

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE AGRONOMÍA
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**



TESIS DE GRADO

**EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE AFLATOXINAS M1 EN LA LECHE Y
AFLATOXINAS B1 EN EL FORRAJE ALMACENADO DE 4 COMUNIDADES EN EL
ÁREA DE INFLUENCIA A LA PLANTA DE TRANSFORMACIÓN DE PRODUCTOS
LÁCTEOS DE LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL DE CHOQUENAIRA**

MILTON WILFREDO VICENTE QUISBERT

La Paz – Bolivia

2012

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE AGRONOMÍA
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**

**EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE AFLATOXINAS M1 EN LA LECHE Y
AFLATOXINAS B1 EN EL FORRAJE ALMACENADO DE 4 COMUNIDADES EN EL
ÁREA DE INFLUENCIA A LA PLANTA DE TRANSFORMACIÓN DE PRODUCTOS
LÁCTEOS DE LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL DE CHOQUENAIRA**

*Tesis de grado presentada como requisito
parcial para optar el Título de
Ingeniero Agrónomo*

MILTON WILFREDO VICENTE QUISBERT

Asesores:

Lic. Edgar García Cárdenas

Ing. Yovana Amira Robles Alipaz

Tribunal Examinador

Ing. Víctor Chungara Castro

Ing. Rafael Murillo García

Ing. Bernardo Ticona Contreras

Presidente Tribunal Examinador

DEDICATORIA

*A: La persona que más
admiro y quien me enseñó el
respeto la gentileza el
sacrificio la confianza
paciencia y el perdón pero
sobre todo el gran amor que
existe en una persona.*

*Nunca podre agradecerte
todo lo que has hecho por mí
pero quiero empezar por
dedicarte este trabajo que lo
hice para ti y gracias a ti,
muchas gracias mamá B.
Lastenia Quisbert Mollo.*

AGRADECIMIENTOS

Dios mío gracias por todo tu infinito amor y ser mi guía por el camino de mi vida.

A la Universidad Mayor de San Andrés, Facultad de Agronomía, Carrera de Ingeniería Agronómica, al plantel docente por instruirme en mi formación profesional.

Por su sacrificio, confianza, aliento, por todo su amor y por demostrarme que todos podemos alcanzar la felicidad en esta vida no importa lo que nos pase, mañana el sol siempre saldrá para todos, gracias mamá Benita Lastenia Quisbert Mollo.

A mi hermanito Miguel Angel Vicente por haber estado con migo en los tiempos más difíciles muchas gracias, a mi hermano Octavio y Juan Carlos gracias por sus palabras de aliento.

Por ser la persona más especial en mi vida y por permitirme ser parte de su vida y a quien debo las ganas de vivir, te quiero mucho Nilda Chalco Z. (Pili).

A mis tíos Santusa Apaza y Justo Quisbert por brindarme todo su apoyo, a mi abuela Águeda Mollo, a mis primos Herbert, Andrés, Luz, Dominga, Jazmin y Cristian por ser una familia para mí muchas gracias.

A mis compañeros de la universidad, que me ofrecieron su amistad sincera y comprensión durante todos los años de estudio y en especial a Fredy M., Víctor R., Yoly R., Josué A., Alvaro R. y Jheny M. gracias amigos.

Mis sinceros agradecimientos al Lic. Edgar R. García Cárdenas por su confianza, amistad, paciencia y comprensión, el asesoramiento y sugerencias en la redacción y elaboración del presente documento.

De igual forma mis agradecimientos al Laboratorio de Toxicología de Alimentos (MLASA), a la Dra. Erika Montaña R., al Dr. Guido Alarcón Ch., y al Dr. Ramiro Ávila I., por sus sugerencias acertadas y el apoyo en la elaboración del presente trabajo de investigación.

A mi tribunal revisor: Ing. Víctor Chungara Castro, Ing. Rafael Murillo García y Ing. Bernardo Ticona Contreras, por la revisión y sugerencias para la elaboración del presente investigación.

Y a todas las personas que de una u otra forma hicieron posible, la conclusión mis estudios y del presente trabajo.

A todos ellos,

Muchas gracias.....

CONTENIDO

	Pág.
ÍNDICE GENERAL.....	i
ÍNDICE DE CUADROS.....	v
ÍNDICE DE FIGURA.....	viii
RESUMEN.....	x
SUMMARY.....	xi

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
1. INTRODUCCION.....	1
1.1. Justificación.....	2
1.2. Objetivos.....	3
1.2.1. Objetivo General.....	3
1.2.2. Objetivos Específicos.....	3
2. REVISION BIBLIOGRAFICA.....	4
2.1. La Inocuidad de los Alimentos.....	4
2.2. Micotoxinas.....	4
2.2.1. Micotoxinas en el Forraje.....	6
2.3. El Agente Causal.....	7
2.3.1. Aspergillus.....	7
2.3.2. Morfología.....	9
2.4. Aspectos Generales de las Aflatoxinas.....	10
2.4.1. Aflatoxina B1.....	11

2.4.1.1. Biotransformación de Aflatoxina B1.....	12
2.4.2. Aflatoxinas M1.....	14
2.4.2.1. Absorción y Transmisión de la Aflatoxina B1 y Biotransformación en Aflatoxina M1 Dentro del Organismo Animal.....	14
2.4.3. Estabilidad de las Aflatoxinas.....	15
2.4.3.1. Estabilidad de la Aflatoxina M1.....	15
2.4.4. Aflatoxinas en Quesos.....	16
2.5. Henos.....	16
2.6. La Leche.....	17
2.6.1. Contaminantes en la leche.....	18
2.6.2. Presencia de Aflatoxinas en Leche y Productos Lácteos.....	21
2.7. Métodos de detoxificación de AFM1 en leche.....	22
2.8. Reglamentos para las Micotoxinas en el año 2003 y desarrollos actuales.....	23
2.8.1. Legislación Aplicable.....	25
2.8.2. Normativa Vigentes para Aflatoxinas M1.....	26
2.9. Métodos de Análisis de Cuantificación para Aflatoxina M1 en la Leche..	26
2.9.1. Técnica de Elisa.....	27
2.9.2. RIDASCREEN Aflatoxin M130/15.....	29
2.9.3. Cromatografía de capa fina.....	30
2.9.4. Columna de Inmuno Afinidad.....	30
2.10. Exposición humana a aflatoxinas.....	31
2.10.1. La exposición aguda.....	31
2.10.2. Sobre la intoxicación crónica.....	31

2.11. Impacto Económico por Aflatoxinas.....	32
2.12. Control.....	33
3. LOCALIZACION.....	34
3.1. Ubicación geográfica.....	34
3.2. Aspectos Fisiográficos y Climáticos.....	35
3.2.1. Fisiografía.....	35
3.2.2. Clima.....	35
3.2.3. Vegetación.....	35
3.3. Procesamiento de las Muestras.....	35
4. MATERIALES Y METODOS.....	36
4.1. Materiales.....	36
4.1.1. Materiales de laboratorio y equipo.....	36
4.1.1.1. Material de Campo.....	36
4.1.2. Reactivos.....	36
4.1.3. Material biológico.....	36
4.1.4. Material de gabinete.....	37
4.2. Metodología.....	37
4.2.1. Análisis Estadístico.....	37
4.2.2. Determinación del Tamaño de la Muestra.....	37
4.2.3. Procedimiento del Ensayo	39
4.2.3.1. RIDASCREEN Aflatoxin B1 y M1 30/15. es un ELISA competitivo.....	39
4.2.3.1.1. Procesamiento de la Muestra.....	39
4.2.3.1.2. Consideraciones Generales.....	41

4.2.3.1.3. Implementación del Ensayo para Aflatoxinas B1.....	41
4.2.3.2. Procedimiento del Ensayo para Aflatoxina M1.....	43
4.2.3.2.1. Procesamiento de la Muestra.....	43
4.2.3.2.2. Consideraciones Generales.....	44
4.2.3.2.3. Implementación del Ensayo para Aflatoxinas M1.....	45
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	48
5.1. Elaboración de la curva de calibración para AFB1.....	48
5.2. Resultado de Cuantificación de Aflatoxina B1 para cada Comunidad en Estudio.....	48
5.3. Elaboración de la curva de calibración para AFM1.....	61
5.4. Resultado de Cuantificación de Aflatoxina M1 para cada Comunidad de las Muestras Tomadas.....	64
6. CONCLUSIONES.....	36
4. RECOMENDACIONES.....	36
4. BIBLIOGRAFIA.....	36
9. ANEXOS.....	79

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro N° 1. Hongos productores y micotoxinas presentes en alimentos.....	5
Cuadro N° 2. Hongos que Producen Micotoxinas de Acuerdo con el Hábitat.....	7
Cuadro N° 3. Composición promedio de la leche de algunas especies de mamíferos (por 100 g).....	18
Cuadro N° 4. Contaminantes de la Leche y Derivados.....	20
Cuadro N° 5. Micotoxicosis según Agencia Internacional para la Investigación del cáncer (IARC).....	32
Cuadro N°6. Resultados de Absorbancia promedio entre muestra y replica, coeficiente de variación, % de Absorbancia, de las concentraciones estándar provistas por el kit de Elisa RIDASCREEN Aflatoxin B1 30/15.....	48
Cuadro N° 7. Absorbancia para las muestras de forraje tomadas de la comunidad “Choquenaira” de 3 productores, lectura en espectrofotómetro a 450 nm.....	50
Cuadro N° 8. Resultados de coeficiente de variación, % de Absorbancia y concentración de aflatoxina B1 en ppb, de las muestras analizadas de la comunidad “Choquenaira” de 3 productores.....	51
Cuadro N° 9. Absorbancia para las muestras de forraje tomadas de la comunidad “Copalacaya” de 4 productores, lectura en espectrofotómetro a 450 nm.....	53
Cuadro N° 10. Resultados de coeficiente de variación, % de Absorbancia y concentración de aflatoxinas B1 en ppb, de las muestras de forraje analizadas de la comunidad “Copalacaya” de 4 productores.....	54
Cuadro N°11. Absorbancia para las muestras de forraje tomadas de la comunidad “Canaviri” de 4 productores, lectura en espectrofotómetro a 450 nm.....	54

Cuadro N° 12. Resultados de coeficiente de variación, % de Absorbancia y concentración de aflatoxina B1 en ppb, de las muestras analizadas de la comunidad “Canaviri” de 4 productores.....	56
Cuadro N° 13. Absorbancia para las muestras de forraje tomadas de la comunidad “Callisaya” de 4 productores, lectura en espectrofotómetro a 450 nm.....	59
Cuadro N° 14. Resultados de coeficiente de variación, % de Absorbancia y concentración de aflatoxina B1 en ppb, de las muestras analizadas de la comunidad “Callisaya” de 4 productores.....	59
Cuadro N° 15. Resultados de Absorbancia promedio entre muestra y replica, coeficiente de variación, % de Absorbancia, de las concentraciones estándar provistas por el kit de Elisa RIDASCREEN Aflatoxin M1 30/15.....	62
Cuadro N° 16. Absorbancia para las muestras de leche tomadas de la comunidad “Copalacaya” de 4 productores, lectura en espectrofotómetro a 450 nm	64
Cuadro N° 17. Resultados del coeficiente de variación, % de Absorbancia y concentración de Aflatoxinas M1 en ppt, de las muestras analizadas de la comunidad “Copalacaya” de 4 productores	65
Cuadro N° 18. Absorbancia para las muestras de leche tomadas de la comunidad “Canaviri” de 4 productores, lectura en espectrofotómetro a 450 nm.....	66
Cuadro N° 19. Resultados de coeficiente de variación, % de Absorbancia y concentración de aflatoxina M1 en ppt, de las muestras analizadas de 4 productores, comunidad “Canaviri”	67
Cuadro N° 20. Absorbancia para las muestras de leche tomadas de la comunidad “Callisaya” de 4 productores, lectura en espectrofotómetro a 450 nm.....	68
Cuadro N° 21. Resultados de coeficiente de variación, % de Absorbancia y concentración de aflatoxina M1 en ppt, de las muestras analizadas de 4 productores de la comunidad “Callisaya”.....	68

Cuadro N° 22. Absorbancia para la muestra de leche de la Planta Procesadora Estación Experimental Choquenaira y Central de acopio - Delizia lectura en espectrofotómetro a 450 nm 71

Cuadro N° 23. Resultados del coeficiente de variación, % de Absorbancia y concentración de Aflatoxinas M1 en ppt, de las muestras analizadas de la Planta Procesadora Estación Experimental Choquenaira y Central de acopio Delizia..... 72

Cuadro N° 24. Absorbancia para la muestra de leche pasteurizada de la empresas distribuidoras de La Paz (Delizia, Soalpro y Pil), lectura en espectrofotómetro a 450 nm..... 73

Cuadro N° 25. Coeficiente de variación, % de Absorbancia y concentración de aflatoxina M1 en ppt, de las muestras analizadas de las Empresas distribuidoras de La Paz (Delizia, Soalpro y Pil), lectura en espectrofotómetro a 450 nm..... 74

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura N° 1. <i>Aspergillus flavus</i> porción terminal de un conidióforo.....	8
Figura N° 2. Estructura morfológica del genero <i>Aspergillus ssp</i>	9
Figura N°3. Estructura química de las Aflatoxinas.....	10
Figura N°4. Estructura de la Aflatoxina B1.....	12
Figura N° 5. Biotransformación de las Aflatoxinas.....	13
Figura N° 6. Biotransformación de la aflatoxina B1 en aflatoxina M1.....	14
Figura N° 7. Países con y sin reglamentos para las micotoxinas.....	23
Figura N° 8. Área de estudio.....	34
Figura N° 9. Kit RIDASCREEN Aflatoxin.....	39
Figura N° 10. Muestras de forraje recolectadas molidas y pesadas.....	40
Figura N° 11. Dilución de la muestra con metanol 70 % filtrado y extracción de la alícuota para el ensayo.....	40
Figura N° 12. Microplaca del Ensayo.....	41
Figura N° 13. Adición de las muestras procesadas a los pocillos.....	41
Figura N°14. Adición de conjugado enzimático diluido y la solución anticuerpo...	42
Figura N° 15. Lavado de los pocillos con buffer de lavado.....	42
Figura N°16. De adición del sustrato cromógeno.....	42
Figura N° 17. Adición de solución stop.....	43
Figura N° 18. Lectura de las muestras en el espectrofotómetro a 450nm.....	43
Figura N° 19. Centrifugación y procesado de muestras de leche.....	44
Figura N° 20. Microplaca del Ensayo.....	45
Figura N° 21. Adición de las muestras procesadas a los pocillos.....	45

Figura N° 22. Vaciado y lavado de los pocillos.....	45
Figura N° 23. Adición de conjugado Enzimático diluido.....	46
Figura N° 24. Lavado de los pocillos.....	46
Figura N°25. Adición del sustrato cromógeno.....	46
Figura N° 26. Adición de solución.....	47
Figura N° 27. Lectura de las muestras en el espectrofotómetro a 450nm.....	47
Figura N° 28. Curva de calibración de los estándares del kit de Elisa RIDASCREEN Aflatoxin M130/15 para las concentraciones 0,1, 5, 10, 20, 50 ppt.....	49
Figura N° 29. Concentraciones de AFB1 en la comunidad de Choquenaira.....	52
Figura N° 30. Concentraciones de AFB1 en la comunidad de Copalacaya.....	54
Figura N° 31. Concentraciones de AFM1 en la comunidad de Canaviri.....	57
Figura N° 32. Concentraciones de AFB1 en la comunidad de Callisaya.....	60
Figura N° 33. Curva de calibración de los estándares del kit de Elisa RIDASCREEN Aflatoxin M130/15 para las concentraciones 0,5, 10, 20, 40 y 80 ppt.....	63
Figura N° 34. Concentraciones de AFM1 en la comunidad de Copalacaya.....	65
Figura N° 35. Concentraciones de AFM1 en la comunidad de Canaviri.....	67
Figura N° 36. Concentraciones de AFM1 en la comunidad de Callisaya.....	70
Figura N° 37. Concentraciones de AFM1 en la comunidad de Callisaya.....	66
Figura N° 38. Concentraciones de AFM1 de las empresas distribuidoras de la ciudad de La Paz.....	67

RESUMEN

Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos producidos por determinados hongos que se desarrollan en los alimentos, como *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium sp.* La FAO estima que el 25% de los cultivos alimenticios del mundo son afectados por los micotoxinas, y las más importantes son las aflatoxinas.

La aflatoxina B₁ es la micotoxina altamente toxica y esto a su vez deriva en aflatoxina M1 y que se encuentran en la leche y derivados lácteos de hembras lactantes que han consumido forrajes contaminados con B₁.

Muchas de las comunidades existentes en el departamento de La Paz se dedican a la producción lechera, principalmente para su venta a varias empresas acopiadoras y en menor proporción para la venta directa al público.

El consumo de alimentos contaminados con aflatoxinas radica en que son potentes carcinógenos, mutagénicos y teratogénicos, y son grandes agentes destructores del sistema hepático. La más potente es la toxina B₁ mientras que la M1 tiene una potencia diez veces menor. Una de las características más importantes de las aflatoxinas M1 es su termorresistencia.

En la Unión Europea establece una concentración máxima permitida de aflatoxinas B₁ 5ppb, y aflatoxinas M1 de 50 ppt, En cambio FDA establece un máximo de 5 ppb para aflatoxinas B₁ y 500 ppt para aflatoxinas M1.

Los niveles de aflatoxinas B₁ encontrados en las muestras de forraje de las 4 comunidades en estudio resultaron en un 80 % por encima de los valores establecidos por la Unión Europea (2 ppb), sin embargo según la tolerancia máxima permitidos en la FDA de los Estados Unidos (5 ppb), solo una muestra sobrepaso el límite con 7,77 ppb.

En cuanto los niveles de concentración de aflatoxinas M1 en la leche de las 4 comunidades en estudio resultaron en su mayoría negativos, en una gran parte no detectables por el kit Elisa.

ABSTRACT

Mycotoxins are toxic secondary metabolites produced by certain fungi that grow in food such as *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium* sp. FAO estimates that 25% of the world's food crops are affected by mycotoxins, and the most important are the aflatoxins.

The mycotoxin aflatoxin B1 is highly toxic and this in turn leads to aflatoxin M1 and found in milk and dairy products of lactating females who have consumed contaminated feed B1.

Many communities in the department of La Paz are devoted to milk production, primarily for sale to several companies and to a lesser extent foragers for direct sale to the public.

Consumption of food contaminated with aflatoxin is that are potent carcinogenic, mutagenic and teratogenic, and are great destroyers of the hepatic system agents. The stronger the toxin B1 while the M1 has ten times less power. One of the most important characteristics of aflatoxin M1 is its heat resistance.

In the European Union establishes a maximum allowable concentration of aflatoxin B1 5ppb and 50 ppt aflatoxin M1, But FDA sets a maximum of 5 ppb for aflatoxin B1 and 500 ppt for aflatoxin M1.

Levels of aflatoxin B1 found in forage samples of the 4 study communities were 80% above the values set by the European Union (2 ppb), however as the maximum tolerance allowed in the FDA in the United States (5 ppb), only one sample exceeded the limit to 7.77 ppb.

As levels of aflatoxin M1 in the milk of the 4 study communities were mostly negative in a largely non-detectable by the ELISA kit.

1. INTRODUCCION

Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos producidos por determinados hongos que se desarrollan en los alimentos, como *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium sp.* el término micotoxina se estableció por primera vez en 1960, tras la muerte de más de 100.000 pavos por el consumo de harina de cacahuete contaminada con aflatoxina. Hasta el momento, se han descrito alrededor de 300 micotoxinas, de las cuales sólo unas pocas reciben atención especial por su mayor amenaza para la salud humana y animal, (Bennett y Klich, 2003).

Coker (1997), considera que las aflatoxinas, son las toxinas más peligrosas producidas por *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*. La presencia de estos hongos es amplia, antes y después de la cosecha de oleaginosas, frutos secos y cereales en climas templados, tropicales y subtropicales. Se describen cuatro aflatoxinas principales la B₁, B₂, G₁ y G₂, sin embargo la aflatoxina M₁ y M₂ son metabolitos derivados de las aflatoxinas B₁ y B₂, que se encuentran en la leche y derivados lácteos de hembras lactantes que han consumido alimentos contaminados. Algunas características importantes de estas toxinas son su capacidad de bioconcentración, bioacumulación y su gran estabilidad.

La contaminación de los forrajes por la aflatoxina B₁, puede constituir un problema muy grave, cuya causa se debe parcialmente a condiciones inadecuadas de almacenamiento. La Aflatoxina B, es un tipo de toxina que puede encontrarse en alimentos para consumo de ganado lechero, que al entrar al organismo del animal, se transforma en otro tipo de aflatoxina como ser la aflatoxina M₁, la cual es secretada junto con la leche destinada directamente al consumo humano o a la producción de derivados lácteos, hecho que pone en riesgo la salud de la población (Arangure y Arangüelles, 2009).

Muchas de las comunidades en el Departamento de La Paz, se dedican a la producción lechera, principalmente para su venta a varias empresas acopiadoras y en menor proporción para la venta directa al público. En algunas de estas comunidades debido a una inadecuada conservación del alimento para el hato lechero, puede presentarse la contaminación de la leche con Aflatoxina M₁, el

cual puede acarrear problemas en la salud de los consumidores si la concentración de estas micotoxinas es elevada, además es necesario tener en cuenta que la misma no se elimina con procesos tales como la pasteurización y ultrapasteurización (Buitron, 2010).

La presencia de la AFM₁ en la leche representa un peligro para la salud humana, especialmente para niños pequeños quienes son los principales consumidores, por tal razón es necesario monitorear su presencia en este alimento, además de conocer si las concentraciones encontradas representan un peligro para las personas expuestas.

1.1. Justificación

La leche consumida por la mayor parte de la población proviene del ganado vacuno y una de las más importantes, por tanto la exigencia para los productores, es ofrecer alimento de calidad a su ganado, el cual se verá reflejado en la obtención de leche de alta calidad. Además, de ser una fuente de ingresos para muchas familias campesinas dedicadas a este rubro.

La presencia de aflatoxinas en los alimentos puede derivar efectos nocivos de intoxicación aguda (Hemorragias, edema, y daño agudo al hígado) y crónica (Efectos carcinogénicos, teratogénicos, embriotoxigénicos, inhibición de la síntesis de proteínas, pueden actuar como anticoagulante, como también sobre el sistema inmunológico, causando inmunosupresión), para la salud de los consumidores.

Es por eso que el presente trabajo de investigación se realizó con el objetivo de determinar la presencia de aflatoxinas M₁ en la leche y aflatoxinas B₁ en el forraje mismas que fueron recolectadas de las 4 comunidades del área de influencia a la Planta de Transformación de Productos Lácteos de la Estación Experimental de Choquenaira.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

Evaluar la presencia de aflatoxinas M₁ en la leche y aflatoxinas B₁ en el forraje almacenado de 4 comunidades en el área de influencia a la Planta de Transformación de Productos Lácteos de la Estación Experimental de Choquenaira

1.2.2. Objetivos Específicos

Determinar la contaminación con aflatoxina M₁ de las muestras de leche cruda por el método de ELISA mediante el Kit RIDASCREEN® Aflatoxin M₁ 30/15.

Determinar la contaminación con aflatoxina B₁ de las muestras de forraje por el método de ELISA mediante el Kit RIDASCREEN® Aflatoxin B₁ 30/15.

Contrastar los resultados obtenidos con el parámetro máximo de tolerancia para la AFM₁ y AFB₁ aceptada por Instituciones Reguladoras Internacionales.

Analizar la importancia del control de la presencia de aflatoxinas en la leche como materia prima para la elaboración de productos derivados en la industria láctea.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1. La Inocuidad de los Alimentos

La inocuidad de los alimentos utilizados por el hombre es un tema cada vez más importante a nivel mundial. Muchos tipos de contaminantes pueden estar presentes en los alimentos. La calidad de los alimentos depende de las características organolépticas, físicas, nutritivas, apariencia visual y del estado sanitario de los productos.

Lara (2003), indica que en la de inocuidad de los alimentos se deben considerar no solo la contaminación microbiológica y la contaminación química de origen humano, sino también la contaminación por sustancias tóxicas naturales. Dentro de éstas se incluye a las micotoxinas, sustancias que empiezan a ser consideradas de gran importancia en la nutrición humana y animal.

