

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
CENTRO UNIVERSITARIO DE ORIENTE
ZOOTECNIA

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central figure of a man on horseback, holding a staff. Above him is a shield with a crown on top. The shield is supported by two figures. The entire scene is enclosed within a circular border containing the Latin text "SACRIS CONSPICUA CAROLINA ACADEMIA COACTEMALENSIS INTER".

INCIDENCIA DE AFLATOXINA M1 EN LECHE FLUIDA DE VACA EN
LOS EXPENDIOS DEL MUNICIPIO DE ESQUIPULAS,
DEPARTAMENTO DE CHIQUIMULA

JOSÉ RENÉ PINTO ESPAÑA

CHIQUIMULA, GUATEMALA, MAYO DE 2012

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
CENTRO UNIVERSITARIO DE ORIENTE
ZOOTECNIA**

**INCIDENCIA DE AFLATOXINA M1 EN LECHE FLUIDA DE VACA EN
LOS EXPENDIOS DEL MUNICIPIO DE ESQUIPULAS,
DEPARTAMENTO DE CHIQUIMULA**

TRABAJO DE GRADUACIÓN

PRESENTADA AL HONORABLE CONSEJO DIRECTIVO

POR

JOSÉ RENÉ PINTO ESPAÑA

EN EL ACTO DE INVESTIDURA COMO

ZOOTECNISTA

EN EL GRADO ACADÉMICO DE LICENCIADO

CHIQUIMULA, GUATEMALA, MAYO DE 2012

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
CENTRO UNIVERSITARIO DE ORIENTE
ZOOTECNIA



RECTOR
LIC. CARLOS ESTUARDO GÁLVEZ BARRIOS

CONSEJO DIRECTIVO

Presidente:	M.Sc. Nery Waldemar Galdámez Cabrera
Secretario:	Lic. Tobías Rafael Masters Cerritos
Representante de Docentes:	M.Sc. Felipe Nery Agustín Hernández M.Sc. Edgar Arnoldo Casasola Chinchilla
Representante de Egresados:	Lic. Zoot. Genesio Alberto Orellana Roldán
Representante de Estudiantes:	Br. Eibi Estephania Lemus Cruz MEPU. Leonel Oswaldo Guerra Flores

AUTORIDADES ACADÉMICAS

Coordinador Académico:	Ing. Agr. Edwin Filiberto Coy Cordón
Coordinador Zootecnia	Lic. Zoot. Merlin Wilfrido Osorio López

TERNA EVALUADORA

M.V. Mynor Vinicio Galicia de León
M.V. Lesbia Albertina Calderón Aguirre
M.V. Gustavo Adolfo López

Chiquimula, Mayo del 2012.

Señores:

Consejo Regional

Centro Universitario de Oriente

Presente,

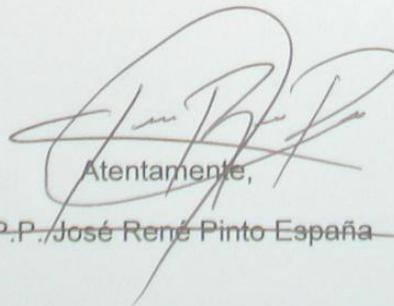
Respetables señores:

En cumplimiento a lo establecido por los estudios de la Universidad de San Carlos de Guatemala y el Centro Universitario de Oriente, presento a consideración de ustedes el trabajo de tesis titulado:

“INCIDENCIA DE AFLATOXINA M1 EN LECHE FLUIDA DE VACA EN LOS EXPENDIOS DEL MUNICIPIO DE ESQUIPULAS, DEPARTAMENTO DE CHIQUIMULA”.

Como requisito previo a optar al título de Zootecnista, en el Grado de Académico de Licenciado.

Esperando que el presente trabajo de investigación llene los requisitos para su aprobación,



Atentamente,

T.P.P. José René Pinto España



USAC
TRICENTENARIA
Universidad de San Carlos de Guatemala

Universidad de San Carlos de Guatemala
Centro Universitario de Oriente
CARRERA ZOOTECNIA



Chiquimula, mayo de 2012.

Señor Director:
Nery Waldemar Galdámez Cabrera, M. Sc.
Centro Universitario de Oriente
Universidad de San Carlos de Guatemala

Señor Director.

En atención a la designación efectuada por la Comisión de Trabajos de Graduación, de la Carrera de Zootecnia para asesorar al: **TPP JOSÉ RENÉ PINTO ESPAÑA**, en el trabajo de graduación intitulado: **“INCIDENCIA DE AFLATOXINA M₁ EN LECHE FLUIDA DE VACA EN LOS EXPENDIOS DEL MUNICIPIO DE ESQUIPULAS, DEPARTAMENTO DE CHIQUIMULA”**. Tengo el agrado de dirigirme a usted, para informarle que he procedido a revisar y orientar al mencionado sustentante sobre el contenido de dicho trabajo.

En ese sentido el tema desarrollado, permite establecer el riesgo de que la leche fluida de la región tenga aflatoxinas M₁ lo cual provoca un efecto tóxico en el ser humano, por ello la presente investigación debe marcar uno de los temas a discutir y difundir a nivel nacional para buscar los correctivos en la alimentación animal.

