L
<b>030R</b>	UHT LOTE: R8135 VENCE: 27/MAY/16	400 ml	0,0232 µg/ kg 23.2 ng/L
<b>030S</b>	UHT LOTE: R8654 VENCE: 29/ABR/16	900 ml	0,0312µg/ kg 31.2 ng/L
<b>030T</b>	UHT LOTE: R8914135 VENCE: 05/JUN/16	400 ml	0,038µg/ kg 38.0 ng/L
<b>030U</b>	UHT LOTE: R01984 VENCE: 11/ABR/16	900 ml	0,0111 µg/ kg 11.1 ng/L
<b>030V</b>	UHT LOTE: R910163 VENCE: 18/MAR/16	900 ml	0,0266µg/ kg 26.6 ng/L
<b>030W</b>	UHT LOTE: R961416134 VENCE: 26/MAY/16	900 ml	0,0494µg/ kg 49.4 ng/L
<b>030X</b>	UHT LOTE: R8135 VENCE: 27/MAY/16	400 ml	0,0474µg/ kg 47.4 ng/L

---

**OBSERVACIONES:**

ng/L = partes por billón

µg/kg = partes por trillón

N.D = No detectable

Laboratorio de toxicología Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá

### ANÁLISIS DE AFLATOXINA M1

Norma: ISO14501 HPLC-espectofluorimetría

Limite de detección:0,01 µg/kg

Fecha de análisis: 2016-08-22

N°	Muestra	cantidad	AFM1
INV-002 <sup>a</sup>	Leche cruda	250 ml	3.3 ng/L
	Finca San Francisco		0,033 µg/L
INV-002B	Leche cruda	250 ml	100 ng/L
	Finca La unión		0,100 µg/L
INV-002C	Leche cruda	250 ml	N.D
	Finca La Chinita		
INV-002D	Leche cruda	250 ml	N.D
	Finca San Daniel		
INV-002E	Leche cruda	250 ml	N.D
	Finca Santa Helena		
INV-002F	Leche cruda	250 ml	N.D
	Finca La Esmeralda		
INV-002G	Leche cruda	250 ml	N.D
	Finca Los Cambulos		
INV-002H	Leche cruda	250 ml	N.D
	Finca Margaritas		
INV-002I	Leche termizada	250 ml	9.5 ng/L
	Tanque de almacena		0,0095 µg/L
INV-002J	Leche cruda	250 ml	6.5 ng/L
	Finca La Fortuna		0,0065 µg/L
INV-002K	Leche cruda	250 ml	11,0 ng/L
	Finca La Alegría		0,011 µg/L
INV-002L	Leche cruda	250 ml	N.D
	Finca La primavera		
INV-002M	Leche cruda	250 ml	7.9 ng / L
	Finca La Esperanza		0,0079 µg/L
INV-002N	Leche cruda	250 ml	8.6 ng /L
	Finca Alejandría		0,0086µg/L
INV-002Ñ	Leche cruda	250 ml	3.9 ng/L
	Tanque alm 7		0,0039µg/L

<b>INV-002°</b>	Leche cruda Tanque alm 2	250 ml	N.D
<b>INV-002P</b>	Leche cruda Tanque alm 6	250 ml	9,1 ng/L 0,0091µg/L
<b>INV-002Q</b>	UHT LOTE: 1426139 VENCE: 09/SEP/16	400 ml	11.7 ng/L 0,0117 µg/L
<b>INV-002R</b>	UHT LOTE: 14166135 VENCE: 18/SEP/16	400 ml	7.3 ng/L 0,0073µg/L
<b>INV-002S</b>	UHT LOTE: 14165134 VENCE: 19/SEP/16	900 ml	8.8 ng/L 0,0088µg/L
<b>INV-002T</b>	UHT LOTE: 2166139 VENCE: 20/SEP/16	900 ml	7.9 ng/L 0,0079 µg/L
<b>INV-002U</b>	UHT LOTE: 1451317532VENCE: 23/SEP/16	400 ml	8.9 ng/L 0,0089µg/L
<b>INV-002V</b>	UHT LOTE: 72146163 VENCE: 22/SEP/16	1100 ml	4.0ng/L 0,004µg/L
<b>INV-002W</b>	UHT LOTE: 921614134 VENCE: 17/SEP/16	1100 ml	N.D
<b>INV-002X</b>	UHT LOTE: 1416134 VENCE: 18/SEP/16	900 ml	8,7 ng/L 0,0087µg/L