Al respecto Rendón (2007), considera que los hongos del género *Aspergillus* causan el deterioro de muchos productos alimenticios siendo uno de los más importantes *Aspergillus flavus*. Hongos que se encuentran ampliamente distribuidos en el suelo, la vegetación en descomposición y en una amplia variedad de material orgánico. Los cuales pueden contaminar alimentos y cultivos agrícolas a nivel mundial por medio de sus micotoxinas, de las cuales las aflatoxinas son las más importantes y las más peligrosas.

Moreno (2005), reporta que la contaminación de alimentos para uso humano o animal por hongos generadores de Aflatoxinas puede ocurrir tanto en el campo como en el almacenaje y puede afectar a cualquier producto que requiere de secado cuando este no se realiza adecuadamente. Los principales productos que se han identificado contaminados son: cultivos de maní, árbol de la nuez, maíz, trigo, leche y semillas de oleaginosas como el algodón.

2.2. Micotóxicas

El hombre conoce los hongos que crecen en los alimentos desde la antigüedad, y los han utilizado en su propio beneficio como alimento directo, para mejorar alimentos y

especialmente con fines terapéuticos (antibióticos) (Carrillo 2003, citado por Combata y Mildenberg, 2009).

Los hongos unicelulares o levaduras, y los hongos filamentosos pluricelulares o mohos, son en su mayoría aerobios estrictos. Los hongos no sólo disminuyen el valor nutritivo y la palatabilidad de los piensos sino que además algunas especies de mohos presentes en los mismos pueden producir metabolitos secundarios capaces de producir efectos nocivos sobre hombres y animales expuestos a ellas, generalmente a través del consumo de alimentos o piensos contaminados con micotoxinas (Driehuis *et al.*, 2001).

Cuadro 1. Hongos productores y micotoxinas presentes en alimentos

MICOTOXINAS	ALIMENTOS	HONGOS PRODUCTORES
Aflatoxinas B1	Maíz, especias, almendras, pistachos	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i>
Aflatoxina M1	Leche, queso	
Ocratoxina A	Trigo, arroz, regaliz, café, vino	<i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Aspergillus carbonarius</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Penicillium verrucosum</i>
Deoxinivalenol, Toxinas t-2 y HT-2	Trigo, avena, maíz	<i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium culmorum</i> <i>Fusarium sporotrichioides</i> <i>Fusarium poae</i>
Zearalenona	Maíz, trigo	<i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium culmorum</i>
Fumonisin	Maíz	<i>Fusarium verticillioides</i> <i>Fusarium proliferatum</i>
Patulina	Manzana	<i>Penicillium expansum</i>

Fuente: Herrera, sf. Departamento de ciencia, tecnología y Universidad de Aragon

La micotoxinas se clasifica con base en la afectación de un órgano blanco determinado. Siendo las aflatoxinas hepatotóxicas, ocratoxinas A, nefrotóxica, fumonisinas, son neurotóxicas; los tricotecenos son dermonecróticos y la Zearalenona estrogénica. Se consideran micotoxinas inmunosupresoras a las aflatoxinas, Ocratoxina A y algunos tricotecenos.

Al respecto Salazar (2008), considera que las micotóxicas son productos resultantes del metabolismo secundario de los hongos, pueden desencadenar cuadros graves de toxicidad cuando las condiciones medioambientales son favorables para su producción por lo que es muy importante su prevención. Las Micotoxinas más importantes desde el punto de vista agroalimentario son las Aflatoxinas, Fumonisinias, Ocratoxinas A, Patoina, Tricocenteno y Zearalenona. Las especies de los géneros más frecuentes son *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*

Sin embargo Medina *et al.*, (2009), informan que, la contaminación por micotoxinas es un problema de grandes repercusiones, tanto económicas como de salud, humana y animal. El Consejo de Ciencia y Tecnología de los Estados Unidos, calculó que las micotoxinas (aflatoxinas, Fumonisinias y vomitoxina) causan pérdidas económicas de 932 millones de dólares anualmente. Las investigaciones realizadas a partir de 1960 han generado mucha información, no obstante, aun queda pendiente realizar más investigación, a la fecha aún no se conoce el total de micotoxinas, probablemente la cantidad de metabolitos tóxicos puede ser del orden de miles. Por otra parte, el Instituto Internacional de Investigación sobre cáncer ha decretado que las aflatoxinas B1 y M1, ocratoxinas A y Fumonisina B1, son compuestos cancerígenos, considerando que la aflatoxina B1 es el compuesto más tóxico.

2.2.1 Micotoxinas en el Forraje

CAC/RCP (1997), señala que 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.

Rendón (2007), afirma que la producción de forrajes conservados requiere de una adecuada aplicación de las técnicas de cultivo, recolección y almacenamiento. Un manejo inadecuado, entre los que cabe destacar una humedad excesiva en condiciones de aerobiosis, puede dar lugar a la aparición de toxinas producidas por hongos, cuyas especies más peligrosas pueden afectar en forma grave a los animales y al hombre. Estos hongos incluyen especies de *Aspergillus*, *Alternaria*,

Fusarium, *Claviceps* y otros hongos endofíticos que son potencialmente productores de micotoxinas. Son múltiples factores que intervienen en el proceso de proliferación fúngica y de la contaminación con micotoxinas de los forrajes conservados. Los principales factores que se pueden citar son: tipo de suelo, susceptibilidad del cultivo, madurez de los granos en el momento de la cosecha, temperatura y humedad, daños mecánicos o los producidos por insectos y/o pájaros y tipo de almacenamiento.

Cuadro N° 2. Hongos que Producen Micotoxinas de Acuerdo con el Hábitat

HONGOS QUE PRODUCEN MICOTOXINAS DE ACUERDO CON EL HÁBITAT:	ASPERGILLUS FLAVUS FUSARIUM CLAVICEPS PURPUREA GRAMINEARUM
Hongos que se encuentran en las plantas:	Fusarium moniliforme Helminthosporium biseptatum Rhizoctonia leguminicola Sclerotinia sclerotiorum Aspergillus flavus A.clavatus A.ochraceus
Hongos que se encuentran en el almacenaje	Fusarium graminearum A. parasiticus F. moniliforme F. nivale Penicillium expansum P. citrinum P. rubrum

Fuente: Laboratorio de Microbiología UMSA (2007)

2.3. El Agente Causal

2.3.1. Aspergillus

Según Carrillo, (2003), los mohos del género *Aspergillus* causan el deterioro de muchos productos alimenticios. Los productos metabólicos de la invasión fúngica suelen ser muy tóxicos, tanto para el hombre como para algunos animales. También producen la inhibición de la germinación junto con cambios de color, calentamiento, amohosado, apelmazado y finalmente podredumbre de las semillas.

Para Cornejo y Villarroel (2005), *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, 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. Se presentan en climas húmedos y calientes. *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* no pueden crecer o producir aflatoxinas en sustratos con actividad de agua menor de 0.7, humedad relativa menor a 70% y temperaturas por debajo de 10.C. Bajo condiciones de stress 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. En definitiva, el crecimiento de *Aspergillus* y la contaminación de los productos con aflatoxinas son consecuencia de la interacción entre el hongo, el anfitrión y el ambiente.

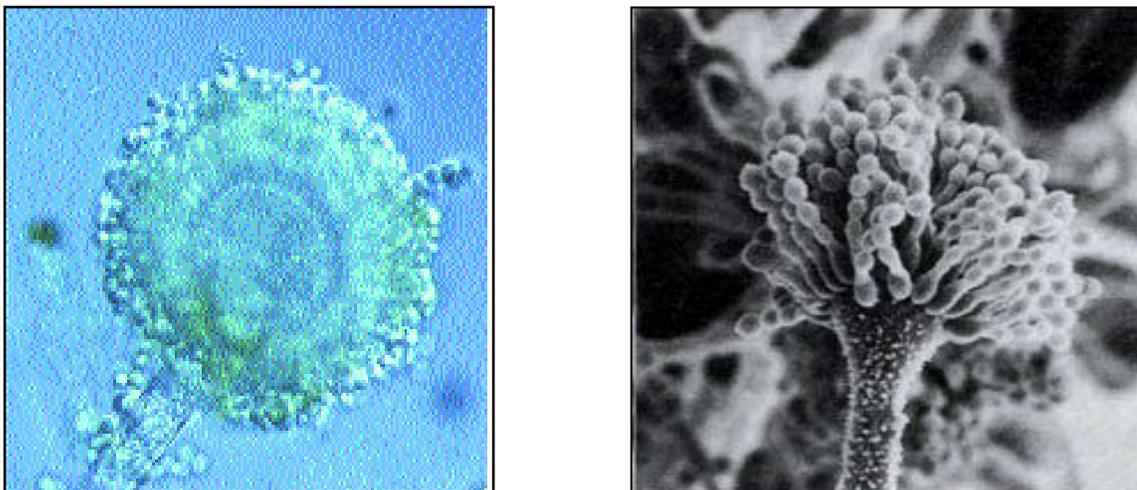


Figura N° 1. *Aspergillus flavus* porción terminal de un conidióforo

Fuente: Departamento de Sanidad Universidad Autónoma de Barcelona (2000)

El stress hídrico, las altas temperaturas y los daños de la planta anfitriona producidos por insectos son factores importantes que determinan la infestación por el hongo y la producción de la toxina. La combinación apropiada de estos factores determina la infestación y la colonización del sustrato, y el tipo y la cantidad de aflatoxina producidos.

2.3.2. Morfología

El color es la principal característica macroscópica para la identificación de los grupos de aspergilos. Poseen distintos tonos de verde, pardo, amarillo, blanco, gris y negro. Las cabezas conidiales presentan bajo el microscopio cuatro formas básicas: globosa, radiada, columnar o claviforme, y a simple vista las más grandes suelen parecer diminutos alfileres sobre el substrato.

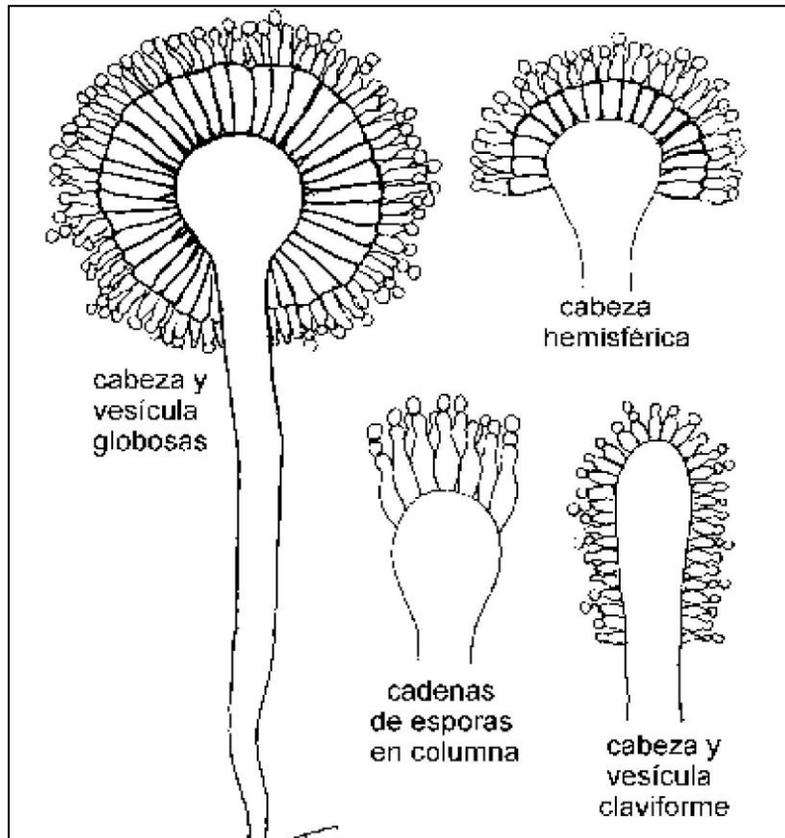


Figura N° 2. Estructura morfológica del genero *Aspergillus* ssp.

Fuente: Carrillo (2009)

En los aspergilos, los conidios constituyen cadenas que se originan en la célula conidiógena o fiálide. En algunos aspergilos hay células adyacentes a las fiálides denominadas métulas o células de soporte. Los *Aspergillus* poseen una o dos series de células sobre la vesícula, o bien presentan simultáneamente cabezas de ambos tipos.

2.4. Aspectos Generales de las Aflatoxinas

La palabra aflatoxina deriva 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).

Hasta el momento han sido identificadas 20 aflatoxinas diferentes, sin embargo únicamente las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ se originan de manera natural en sustratos contaminados por *Aspergillus* aflatoxigénicos. Las demás aflatoxinas (M₁, M₂, P₁, Q₁, aflatoxicol, etc.) ocurren como productos metabólicos de sistemas microbianos o animales (Smith *et al.*, 1991).

Gimeno y Martins (2000), indican que las aflatoxinas al igual que otras micotoxinas son metabolitos secundarios generalmente tóxicos producidos por algunas especies fúngicas.

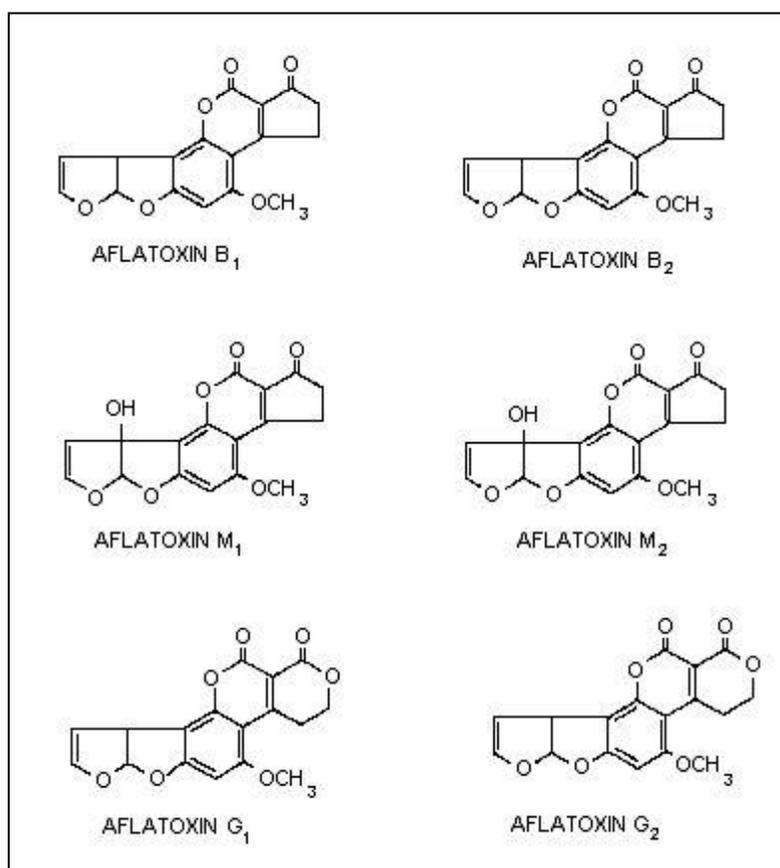


Figura N°3 Estructura química de las Aflatoxinas

Fuente: Wageningen University, the Netherlands (2009)

Las aflatoxinas son producidas esencialmente por *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*. El *Aspergillus* es un mohó que fundamentalmente pertenece a la flora de almacenamiento. En general, la temperatura mínima necesaria para desarrollarse y producir micotoxinas es de 10-12°C. 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 (HESSELTINE, 1976).

Sin embargo Mallmann y Dikin (2007), considera que las aflatoxinas son metabolitos fúngicos secundarios pertenecientes al grupo de las bifuranocumarinas, son formadas por moléculas heterocíclicas, con átomos de oxígeno y anillos de bifurano, que difieren entre sí apenas por pequeñas variaciones en su estructura molecular básica. Son conocidas más de veinte sustancias del grupo de las aflatoxinas, pero las más comunes en los alimentos son las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂.

2.4.1. Aflatoxina B1

Rojas y Wilches (2009), relatan que la aflatoxina B₁, es la más frecuente y tóxica. La nomenclatura hace referencia a sus propiedades físico – químicas, 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. El subíndice 1 indica mayor movilidad cromatografía que el 2. En estado puro son polvos cristalinos que se descomponen al alcanzar el punto de fusión (B1 268-269° C, B2 286-289° C, G1 244-246, G2 237-240, M1 299° C, M2 330° C)

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. Las aflatoxinas M₁ y M₂ son igualmente activas y eso constituye un

riesgo para la salud humana. Estos derivados hidroxilados, pueden estar presentes en leche líquida y en polvo

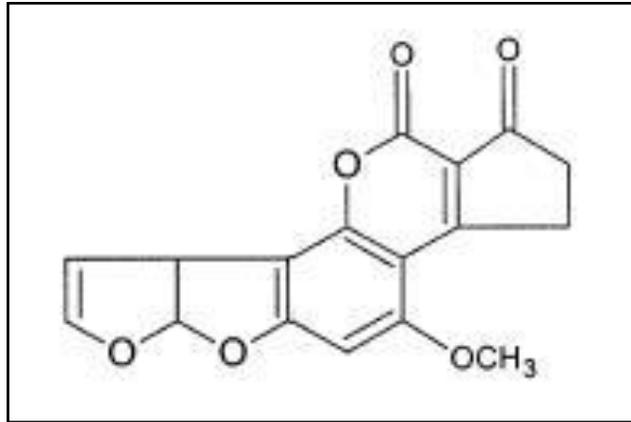


Figura N°4 Estructura de la Aflatoxina B1

Fuente: Denli y Pérez (2006)

2.4.1.1. Biotransformación de Aflatoxina B1

Rodríguez *et al.*, (2006), expresan que la exposición crónica el efecto más drástico se ve en el ADN. Su efecto se puede subdividir en: Carcinogénico, Mutagénico y Teratogénico. La Aflatoxina AFB₁ en el hígado pasa por dos fases:

Fase I: por acción del Complejo Citocromo p-450 monooxigenasa, produciendo derivados reducidos y oxidados que supuestamente no presentan actividad carcinogénica. Pero también produce aflatoxina AFB₁, que es un producto inestable y que forma aducciones con el ADN, el cual conlleva a mutaciones en proto- oncogen y genes supresores de tumores.

Fase II: el compuesto AFBO se conjuga con proteínas o puede sufrir hidroxilación o conjugarse con el glutacón (GSH) en el hígado, y ser excretado en la orina o en las heces como Ácido Mercaptúrico, combinándose con Proteínas a los diferentes tejidos y provocando las diferentes clases de intoxicaciones, además de los efectos carcinogénicos, las aflatoxinas y sus metabolitos pueden afectar cualquier órgano. El órgano blanco principal de las aflatoxinas es el hígado, produciendo hígado grado y

pálido, necrosis moderada y extensiva, hemorragia y otras patologías como alargamiento de la vesícula, daño en el sistema inmune, nervioso y reproductivo.

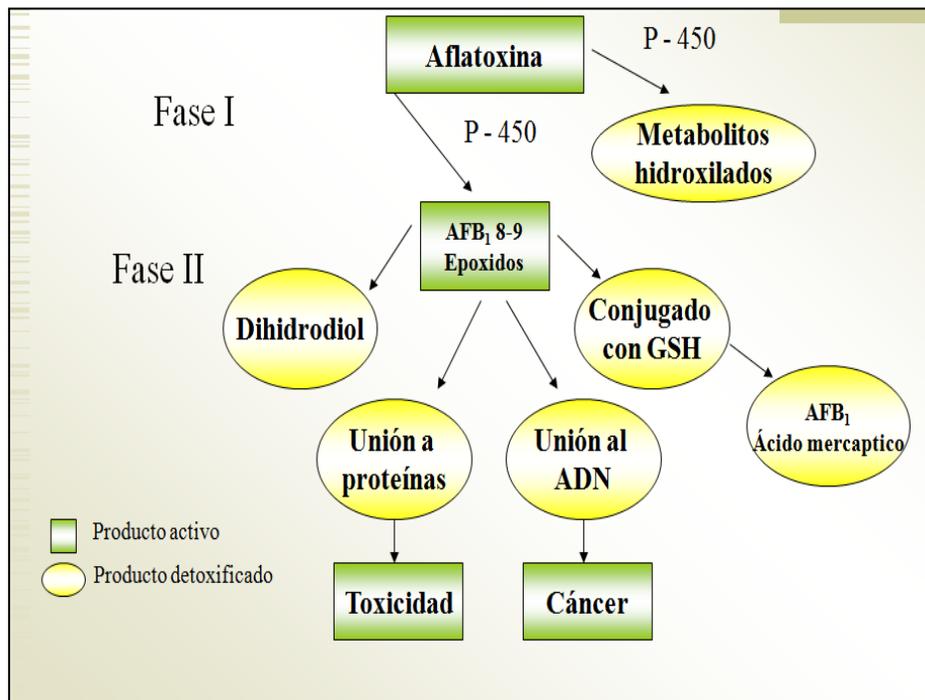


Figura N° 5. Biotransformación de las Aflatoxinas

Fuente: Universidad de Los Andes. Facultad de Farmacia y Bioanálisis (2006)

Williams y Wilson (1999), menciona que por más de 30 años se ha deliberado sobre los riesgos para la salud causados por la presencia de aflatoxinas en la dieta humana y se ha llegado a la conclusión de que existen riesgos causados por la exposición a esta toxina. La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer de la Organización Mundial para la Salud ha determinado que existe suficiente evidencia para clasificar la aflatoxina B1 como probable carcinogénico para humanos. No obstante, debido a que estos compuestos se producen naturalmente, no existe forma de evitarlos. No existe un “nivel sin efecto” que sirva como base para regulaciones gubernamentales al respecto, de modo que todos los países encaran el problema de regular el contenido de aflatoxinas en los alimentos para la venta. Cada país trata este asunto de diferente manera. Es así que, la Unión Europea tiene sus normas, Japón otra, los Estados Unidos otras, Canadá otras y así sucesivamente.

2.4.2. Aflatoxinas M1

Combita (2009), relata que la aflatoxina M1 (AF M1) 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 AF B1 en la dieta (aflatoxinas M, del inglés milk, leche). Debido a esto, es muy importante el control sanitario de los animales productores de carne y de leche. Las aflatoxinas M1 y M2 son metabolitos oxidativos de las aflatoxinas B1 y B2 producidos por los animales tras la ingestión de estas, aparecen en la leche materna (tanto animal como humana), la orina y las heces.

2.4.2.1. Absorción y Transmisión de la Aflatoxina B1 y Biotransformación en Aflatoxina M1 Dentro del Organismo Animal

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. 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.

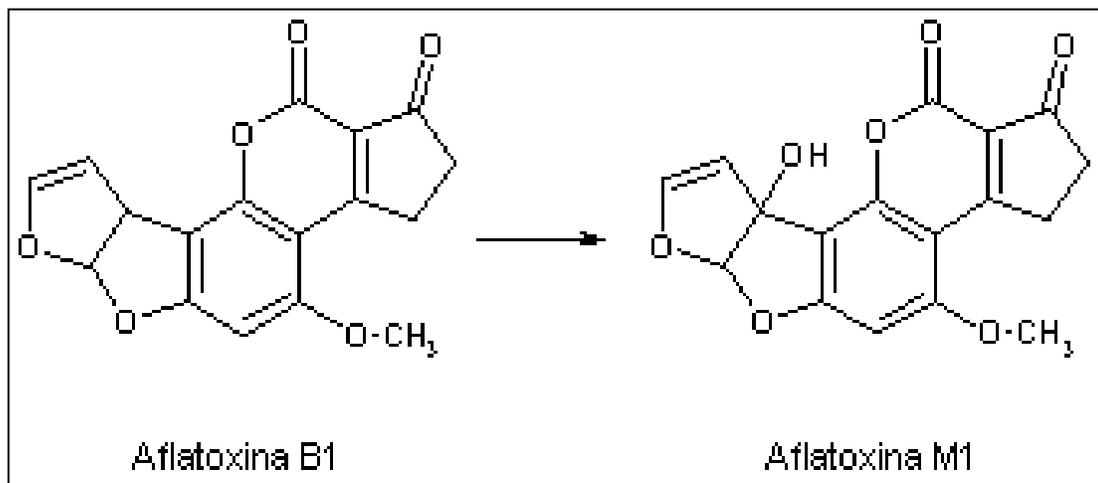


Figura N° 6 Biotransformación de la aflatoxina B1 en aflatoxina M1

Fuente: Universidad Nacional de Salta (2003)

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). El organismo animal produce generalmente esos productos metabólicos 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, 2004).