Por lo que en mi opinión este trabajo reúne los requisitos exigidos por las normas pertinentes; razón por la cual recomiendo su aprobación para su sustentación en el Examen General Público, previo a optar al título de Zootecnista en el grado académico de Licenciado.

“ID Y ENSEÑAD A TODOS”

M.C. Raúl Jáuregui Jiménez
Asesor Principal



EL INFRASCRITO DIRECTOR DEL CENTRO UNIVERSITARIO DE ORIENTE DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA, POR ESTE MEDIO HACE CONSTAR QUE: Conoció el documento de la investigación que efectuó el estudiante **JOSÉ RENÉ PINTO ESPAÑA** titulado **“INCIDENCIA DE AFLATOXINA M1 EN LECHE FLUIDA DE VACA EN LOS EXPENDIOS DEL MUNICIPIO DE ESQUIPULAS, DEPARTAMENTO DE CHIQUIMULA”**, trabajo que cuenta con Comisión de Trabajos de graduación de la carrera de Zootecnia. Por tanto, la Dirección del CUNORI con base a las facultades que le otorga las Normas y Reglamentos de Legislación Universitaria **AUTORIZA** que el documento sea publicado como Trabajo de Graduación, a Nivel de Licenciatura, previo a obtener el título de Zootecnista.

Se extiende la presente en la ciudad de Chiquimula, a dieciséis de mayo de dos mil doce.

“ID Y ENSEÑAD A TODOS”



MSc. Nery Waldemar Galdamez Cabrera
DIRECTOR
CUNORI - USAC



c.c. Archivo

ars

ACTO QUE DEDICO

A DIOS: Todo poderoso.

A mis padres: Alberto René Pinto Morales (+), Elvia Amparo España de Pinto (+).

A mis hermanos: Brenda Yadira, Mara Eugenia, Nancy Roselia.

A mi esposa: Dina Carlota Hernández de Pinto.

A mis sobrinos

A tíos, primos y familia en general.

A mis amigos en general.

A mis amigos en especial: Gerson Alfredo Barahona Salguero, Juan Carlos Argueta Martínez.

A mis compañeros de estudio en general.

AGREDECIMIENTOS

A **Dios**, fuente de sabiduría, perseverancia y salud durante todo el proceso de formación profesional.

A **mis padres**, por su apoyo económico, moral y la comprensión por creer en mi interés de salir adelante en la vida profesional, quienes ya partieron a la presencia del Altísimo y desde su sueño eterno comparten mi triunfo.

A **mis hermanas** por darme su cariño y apoyo incondicional en todo momento y el aliento cuando más lo necesitaba.

A **mi esposa** Quien me brindo su amor, su cariño y su estímulo constante.

A **mis cuñados (a)**, en especial a Erick Cuevas, gracias por su su ayuda y apoyo incondicional.

A **mis asesores** M.Sc. Raúl Jáuregui Jiménez, Lic. Zoot. Luis Cordón.

A **los docentes de la carrera de Zootecnia** por transmitirme sus conocimientos e influir en mi formación profesional y personal.

A **los miembros de la terna evaluadora**: Mv. Lesvia Calderón, Mv. Gustavo López, Mv. Mynor Galicia.

A la **UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA y CENTRO UNIVERSITARIO DE ORIENTE** por abrirme las puertas y ayudar en el fortalecimiento profesional.

A **mis amigos**, Helka Cuevas, Bernardo Loyo, Pedro Cerritos, Wilmer García y Javier Mérida por acompañarme en todo el proceso de formación, animándome a seguir adelante.

ÍNDICE

<u>Contenido</u>	<u>Pág.</u>
Índice general	i
Índice de cuadros	ii
Índice de figuras	iii
Resumen	iv
I. Introducción	01
II. Planteamiento del problema	03
III. Justificación	04
IV. Objetivos	05
V. Hipótesis	06
VI. Marco teórico	07
6.1 Generalidades	07
6.2 Historia	08
6.3 Descripción Aflatoxina M1	09
6.4 Características de la micotoxicosis	10
6.5 Principales micotoxinas en alimentos	11
6.6 Micotoxinas de importancia mundial	12
6.7 Agentes productores de micotoxinas	13
6.8 Producción de micotoxinas	13
6.8.1 Factores físicos	14
6.8.2 Factores químicos	14
6.8.3 Factores biológicos	14
6.9 Impacto sobre la salud y productividad de los animales	14
6.10 Impacto económico de Aflatoxinas	16
6.11 Impacto sobre la salud pública	17
6.12 Influencia del cambio climático	18

6.13 Legislación Aflatoxina M1	18
6.14 métodos para detectar Aflatoxinas M1	19
VII. MARCO METODOLÓGICO	20
7.1 Población	20
7.2 Muestra	20
7.3 Técnicas de observación	21
7.4 Técnicas de recolección y análisis de datos	22
7.4.1 Técnicas de recolección de datos	22
a. Identificación	22
b. Aleatorización	22
7.5 Técnicas de análisis de datos	22
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
IX. CONCLUSIONES	30
X. RECOMENDACIONES	31
XI. BIBLIOGRAFÍA	32
XII. ANEXOS	36