---

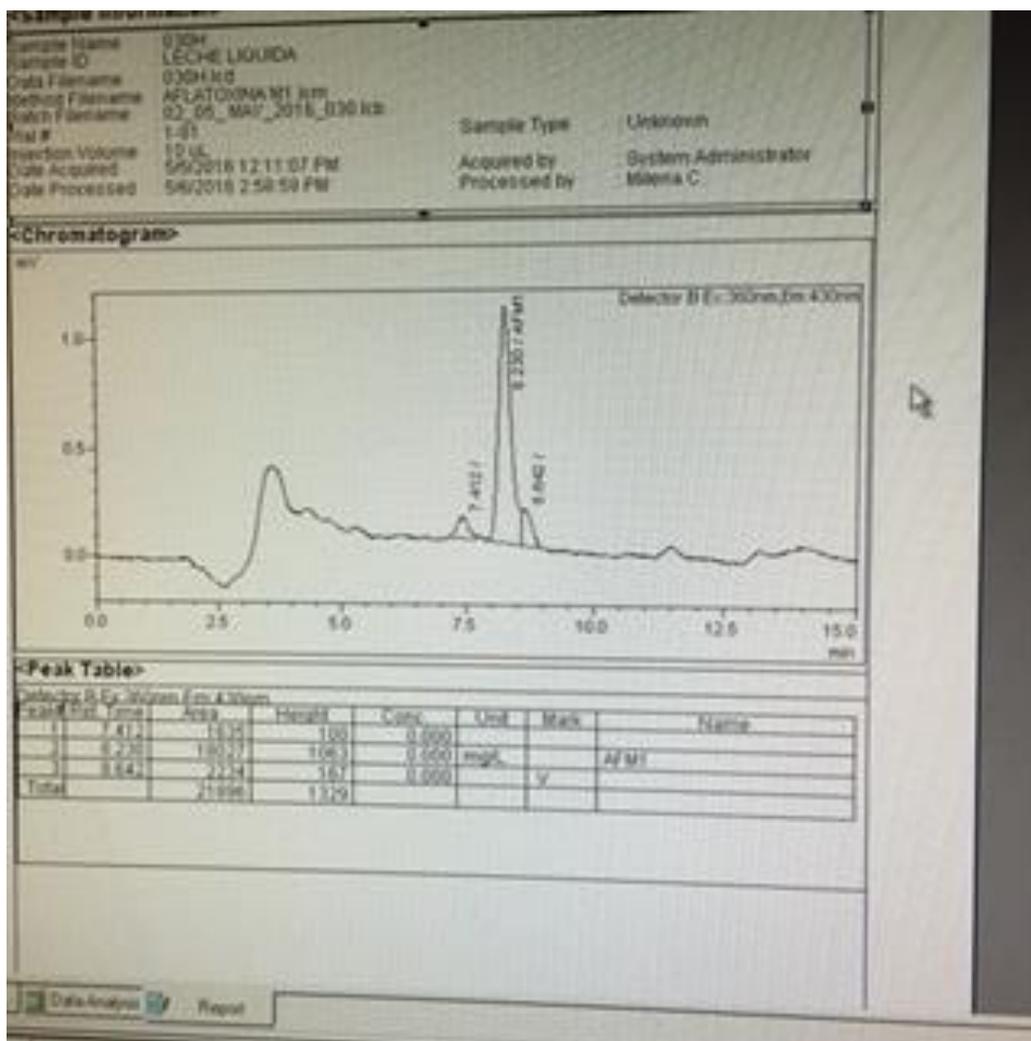
**OBSERVACIONES:**

ng/L = partes por billón

µg/kg = partes por trillón

N.D = No detectable

## Anexo 7. Cromatogramas.



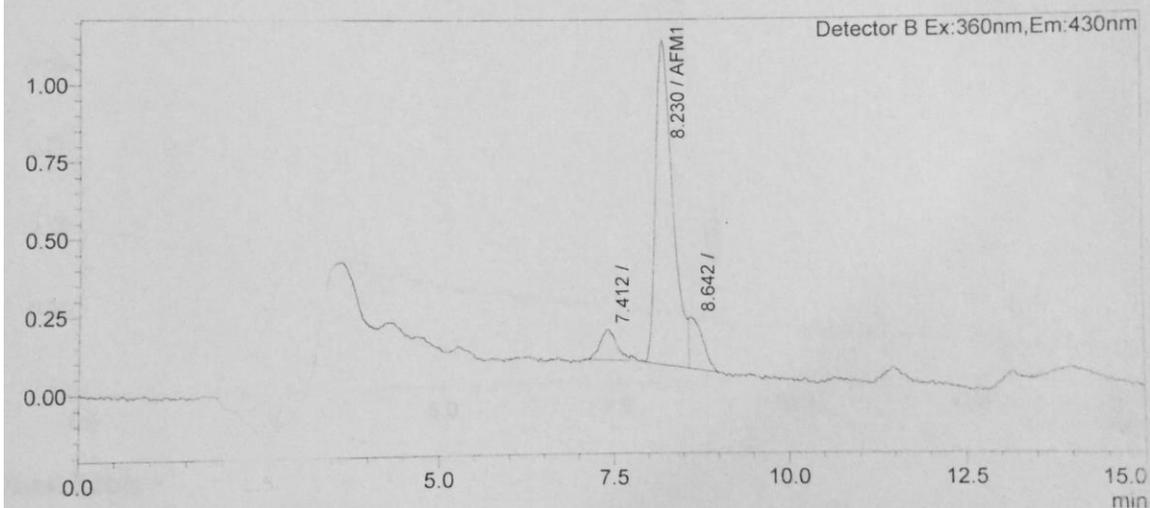
Fuente: Autor

LABORATORIO DE TOXICOLOGIA  
 FACULTAD MEDICINA VETERINARIA Y DE ZOOTECNIA  
 UNIVERSIDAD NACIONAL

**Sample Information >**

Sample Name	: 030H	Sample Type	: Unknown
Sample ID	: LECHE LIQUIDA	Acquired by	: System Administrator
Data Filename	: 030H.lcb	Processed by	: Milena C
Method Filename	: AFLATOXINA M1.lcm		
Batch Filename	: 02_05_MAY_2016_030.lcb		
Anal #	: 1-8		
Injection Volume	: 10 µl		
Date Acquired	: 5/6/2016 11:07 PM		
Date Processed	: 5/6/2016 1:38:59 PM		

**Chromatogram >**



**Peak Table >**

Peak#	Ret. Time	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	7.412	100	0.000			
2	8.230	1063	0.000	mg/L		AFM1
3	8.642	167	0.000		V	
Total		1329				