2.4.3. Estabilidad de las Aflatoxinas

Elika (2007), se refiere a los tratamientos que son comunes en el sector lechero se pueden separar en dos procesos distintos: los que no implican la separación de los componentes de la leche, tales como tratamiento por calor, almacenaje a baja temperatura, y preparación del yogur; y procesos que implican la separación de los componentes de la leche, tales como concentración, secado ,y producción del queso y de mantequilla.

2.4.3.1. Estabilidad de la Aflatoxina M1

Se ha estudiado la estabilidad de la aflatoxina M1 durante el tratamiento por calor, como en la pasteurización y el calentamiento de la leche directamente sobre el fuego a 3'4 h, aunque los resultados de los estudios no son constantes, la mayoría indican que tales tratamientos de calor no cambian la cantidad de la aflatoxina M1 y la estabilidad de la aflatoxina M1 en leche durante el almacenamiento en fresco o congelado dieron resultados, pero el almacenamiento de la leche contaminada congelada y otros productos lácteos por algunos meses no aparecían afectar el contenido de la aflatoxina M1.

Aranguren y Arguelles (2009), consideran que una de las características más importantes de las aflatoxinas M1 es su termorresistencia, sus puntos de fusión están por encima de los 250 °C y resisten a pH de 3 hasta 10 y gracias a su fluorescencia son fácilmente detectadas en el laboratorio.

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 (Gimeno, 2004).

2.4.4. Aflatoxinas en Quesos

Aranguren y Arguelles (2009), aseguran que cuando la aflatoxina B1 (AFB1), es ingerida por la vaca junto con la comida contaminada, por medio de una serie de degradaciones metabólicas se convierte en aflatoxina M1 y esta toxina tiene la capacidad de diseminarse por todo el organismo, pudiéndose encontrar en secreciones como la leche.

Entonces, cuando esta leche contaminada es utilizada como materia prima para la elaboración de quesos, y no se tiene un control riguroso de la calidad de la leche, ni de la salud del animal (proveedor de leche), logra transmitirse fácilmente a los humanos causando intoxicaciones leves a severas, según la concentración ingerida. De esta forma, la presencia de AFM1 en quesos se convierte en un importante problema de salud pública, ya que goza de propiedades teratogénicas, mutagénicas, hepatotóxicas, endocrinosupresoras e inmunosupresoras, siendo los niños y ancianos los principales afectados.

Entre los derivados lácteos, es este quien debe tener una mayor atención, ya que durante su proceso de elaboración, se desarrolla un factor de enriquecimiento exactamente en la etapa de coagulación. La AFM1 aumenta su afinidad por la caseína, lo que conlleva a que las concentraciones de la aflatoxina aumenten 3 a 5 veces más con respecto a los valores presentes en la leche

2.5 Henos

Parsi, et al., relatan que los henos son los forrajes deshidratados naturalmente (curado al sol) o en forma artificial para lograr su conservación y ser usados en momentos de escasez de alimento o de suplementación estratégica. Según su presentación física se denominan fardos o rollos.

El objetivo de la henificación es cosechar el cultivo al estado óptimo de madurez que provea la máxima producción de nutrientes digestibles/ha. El estado de madurez del forraje al corte tiene una gran influencia sobre su calidad. Para obtener un buen heno el contenido de humedad debe ser reducido al 20%, para facilitar el almacenaje sin pérdida de calidad. Otros factores que contribuyen a su calidad son: madurez del cultivo, método de henificación, condiciones climáticas durante la cosecha. Las pérdidas que ocurren son físicas, pérdida de hojas o recuperación incompleta del forraje cosechado.

Otras pérdidas son las causadas por la actividad enzimática y oxidación de los tejidos, cuando la planta se está secando. La lluvia es considerada el factor incontrolable más detrimental. Cuando el forraje se está secando una lluvia puede causar hasta un 40 % de pérdida en la MS, 20 % de N, 30 % de P, etc. El color y la presencia de hojas, presencia de mohos, son características a evaluar previas al análisis de laboratorio.

2.6. La Leche

Palencia (2002), alude que la leche es el primer alimento que el ser humano, así como todas las crías de los mamíferos, recibe desde el inicio de su vida extrauterina, y resulta ser el alimento completo que cubre todas las necesidades nutricionales en la primera etapa de la vida (0-6 meses de edad), siempre y cuando sea la leche de su propia especie, la especie Humana. Sin embargo, a partir de aproximadamente los seis meses de edad, la leche materna se hace insuficiente, como único alimento, para satisfacer los requerimientos nutricionales del lactante, y es necesario complementarla introduciendo gradualmente nuevos alimentos, especialmente de origen vegetal. No se recomienda que los bebés consuman leche de vaca antes del año de edad, en primer lugar, por ser considerado un alimento sumamente alergénico y difícil de tolerar, y en segundo lugar por su pobreza en hierro.

No obstante la leche de vaca es la más consumida, a pesar de que la leche de vaca difiere muchísimo de la leche de mujer. La composición de la leche de vaca es ideal para los terneros, pero no para los humanos. Por eso, en las fórmulas lácteas para alimentación infantil, se modifica la composición de la leche de vaca, con el fin de

asemejarla a la de la leche humana. La leche humana es la más pobre en proteínas y calcio de todas las leches. Sin embargo, es la más rica en ácidos grasos monoinsaturados (como el oleico) y poliinsaturados (como el linoleico), necesarios para el desarrollo del cerebro humano.

Cuadro N° 3. Composición promedio de la leche de algunas especies de mamíferos (por 100 g)

COMPONENTES	ESPECIE			
	Humana	Vaca	Cabra	Oveja
Agua (g)	87,5	87,2	87,0	80,7
Sólidos totales (g)	12,5	12,8	13,0	19,3
Proteínas (g)	1,0	3,3	3,6	6,0
Grasas (g)	4,4	4,0	4,1	7,4
Hidratos de Carbono (g)	6,9	4,7	4,4	5,0
Cenizas (g)	0,2	0,7	0,9	0,9
Calcio (mg)	32,2	119,0	133,0	193,0
Colesterol (mg)	13,9	13,6	11,4	27,0

Fuente: Pamplona (1999), Hernández y Sastre (1999).

En cambio, la leche de vaca contiene más del triple de proteínas y de calcio que la leche humana, aunque menos grasas e hidratos de carbono. Sus glóbulos de grasa son muy grandes, y tienden a flotar formando la nata. Esto hace que la digestión de la leche de vaca en su estado natural sea más lenta que la de otros mamíferos. La homogeneización de la leche disminuye un poco este inconveniente.

2.6.1. Contaminantes en la Leche

Al respecto González y Juan (2010), afirman que las cualidades nutritivas de la leche y sus derivados la sitúan entre los alimentos básicos por excelencia. Su consumo no está exento de riesgos para el consumidor ya que puede alterarse en cada uno de los múltiples pasos que van desde su secreción hasta su consumo. Los principales riesgos son microbiológicos y químicos numerosas sustancias pasan de la vaca a la

leche, y suponen una amenaza para la salud humana. Entre ellas cabe destacar las siguientes:

El elevado valor nutritivo de la leche, la hace un medio muy apropiado para el desarrollo de microorganismos. Se trata de un factor que se debe tener en cuenta desde tres puntos de vista:

1. Tecnológico. Desde este punto de vista es interesante que la leche, cuando llega a la central lechera, lo haga en condiciones adecuadas para la elaboración de los productos lácteos.

2. Económico. Este factor afecta al productor ya que si produce leches con mala calidad microbiana éstas serán rechazadas en la central lechera.

3. Sanitario. En este punto es donde está el factor importante ya que la leche en mal estado puede constituir un vehículo de transmisión de enfermedades zoonóticas causadas por los microorganismos patógenos o sus toxinas, siendo las vacas o los ordeñadores y personas que manipulan la leche la fuente de contaminación más importante. En otras ocasiones la contaminación viene producida por falta de higiene, poca limpieza de las vacas, del medio ambiente, de los sistemas de ordeño, conducciones de leche, ollas o sistemas de refrigeración.

Enfermedades, las más destacables que pueden afectar a las personas por consumo de leche en mal estado se encuentran:

"*Salmonella enteritidis*", "*Salmonella typhimurium*" y "*Salmonella enteritidis*", que pueden provocar gastroenteritis agudas. En los dos primeros el modo de infección es por heces de vaca o ubres enfermas o por protados humano; mientras que en el último caso es por heces de vacas enfermas.

"*Salmonella typhi*" puede provocar fiebre tifoidea, "*Salmonella paratyphi*" provoca la fiebre paratifoidea. En ambos casos el modo de infección puede ser por manos sucias del portador o enfermo de tifus o bien por suministro de agua contaminada.

"*Mycobacterium tuberculosis*" es el microorganismo implicado en la tuberculosis y, en este caso, la infección puede llegar a través de ubres infectadas o por heces de vacas.

"*Brucella abortus*" puede provocar fiebre ondulante y "*Corynebacterium diphtheriae*" la difteria. En estos dos últimos casos el modo de infección es por ubres infectadas o medio ambiente contaminado.

"*Staphylococcus aureus*" puede provocar en los humanos gastroenteritis por toxina, y la infección puede derivar de ubres infectadas o bien a través de portador humano.

Cuadro N° 4. Contaminantes de la Leche y Derivados

PRODUCTO	CONTAMINANTES
Leche	Residuos de medicamentos veterinarios. Ej.: antibióticos. Productos antiparasitarios Desinfectantes y detergentes Productos fitosanitarios o pesticidas (Comp. Hidrocarburos orgánicos altamente clorados, liposolubles) Otros Hidrocarburos clorados (Bifenilos policlorados, Dibenzodioxinas policloradas, Dibenzofuranos policlorados) Metales pesados (Pb, Cd, Hg) Micotoxinas (aflatoxinas) Somatotropina bovina Sustancias radioactivas (I-131, Ce-134, Ce-137, Sr-90)
Queso	Conservantes. Ej.: formaldehido (hexametilentetramina o E239), nitrato potásico. Antibióticos (Natamicina) Colorantes de parafinas o ceras de revestimiento Fosfatos Micotoxinas (de los mohos de maduración aflatoxinas M1) Aminoácidos biógenos Aditivos (espesantes, aromas)

Fuente: González y Juan (2010)

2.6.2. Presencia de Aflatoxinas en Leche y Productos Lácteos

Para Ellis (1991) citado por Combata (2009), la leche y sus derivados constituyen el principal grupo de alimentos de origen animal susceptibles de contaminación por aflatoxinas. La presencia de estas sustancias en dichos productos puede ser el resultado de dos formas de contaminación.

a. Directa: debida al crecimiento en el producto de hongos aflatoxigénicos y producción de toxinas sobre la leche. Las aflatoxinas que se detectan en su mayoría en este tipo de contaminación son: AFB1, AFG1, AFB2, AFG2, de entre las cuales la más importante, como se ha mencionado anteriormente es la AFB1

b. Indirecta: derivada del consumo por parte de animales en periodo de lactación de alimentos contaminados con aflatoxinas, lo que da a lugar la aparición en la leche de estos animales diversos metabolitos tóxicos. Este es principalmente el caso de la contaminación de leche y sus derivados con AFM1, pudiendo aparecer, aunque en menores cantidades, AFM2, AFGM1, AFGM2, AFB1 y AFM1.

Reyes, (sf.) afirma que la leche puede contener aflatoxina M1, procedente de animales que hayan consumido alimentos contaminados, granos principalmente, por algunas cepas de *Aspergillus flavus* o *A. parasiticus*, productoras de aflatoxina B1. La aflatoxina M1 se detecta en la leche del animal de 12 a 24 horas después de la ingestión de aflatoxina B1, alcanzando los niveles más elevados a los 2 ó 3 días, y disminuye hasta desaparecer totalmente 4 ó 5 días después de su consumo.

El nivel de aflatoxina M1 encontrado en la leche es proporcional a la cantidad de aflatoxina B1 que ha sido consumido por el ganado a través de la ración. La legislación de la Unión Europea y la FAO establece para raciones y suplementos destinados al ganado bovino, ovino y caprino lechero una concentración máxima permitida de 5 µg de aflatoxina B1 por kg de alimento con una humedad del 12%. En este sentido, la normatividad internacional establece como límite máximo de 0,05 µg de aflatoxina M1 por kg de leche. Para asegurar que la aflatoxina M1 no supere ese nivel en la leche, hay que prestar atención a los residuos de aflatoxina B1 presentes en la ración diaria de las vacas lecheras lactantes.

Para evitar la presencia de estas sustancias en la leche es necesario considerar las recomendaciones descritas en los códigos Codex Alimentarius CAC/RCP 45-1997, Código de prácticas para reducir la aflatoxina B1 presente en las materias primas y los piensos suplementarios para animales productores de leche, y CAC/RCP 57-2004, Código de prácticas de higiene para la leche y los productos lácteos.

2.7. Métodos de detoxificación de AFM1 en leche

Para disminuir la concentración inicial de AFM1 en la leche, se han realizado varios experimentos en donde se encuentra que cuando la leche es calentada a 64 °C por 30 min., entre 64 y 100 ° de 15 a 20 min, o a calentamientos directos de la leche durante 3-4 horas y algunos procesos de pasteurización; se evidenció que la concentración de la aflatoxina prácticamente se ve inalterada, teniendo la capacidad de residir en derivados lácteos.

Con otros tipos de calentamientos entre 71 y 120 °C por 30 min., se ha reducido la AFM1 entre un 12-35% y con otros procesos de pasteurización como la ultrapasteurización, esterilización, evaporación, secado Roller y Spray, se ha conseguido disminuir la contaminación de AFM1 del orden de 32 a 86%.

Consecuentemente con lo anterior, la principal herramienta es la inactivación por calor, en la que se utilizan temperaturas superiores a 150 °C y debe presentarse, disponibilidad suficiente de agua, ya que esta es una herramienta para abrir el anillo de la AFM1, con el fin de convertirlo en un ácido carboxílico terminal que por efecto de la temperatura se descarboxilará.

Otro método, aplicado en leches, es la radiación UV, esta actúa sobre el doble enlace del anillo furánico, siendo capaz de disminuir la concentración entre un 3,6 y un 100% dependiendo del tiempo de exposición de la leche y el volumen tratado. También se utilizan métodos químicos como la exposición de la leche a bisulfato potásico al 0.4% a 25 °C durante 5 horas, presentándose una disminución en la concentración de AFM1 de hasta un 45%. Sin embargo hoy el uso de estos métodos está restringido debido al alto costo de los materiales, a la toxicidad de los mismos y a la caída nutricional de los alimentos tratados. Entonces se han planteado otro tipo de estrategias de tipo biológico, como utilizar bacterias ácido lácticas y bifidobacterias para reducir la disponibilidad de la aflatoxina a nivel gastrointestinal (Aranguren y Arguelles 2009).

HT-2; las fumonisinas B1, B2, y B3; el ácido agárico; los alcaloides del ergot; la ocratoxina A; la patulina; las fomopsinas; la esterigmatocistina y la zearalenona). Con los años el número de países que reglamentan las micotoxinas ha aumentado. Comparando la situación en 1995 con la del año 2003, resulta que en este último año hay más micotoxinas reglamentadas en más productos básicos y en otros productos en tanto que los límites tolerables permanecen generalmente en los mismos valores o tienden a disminuir. Los reglamentos son más variados y detallados, con nuevos requisitos relativos a los procedimientos oficiales de muestreo y a las metodologías analíticas. Al mismo tiempo, se han armonizado o se encuentran en alguna etapa de armonización varios reglamentos entre países integrantes de comunidades económicas (Australia/Nueva Zelandia, UE, MERCOSUR).

La Comisión del Codex Alimentarius de la FAO/OMS cuenta con un comité experto en aditivos de los alimentos, que también tiene a su cargo la contaminación por aflatoxinas. Este comité evaluó el tema de la influencia de las aflatoxinas en una reunión realizada en junio de 1997, en ésta, se llegó a la conclusión de que las aflatoxinas deben tratarse como contaminantes carcinogénicos y que su consumo debe ser lo más bajo posible. Recientemente, el Gobierno de Bolivia expresó su preocupación a la Organización Mundial de Comercio, con respecto a las regulaciones de la UE y sus efectos sobre el comercio.

Las conclusiones sobre los riesgos de cáncer que se presentan en el informe del Codex indican que la disminución del contenido permisible de aflatoxinas en alimentos de 20 a 10 ppb, no tendría un efecto mensurable en cuanto a la incidencia de riesgo de cáncer del hígado en Europa. Esta conclusión se basó en el bajo consumo de aflatoxinas de la dieta promedio europea.

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 (SMITH, 1982 y SHARMA, 1993).

2.8.1. Legislación Aplicable

Elika (2007), comenta que los contenidos máximos de Aflatoxinas en alimentación humana se rigen según el Reglamento 466/2001 de la Comisión, de 8 de Marzo, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en productos alimenticios y sus posteriores modificaciones.

Respecto a la leche, tanto leche cruda como leche para la fabricación de productos lácteos y leche tratada térmicamente, el contenido máximo en Aflatoxina M1 se fija en 0,05 µg/kg. En lo que respecta a la alimentación animal, la directiva 2002/32/CE, de 7 de mayo, incorporada al ordenamiento jurídico estatal a través del Real Decreto 465/2003, de 25 de Abril, cuyo anexo fue posteriormente modificado por la Orden PRE/1422/2004, de 20 de mayo, establece las sustancias y productos indeseables en la alimentación animal. Actualmente solo se contemplan límites máximos para la Aflatoxina B1 tanto para materias primas de alimentación animal como para piensos. Para alimentación de ganado vacuno lechero se fija el límite de 0,005 mg/kg de Aflatoxina B1 y para todas las materias primas 0,02 mg/kg.

Por otro lado, la Recomendación de la Comisión de 2 de marzo de 2005 (2005/187/CE), relativa a los programas coordinados de controles en el ámbito de la alimentación animal para el año 2005, recomienda vigilar la frecuencia de aparición y la concentración de las siguientes micotoxinas en piensos y materias primas: Aflatoxina B1, Deoxinivalenol, Ocratoxina A, Zearalenona y Fumonisinias.

La exposición a las aflatoxinas es difícil de evitar porque no es sencillo prevenir el crecimiento fúngico en los granos y otros productos. Los límites a la concentración de aflatoxinas para proteger la salud humana y animal, establecidos por distintos países e instituciones son variables. Por ejemplo, Canadá aceptó el límite de 50 ng de aflatoxina M1/L de leche, propuesto por la Comisión Codex sobre Contaminantes y Aditivos Alimentarios (FAO-WHO) pero no Brasil, pues sufriría un gran impacto económico si se aplicara en ese país. Un ng/kg de peso corporal/día de aflatoxina B1 o aun menos, contribuye al riesgo de contraer cáncer hepático.

La Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de Estados Unidos estableció como límites máximos la concentración de 20 ng/kg para granos y otros

forrajes destinados a la crianza animal y vacas lecheras, 100 ng/kg para granos destinados al ganado y cerdos reproductores así como gallinas ponedoras, 200 ng/kg para granos empleados en el engorde de cerdos y 300 ng/kg para los destinados al engorde en criaderos.

El uso de un nivel máximo de contaminación reduce la ingesta promedio de toxinas por la población, aunque la aplicación de un límite de 20 ng de aflatoxinas/kg resulta en el rechazo de un 4% de las muestras con un nivel de 0,9 ng/kg, mientras que un límite de 10 ng/kg impide la aceptación del 6,2% de las muestras con valores entre 0,3 y 0,6 ng/kg. Si todos los lotes con una contaminación superior a 20 ng/kg se eliminaran de la dieta “europea”, la ingesta diaria estimada promedio sería 19 ng/persona por día, mientras que con una dieta “oriental” sería 125 ng/persona por día (Rendón, 2007).

2.8.2 Normativa Vigentes para Aflatoxinas M1

Aranguren y Arguelles (2009), por su parte indican que la leche goza de una clara reglamentación. En la UE se establece que para la leche cruda, leche destinada a la fabricación de productos a base de leche y leche de consumo tratada térmicamente, la concentración máxima permitida de aflatoxinas M1 es de 50 ppt, y en caso de preparados para lactantes se permite máximo de 25ppt.

El FDA (Food and Drug Administration) en cambio establece que la concentración máxima permitida de aflatoxinas M1 en leche entera, semidescremada y descremada es de 500 ppt, normas adoptadas por algunos países de América Latina (Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay).

Las normas en Colombia, la NTC 3581 es la encargada de regular la concentración de AFM1 en la leche, estipulando una concentración máxima de 400 ppt.

2.9. Métodos de Análisis de Cuantificación para Aflatoxina M1 en la Leche

Desde el descubrimiento de las aflatoxinas y de sus propiedades tóxicas se han realizado muchas investigaciones sobre el desarrollo de métodos para el análisis de estas sustancias. Estos métodos son necesarios para el establecimiento de programas adecuados de control de alimentos, así como para la investigación sobre

aspectos relacionados con las aflatoxinas tales como su producción por los hongos aflatoxigénicos o el metabolismo de estas sustancias en los animales (Duarte 2004).

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

Independientemente del método de análisis empleado, la determinación específica del nivel de aflatoxinas en un alimento implica generalmente: la recogida de una muestra representativa, la homogenización de la misma, la separación de una cantidad más pequeña a partir de la muestra original y el análisis posterior. El muestreo es un aspecto muy importante a la hora de realizar una valoración de la cantidad de aflatoxinas presentes en un alimento ya que puede ser fuente de un alto porcentaje de error. En este sentido, hay que tener en cuenta que la distribución de las aflatoxinas en los alimentos no suele ser homogénea, salvo en el caso de productos líquidos. Además, el nivel de aflatoxinas en un alimento puede variar en función de cuando se realice el muestreo. También influye el tamaño de la muestra ya que esta debe ser representativa y suficiente para realizar el análisis (en el caso de alimentos líquidos suelen precisarse cantidades menores) (Stoloff, 1991, citado por Combita y Mildenberg, 2009).

Los métodos analíticos para aflatoxina M1 se pueden dividir en dos grupos principales: métodos de screening y métodos analíticos cuantitativos. El screening utiliza principalmente ELISA (enzimo-inmuno análisis) o el radioinmunoanálisis raramente utilizado. La cuantificación implica generalmente la cromatografía de capa fina o la cromatografía líquida del alta performance (HPLC). Las columnas de Inmunoafinidad (IAC) para purificación fueron introducidas, y la combinación de IAC con HPLC ahora ofrece el mejor método en lo que respecta a sensibilidad y confiabilidad para la detección de aflatoxina M1. (Romer labs, 2007, citado por Combita y Mildenberg, 2009).

2.9.1. Técnica de Elisa.

Un grupo de técnicas que se vienen desarrollando desde los años ochenta para el análisis de aflatoxinas son las técnicas inmunológicas, basadas en los

procedimientos de enzimoanálisis (ELISA) para la detección y cuantificación
Combita (2009),

El ELISA se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmunoabsorbente) la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro (Chu, 1991, citado por Combita y Mildenberg, 2009).

Las técnicas analíticas para la detección de micotoxinas están en continuo desarrollo, existen kits ELISA comerciales de análisis basados en la técnica enzimoanálisis competitivo. El principio básico de estos kits como se nombro anteriormente se basa en la afinidad de las aflatoxinas por anticuerpos específicos fijados a un soporte o microplaca. La reacción de competición entre la aflatoxina y un producto enzimo/conjugado (coloreado) que contiene el kit indica la ausencia de aflatoxina cuando el resultado de la prueba es una señal coloreada, y presencia de las mismas en caso de ausencia de color. Estas técnicas permiten el control de las aflatoxinas in situ, de un modo rápido, fiable y sencillo (Biopharm 2011).

Los diferentes tipos de ELISA son los que se enumeran a continuación:

Anticuerpos marcados:

ELISA Directo

ELISA Indirecto

ELISA sándwich

Antígeno marcado:

ELISA competitivo (Biopharm 2011)

2.9.2. RIDASCREEN Aflatoxin M130/15.

Es un inmunoensayo enzimático competitivo para el análisis cuantitativo de aflatoxina M1 en leche. La base del ensayo es la reacción antígeno-anticuerpo. Los pocillos de la microplaca están sensibilizados con anticuerpos específicos dirigidos contra Aflatoxina M1. Se agregan los estándares de Aflatoxina M1 o las soluciones de muestras y, luego de un paso de lavado, se agrega el conjugado enzimático. La Aflatoxina M1 libre y el conjugado Aflatoxina M1- enzima compiten por los sitios de unión de los anticuerpos anti-Aflatoxina M1 (inmunoensayo enzimático competitivo); cualquier conjugado enzimático no unido se remueve en el paso de lavado. Se agrega el sustrato/cromógeno a los pozos y se incuba. El conjugado enzimático unido convierte al cromógeno incoloro en un producto azul. La adición de la solución stop lleva a un cambio de color del azul al amarillo. La medición se hace fotométricamente a 450 nm y la absorbancia es inversamente proporcional a la concentración de Aflatoxina M1 en la muestra (Biopharm, 2011).

Desempeño de la prueba.

- Precisión los resultados son comparables a resultados publicados en HPLC.
- Alta sensibilidad el límite de detección para leche fresca es de 5 ppt.
- Repetibilidad se obtienen resultados consistentes en pruebas inter e intra laboratorios.
- Reacción cruzada Aflatoxina M1: 100%
- Alta recuperación para leche fresca: 95%. (Biopharm 2011).

Beneficios.

- Buen rango de cuantificación cubre los estrictos niveles de regulación de la Unión Europea.
- Costo/ beneficio: Tiene 96 pocillos que se pueden separar, haciendo más eficiente el uso del kit. Estable tiempo de caducidad es de 9 meses.
- Se tienen hasta 15 min para la lectura después de parar la reacción. (Biopharm 2011).

El formato de pocillos de microtitulación en el sistema ELISA se adapta al análisis en serie de gran número de muestras. Esto permite economizar gastos. ELISA permite la inclusión de controles positivos durante el análisis.

Esto no ocurre en el sistema de la Columna de Inmuno Afinidad. La única forma de asegurarse que el sistema está siendo efectivo es mediante algún tipo de control concomitante. El formato de pozo de titulación permite el uso de controles, lo que asegura el buen funcionamiento del ensayo (Biopharm, 2011)

2.9.3. Cromatografía de capa fina.

Es un método de multidetección por el que pueden determinarse la mayoría de las micotoxinas de interés. La extracción de las micotoxinas se realiza en un único disolvente, utilizando posteriormente disolventes de desarrollo específicos y reacciones de identificación selectivas para cada una de las micotoxinas. Mediante este método de multidetección se pueden cuantificar, entre otras, las siguientes micotoxinas: Aflatoxinas, Ocratoxina A, Citrinina, Zearalenona, Patulina (Carrillo, 2003).

Otro método empleado en el análisis de aflatoxinas es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección por fluorescencia. En este caso se emplea una columna de fase inversa (C18), seguida de la separación de una reacción de derivatización para proveer a la aflatoxina de la fluorescencia necesaria para poder cuantificarse. 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).

2.9.4. Columna de Inmuno Afinidad.

El principio se basa en extraer la aflatoxina M1 haciendo pasar la porción a analizar a través de una columna de inmunoafinidad. La columna contiene anticuerpos específicos ligados a un soporte sólido. A medida que la muestra pasa a través de la columna, los anticuerpos se unen selectivamente con la aflatoxina M1 (antígeno) formando un complejo antígeno-anticuerpo. Los demás componentes de la matriz de la muestra se lavan de la columna con agua. La aflatoxina M1 es luego eluída de la

columna, colectando el eluato. La cantidad de aflatoxina M1 presente en este eluato se determina por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con detección fluorométrica (ICONTEC, 2003).

2.10. Exposición humana a aflatoxinas

Para Arango (sf.), se ha encontrado contaminación por aflatoxinas en productos como el cacahuete, semilla de algodón, semilla de girasol, coco, aceite de oliva, maíz, sorgo, arroz, trigo, cebada, millo, avena, pistachos, nuez del Brasil, almendras, nuez moscada e higos. Estas micotoxinas pueden producir dos tipos de intoxicación: aguda y crónica.

2.10.1. La exposición aguda

Está más relacionada con el consumo de altos niveles de aflatoxinas sobre períodos relativamente cortos (días). La intoxicación aguda se manifiesta por vómito, dolor abdominal, edema pulmonar, infiltración grasa y necrosis del hígado. El estado nutricional es importante en la expresión de esta toxicidad; una dieta baja en lípidos hace más vulnerable el hígado a las aflatoxinas lo mismo que las dietas deficientes en proteínas; al contrario, hígado con gran cantidad de ácidos grasos insaturados no es afectado por estas toxinas.

2.10.2. Sobre la intoxicación crónica

Por aflatoxinas, principalmente la B1 que es ante todo un potente carcinogénico, la importancia se centra en los efectos que se producen por la exposición por períodos largos de tiempo y a bajas concentraciones. En estos momentos, la Aflatoxina B1 es considerada por la Agencia Internacional para la Investigación del cáncer (IARC) como evidente cancerígeno en animales de experimentación y también ha sido clasificada como cancerígeno humano. La aflatoxina M1 se encuentra clasificada como posible cancerígeno

Cuadro N° 5. Micotoxicosis según Agencia Internacional para la Investigación del cáncer (IARC)

MICOTOXINAS	EFFECTOS TÓXICOS
Aflatoxina B1	(IARC Grupo 1) Carcinógeno, hepatotóxico, inmunosupresor
Aflatoxina M1	(IARC Grupo 2B) Posible carcinógeno
Ocratoxina A	(IARC Grupo 2B) Posible carcinógeno, neurotóxico, teratógeno, inmunosupresor
Fumonisina B1	(IARC Grupo 2B) Posible carcinógeno, neurotóxico, citotóxico
Patulina	(IARC Grupo 3) Inmunosupresor
Toxinas T-2 y HT-2	(IARC Grupo 3) Dermatológico, hemorrágico, Inmunosupresor
Zearalenona	(IARC Grupo 3) Estrogénica

Fuente: Gobierno de Aragón Departamento de Ciencia Agricultura y Universidad (2009)

2.11. Impacto Económico por Aflatoxinas

El impacto económico de la contaminación de los alimentos por aflatoxinas deriva directamente de las pérdidas de las cosechas y del ganado e indirectamente del costo de los programas diseñados para reducir riesgos a la salud animal y humana. La FAO estima que el 25% de los cultivos alimenticios del mundo son afectados por los micotoxinas, de las cuales las más importantes son las aflatoxinas.

Las pérdidas de los productores de ganado y de aves de corral incluyen la muerte y también efectos más sutiles como la supresión del sistema inmune, tasas de crecimiento reducidas y pérdidas en eficacia de la alimentación. Otros efectos económicos adversos incluyen producciones más bajas de alimentos y fibras (Cornejo y Villarroel, 2005).

Como es de suponerse, en casi todos los países del mundo los efectos toxicológicos descritos anteriormente tanto en humanos como en animales no tendrían mayor repercusión en la sociedad si no se viera afectado un factor clave: el económico. La agricultura y la ganadería son dos áreas seriamente afectadas por la presencia de las aflatoxinas. Por ejemplo en la ganadería, un animal enfermo es un animal desnutrido, normalmente bajo de peso y talla, con baja producción lechera,

inapetente, con baja capacidad reproductora; lo mismo en avicultura, las aves contaminadas producen menos huevos o huevos contaminados, lo que repercute en la producción. También la pérdida económica se puede ver indirectamente afectada por la inasistencia laboral o la baja producción de los intoxicados y el pago de hospitalización y medicamentos. Es interesante que las pruebas para cuantificar aflatoxinas en Colombia no se hacen de rutina para los humanos, mientras que estas pruebas se consiguen con cierta facilidad para el control de los alimentos animales (Santos, 2000).

2.12. Control

Teniendo en cuenta que la eliminación de la AFM1 en la leche es un proceso complejo que no garantiza la eliminación completa de la toxina en muchos casos, la solución entonces debe estar planteada hacia la eliminación de la AFB1. Esto conlleva a aplicar medidas preventivas durante todas las etapas de producción del alimento del ganado desde la etapa inicial del cultivo, pasando por la etapa de cosecha, continuando con el almacenamiento y transporte hasta culminar con la distribución. También se puede implementar métodos de detoxificación, como la desactivación térmica por medio del tostado del alimento, la irradiación por rayos gama o UV, la adsorción con carbono activado o aluminosilicatos, o el tratamiento químico con NH₃ (Aranguren y Arguelles, 2009).

Incuestionablemente, la prevención del crecimiento del hongo y la toxina es la mejor arma para combatir la presencia de las micotoxinas, principalmente con el buen manejo de las condiciones de almacenamiento tales como humedad y temperatura. Hay que almacenar los granos o sustratos con muy baja humedad, sin contacto con el exterior, y ojalá en sitios donde se mantenga a temperatura baja. Otros aspectos que también influyen son el manejo apropiado de los productos agrícolas en la recolección y el transporte, el almacenamiento de material en buenas condiciones, control con fungicidas y otros más drásticos, como la irradiación Santos (2002).

3. LOCALIZACION

El área de estudio, comprendió a cuatro comunidades como ser: Choquenaira, Copalacaya, Canaviri y Calisaya, incluida la Estación Experimental de las cuales se tomaron las muestras correspondientes.

3.1. Ubicación Geográfica

La zona de estudio se encuentra entre los $16^{\circ}41'35.58''$ Latitud Sur, $68^{\circ}17'14.41''$ Longitud Oeste. A una altura de 3853 msnm perteneciente a la provincia Ingavi del departamento de La Paz.

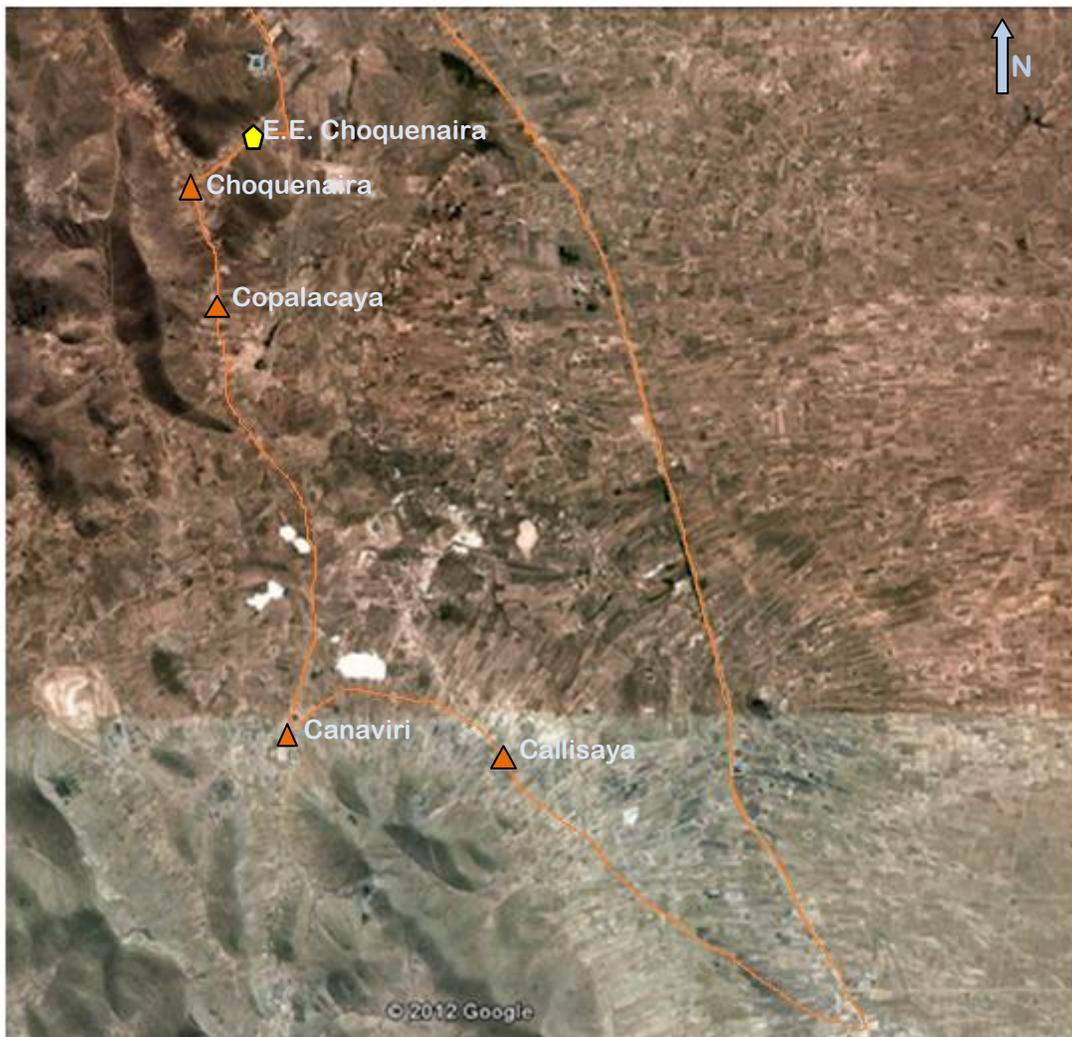


Figura N° 8. Área de estudio

Fuente: www.google.com/earth/index.html (2012)

3.2. Aspectos Fisiográficos y Climáticos

3.2.1. Fisiografía

Los rasgos fisiográficos propios diferencian con marcada claridad las zonas aptas para la productividad agrícola la vegetación corresponde a Bosque Húmedo Montano Subtropical, donde la vegetación primaria dominante son las plantas xerofíticas y mesofíticas; las especies más representativas que componen la comunidad vegetal son de tipo herbáceos, arbustos y anuales.

Las plantas que predominan en las praderas nativas son las gramíneas y la condición de las mismas van de regular a pobre, producto del uso irracional de los sitios, principalmente está relacionado con el sobre pastoreo de vacunos y ovinos. Su topografía en general es ondulada y quebrada, presentando importantes tierras de pendientes suaves.

3.2.2. Clima

Las condiciones climatológicas son duras (frio intenso, vientos fuertes) con una temperatura promedio en las comunidades que oscila entre 15.5 °C en verano y 4 °C en invierno. Las precipitaciones pluviales tienen un promedio de 621 mm con zonas propensas a inundaciones.

3.2.3. Vegetación

La superficie del suelo con que cuenta la zona no es abundante en especies de flora, no obstante existen las siguientes variedades; Thola *Bacharis deacuntifolia*, Ichu *Stipa ichu*, Chillihua *Festuca orthophyla*, Paja *Festuca dolichophilia*, Sicuya *Paratrypha lepidophyllum*, Waraco *Opuntia floosa*

3.3. Proceso de Análisis de las Muestras de Leche

Toda la fase de análisis de muestras, se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Investigación Clínica INLASA (Instituto Nacional de Laboratorios de Salud) ubicado en la zona de Miraflores, lado Hospital del Niño N° 1889 en la de ciudad de La Paz.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Materiales

4.1.1. Materiales de Laboratorio y Equipo

Espectrofotómetro para Microplacas (450 nm)

Centrifuga

Pipetas graduadas

Micropipetas variables de 20 µl - 200 µl - 1000 µl

Termómetro digital

Vasos de precipitados de 100 ml

Embudos de decantación

Matraces erlenmayer de 100 ml

Papel filtro Whatman N° 1

Molino manual

Balanza analítica

4.1.1.1. Materiales de campo

Conservador de plastroformo para trasladar muestras a laboratorio

Embudo de vidrio de 500 ml (para recolección muestras de leche)

Bolsas de polietileno 1 kl (para recolección de muestras de forraje)

4.1.2. Reactivos

Kit RIDASCREEN Aflatoxina B1

Kit RIDASCREEN Aflatoxina M1

Agua destilada

Metanol al 70 %

4.1.3. Material Biológico

Muestras de Forraje Almacenado

Leche Cruda

4.1.4. Material de Gabinete

Cámara fotográfica

Computadora

Guardapolvos, barbijos y guantes quirúrgicos

4.2. Metodología

4.2.1. Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó en base a estadística descriptiva, de tal forma describir las características de una población en base al análisis de datos de muestras tomadas en forma aleatoria simple para realizar el estudio con las familias productoras de leche de la zona.

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum [Xi - \mu]^2}{[n - 1]}}$$

σ = Desvió estándar

Xi = Muestra

μ = Media general

n = Numero de muestras

$$CV = \frac{\sigma}{\mu} * 100\%$$

CV= Coeficiente de Variación

σ = Desvió estándar

μ = Media general

4.2.2. Determinación del Tamaño de la Muestra

Para el presente trabajo de investigación se utilizó la siguiente metodología, para todas las muestras en estudio:

El tamaño de muestra de los productores de cada comunidad se determinó usando la siguiente fórmula:

$$n = \frac{z^2 * p * q * N}{(N * e^2) + (z^2 * p * q)}$$

Donde:

n = Tamaño de la muestra (15 productores en estudio)

z = Nivel de confianza al 95% (1.96)

N = Población de estudio (80 productores)

e = Error de estimación (0.10)

p = Probabilidad de éxito (0.95)

q = Probabilidad de fracaso (0.05)

El tamaño de la muestra obtenida a través de la formulación con un tamaño de muestra de n=15, el cual determino el número de productores con los cuales se trabajo, para tal efecto se realizo un muestreo aleatorio simple del área en estudio.

4.2.3. Procedimiento del Ensayo

Para la detección de aflatoxinas B1 y aflatoxinas M1 se utilizó un método del tipo ELISA.

4.2.3.1. RIDASCREEN Aflatoxin B1 y M1 30/15. Es un ELISA competitivo

Es un inmunoensayo enzimático competitivo para el análisis cuantitativo de aflatoxina. La base del ensayo es la reacción antígeno-anticuerpo. Los pocillos de la microplaca están sensibilizados con anticuerpos específicos dirigidos contra anticuerpos anti-aflatoxina. Se agregan los estándares de aflatoxina y las soluciones de muestras, luego de un paso de lavado, se agrega el conjugado enzimático. La Aflatoxina libre y el conjugado aflatoxina enzima compiten por los sitios de unión de los anticuerpos anti-Aflatoxina (inmunoensayo enzimático competitivo); cualquier conjugado enzimático no unido se remueve en el paso de lavado.



Figura N° 9. Kit RIDASCREEN Aflatoxin

Se agrega el sustrato/cromógeno a los pozos y se incuba. El conjugado enzimático unido convierte al cromógeno incoloro en un producto azul. La adición de la solución stop lleva a un cambio de color del azul al amarillo. La medición se hace fotométricamente a 450 nm y la absorbancia es inversamente proporcional a la concentración de Aflatoxina en la muestra (Biopharm 2011).

4.2.3.1.1. Procesamiento de la Muestra

Las muestras se llevaron a laboratorios de análisis, después de haber sido recogidas de las comunidades en estudio, para ser ensayadas en el día en que fueron tomadas. Preparar la solución metanol 70% mezclando 70 ml de metanol (100%) con 30 ml de agua destilada o deionizada.

Las muestras se transportaron y almacenaron en refrigeración a una temperatura de 0 a 5 °C en un contenedor de plastoformo protegidas de la luz, luego se procedió a su molido mezclado exhaustivo antes de pesar 5 gr, según lo establecido por el protocolo del Ridascreen Aflatoxin B1.



Figura N° 10. Muestras de forraje recolectadas molidas y pesadas

Posteriormente a la pesa de 5 gr de muestra en un vaso de precipitados se agrega 25 ml de metanol 70 % agitar vigorosamente por 3 min (manual o con agitador), filtrar el extracto a través de un filtro whatman N°1 (o equivalente).

Se utilizo 1 ml del filtrado obtenido con 1 ml de agua destilada, usando 50 µl del filtrado diluido en cada pocillo en el ensayo.



Figura N° 11. Dilución de la muestra con metanol 70 % filtrado y extracción de la alícuota para el ensayo

4.2.3.1.2. Consideraciones Generales.

Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente (20 – 25 °C / 68- 77 °F) antes de su uso.

Se utilizó como buffer de lavado un buffer PBS tween y se disolvió la totalidad de las sales en 1 litro de agua destilada.

4.2.3.1.3. Implementación del Ensayo para Aflatoxinas B1

1. Se colocó un número suficiente de pozos en el soporte de la microplaca para los estándares y las muestras las cuales fueron analizadas por duplicado. Se documentó la posición de las muestras.

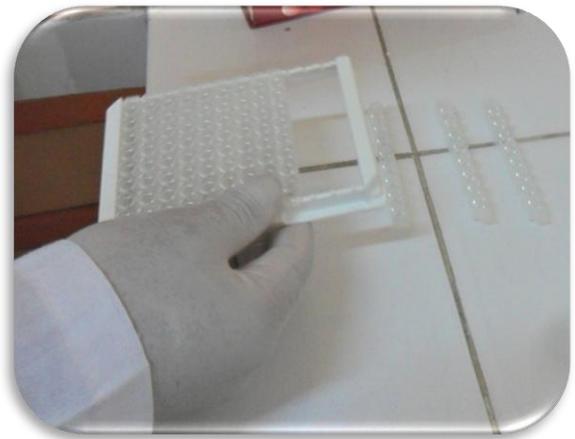


Figura N°12. Microplaca del Ensayo

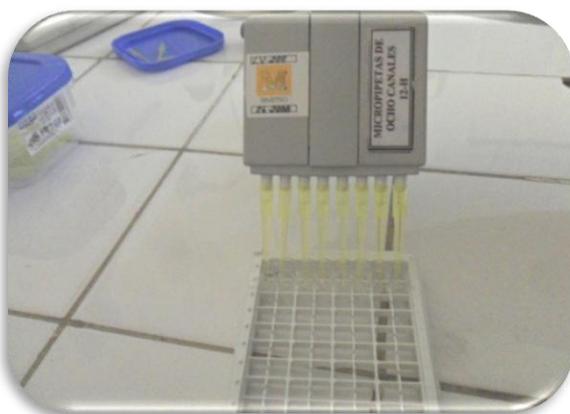


Figura N° 13. Adición de las muestras procesadas a los pocillos

2. Se agregó 50 µl de los estándares y de las muestras procesadas, según la preparación de la muestra mencionada anteriormente, en pozos separados usando un tip diferente para cada estándar y para cada muestra.

3. Se agregó 50 μ l del conjugado enzimático a cada pocillo, seguido de 50 μ l de la solución de anticuerpo anti-aflatoxina a cada pocillo luego se mezcló la placa suavemente por rotación manual y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente (20-25 $^{\circ}$ C / 68-77 $^{\circ}$ F).



Figura N° 14. Adición de conjugado enzimático diluido y la solución anticuerpo



Figura N° 15. Lavado de los pocillos con buffer de lavado

5. Se agregó 100 μ l sustrato-cromógeno a cada pocillo. Se mezcló suavemente la placa en forma manual e incubó por 15 minutos a temperatura ambiente (20 -25 $^{\circ}$ C / 68 -77 $^{\circ}$ F), en oscuridad.



Figura N°16. De adición del sustrato cromógeno

4. Se eliminó el líquido de los pozos y se golpeó la microplaca vigorosamente hacia abajo sobre un papel absorbente (3 veces) para asegurar una completa remoción de líquido de los pozos. Se llenó cada pocillo con 250 ml de buffer de lavado, según las consideraciones generales nombradas anteriormente y se eliminó nuevamente el líquido. Se repitió el paso de lavado 2 veces.

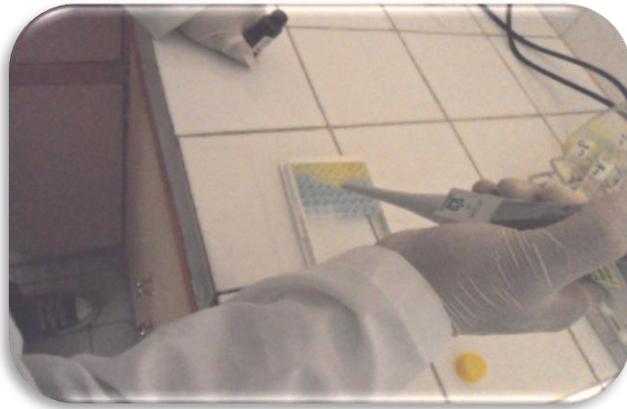


Figura N° 17. Adición de solución stop

6. Se agregó 100 ml de solución stop a cada pocillo, se mezcló suavemente por rotación manual de la placa y se leyó la absorbancia a 450 nm dentro de los 15 minutos posteriores a la adición de la solución stop.