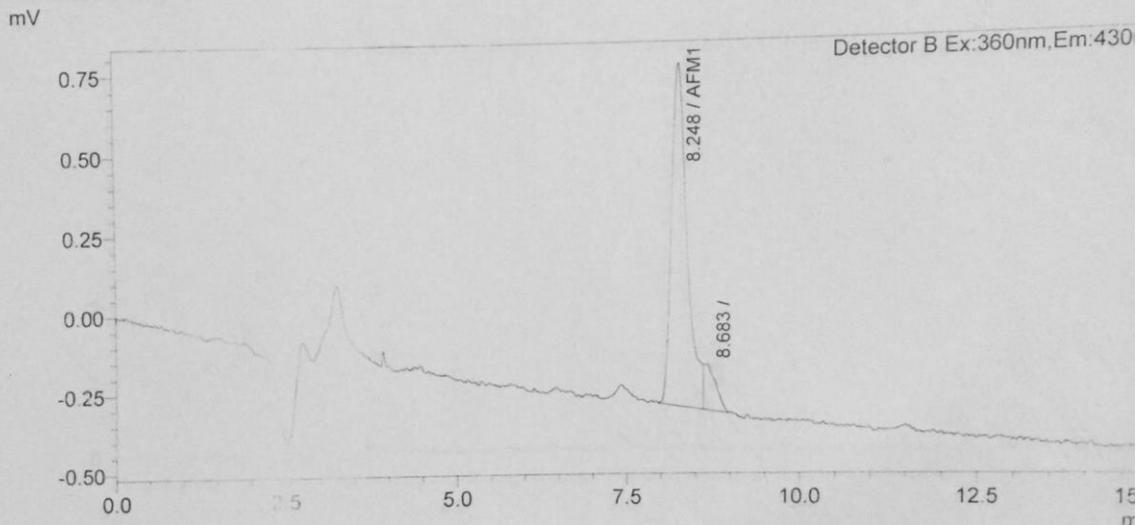
Fuente: Autor.

LABORATORIO DE TOXICOLOGIA  
FACULTAD MEDICINA VETERINARIA Y DE ZOOTECNIA  
UNIVERSIDAD NACIONAL

**<Sample Information>**

Sample Name	: CC_100	Sample Type	: Unknown
Sample ID	: 100 ng/L	Acquired by	: System Administrator
Data Filename	: CC_100_1.lcd	Processed by	: Milena C
Method Filename	: AFLATOXINA M1.lcm		
Batch Filename	: 02_05_MAY_2016_030.lcb		
Vial #	: 1-71		
Injection Volume	: 10 µL		
Date Acquired	: 5/5/2016 9:20:53 AM		
Date Processed	: 5/6/2016 2:54:11 PM		

**<Chromatogram>**



**<Peak Table>**

Detector B Ex:360nm, Em:430nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	8.248	16727	1070	0.000	mg/L		AFM1
2	8.683	1694	143	0.000		V	
Total		18421	1213				

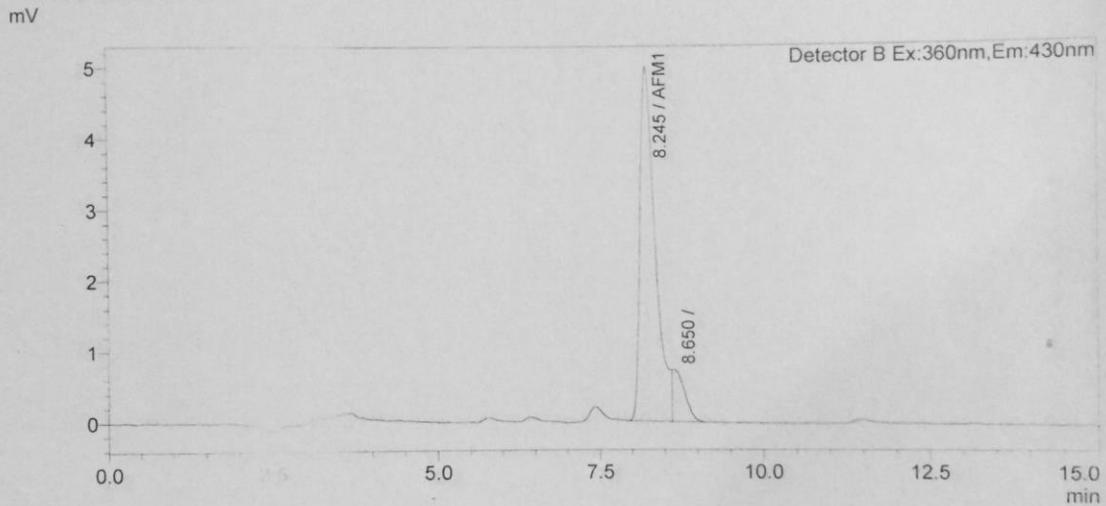
Fuente: Autor.