7. Los valores de absorbancia se representaron como porcentajes. Para obtener la concentración de Aflatoxina B1 en $\mu\text{g}/\text{kl}$ (ppb) correspondiente a la absorbancia de cada muestra se lee de la curva de calibración.



Figura N° 18. Lectura de las muestras en el espectrofotómetro a 450nm.

4.2.3.2. Procedimiento del Ensayo para Aflatoxina M1

Para la detección de aflatoxinas M1 se utilizó un método del tipo ELISA.

4.2.3.2.1. Procesamiento de la Muestra

Las muestras se llevaron a laboratorios de análisis, inmediatamente después de haber sido recogidas de las comunidades en estudio, para ser ensayadas en el día en que fueron tomadas.

Las muestras se transportaron y almacenaron en refrigeración a una temperatura de 0 a 5 °C en un contenedor de plastroformo protegidas de la luz, en las instalaciones del instituto nacional de laboratorios de salud (INLASA).

Cada muestra de leche se centrifugó para descremarlas por 10 min / 3500 g /10 °C como no se contaba con una centrifuga refrigerada las muestras se refrigeraron llevando a una temperatura de 10 °C, según lo establecido por el protocolo de RIDASCREEN Aflatoxin M1 30/15, luego de la centrifugación, se removi6 la capa superior de crema completamente por aspiraci6n con pipeta Pasteur, y se us6 la leche descremada (sobrenadante desnatado) directamente en el ensayo (100 ml por pocillo).

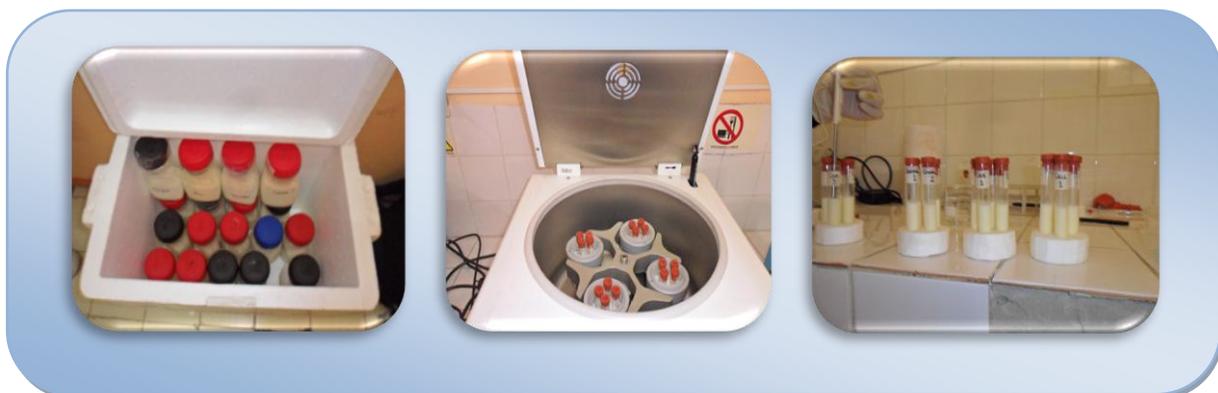


Figura N° 19. Centrifugaci6n y procesado de muestras de leche

4.2.3.2.2. Consideraciones Generales.

Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente (20 – 25 °C / 68- 77 °F) antes de su uso. El conjugado aflatoxina M1 es concentrado, como el conjugado enzimático diluido tiene una estabilidad limitada, se reconstituy6 solamente la cantidad que se necesita para el ensayo. Antes de pipetear, el conjugado enzimático se agit6 cuidadosamente. Para su reconstituci6n, el conjugado enzimático se diluy6 1:11 (1 + 10) en Buffer de diluci6n de conjugado.

Se utiliz6 como buffer de lavado un buffer PBS tween y se disolvi6 la totalidad de las sales en 1 litro de agua destilada.

4.2.3.2.3. Implementación del Ensayo para Aflatoxinas M1

1. Se colocó un número suficiente de pozos en el soporte de la microplaca para los estándares y las muestras las cuales fueron analizadas por duplicado. Se documentó la posición de las muestras.

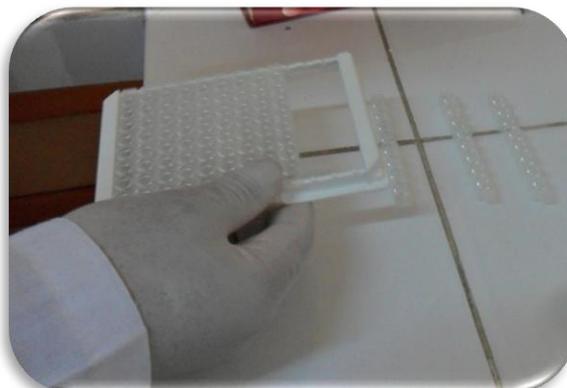


Figura N° 20. Microplaca del Ensayo

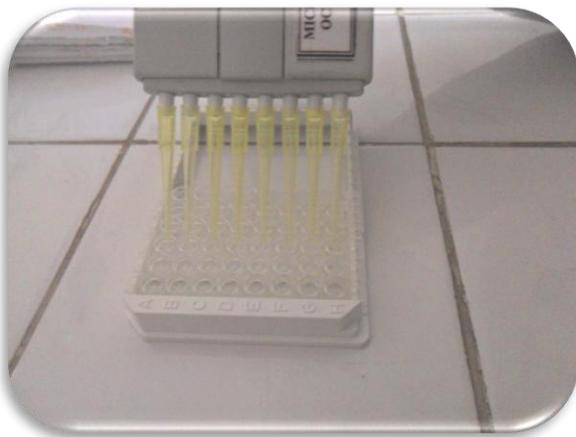


Figura N° 21. Adición de las muestras procesadas a los pocillos

2. Se agregó 100 μ l de los estándares y de las muestras procesadas, según la preparación de la muestra mencionada anteriormente, en pozos separados por duplicado, luego se mezcló la placa suavemente por rotación manual y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente.

3. Se eliminó el líquido de los pocillos y se golpeó la microplaca hacia abajo sobre un papel absorbente (3 veces) para asegurarse la completa remoción del líquido de los pocillos, posteriormente se llenó cada pocillo con 250 μ l de buffer de lavado, se eliminó nuevamente el líquido. Se repitió el paso de lava dos veces más.



Figura N° 22. Vaciado y lavado de los pocillos

4. Se agregó 100 ml del conjugado enzimático diluido, luego se mezcló la placa suavemente por rotación manual y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C / 68-77 °F) en oscuridad.



Figura N° 23. Adición de conjugado Enzimático diluido



Figura N° 24. Lavado de los pocillos

5. Se eliminó el líquido de los pozos y se golpeó la microplaca vigorosamente hacia abajo sobre un papel absorbente (3 veces) para asegurar una completa remoción de líquido de los pozos. Se llenó cada pocillo con 250 ml de buffer de lavado, según las consideraciones generales nombradas anteriormente y se eliminó nuevamente el líquido. Se repitió el paso de lavado 2 veces.

6. Se agregó 100 ml sustrato-cromógeno a cada pocillo. Se mezcló suavemente la placa en forma manual e incubó por 15 minutos a temperatura ambiente (20 -25 °C / 68 -77 °F), en oscuridad.



Figura N° 25. Adición del sustrato cromógeno



Figura N° 26. Adición de solución stop

Los valores de absorbancia se representaron como porcentajes. Para obtener la concentración de Aflatoxina M1 en ng/L contenida en la muestra, la concentración leída de la curva de calibración se multiplicó por el correspondiente factor de dilución. Se trabajó de acuerdo a las indicaciones detalladas, el factor de dilución para leche fue de 1.

7. Se agregó 100 ml de solución stop a cada pocillo, se mezcló suavemente por rotación manual de la placa y se leyó la absorbancia a 450 nm dentro de los 15 minutos posteriores a la adición de la solución stop.



Figura N° 27. Lectura de las muestras en el espectrofotómetro a 450nm.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Elaboración de la curva de calibración para AFB1

La realización de la curva de calibración es uno de los puntos críticos para determinar la presencia y cantidad de aflatoxinas B1, en las muestras de forraje. Para el presente estudio fue construida en base a los estándares que están incluidas en el Kit Ridascreen Aflatoxin B1, en concentraciones 0, 1, 5, 10, 20, 50 ppb, con sus correspondientes absorbancias. El trazado de la curva de los estándares se muestra en el certificado de aseguramiento de calidad que se encuentra incluido en la caja del ensayo (anexo 1). El estándar cero será por lo tanto igual a 100% de absorbancia. Los valores calculados fueron obtenidos a partir de las absorbancias estándares encontradas por el espectrofotómetro y posteriormente expresados en porcentajes y graficados en un sistema de coordenadas en papel semilogarítmico, ubicando al porcentaje de las Absorbancias en el eje “Y” y a las concentraciones de aflatoxina B1 en ppb en el eje “X”.

Cuadro N°6. Resultados de Absorbancia promedio entre muestra y replica, coeficiente de variación, % de Absorbancia, de las concentraciones estándar provistas por el kit de Elisa RIDASCREEN Aflatoxin B1 30/15.

C. E. (ppt)	Absorb Estándar	Absorb Replica	Absorb Promedio	Desvio Estándar	Coef. de Var.	(%) de Absorb
0	0,467	0,488	0,4775	0,014	3,1	100
1	0,342	0,391	0,3665	0,034	9,4	76,8
5	0,237	0,256	0,2465	0,013	5,4	51,6
10	0,18	0,192	0,186	0,008	4,56	39
20	0,153	0,152	0,1525	0,0007	0,46	31,9
50	0,092	0,095	0,0935	0,0021	2,26	19,6

Como se observa en el cuadro N°6, el coeficiente de variación de los resultados no sobrepasaron el 9.4 % demostrando así un grado de variabilidad aceptable que representa una homogeneidad en los datos teniendo en cuenta que el valor máximo reportado por el kit Ridascreen Aflatoxin B1, de coeficiente de variación es igual al 8.3%, similares a los del presente estudio.

Al respecto Ochoa (2007), afirma que un coeficiente de variación de 9,4%, indica que los datos obtenidos son confiables y el manejo de las unidades experimentales (pocillos) fue muy bueno.

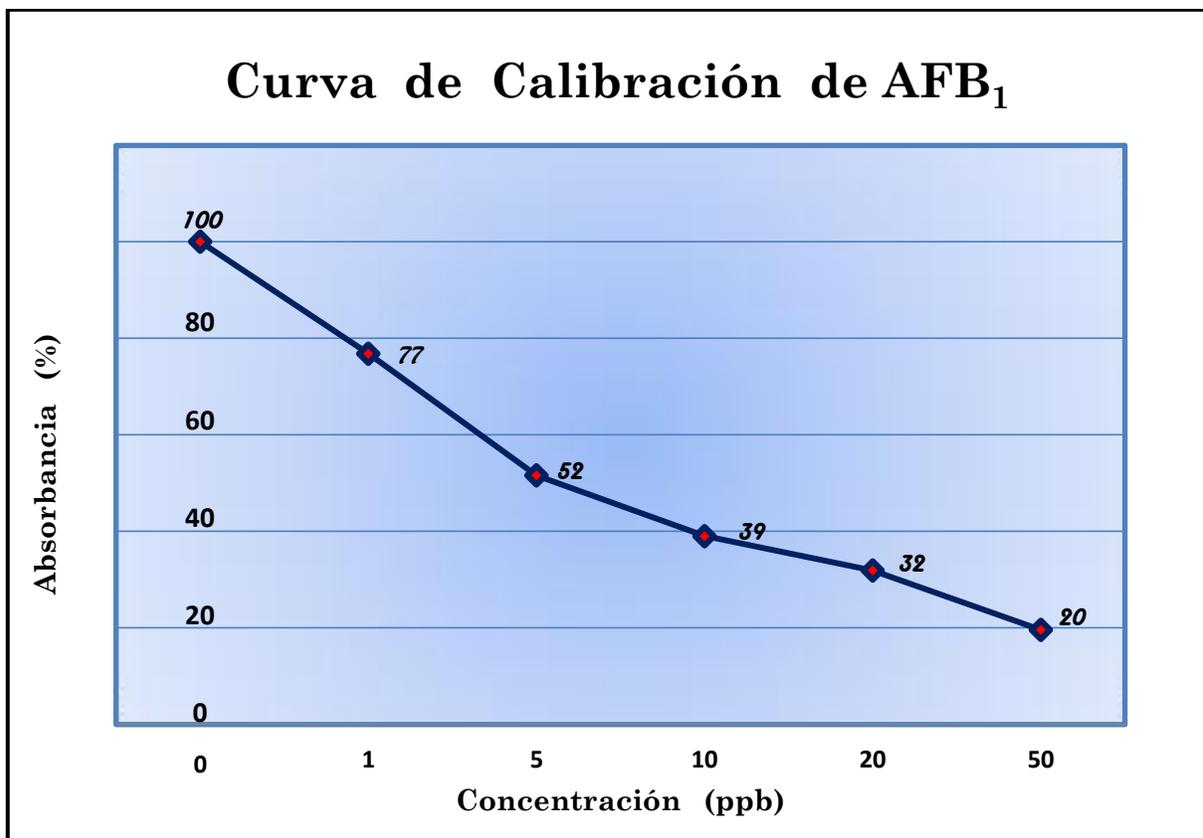


Figura 28. Curva de calibración de los estándares del kit de Elisa RIDASCREEN Aflatoxin B130/15 para las concentraciones 0,1, 5, 10, 20, 50 ppt.

Como se aprecia en la figura 28, a mayor absorbancia menor concentración de aflatoxinas B1, y a menor absorbancia mayor concentración de aflatoxinas. Habiendo reportado para una mayor absorbancia de 77 % una concentración de 1ppb sin embargo con una menor absorbancia de 20 % se obtiene una mayor concentración de 50 ppb con cuales se elaboro la curva de calibración.

Al respecto r-Biopharm (2011), para la elaboración de la curva calibración para el kit Aflatoxina B1, obtuvo una absorbancia mayor de 87% para una concentración de 1ppb, y la una absorbancia menor de 16% para una concentración de 50ppb, similares a los reportados en el certificado de aseguramiento incluido en el kit (anexo 1), por tanto se puede observar que estas tienen una semejanza y es correspondiente a las concentraciones de Aflatoxinas B1 (ppb).

5.2. Resultado de Cuantificación de Aflatoxina B1 para cada Comunidad en Estudio

Los resultados obtenidos de las muestras de la comunidad de Choquenaira Copalacaya, Canaviri y Callisaya acerca de las absorbancias reportadas por el espectrofotómetro, las concentraciones de aflatoxina B1, contenida en las muestras de forraje se detallan a continuación:

Cuadro N° 7. Absorbancia para las muestras de forraje tomadas de la comunidad “Choquenaira” de 3 productores, lectura en espectrofotómetro a 450 nm.

CHOQUENAIRA			
N°	Absorbancia de la muestra	Absorbancia de la Replica	Absorbancia Promedio
Muestra 1	0,257	0,270	0,264
Muestra 2	0,302	0,337	0,320
Muestra 3	0,277	0,295	0,286

Los resultados de la absorbancia entre replica y muestra (cuadro 7), no presentan una variación representativa, comparando con las absorbancias de la curva calibración del kit demostrando así la similitud y que está dentro de las concentraciones correspondientes en el certificado de aseguramiento anexo 1, por otra parte la muestra 2 tiene el mayor promedio de 0,320 y la muestra 1 con un promedio menor de 0,264, sin embargo no presentan deferencias estadísticamente significativas.

Cuadro N° 8. Resultados del coeficiente de variación, % de Absorbancia y concentración de Aflatoxinas B1 en ppb, de las muestras analizadas de la comunidad “Choquenaira” de 3 productores.

CHOQUENAIRA			
N°	Coeficiente de variación	(%) de Absorbancia	Concentración AFB1 (ppb)
Muestra 1	3,48	55,2	4,5
Muestra 2	7,74	66,9	1,01
Muestra 3	4,5	59,9	3,72

El coeficiente de variación máximo no superior a 7.7% expresado en el cuadro 8, para las muestras de recolectadas de la comunidad de “Choquenaira”, el cual indica el grado de variabilidad de las observaciones respecto a la media considera que los datos son confiables y la manipulación de las muestras fue muy bueno, confirmando de esta manera la veracidad de los datos.

De acuerdo con la figura 29, las concentraciones de aflatoxinas B1 presentes en muestras de forraje de la comunidad Choquenaira de 3 productores se encuentran en niveles 4,5; 1,01; 3,72 ppb, de los cuales la muestra 1 y 3 están por encima respecto al máximo permisible por la Unión Europea (UE) de 2 ppb.

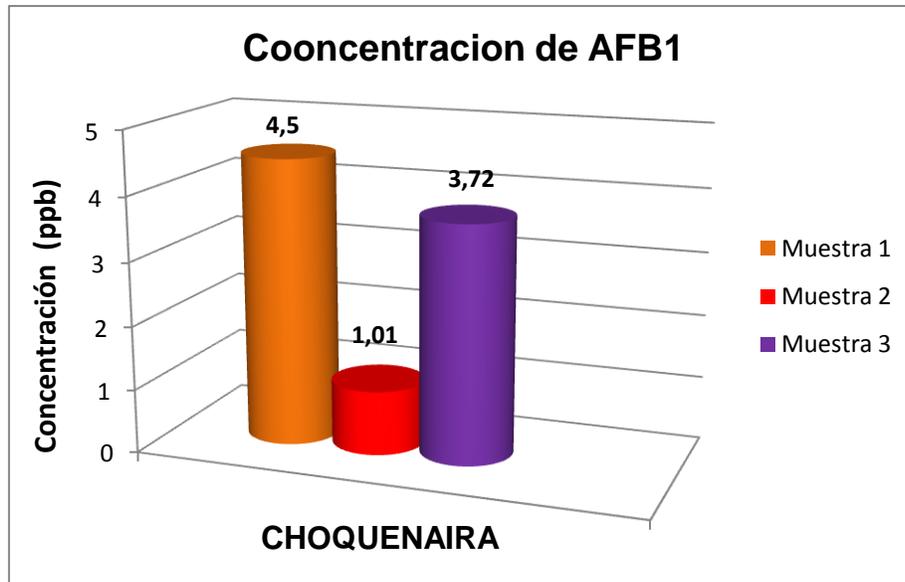


Figura N° 29. Concentraciones de AFB1 en la comunidad de Choquenaira

Sin embargo se encuentran dentro de los límites permisibles con relación a la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de Estados Unidos que establece una concentración máxima permitida de aflatoxinas B1 en cereales y piensos de 5 ppb, normas adoptadas por algunos países de América Latina (Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay).

Por tanto se considera que los niveles de concentración de aflatoxina B1 en forrajes para la alimentación del ganado lechero para esta comunidad no representan peligro para la salud del animal y su presencia en la leche según la conversión de AFB1 en AFM1 no generaría peligros de consideración al consumidor según la FDA.

Rosiles y Bautista (2002), describen que las concentraciones de aflatoxina B1 en alimento para vacas lecheras están presentes en el alimento de tipo pienso, en cambio en alimento fresco recién cortado de la pradera no existen. Esto de alguna forma afirma que este productor por utilizar pienso y concentrado como alimento sumando un mal manejo aumenta el riesgo de consumo y de transmisión de la aflatoxina B1 del alimento a la leche como M1, aunque no se puede determinar con precisión la cantidad e aflatoxina B1 que cada animal consume.

Sassahara *et al.*, (2005), señalan que el monitoreo de micotoxinas debe ser continuo, ya que las condiciones favorables para su producción varían de acuerdo a la época del año.

Bakirci (2001), considera que esta inspección debe realizarse al menos dos veces al año.

Cuadro N°9. Absorbancia para las muestras de forraje tomadas de la comunidad “Copalacaya” de 4 productores, lectura en espectrofotómetro a 450 nm.

COPALACAYA			
N°	Absorbancia de la muestra	Absorbancia de la Replica	Absorbancia Promedio
Muestra 1	0,319	0,320	0,320
Muestra 2	0,281	0,279	0,280
Muestra 3	0,247	0,251	0,249
Muestra 4	0,218	0,210	0,214

Según los resultados de la absorbancia entre replica y la muestra (cuadro 9) no presentan una variación representativa, comparando con las absorbancias de la curva calibración del kit demostrando así la similitud y que está dentro de las concentraciones correspondientes en el certificado de aseguramiento ubicado en el anexo 1, por otra parte la muestra N°1 tiene el mayor promedio de 0,320 y la muestra 4 con un promedio menor de 0,214.

Cuadro N°10. Resultados de coeficiente de variación, % de Absorbancia y concentración de Aflatoxina B1 en ppb, de las muestras de forrajes analizadas de la comunidad “Copalacaya” de 4 productores.

COPALACAYA			
N°	Coeficiente de variación	(%) de Absorbancia	Concentración AFB1 (ppb)
Muestra 1	0,22	66,9	2,6
Muestra 2	0,5	58,6	3,95
Muestra 3	1,13	52,1	5,01
Muestra 4	2,6	44,8	7,77

Asimismo el coeficiente de variación no superior a 2,6%, indica que las observaciones se dispersan en 2,6% respecto al promedio de las observaciones. Igualmente revela que los resultados obtenidos son confiables debido a la homogeneidad de la muestras y el manejo de las mismas fue excelente.

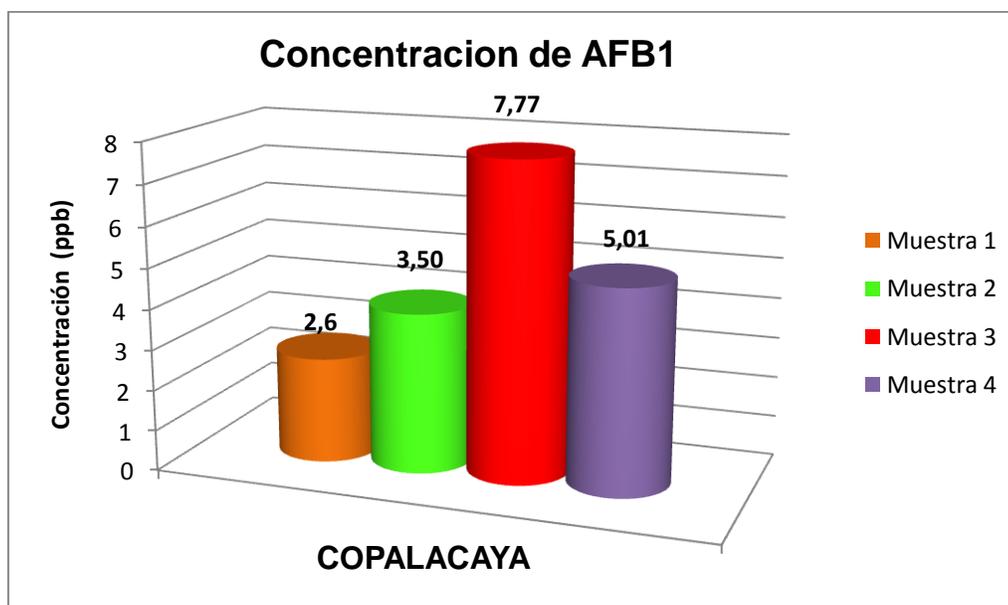


Figura N° 30. Concentraciones de AFB1 en la comunidad de Copalacaya

Se observa en la figura 30, las concentraciones de aflatoxinas B1 presentes en el forraje de la comunidad Copalacaya el 100 % de las muestras sobrepasan el máximo permisible por la Unión Europea (UE) de 2 ppb, en cuanto a los límites permisibles a la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de Estados Unidos que establece una concentración máxima permitida de aflatoxinas B1 en cereales y piensos de 5 ppb, las muestras 3 y 4 sobrepasan este límite por tanto se considera que los niveles de concentración de aflatoxina B1 en forrajes para la alimentación del ganado lechero para esta comunidad representan un peligro para la salud del animal y su presencia en la leche para el consumidor según la conversión de AFB1 en AFM1 .

Estos valores pueden conllevar a una intoxicación crónica, en el caso de seguir consumiendo por tiempo prolongado de piensos con concentraciones similares. Esto revela que la contaminación de aflatoxinas B1 es inevitable en las condiciones rústicas de almacenamiento de forraje en la comunidad de Copalacaya lo que representa no solo el peligro a la salud también a los rendimientos y economía del productor.

Forbisch *et al.*, (1986) y Price *et al.*, (1985), han sugerido que sólo el 1,6 % de la cantidad de AFB₁ ingerida, es convertida a AFM1 por el ganado lechero, por lo que se puede calcular los valores de AFB₁ en el alimento contaminado usando la fórmula propuesta por los mismos autores.

Al respecto Montesano (2007), sostiene que una gran cantidad de evidencia indica que la exposición crónica a la toxina induce a la producción de células cancerígenas, convirtiéndolo en un problema de salud pública, especialmente cuando se asegura que del 20 al 50% de todos los cánceres están relacionados con factores de la dieta.

Cuadro N°11. Absorbancia para las muestras de forraje tomadas de la comunidad “Canaviri” de 4 productores, lectura en espectrofotómetro a 450 nm.

CANAVIRI			
N°	Absorbancia de la muestra	Absorbancia de la Replica	Absorbancia Promedio
Muestra 1	0,293	0,277	0,285
Muestra 2	0,277	0,261	0,269
Muestra 3	0,299	0,303	0,301
Muestra 4	0,344	0,342	0,343

En el cuadro 11, se observa la absorbancia entre replica y la muestra de la comunidad de Canaviri, las cuales no presentan una variación representativa, con relación a las absorbancias de la curva calibración del kit demostrando así la similitud y que se encuentra dentro de las concentraciones correspondientes al kit (anexo x).

Cuadro N° 12. Resultados de coeficiente de variación, % de Absorbancia y concentración de aflatoxina B1 en ppb, de las muestras analizadas de la comunidad “Canaviri” de 4 productores.

CANAVIRI			
N°	Coeficiente de variación	(%) de Absorbancia	Concentración AFB1 (ppb)
Muestra 1	3,9	59,7	3,75
Muestra 2	4,2	56,3	4,3
Muestra 3	0,93	63	3,25
Muestra 4	0,41	71,8	1,82

Respecto el coeficiente de variación no superior a 4.2%, obtenido para las muestras de la comunidad de Canaviri, representa el grado de variabilidad bajo, no significativo que corresponde al excelente manejo de las unidades experimentales.

Al respecto Ochoa (2007), indica que los coeficientes de variación en experimentos frente a la aplicación de un determinado tratamiento, mayores a 35% es elevado y los datos pueden ser no confiables, bajo esta aseveración se puede afirmar que los datos de la investigación para esta comunidad son confiables y el manejo de las unidades experimentales fue excelente.

En cuanto a los porcentajes de absorbancia se encuentran en un rango de 56,3 % hasta un 71,8%, se puede indicar que a menor porcentaje de absorbancia existe una mayor concentración de Aflatoxinas B1 en la muestras de forraje y a una mayor absorbancia de las muestras existe una menor concentración de Aflatoxinas B1.

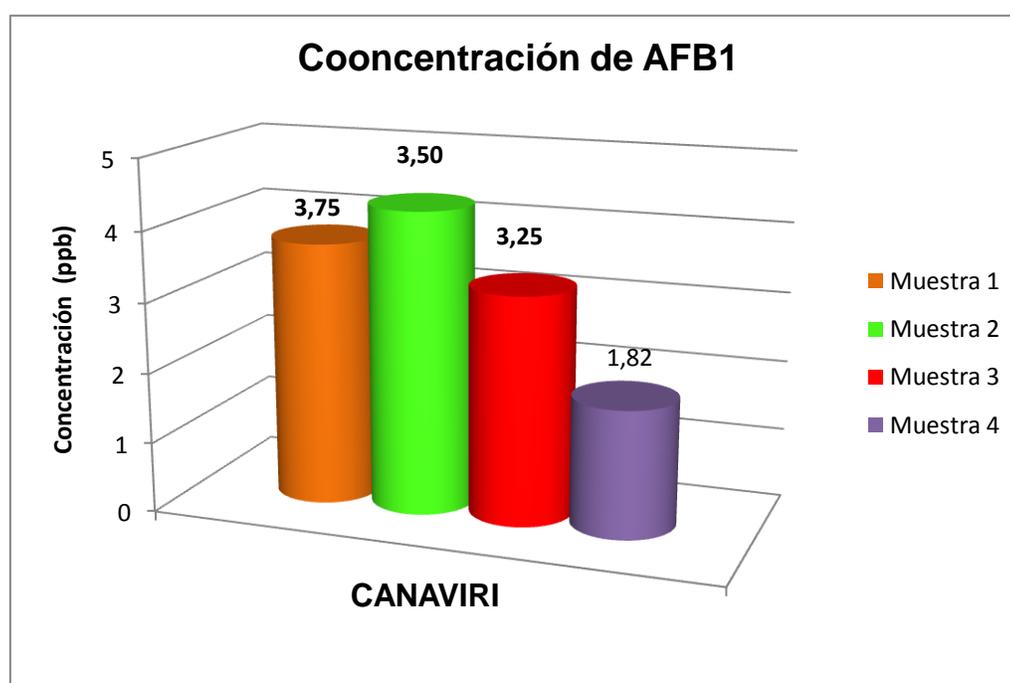


Figura N° 31. Concentraciones de AFB1 en la comunidad de Canaviri

La figura 31, se observa los resultados de las concentración de aflatoxina B1, para la comunidad de Canaviri, cuya diferencia entre valores extremos (rango) de las muestras tomadas es de 1.7 ppb, sin embargo la muestra del productor 4 con 1,82 ppb de concentración no sobrepasa los términos señalados por la UE. Por otra parte las muestras de los productores 1, 2 y 3 superaron el valor establecido por la UE de 2 ppb y ninguna de las muestras paso los límites permisibles establecidos por la

FDA de 5 ppb, siendo para este último un producto apto para el consumo animal y sin riesgo para la salud pública, no obstante al ser la aflatoxina B1, la micotoxina más tóxica y su concentración varía drásticamente con el cambio de estación, aumentos de temperatura, por tanto es necesario el constante monitoreo y mantener al mínimo estos niveles.

En cuanto a estos valores puede conllevar a una intoxicación crónica en caso de seguir consumiendo por tiempos prolongados.

Igualmente Gimeno (2004), comenta que 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.

A su vez Rastogi (2004), ha sugerido que la tasa de conversión de aflatoxina B1 a aflatoxina M1 que se excreta en la leche es de 1,6%. Incluso estos autores proponen la siguiente ecuación: $y = -2,55 + 0,84x$ ($r^2 = 0,73$; $n = 43$), donde $x = \text{mgAFB1/vaca/día}$; $y = \text{microgramos AFM1 /litro de leche}$ (calculando una media de 20 litros de leche/vaca/día).

La importancia de los datos anteriormente mencionados, residen en que si se saca correctamente el porcentaje de transformación de la AFB1 a la AFM1, se podría establecer el porcentaje de concentración máxima permitido de aflatoxina M1 en la leche; como también el porcentaje de concentración de aflatoxina B1 en piensos y concentrados para los animales ya que como se puede ver en los datos anteriormente nombrados están estrechamente ligados. Sin embargo este tema continúa siendo un debate.

Cuadro N° 13. Absorbancia para las muestras de forraje tomadas de la comunidad “Callisaya” de 4 productores, lectura en espectrofotómetro a 450 nm.

CALLISAYA			
N°	Absorbancia de la muestra	Absorbancia de la Replica	Absorbancia Promedio
Muestra 1	0,275	0,267	0,271
Muestra 2	0,265	0,278	0,276
Muestra 3	0,340	0,342	0,341
Muestra 4	0,271	0,261	0,266

Los resultados no tienen una variación representativa entre la réplica y la muestra, si las absorbancias son comparadas con los datos arrojados por la curva de calibración del estudio, se puede constatar que estas tienen una similitud y es correspondiente a las concentraciones de la curva.

Cuadro N° 14. Resultados de coeficiente de variación, % de Absorbancia y concentración de Aflatoxina B1 en ppb, de las muestras analizadas de la comunidad “Callisaya” de 4 productores.

CALLISAYA			
N°	Coeficiente de Variación	(%) de Absorbancia	Concentración AFB1 (ppb)
Muestra 1	2,08	56,8	4,25
Muestra 2	3,40	56,9	4,22
Muestra 3	0,41	71,4	1,9
Muestra 4	2,60	55,7	4,37

Según el cuadro 14, el coeficiente de variación que no sobrepasa del 3,40%, indica la mínima dispersión de los resultados en torno a la media, dando así la confiabilidad de los resultados, mostrando así la eficacia en la implementación del ensayo.

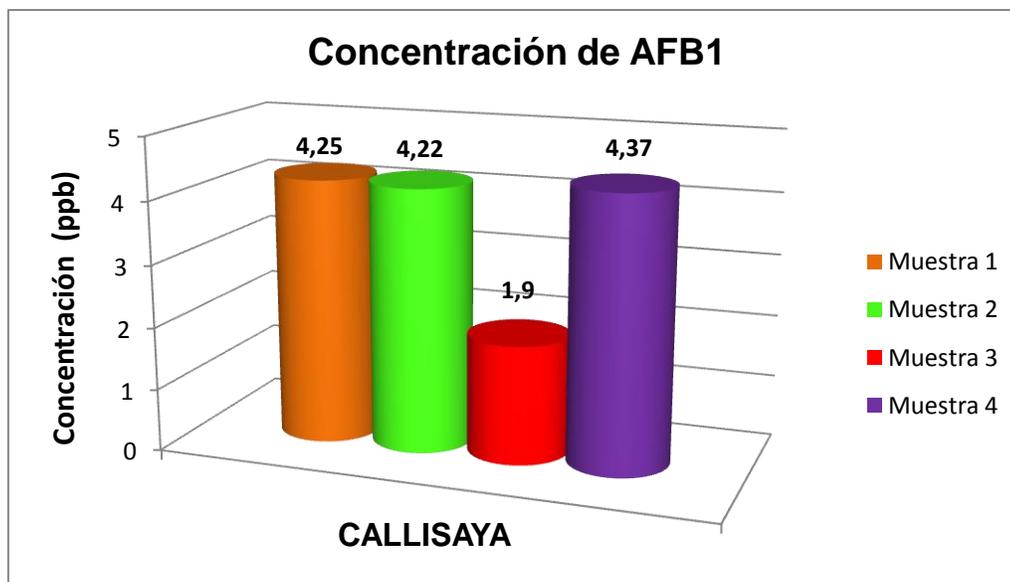


Figura N° 32. Concentraciones de AFB1 en la comunidad de Callisaya

La figura 32, revela los resultados obtenidos de concentración de aflatoxina B1, en el forraje para los 4 productores en estudio de la comunidad de Callisaya, donde la muestra del productor N°3 no sobrepasa los niveles dictados por la UE de 2ppb. Sin embargo las muestras 1, 2 y 4 con 4,25; 4,22 y 4,37 respectivamente superan los niveles determinados por la UE, pero ninguna de las muestras sobrepasó el límite de la FDA correspondiente 5 ppb.

Al respecto Gimeno y Martins (2000), citado por Comita y Mildenberg (2009), consideran que la concentración de aflatoxina B1, es uno de los factores más importantes ya que la AFM1 es uno de sus derivados metabólicos que va a la leche contaminándola, se estipula que la vaca puede transformar AFB1 en AFM1 dentro de las 12 a 24 horas de ingestión del alimento contaminado, incluso a las 6 horas ya pueden aparecer residuos de AFM1 en la leche.

Por su parte Combita y Mildenberg (2009), afirman que las concentraciones de aflatoxina B1, en alimento fresco recién cortado de la pradera no existen. Esto de alguna forma afirma que por utilizar henos y concentrado como alimento adherido a un mal manejo del mismo incrementa los riesgos de contaminación por la aflatoxina B1.

5.3. Elaboración de la curva de calibración para aflatoxinas M1

La construcción de la curva de calibración para determinar la presencia y cantidad de AFM1 en las muestras de leche de las cuatro comunidades para el presente estudio fue elaborada con los estándares de concentraciones: 0, 5, 10, 20, 40, 80 ppt de aflatoxina M1, con sus respectivas replicas cada uno, y habiendo obtenido sus correspondientes absorbancias se puede graficar una tendencia de los valores de absorbancia y concentraciones de aflatoxina M1 representado en la figura N°33.

Para el presente estudio se tomó como referencia la norma Internacional Europea (UE) 50 ppt, la cual es estricta en cuanto a los niveles tolerables de aflatoxina M1, y como segunda referencia a la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de Estados Unidos establece que la concentración máxima permitida de aflatoxinas M1 en leche es de 500 ppt, normas adoptadas por algunos países de América Latina (Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay).

Existen diferentes limitaciones en cuanto a la contaminación con micotoxinas que es permitida, aunque cabe resaltar que no existe ningún nivel seguro. Si hacemos referencia a nuestro país, a la fecha no existe ninguna limitación para aflatoxinas M1 en leche y derivados, excepto para aflatoxinas B1, en algunos productos para consumo humano. Se han hecho diferentes estudios al respecto, empero no existe suficiente información sobre los niveles de contaminación por aflatoxinas B1, M1, G1 y otras micotoxinas.

Stoloff (1991), además considera que el nivel de aflatoxinas en un alimento puede variar en función de cuando se realice el muestreo. También influye el tamaño de la muestra ya que esta debe ser representativa y suficiente para realizar el análisis en el caso de alimentos líquidos suelen precisarse cantidades menores.

Ya que no existe evidencia suficiente sobre la ocurrencia de las aflatoxina M1, en la leche en Bolivia, es necesario empezar por detectar la presencia o ausencia de la aflatoxinas M1 en leches y las zonas de incidencia, para su posterior control.

Cuadro N° 15. Resultados de Absorbancia promedio entre muestra y replica, coeficiente de variación, % de Absorbancia, de las concentraciones estándar provistas por el kit de Elisa RIDASCREEN Aflatoxin M1 30/15.

C. E. (ppt)	Absorb Estándar	Absorb Replica	Absorb Promedio	Desvio Estándar	Coef. de Var.	(%) de Absorb
0	0,451	0,421	0,436	0,015	3,4	100,00
5	0,401	0,373	0,387	0,019	5,11	88,76
10	0,38	0,366	0,373	0,0098	2,65	85,55
20	0,312	0,289	0,3005	0,016	5,41	68,92
40	0,243	0,233	0,238	0,007	2,97	54,59
80	0,184	0,179	0,1815	0,003	1,94	41,63

El cuadro 15 muestra que los resultados en efecto no tienen una variación representativa entre la réplica y la muestra. Si las absorbancias son comparadas con los datos arrojados por la curva calibración del estudio, se puede observar que estas tienen una semejanza y es correspondiente a las concentraciones del anexo N°2.

Siguiendo el protocolo establecido en el Kit para detección de aflatoxinas M1, el coeficiente de variación de los resultados no sobrepasó el 5,4%, demostrando así la confiabilidad de los resultados y la eficacia en el manejo de las unidades experimentales.

En la siguiente página, en la figura 33, se aprecia la curva de calibración del presente estudio, para aflatoxinas M1, donde se muestra los porcentajes de absorbancias frente a las concentraciones de aflatoxinas M1, en ppt para los estándares de comparación.

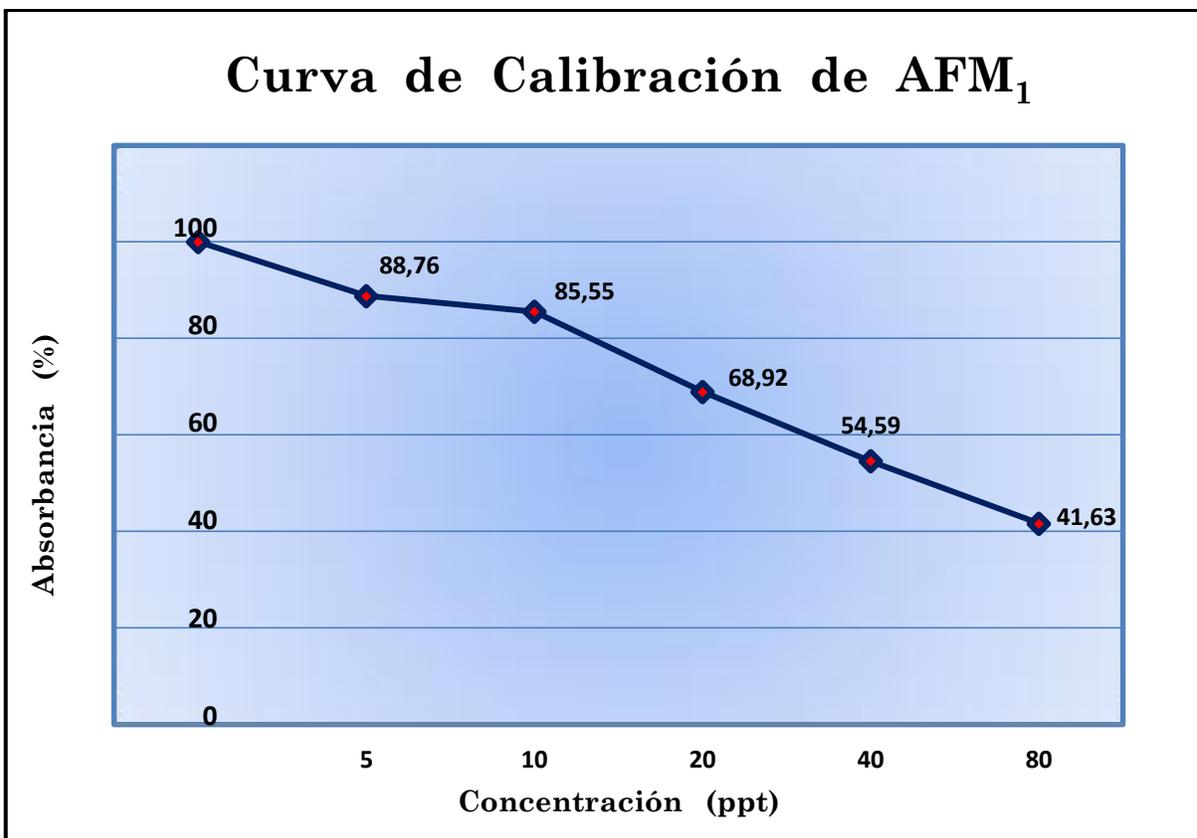


Figura N° 33. Curva de calibración de los estándares del kit de Elisa RIDASCREEN Aflatoxin M1 30/15 para las concentraciones 0, 5, 10, 20, 40 y 80 ppt.

En la figura 33, se observa que a mayor porcentaje de absorbancia existe una menor concentración de aflatoxinas M1, y a menor absorbancia mayor concentración de aflatoxinas M1. Habiendo reportado para una absorbancia de 88,76% una concentración de 5ppt, sin embargo con una menor absorbancia del 41,63% se obtuvo una mayor concentración de 80ppt, valores con los que se construyó la curva de calibración del presente estudio.

Al respecto r-Biopharm (2011), en la elaboración de la curva calibración para el kit aflatoxina M1, obtuvo una absorbancia mayor del 85% para una concentración de 5ppt, y una absorbancia menor de 34% para una concentración de 80ppt, similares a los reportados en el presente estudio.

5.4. Resultado de Cuantificación de Aflatoxina M1 para cada Comunidad en Estudio.

Los resultados conseguidos de las muestras de leche recolectadas de las comunidades de: Choquenaira, Copalacaya, Canaviri, Callisaya y algunas empresas de distribución local, según las absorbancias reportadas por el espectrofotómetro y las concentraciones de aflatoxina M1, halladas se detallan a continuación:

Cuadro N° 16. Absorbancia para las muestras de leche tomadas de la comunidad “Copalacaya” de 4 productores, lectura en espectrofotómetro a 450 nm.

COPALACAYA			
N°	Absorbancia de la muestra	Absorbancia de la Replica	Absorbancia Promedio
Muestra 1	0,439	0,402	0,421
Muestra 2	0,402	0,402	0,402
Muestra 3	0,439	0,412	0,423
Muestra 4	0,416	0,389	0,403

El cuadro 16, expresa las absorbancias entre replica y muestra de la comunidad de Copalacaya, los cuales no presentan una variación representativa, con relación a las absorbancias de la curva calibración del kit demostrando así la similitud y que se encuentra dentro de las concentraciones correspondientes en el certificado de aseguramiento (anexo N°2).

Igualmente Combita y Mildenberg (2009), en la lectura de las absorbancias de las muestras fortificadas donde revelaron una diferencia no significativa habiendo hallado para la mínima concentración de 5ppt una absorbancia promedio de 1,07 y para la concentración máxima de 50ppt una absorbancia promedio entre muestra y replica hallando un valor de 0,428 afines con las absorbancias y las concentraciones reportadas por la curva de calibración del certificado de calidad del Kit de Elisa que emplearon, resultados similares a los encontrados en el presente estudio.

Cuadro N° 17. Resultados del coeficiente de variación, % de Absorbancia y concentración de Aflatoxinas M1 en ppt, de las muestras analizadas de la comunidad “Copalacaya” de 4 productores

COPALACAYA			
N°	Coeficiente de variación	(%) de Absorbancia	Concentración AFM1 (ppt)
Muestra 1	6,00	96,44	1,57
Muestra 2	0,17	92,20	3,42
Muestra 3	4,48	97,59	1,075
Muestra 4	4,74	92,32	3,41

En el cuadro anterior se observa el coeficiente de variación no superior al 6%, el cual indica el grado de dispersión de las observaciones con respecto a la media y que los datos son altamente confiables, indica también que el manejo de los elementos experimentales fue excelente.

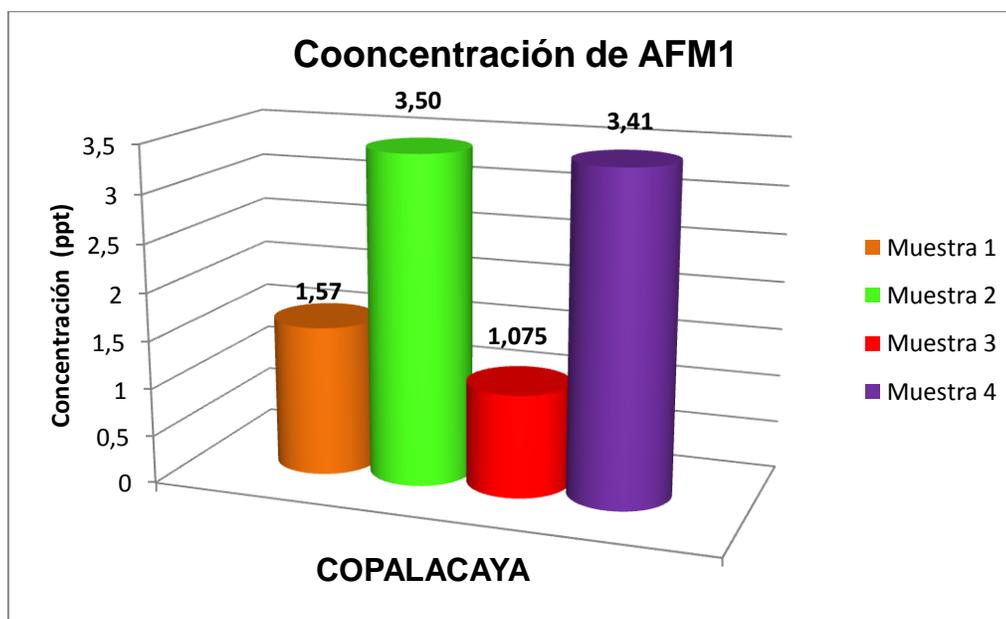


Figura N° 34. Concentraciones de AFM1 en la comunidad de Copalacaya

De acuerdo con la figura 34, las concentraciones de aflatoxinas M1 presentes en leche de la comunidad Copalacaya de los 4 productores en cuestión, se hallan

alrededor de los niveles mínimos (1,57; 3,50; 1,07 y 3,41 ppt) con respecto al máximo permisible por la Unión Europea (UE) de aflatoxinas M1, de 50 ppt, y en caso de preparados para lactantes se permite máximo de 25ppt.

Al respecto la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de Estados Unidos establece que la concentración máxima permitida de aflatoxinas M1, en leche es de 500 ppt, normas adoptadas por algunos países de América Latina Argentina, Brasil, Paraguay.

Por tanto se considera que los niveles de concentración de aflatoxina M1, en la leche para esta comunidad no representan peligro para la salud de sus consumidores.