LABORATORIO DE TOXICOLOGIA  
FACULTAD MEDICINA VETERINARIA Y DE ZOOTECNIA  
UNIVERSIDAD NACIONAL

**<Sample Information>**

Sample Name	: CC_500_1	Sample Type	: Unknown
Sample ID	: 500 mg/L	Acquired by	: System Administrator
Data Filename	: CC_500_1.lcb	Processed by	: Milena C
Method Filename	: AFLA TOXINA M1.lcm		
Batch Filename	: 02_05_MAY_2016_030.lcb		
Vial #	: 1-73		
Injection Volume	: 10 µl		
Date Acquired	: 5/5/2016 10:07:18 AM		
Date Processed	: 5/6/2016 2:57:47 PM		

**<Chromatogram>**



**<Peak Table>**

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	8.245	5016	5016	0.000	mg/L		AFM1
2	8.650	737	737	0.000		V	
Total		5753	5753				

Fuente: Autor.

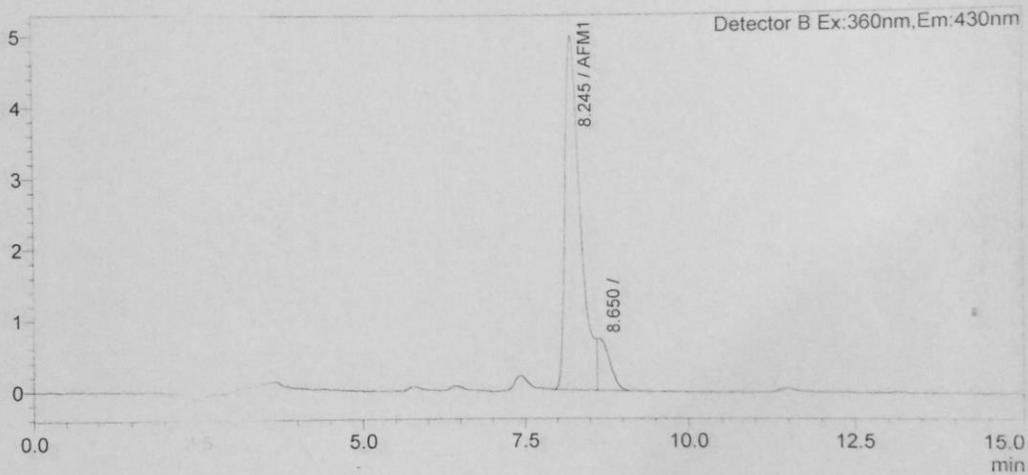
LABORATORIO DE TOXICOLOGIA  
FACULTAD MEDICINA VETERINARIA Y DE ZOOTECNIA  
UNIVERSIDAD NACIONAL

**<Sample Information>**

Sample Name	: CC_500_1	Sample Type	: Unknown
Sample ID	: 500 mg/L	Acquired by	: System Administrator
Data Filename	: CC_500_1.lcb	Processed by	: Milena C
Method Filename	: AFLA TOXINA M1.lcm		
Batch Filename	: 02_05_MAY_2016_030.lcb		
Vial #	: 1-73		
Injection Volume	: 10 µl		
Date Acquired	: 5/5/2016 12:07:18 AM		
Date Processed	: 5/6/2016 2:57:47 PM		

**<Chromatogram>**

mV



**<Peak Table>**

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	8.245	5016	5016	0.000	mg/L		AFM1
2	8.650	737	737	0.000		V	
Total		5753	5753				