Sin embargo Gimeno (2004), comenta que la exposición a cualquier nivel cuando se trata de un carcinógeno genotóxico, como es el caso de la AFM1, puede suponer un riesgo sanitario para los consumidores, en especial para los niños.

Cuadro N° 18. Absorbancia para las muestras de leche tomadas de la comunidad “Canaviri” de 4 productores, lectura en espectrofotómetro a 450 nm.

CANAVIRI			
N°	Absorbancia de la muestra	Absorbancia de la Replica	Absorbancia Promedio
Muestra 1	0,415	0,39	0,4025
Muestra 2	0,398	0,377	0,3875
Muestra 3	0,407	0,394	0,4005
Muestra 4	0,412	0,437	0,4245

En el cuadro 18, se muestra la absorbancia entre replica y muestra de la comunidad de Canaviri mismos no presentan una variación representativa, con relación a las absorbancias de la curva calibración del kit demostrando así la similitud y que se encuentra dentro de las concentraciones correspondientes en el certificado de aseguramiento (anexo N°2).

Cuadro N° 19. Resultados de coeficiente de variación, % de Absorbancia y concentración de aflatoxina M1 en ppt, de las muestras analizadas de 4 productores, comunidad “Canaviri”

CANAVIRI			
N°	Coeficiente de Variación	(%) de Absorbancia	Concentración AFM1 (ppt)
Muestra 1	4,39	92,32	3,47
Muestra 2	3,8	88,88	5,2
Muestra 3	2,3	91,86	3,6
Muestra 4	4,16	97,36	1,25

En cuanto al coeficiente de variación encontrado entre las muestras de los estándares reportados por el kit 5,4% y los obtenidos en el ensayo, valores que no superan el 4,3%, el cual nos indica que los datos obtenidos en el presente estudio para las muestras de la comunidad de Canaviri son confiables y la variabilidad es mínima, por tanto no existe diferencias significativas

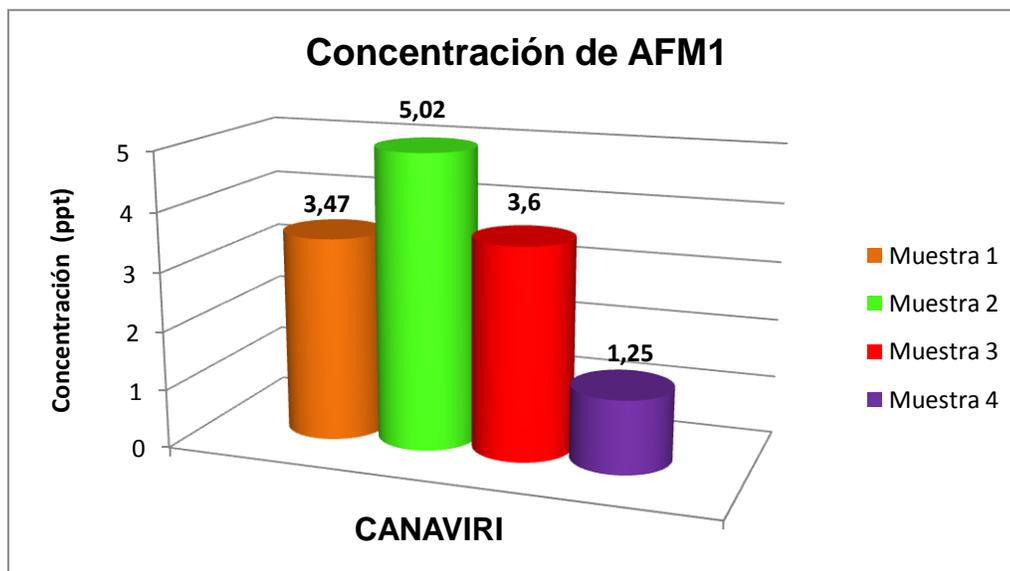


Figura N° 35. Concentraciones de AFM1 en la comunidad de Canaviri

Al analizar los datos de las concentraciones de AFM1, en la leche de la comunidad de Canaviri, se encontró valores por debajo del límite de detección correspondiente a 5 ppt, los datos oscilan entre 1.25 y 5,02 ppt, según se observa en la figura N°35. Si comparamos estos valores con los máximos permitidos por la UE y FDA con valores de 50 y 500 ppt respectivamente, claramente se evidencia que las concentraciones están muy por debajo de estos valores, lo que indica que la concentración de la aflatoxina M1, presente en la leche no proporciona grandes riesgos para la salud de sus consumidores. Por tanto es posible que los productores de esta comunidad no tengan grandes problemas de contaminación con hongos como *A. flavus* y *A. parasiticus*, o posiblemente les estén dando un buen manejo al alimento almacenado que proporcionan a los animales de su hato.

Al respecto Gimeno y Martins (2000), demuestran que la concentración de aflatoxina B1 es uno de los factores más importantes ya que la AFM1, es uno de sus derivados metabólicos que va a la leche contaminándola, se estipula que la vaca puede transformar AFB1 en AFM1 dentro de las 12 a 24 horas de ingestión del alimento contaminado, incluso a las 6 horas pueden aparecer residuos de AFM1 en la leche, sin embargo esta tiende a disiparse 48 horas después de retirado el alimento contaminado al ganado.

Cuadro N° 20. Absorbancia para las muestras de leche tomadas de la comunidad “Callisaya” de 4 productores, lectura en espectrofotómetro a 450 nm.

CALLISAYA			
N°	Absorbancia de la muestra	Absorbancia de la Replica	Absorbancia Promedio
Muestra 1	0,392	0,431	0,4115
Muestra 2	0,362	0,359	0,3605
Muestra 3	0,409	0,384	0,3965
Muestra 4	0,385	0,407	0,396

Los valores de absorbancia que se obtuvieron entre muestra y replica de la comunidad de Callisaya no presentan una diferencia significativa y los promedios están dentro de lo establecido por el kit.

Igualmente Phillips *et al.*,(2008), indica que cuando animales productores de leche consumen alimento contaminado con AFB1, este tóxico es transformado principalmente en el hígado en AFM1 y eliminado en la leche, por lo cual, el consumo de leche contaminada con AFM1, representa un riesgo a la salud de los consumidores y en especial a la población infantil.

Sin embargo Turconi *et al.*, (2004), indican que los niños representan la población más expuesta debido a su alto consumo tanto de leche y de subproductos en su dieta

Cuadro N° 21. Resultados de coeficiente de variación, % de Absorbancia y concentración de aflatoxina M1 en ppt, de las muestras analizadas de 4 productores de la comunidad “Callisaya”

CALLISAYA			
N°	Coeficiente de Variación	(%) de Absorbancia	Concentración AFM1 (ppt)
Muestra 1	6,7	94,38	2,5
Muestra 2	0,58	82,68	11,6
Muestra 3	4,45	90,94	4,0
Muestra 4	3,9	90,83	4,02

Según el coeficiente de variación expresado en el cuadro 21, donde se observa que los porcentajes no sobrepasan del 6.7%, indican claramente que existen un mínimo grado de dispersión de las observaciones en torno a la media, representando también la confiabilidad de los datos exponiendo así eficacia en la implementación del ensayo.

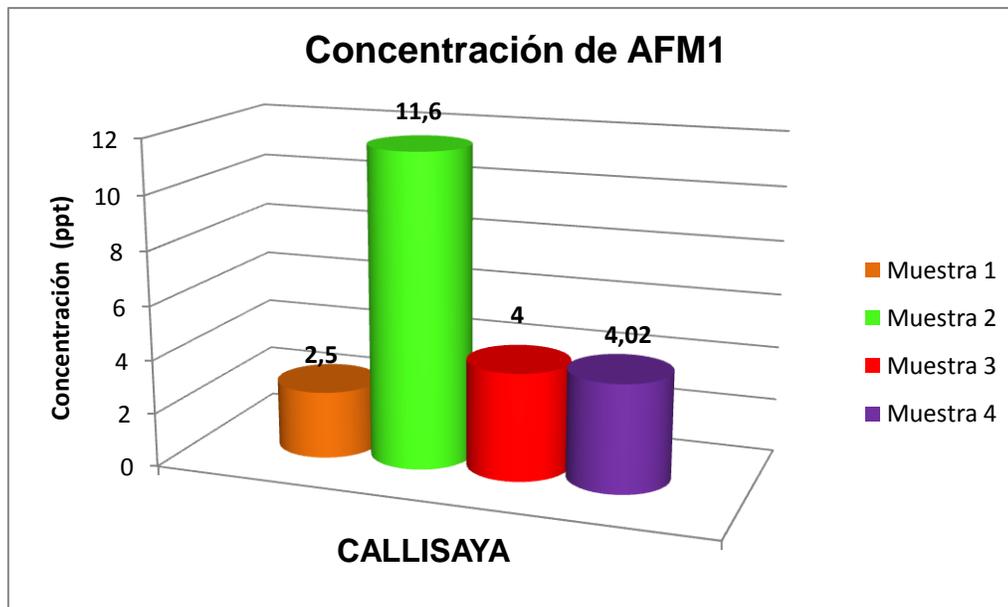


Figura N° 36. Concentraciones de AFM1 en la comunidad de Callisaya

En cuanto a los resultados obtenidos acerca de las concentraciones de aflatoxina M1, en leche para los 4 productores en estudio de la comunidad de Callisaya, reflejados en la figura 36, se halló una concentración de 11.6 ppt en la leche producida por el productor 2, que con relación a las demás comunidades en estudio es el valor más alto en toda la investigación, sin embargo esto no supero el límite establecido por la UE de 50 ppt y más aún para la FDA de 500 ppt, siendo aun así un producto apto para el consumo y sin riesgo para la salud del consumidor.

Combita y Mildenberg (2009), en su estudio, acerca de la concentración de aflatoxina M1 en leche crudo, reporto los valores más altos en su estudio, con concentraciones de 15 ppt a 18 ppt, pero ninguna de las muestras supero el valor de establecido por la Unión Europea ni por la FDA, siendo así producto apto para el consumo y sin riesgo para la salud pública, datos similares a los hallados por el presente estudio.

Como se menciona anteriormente el riesgo de una incremento en la contaminación por aflatoxinas M1, puede presentarse en cualquier momento, a razón de que la mayoría de los productores de la zona mantienen un sistema de almacenado de forraje muy rustico y a la intemperie.

Al respecto Carrillo (2003), menciona que las aflatoxinas M1 y M2 son el producto metabólico hidroxilado de las B1 y B2, alrededor del 1% de la aflatoxina B1 consumida con el forraje, es excretada en leche como M1.

Por su parte Rosiles y bautista (2002), consideran que los factores que influyen en la concentración de AFM1 en la leche son: la raza de la vaca, la cantidad, la duración del consumo de alimento contaminado y el estado de salud del animal. Sin embargo, a todo esto se debe añadir el 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.

Cuadro N° 22. Absorbancia para la muestra de leche de la Planta Procesadora Estación Experimental Choquenaira y Central de acopio - Delizia lectura en espectrofotómetro a 450 nm.

E.E. Choquenaira – Central de acopio Delizia			
Centro de acopio	Absorbancia de la muestra	Absorbancia de la Replica	Absorbancia Promedio
E.E. Choquenaira	0,399	0,401	0,400
Central Delizia	0,387	0,390	0,3885

En el cuadro 22, se muestra la absorbancia entre replica y la muestra de la planta procesadora de la estación experimental de Choquenaira y la central de acopio de la empresa Delizia, los cuales no presentan una variación representativa, con relación a las absorbancias de la curva calibración del kit demostrando así la similitud con los valores de los estándares y que se encuentra dentro de las concentraciones correspondientes en el certificado de aseguramiento (anexo 2)

Cuadro N° 23. Resultados del coeficiente de variación, % de Absorbancia y concentración de Aflatoxinas M1 en ppt, de las muestras analizadas de la Planta Procesadora Estación Experimental Choquenaira y Central de acopio Delizia

E.E. Choquenaira – Central de acopio Delizia			
Centro de acopio	Coeficiente de Variación	(%) de Absorbancia	Concentración AFM1 (ppt)
E.E. Choquenaira	0,84	91,74	3,62
Central Delizia	0,54	89,11	4,95

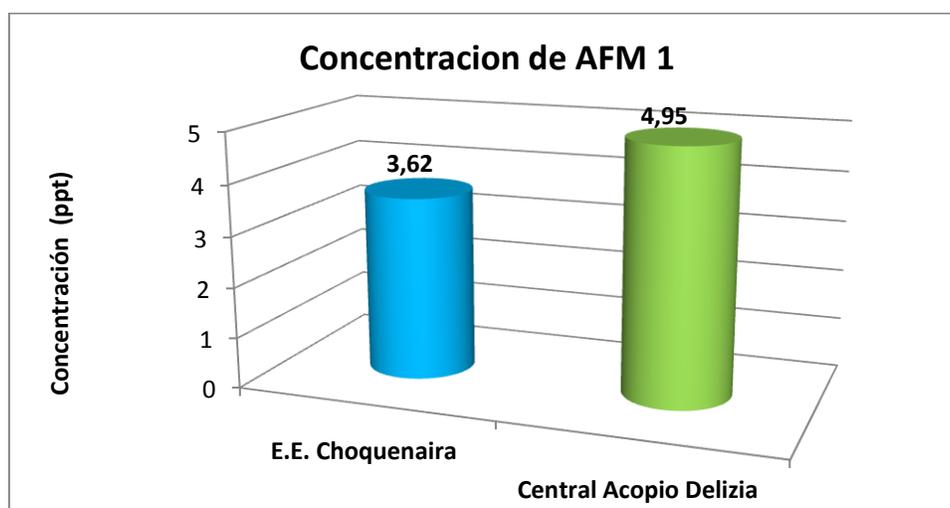


Figura N° 37. Concentraciones de AFM1 en centros de acopio de Estación Experimental Choquenaira y Central de acopio Delizia

Los resultados de la figura 37, expresan las concentraciones de aflatoxinas M1 de la E.E. Choquenaira y Central de acopio Delizia con valores de 3,62 y 4,95 ng/lit (ppt) respectivamente, en leche cruda sin procesar de una mezcla homogénea de las leches obtenidas. Sin embargo es importante destacar que los alimentos (henos) de

la E.E. Choquenaira, están dispuestos en un almacén con ventilación, además la mayor cantidad de alimento que se les proporciona a todo el hato lechero, en un sistema de pastoreo en la pradera nativa donde existe menor contaminación por *A. parasiticus* y *A. flavus* y en forma de ensilaje. Con esto se podría pensar que la contaminación de aflatoxinas, específicamente de AFB1, proviene de la cosecha de forraje almacenado en forma de heno. Sin embargo los valores anteriormente mencionados se encuentran por debajo de los límites permisibles establecidos por la Unión Europea y la Administración de Alimentos y Medicamentos con valores de 50 ppt y 500 ppt respectivamente. Por tanto se puede aseverar que la leche recolectada por el centro de acopio Delizia y la leche producida en la E.E. Choquenaira no presenta mayores peligros a la salud de los consumidores de leche fresca de estos proveedores.

Cuadro N° 24. Absorbancia para la muestra de leche pasteurizada de la empresas distribuidoras de La Paz (Delizia, Soalpro y Pil), lectura en espectrofotómetro a 450 nm.

Empresa Distribuidoras (Delizia, Soalpro y Pil)			
Empresa	Absorbancia muestra	Absorbancia Replica	Absorbancia Promedio
Delizia	0,366	0,369	0,368
Soalpro	0,394	0,374	0,384
Pil	0,392	0,372	0,382

En el cuadro 24, se observa los resultados de las absorbancia que se obtuvieron entre muestra y replica, de algunas las empresas distribuidoras de la ciudad de La Paz: Delizia, Soalpro y Pil, valores que en comparación a las absorbancias halladas de los estándares del kit, son similares, por tanto se encuentran dentro de las concentraciones de la curva de calibración.

Cuadro N° 25. Coeficiente de variación, % de Absorbancia y concentración de Aflatoxina M1 en ppt, de las muestras analizadas de las Empresas distribuidoras de La Paz (Delizia, Soalpro y Pil), lectura en espectrofotómetro a 450 nm.

Empresa Distribuidoras (Delizia, Soalpro y Pil)			
Empresa	Coeficiente de Variación	(%) de Absorbancia	Concentración AFM1 (ppt)
Delizia	0,57	84,29	10,7
Soalpro	3,68	88,07	6,6
Pil	3,7	87,62	6,63

En cuanto al coeficiente de variación hallado para las tres empresas los cuales se observan en el cuadro anterior, donde se rebeló valores de 0,57 a 3,7%, los cuales nos indican que existe un mínimo grado de variabilidad de las observaciones con respecto a la media general y además que las unidades experimentales tuvieron una manipulación excelente habiendo empleado eficientemente la metodología de detección de aflatoxinas M1 en leche.

Independientemente Gimeno (2004), considera que del método de análisis empleado, la determinación específica del nivel de aflatoxinas en un alimento implica generalmente: la recogida de una muestra representativa, la homogenización de la misma, la separación de una cantidad más pequeña a partir de la muestra original y el análisis posterior. El muestreo es un aspecto muy importante a la hora de realizar una valoración de la cantidad de aflatoxinas presentes en un alimento ya que puede ser fuente de un alto porcentaje de error. En este sentido, hay que tener en cuenta que la distribución de las aflatoxinas en los alimentos no suele ser homogénea, salvo en el caso de productos líquidos. Bajo esta aseveración se puede considerar que los datos obtenidos en el presente estudio de detección del contenido de alfatoxinas M1 en leche de las empresas distribuidoras en la ciudad de La Paz, tienen alta valides

debido que se analizaron muestras líquidas y se tuvo mucha eficacia en el empleo de la metodología habiendo mostrado un coeficiente de variación entre 0,57 a 3,7%.

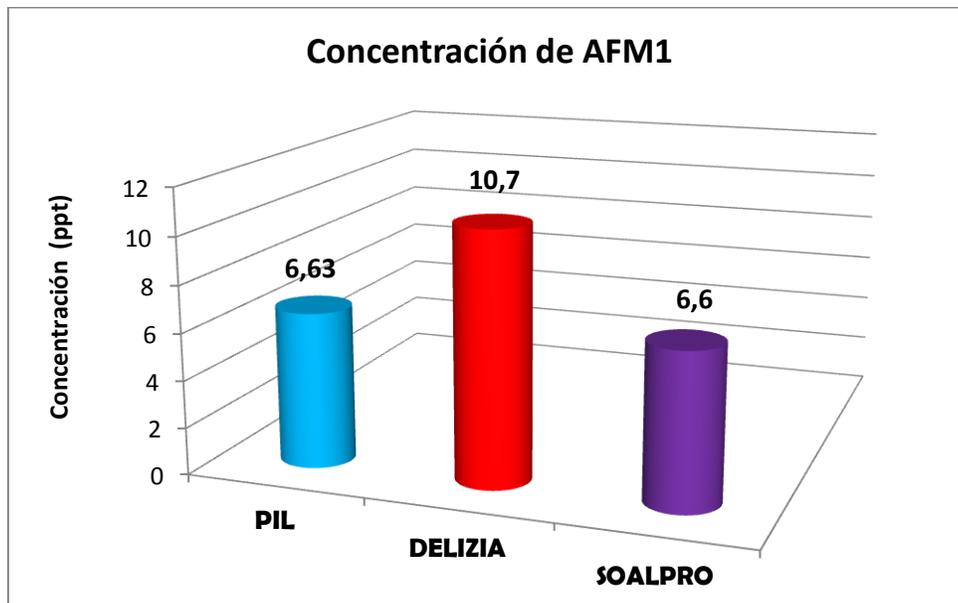


Figura N° 38. Concentraciones de AFM1 de las empresas distribuidoras de la ciudad de La Paz

Los resultados de la figura 38, corresponden a las muestras de tres empresas distribuidoras de leche fresca y productos lácteos. Donde el análisis de la concentración de aflatoxina M1, cuyos valores para cada una de ellas oscilan entre 6,6 a 10,7 ppt, por tanto se puede ver que muestras de leche ya pasteurizada también contienen niveles de contaminación por aflatoxinas M1, además podemos indicar que estos valores son un tanto superiores a los hallados en las muestras de las comunidades en estudio. no obstante estos resultados se encuentran por debajo de los establecidos por la UE y la FDA de 50 y 500 ppt en leche.

Por su parte Duarte (2004), aclara que muchos países han establecido niveles máximos de aflatoxina M1 en la leche y sus derivados de ahí que los países que no se preparen para producir con estos indicadores de calidad no tendrán oportunidad de entrar en el mercado internacional y estarán exponiendo a su población a un

agente posiblemente carcinogénico, tal como lo ha descrito la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC).

Sin embargo Escalona (2005), afirma que las aflatoxinas son potentes carcinógenos, mutagénicos y teratogénicos, y son grandes agentes destructores del sistema hepático, y que la más potente es la toxina B1 mientras que la M1 tiene una potencia diez veces menor.

El Comité científico de la Comunidad Europea indica que hay que valorar cuidadosamente los riesgos derivados de la exposición a estas micotoxinas, ya que la ingesta de leche y derivados entre lactantes y niños puede ser considerable. Los países que defienden el nivel máximo de 500 ppt de AFM1, afirmaron que se podrían producir consecuencias económicas negativas, debido a la dificultad de exportación de leche para países que solo aceptan el nivel máximo de 50 ppt. Sin embargo, no fue presentada ninguna información detallada de la magnitud, importancia, relevancia o impacto estimado de tales consecuencias económicas.

6. CONCLUSIONES.

En la actualidad en nuestro país se sigue considerando la presencia de mohos en los alimentos como un problema de apariencia o una molestia pasajera sin detenernos a pensar las consecuencias que pueden acarrear la presencia de ellos en los productos alimenticios.

Si bien el desarrollo óptimo de los hongos productores de aflatoxinas (*Aspergillus*) se da en condiciones ambientales tropicales y subtropicales, sin embargo el moho puede crecer desde 4°C hasta 45°C, mientras que la toxina puede ser producida desde 11°C hasta 35°C, con una temperatura óptima de 22°C y una humedad relativa del 80-90%.

En nuestra región las condiciones ambientales son limitantes para el desarrollo óptimo de la toxina empero en condiciones de almacenamiento del forraje son favorables e incluso se cumple con las condiciones óptimas de producción de toxinas y más aún si ponemos atención en el manejo rústico como los pilos, que son apilados de forrajes como cebada avena al aire libre pues los productores no cuentan con ambientes para almacenar sus forrajes.

Según los niveles de aflatoxinas B1 encontrados en las muestras de forraje de las 4 comunidades en estudio resultaron en un 80 % por encima de los valores establecidos por la Unión Europea (2 ppb), sin embargo según la tolerancia máxima permitidos en la FDA de los Estados Unidos (5 ppb), solo una muestra sobrepasó el límite con 7,77 ppb.

Si bien los estudios sobre aflatoxinas B1 en forrajes son escasos se ha detectado la presencia de la misma en alimentos como los cereales, castaña, maní, siendo estos más susceptibles a esta toxina presentando concentraciones mayores a 50 ppb.

La concentración de aflatoxina B1 es uno de los factores más importantes ya que la AFM1 es uno de sus derivados metabólicos que se presenta en la leche contaminándola, se estipula que la vaca puede transformar AFB1 en AFM1 dentro de las 12 a 24 horas de ingestión del alimento contaminado, incluso a las 6 horas ya pueden aparecer residuos de AFM1 en la leche, por tanto las concentraciones varían drásticamente y en corto tiempo.

En conclusión debe ser habitualmente evaluado la concentración de aflatoxina B1 en los forrajes y concentrados que se le suministre como alimento al animal.

En cuanto los niveles de concentración de aflatoxinas M1 en la leche de las 4 comunidades en estudio resultaron en su mayoría negativos, en una gran parte no detectables por el kit Elisa. Sin embargo se encontró una concentración de 11.6 ppt en la leche producida por el productor 2 de la comunidad de Callisaya, siendo esta la concentración más alta con relación a las demás comunidades en estudio y más aun a los valores establecidos por la Unión Europea (50 ppb), y la FDA de los Estados Unidos (500 ppb).

En cuanto a las empresas procesadoras de leche (Pil, Delicia, Soalpro), presentaron valores positivos pero en menor concentración (6.63, 10.7, 6.6) ppt respectivamente.

Los resultados de la presencia de AFM₁ en diferentes muestras de leche obtenidos por el método ELISA, se puede observar una baja incidencia, estas concentraciones están relacionadas a la época del año, ya que a fines de diciembre y principios de enero se corta el suministro de forraje almacenado al hato lechero pues con el inicio de las lluvias el ganado tiene a disposición forraje verde en las praderas, en cambio en época seca el hato lechero depende en su mayoría del forraje almacenado.

La población más preocupante sigue siendo los lactantes y los niños ya que tienen mayor riesgo, por tanto es de suma importancia reglamentar la concentración de aflatoxina M1 y o ajustarla a los parámetros existentes.

Se demostró en este estudio que existe incidencia de aflatoxinas M1 y B1 aunque en concentraciones menores no se debe subestimar el peligro que representa su presencia en los alimentos de consumo diario.

Finalmente en lo que respecta a la AFM₁, se debe continuar manteniendo el nivel de riesgo lo más bajo posible y estar siempre alerta.

7. RECOMENDACIONES

- Debido a la rusticidad en el almacenamiento de los forrajes para el ganado lechero en nuestro medio y a la presencia ineludible de aflatoxinas B1, se debe considerar la restricción de piensos contaminados a un porcentaje de la ración diaria de forma que la ingesta diaria de aflatoxina B1 no ocasione la presencia de residuos significativos de aflatoxina M1 en la leche, o en última instancia desviar el uso de piensos contaminados hacia animales no lecheros exclusivamente.
- El control, manejo adecuado y la prevención son el mejor método para reducir significativamente la presencia de aflatoxinas B1 en forrajes para el consumo del ganado, concientizando a los productores del peligro que representa.
- En nuestro país existe reglamentación en cuanto a la concentración de aflatoxinas totales (B1, B2, G1, G2) y otras micotoxinas en alimentos secos de mayor consumo como (maní, almendras, cacao y algunos cereales), sin embargo no se le presta la atención necesaria a productos como la leche y sus derivados por tanto, es preciso para Bolivia realizar una reglamentación conforme dictan los parámetros de la Unión Europea o de la FDA de los Estados Unidos para la concentración de aflatoxina M1 tanto para leche fresca como para derivados de la leche, asegurando así la salud de los consumidores.
- Es de vital importancia realizar análisis periódicos de aflatoxinas M1 en zonas con mayor producción lechera, en centros de acopio y las principales empresas distribuidoras de leche y derivados, ya que estos productos son destinados a lactantes que son la población de mayor importancia y la más susceptible a este tipo de toxinas.
- Realizar estudios similares en zonas con mayor producción lechera a nivel departamental y/o nacional, respecto a los niveles de aflatoxinas M1, para así obtener información que permitan establecer una reglamentación para esta toxina.

8. BIBLIOGRAFÍA

- **ARANGUREN, E. y ARGÜELLES, M., 2009.** Detección de Aflatoxina M1 en Quesos Frescos Comercializados en el Municipio de Yopal, Casanare, Mediante la Técnica de ELISA. Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. 26 p.

- ARELLANO. J., 2003.,** métodos de determinación, identificación y control de micotoxinas en ingredientes para la nutrición animal. Asociación Mexicana de Nutrición Animal (AMENA). Disponible en: dnormaliza@megared.net.mx, cofocalec@megared.net.mx

- **BAKIRCI, T., 1990.** “Uncertainties in the risk assessment of three mycotoxins: aflatoxins, ochratoxins, and zearalenone. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology.

- **BENNETT, J. y KLICH, M., 2003.** *Clinical Microbiology Reviews*.

- **BIOPHARM, 2011.** Manual de instrucciones de manejo para kit de Elisa RIDASCREEN Aflatoxin M130/15.

- **BUITRÓN, C., 2010.** Evaluación genotóxica de leche contaminada con Aflatoxina m1 por el test de mutación y recombinación somática (smart). Tesis de grado. Facultad de Agronomía, UMSA. La Paz, Bolivia.

- **CAC/RCP 45., 1997.** Código de Prácticas para Reducir la Aflatoxina B1 presente en las Materias Primas y los Piensos Suplementarios para Animales Productores de Leche. 3 p.

- **CARRILLO, L., 2003.** los Hongos de los Alimentos y Forrajes Aspergillus. Universidad Nacional de Salta. Salta, Argentina.

- **CÉSPEDES, A., 1997.** Desarrollo y estandarización de tres técnicas analíticas por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y determinación de los niveles de contaminación con aflatoxinas zearalenona y ocratoxina A en

materias primas y alimento terminado empleado para la nutrición de aves y cerdos en Colombia. Trabajo de grado en Salud y producción animal. Universidad nacional de Colombia.

- **COKER, R., 1997.** *NRI Bulletin 73*. Chatham, UK Natural Resources Institute.
- **COMBITA, A. Y MILDENBERG, 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. Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- **COMBITA, A., 2009.** Detección de Aflatoxina M1 en leches frescas comercializadas en la zona del valle del cauca (Colombia mediante la técnica de Elisa. Trabajo de pregrado. Pontificia Universidad Javeriana.
- **COMISIÓN DEL CODEX ALIMENTARIUS, 2003.** Código de práctica para prevenir y reducir la contaminación con micotoxinas en cereales, incluyendo apéndices relativos a la ocratoxina A, la zearalenona, las fumonisinas y los tricotecenos. CCA/RCP-2003. Publicación preliminar. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma, Italia.
- **CORNEJO, J. y VILLARROEL, O., 2005.** Antecedentes generales sobre las aflatoxinas y otras micotoxinas y elementos a tener en cuenta para el diseño de prácticas correctas de cultivo y elaboración de nueces. División de Políticas Públicas Saludables y Promoción. Departamento de Alimentos y Nutrición. Chile.
- **D'MELLO, J. y McDONALD, A., 1997.** *Anim Feed Sci. Technol.*
- **DENLI, M. y PEREZ., J., 2006.** **Contaminación Por Micotoxinas En Los Piensos: Efectos, Tratamiento y Prevención.** Departamento de Ciencia Animal y del Alimentos. Facultad de Veterinaria. UAB. Barcelona.

- **DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y ALIMENTACIÓN, 2004.** Ficha técnica detección de aflatoxinas, prácticas, ITDG. Tecnologías desafiando la contaminación. Disponible en: info@solucionesaflatoxinasmicotoxin.org.pe
- **DRIEHUIS, F.; OUDE-ELFERINK, S.; GOTTSCHAL, J.; SPOELSTRA, S., 2001.** Los procesos de fermentación del ensilaje y su manipulación. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/005/X8486S/x8486s00.HTM>
- **DUARTE, S., 2004.** Las micotoxinas, conceptos básicos y su perspectiva desde la salud pública veterinaria. Trabajo de Grado. Universidad Nacional de Colombia. Bogota, Colombia.
- **ELIKA., 2007.** Aflatoxina M1 En Leche. ELIKA fundación vasca para la seguridad alimentaria – Granja Modelo, s/n. 01192. Arkaute (Áraba). Disponible en: berri@elika.net
- **ELLIS, W.; SMITH, J.; SIMPSON, B. AND OLDHAM, J., 1991.** Aflatoxins in food: Occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control. Critical Reviews in Food Science and Nutrition.
- **ESCALONA, M., 2005.** Mycotoxins. Chemical, Biological and Enviromental Aspects. Ed. Elsevier. Bratislava, 350 p.
- **FAO., 2003.** Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones en el año 2003. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia. Disponible en: http://www.fao.org/es/ESN/index_en.stm
- **Food-Info.net, 2009.** Is an initiative of Wageningen University, The Netherlands Aflatoxinas Producidas por : *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*
- **FROBISH, R.; BRADLEY, D.; WAGNER, P.; LONG-BRADLEY Y HAIRSTON. H., 1986.** Aflatoxin residues in milk of dairy cows after ingestion of naturally contaminated grain.

- **GIMENO, A., 2004.** Aflatoxina M1 en la Leche Riesgo para la Salud Publica Prevención y Control. Dpto. Alimentación Animal. Colombia. Disponible en engormix.com.
- **GIMENO, A.; MARTINS, M., 2000.** Residuos de micotoxinas en leche, huevos y tejidos comestibles de aves, cerdos y rumiantes. 1º parte.
- **GOBIERNO DE ARANGO, 2009.** Micotoxinas y salud humana. Departamento de ciencias básicas de la salud, facultad de ciencias para la salud, universidad de Caldas. Marizales, Colombia.
- **GONZÁLEZ, F. y JUAN B., 2010.** Riesgos asociados al consumo de leche. Fundación eroski consumer. Disponible en:
- **HERNANDEZ, R. y SASTRE, A., 1999.** Tratado de Nutrición. P- 377.
- **HERRERA, M., 2003.** Técnicas analíticas para la detección y cuantificación de micotoxinas. CITA, ADRA. Departamento de ciencia, tecnología y Universidad. Gobierno de Aragon.
- **HESELTINE, C., 1976.** Conditions Leading to Mycotoxin Contamination of Foods Feed in Mycotoxins Other Fungal Related Food Problems. American Chemical Society, Washington. <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/ciencia-y-tecnologia/2001/11/528.php>
- **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.
- **JARVIS, B. AND WILLIAMS, A., 1987.** Methods for detecting fungi in foods and beverages. En "Food and beverage mycology". Ed. Beuchat. New York.
- **JORGE, P.; GODIO, L.; MIAZZO, R.; MAFFIOLI, R.; ECHEVARRÍA, A. Y PROVENSAL, P., 2001.** Valoración nutritiva de los alimentos y formulación de

dietas cursos de producción animal, FAV UNRC. Argentina Disponible en:
www.produccion-animal.com.ar

- **LARA, J., 2003.** Métodos de Determinación, Identificación y Control de Micotoxinas en Ingredientes para la Nutrición Animal. Asociación Mexicana de Nutrición Animal (AMENA). Disponible en:
- **MALLMANN, C. y DIKIN, P., 2007.** Micotoxinas e Micotoxicoses em Suínos.
- **MEDINA, J.; FIERRO, J.; MUÑOZ, J.; ALTAMIRANO, M.; LARA, J.; Y PÉREZ, R., 2009.** Situación actual de la tecnología analítica y los adsorbentes de micotoxinas.
- **MONTESANO, F., 2007.** Materias Primas para la Alimentación de Animales. (Fluorescencia y Elisa). Facultad De Medicina Veterinaria Y Zootecnia Escuela De Medicina Veterinaria. Universidad De San Carlos. Guatemala. Pág. 26.
- **MORENO, R., 2005.** Comunicación personal. Coordinador de Zoonosis en el Instituto Colombiano Agropecuario
- **OCHOA, R., 2007.** Diseños Experimentales, Facultad de Agronomía, Universidad Mayor de San Andrés. La Paz, Bolivia. 298 p.
- **PALENCIA, Y., 2002.** Los alimentos lácteos y sus limitaciones. Disponible en:
<http://Palenciayanettalimentoslacteosysuslimitaciones.pdf>
- **PAMPLONA, R., 1999.** Enciclopedia de los alimentos. Tomo I. P- 187
- **PARCI, L.; PAYNE, G.; DESJARDIN, A.; MARAGOS, C.; NORRED, W.; PESTKA, J.; PHILLIPS, T.; VAN EGMOND, H.; VARDON, P.; WHITAKER, T., Y WOOD, G., 2003.** Mycotoxins, risks in plant, animal and human systems', CAST Task Force Report 139. Council for Agricultural Science and Technology. Ames, Iowa, USA, p 101–103.
- **PARK, D. 2002.** "The concept of Food Safety". International Workshop on Mycotoxins. College Park, Maryland, USA.

- **PHILLIPS, T.; SARR, A.; Y GRANT, P., 2008.** Selective chemicasorption and detoxification of aflatoxinas by phyllosilicate clay. Natural Toxins.
- **PHILLIPS, T., 2004.** Reducing human exposure to aflatoxins through use of clays. 2008. XII International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. Istanbul, Turkey.
- **PRICE, N.; JOSEPHS, R.; KOEBER, R.; BERNREUTHER, A.; LINSINGER, T., Y SCHIMMEL, H., 1985.** Mycotoxins in Human and Animal Health. Technical Report, European Commission, Directorate XII: Science,
- **RASTOGI, S.; PREMENDRA, D.; DWIVEDI, K.; Y KHANNA, D., 2004** Detection of Aflatoxin M1 contamination in milk and infant milk products from Indian markets by ELISA. Science direct. Food Control 15.
- **RENDON, N., 2007.** Determinación de la Presencia del Gen Codificador de la Aflatoxina Producida por *Aspergillus Flavus* en la Castaña (*Bertholletia excelsa*), mediante la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Carrera De Bioquímica Mención Microbiología. Facultad De Ciencias Farmacéuticas Y Bioquímicas. UMSA. La Paz, Bolivia. 105 p.
- **REYES, B., sf.** Micotoxinas y Aflatoxina M1. Normalización del Consejo para el Fomento de la Calidad de la Leche y su Derivados, A.C. (COFOCALEC). Disponible en:
- **RODRÍGUEZ, M.; SALA, A. y SALAZAR, P., 2006.** Aflatoxinas - Cátedra de Toxicología. Universidad de Los Andes. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Venezuela.
- **ROJAS, O. y WILCHES, A., 2009.** Determinación De Aflatoxinas En Alimentos De Mayor Consumo Infantil Comercializados En La Ciudad De Pamplona, Norte De Santander. Revista de la Facultad de Ciencias Básicas Universidad de Pamplona. Pamplona, Colombia. Vol 7
- **ROJO, F. y KNASS, P., 2009.** El Impacto de las Micotoxinas en el Ganado Productor de Leche. Sitio Argentino de Producción Animal. Buenos Aires Argentina. Disponible en: www.produccion-animal.com.ar

- **ROSILES, M. y BAUTISTA, O. 2002.** Concentración de aflatoxinas M1 y B1 en alimento y leche de vacas que reciben alimento fresco y henificado. Departamento de nutrición y farmacia.
- **SALAZAR, L., 2008.** Determinación de la presencia de aflatoxinas en granos de maíz (*Zea mays*) producidos en Petén y distribuidos en la Central de Mayoreo de la ciudad capital, y elaboración de un Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos (APPCC). Tesis de grado. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad De San Carlos . San Carlos, Guatemala.
- **SANTOS, O., 2000.** Importancia y Efectos de la Aflatoxina en los Seres Humanos. Ciencias Básicas. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Bucaramanga. Bucaramanga, Colombia.
- **SASSAHARA, R.; RODRIGUEZ, M.; CALONGE, M.; ORDOÑEZ P.; y ESCUDERO, D. 2005.** "Immunotoxicity of Mycotoxins". *Journal of Dairy Science*, 76: 892-897.
- **SHARMA, R., 1993.** Immunotoxicity of Mycotoxins. *Journal of Dairy Science*.
- **SMITH, J. y ROSS, K., 1991.** The toxigenic *Aspergilli*. *Mycotoxins and Animal Foods*. Boca Ratón, Florida.
- **SMITH, J.; HILL, H., Y HAMILTON, P., 1991.** "The effect of dietary modifications on aflatoxicosis in the broiler chicken".
- **SMITH, T., 1982.** Influence of Mycotoxins on protein and Aminoacid Utilization. *Federation Proceedings*.
- **STOLOFF, L.; VAN EGMOND, H., Y PARK, D., 1991.** Rationales for the establishment of limits and regulations for mycotoxins. *Food Additives and Contaminants* 8, 213-222.
- **TURCONI, D.; MARGELES, A.; SANTANDER, F.; Y CARRITAS, M., 2004.** "Mycotoxin binders: What are they and what makes them work?". *Feedstuffs*, 18: 41-45.

- Universidad de Los Andes, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, 2009. Laboratorio de Toxicología de los alimentos. Buenos Aires, Argentina. Disponible en: www.labs.com/downloads/Mycotoxins/Aflatoxins.pdf.
- **WILLIAM, J. y WILSON, D., 1999.** Informe sobre el problema de Aflatoxinas de la Castaña (*Bertholletia excelsa*) en Bolivia. Chemonics International USAID/Bolivia. Santa Cruz, Bolivia. Pág. 4-5.

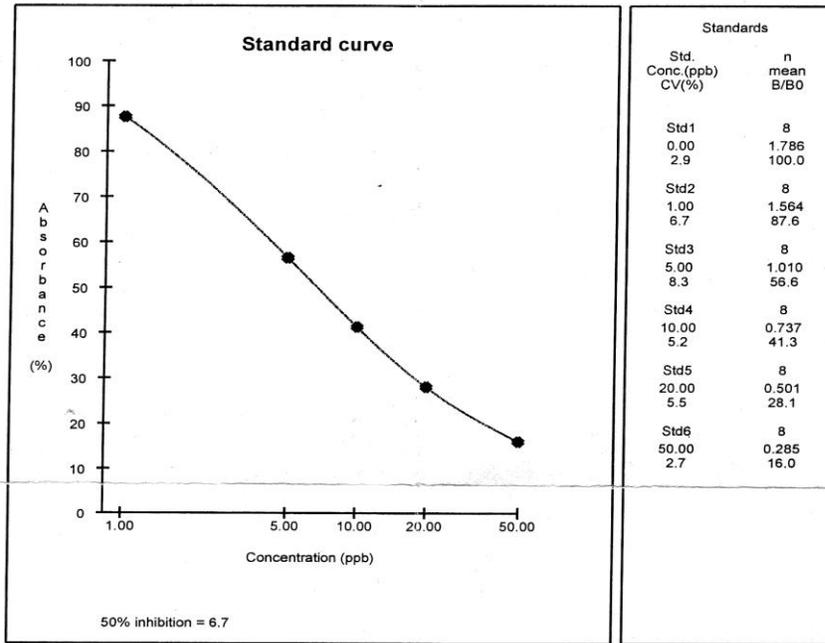
ANEXOS

QUALITY ASSURANCE CERTIFICATE

RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15

Art. No.: R1211 Lot: 13231 Expiry: 2012-07

R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany certifies that this batch has been approved by the Quality Assurance Department and conforms with specifications



	Lot No.	Expiry
MTP K	14201	2013-10
Standards	15221	2013-05
Conjugate	13051	2012-07
Antibody	12061	2012-07
Red Chromogen	14230	2014-04
Stop solution	14031	2015-12
Washing buffer salt	120M8208	2016-01

Please note:

The absorbance for the standards may decrease during the shelf life of the kit. The general shape of the curve will remain similar, while the slope might change slightly. Furthermore refer to product leaflet 8. Indication of instability or deterioration of reagents.

sign.: Edda Rohm
Quality Assurance Representative

Date: 2011-06-08

Remark:
This document has been created electronically and is therefore valid without a signature.

The R-Biopharm group is DIN EN ISO 9001 certified.



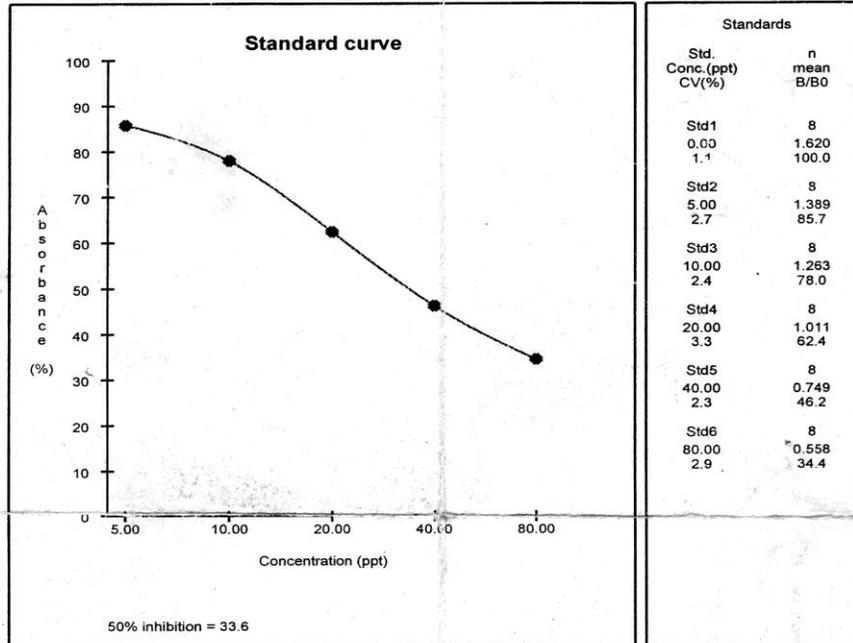
Anexo 1.CERTIFICADO DE CALIDAD KIT - RIDASCREEN AFLATOXIN B1.

QUALITY ASSURANCE CERTIFICATE

RIDASCREEN® Aflatoxin M1 30/15

Art. No.: R1111 Lot: 13091 Expiry: 2012-04

R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany certifies that this batch has been approved by the Quality Assurance Department and conforms with specifications



	Lot No.	Expiry
Microwell plate	14470	2012-10
Standards	13071	2012-10
Conjugate	12081	2012-04
Buffer1	13500	2012-11
Buffer2	13500	2012-11
Red Chromogen Pro	13480	2013-05
Stop solution	02449	2014-09
Washing buffer salt	039K8210	2014-06

Please note:

The absorbance for the standards may decrease during the shelf life of the kit. The general shape of the curve will remain similar, while the slope might change slightly. Furthermore refer to product leaflet 8. Indication of instability or deterioration of reagents.

sign.: Edda Rohm
Quality Assurance Representative

Date: 2011-03-02

Remark:
This document has been created electronically and is therefore valid without a signature.

The R-Biopharm group is DIN EN ISO 9001 certified.



ANEXO 3. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE FORRAJE



Muestreo y transporte de muestras de forraje



Molienda y preparado de una muestra homogénea



Pesaje de 5 gramos, para la realización del ensayo

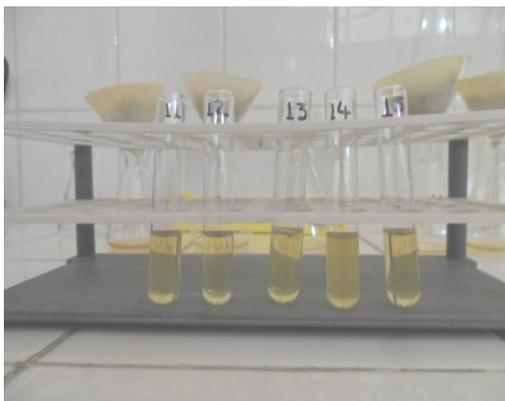
ANEXO 4. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO EN LABORATORIO



Adición de metanol al 70 % a la muestra y mezclado por agitación manual



Filtrado y obtención de la muestra líquida



Dilución de 1 ml del filtrado con 1 ml de agua destilada

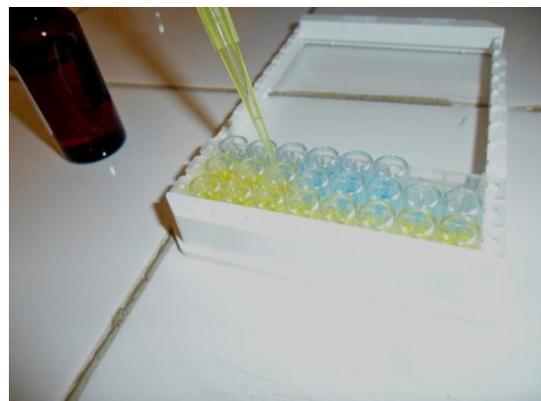
ANEXO 5. RECOLECCIÓN Y PROCESADO DE MUESTRAS DE LECHE



Recolección y transporte de muestras de leche



Lectura de temperatura a 10° C y centrifugación



Adición del sustrato cromogeno y el cambio de color al añadir la solución stop

ANEXO 6. DILUCIÓN DEL BUFFER DE LAVADO Y ACONDICIONAMIENTO DEL KIT RIDASCREEN A TEMPERATURA AMBIENTE



Preparación de buffer de lavado



Kit ridascreen y microplaca con pocillos sensibilizados con anticuerpos anti-aflatoxina

ANEXO 7. EQUIPOS PRECISOS PARA EL PROCESO DEL ENSAYO



Balanza analítica



Centrifugadora



Espectrofotómetro de microplaca 450 nm



Termómetro digital



Micropipetas de 20 μ l a 1000 μ l

ANEXO 10. GRAFICA DE CONCENTRACIONES DE AFLATOXINAS EN PAPEL SEMILOGARITMICO