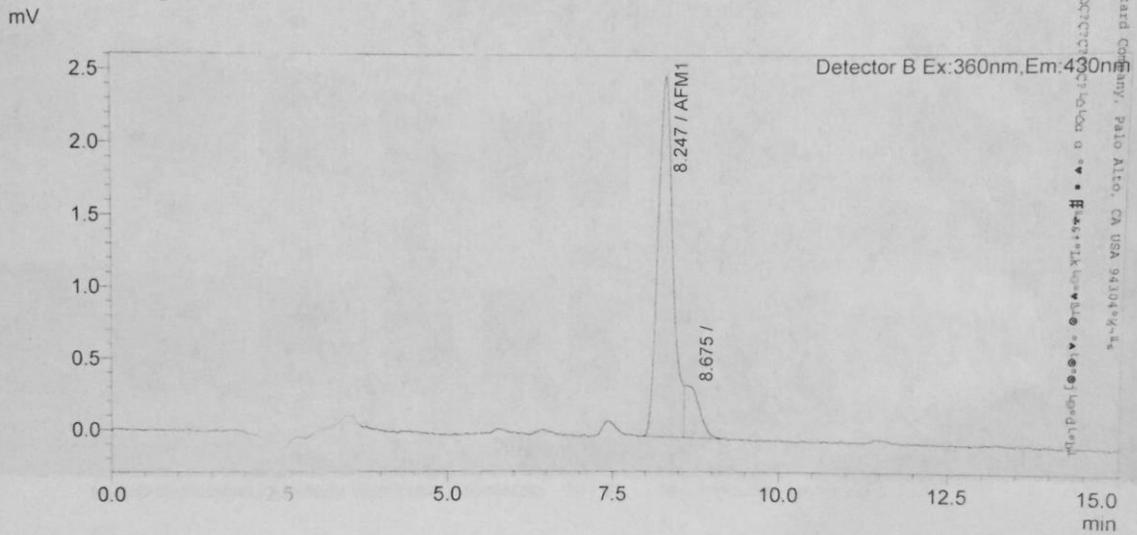
Fuente: Autor.

LABORATORIO DE TOXICOLOGIA  
 FACULTAD MEDICINA VETERINARIA Y DE ZOOTECNIA  
 UNIVERSIDAD NACIONAL

**<Sample Information>**

Sample Name	: CC_250	Sample Type	: Unknown
Sample ID	: 250 /L	Acquired by	: System Administrator
Data Filename	: CC_250.lcd	Processed by	: Milena C
Method Filename	: AFLA TOXINA M1.lcm		
Batch Filename	: 02_05_MAY_2016_030.lcb		
Vial #	: 1-72		
Injection Volume	: 10 µl		
Date Acquired	: 5/5/2016 11:49 AM		
Date Processed	: 5/6/2016 2:27:12 PM		

**<Chromatogram>**



**<Peak Table>**

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	8.247	39201	2512	0.000	mg/L		AFM1
2	8.675	5603	359	0.000		V	
Total		44806	2871				

Fuente: Autor

## Anexo 8. Estadístico t-student.

### MAYO LECHE CRUDA

#### Descriptive Statistics

Variable	N	Mean	SD	Minimum	Median	Maximum
AFM1	15	0,0289	0,0321	0,0000	0,0150	0,1087

### AGOSTO LECHE CRUDA

#### Descriptive Statistics

Variable	N	Mean	SD	Minimum	Median	Maximum
AFM1	17	0,0102	0,0237	0,0000	3,900E-03	0,1000

### MAYO LECHE UHT

#### Descriptive Statistics

Variable	N	Mean	SD	Minimum	Median	Maximum
UHT	10	0,0316	0,0116	0,0111	0,0290	0,0494

#### One-Sample T Test

Null Hypothesis:  $\mu = 0,05$

Alternative Hyp:  $\mu < 0,05$

Variable	Mean	SE	T	DF	P	95% C.I.	Upper C.I.
UHT	0,0316	3,668E-03	-5,01	9	0,0004		0,0383

Cases Included 10 Missing Cases 0

### AGOSTO LECHE UHT

#### Descriptive Statistics

Variable	N	Mean	SD	Minimum	Median	Maximum
UHT	8	7,162E-03	3,596E-03	0,0000	8,300E-03	0,0117

#### One-Sample T Test

Null Hypothesis:  $\mu = 0,05$

Alternative Hyp:  $\mu < 0,05$

Variable	Mean	SE	T	DF	P	95% C.I.	Upper C.I.
UHT	7,162E-03	1,271E-03	-33,69	7	0,0000		9,571E-03

Cases Included 8 Missing Cases 0