ÍNDICE DE CUADROS

EN EL CONTENIDO

CUADRO No.	DESCRIPCIÓN	Pág.
1.	Concentraciones de Aflatoxina B1 en alimento completo en diferentes especies animales.	11
2.	Mohos y micotoxinas de importancia mundial	12
3.	Afecciones en el hombre provocada por la ingestión de Micotoxinas.	15
4.	Rangos establecidos por Kit para determinación de Aflatoxina M1 con el método de ELISA directa.	23

EN EL APÉNDICE

A5	Cronograma de actividades	36
A6	Análisis de varianza para la variable de presencia de Aflatoxina M1.	36
A7	Cuadro 3. Niveles máximos tolerados para las micotoxinas en los alimentos, en los productos lácteos y en las raciones animales (encuesta 2002/2003).	37
A8	Codificación, resultados y conversión a ppt de laboratorio de las muestras colectadas.	38
A9.	Presupuesto general de costo de la investigación.	39

- A10. Curva de distribución de los datos de leche fluida y límite permisible de Aflatoxina M1. 40
- A11. Mapa de ubicación de los expendios de leche del Municipio de Esquipulas, departamento de Chiquimula. 41

ÍNDICE DE FIGURAS

EN EL TEXTO

FIGURA No.	DESCRIPCIÓN	Pág.
1.	Biotransformación de la aflatoxina B1 en M1	10
2.	Comportamiento de los resultados obtenidos en Análisis para Aflatoxinas M1 con el método ELISA directa, en el municipio de Esquipulas, departamento de Chiquimula, 2011.	26
3.	Cantidad de muestras positivas y negativas de Aflatoxina M1 en la leche fluida de bovinos, colectada en el municipio de Esquipulas, departamento de Chiquimula.	27
4.	Cantidad de muestras que presentan contaminación permitidas y no permitidas de aflatoxina M1 en leche fluida de bovino del municipio de Esquipulas, departamento de Chiquimula.	28

EN EL APÉNDICE

A5.	Boleta de resultados de Prueba Elisa Aflatoxin M1 en lector de placas.	42
A6.	Reactivos del Kit para Aflatoxina M1 con el método ELISA directo.	43

A7.	Recolección de muestras de expendios en el municipio de Esquipulas, departamento de Chiquimula.	43
A8.	Equipo utilizado para separación de ácidos grasos en laboratorio de Bromatología de la carrera de Zootecnia del Centro Universitario de Oriente de la Universidad de San Carlos de Guatemala.	44
A9.	Extracción de leche de los recipientes de recolección.	44
A10.	Centrifugación de leche colectada previo a su transporte al laboratorio de Inmuno Diagnóstico de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.	45
A11.	Extracción del suero ya centrifugado de los vacutainer para colocarlo en los viales.	45
A12.	Placa y estándares del Kit Elisa utilizado para el análisis.	46
A13.	Realización de análisis de laboratorio con el Kit para Aflatoxina M1 con el método ELISA directa.	46
A14.	Aplicación del conjugado a cada uno de los pozos.	47
A15.	Lavado de los pozos con la solución PBS Tween.	47
A16.	Reacción de aplicación del sustrato de enzima.	48
A17.	Calibración y lectura de datos presentados por lector de placas Elisa.	48

Pinto, J. 2012. Incidencia de aflatoxina M1 en leche fluida de vaca en los expendios del municipio de Esquipulas, departamento de Chiquimula. Tesis Lic. Zoot. Chiquimula, GT, USAC, CUNORI. 48 p.

Palabras claves: Aflatoxina, micotoxina, micotoxicosis, leche, vaca, expendios, Kit Elisa Aflatoxin M1, incidencia, carcinogénicos, mutagénicos, teratogénicos, hepatotóxicos.

RESUMEN

El presente trabajo se realizó con el fin de determinar la incidencia de aflatoxina M1 en leches fluidas que se distribuyen en el municipio de Esquipulas, departamento de Chiquimula.

La contaminación con micotoxinas afecta de forma general a gran cantidad de ingredientes y piensos utilizados en alimentación animal. Aunque se producen con más frecuencia en las regiones con clima cálido y húmedo, propicio para el crecimiento de los mohos. Por otro lado, es importante destacar el enorme riesgo que representa para la salud humana la presencia de micotoxinas en los productos animales, como consecuencia del consumo por el animal de piensos contaminados.

Se generó información sobre la incidencia de aflatoxina M1, en la leche fluida de vaca producida en las explotaciones lecheras bovinas del municipio de Esquipulas, departamento de Chiquimula.

Determinando a través del método Elisa directa, en la leche fluida de los diferentes expendios lecheros de la ciudad de Chiquimula; se concluye que el 58% de las muestras colectadas muestran presencia de aflatoxina M1 y el 42% no exhibe ninguna presencia. Un porcentaje de incidencia del 92% de los casos muestreados en el mes de octubre del año 2011, y el 8% presenta niveles superiores al límite, según la reglamentación de la Unión Europea, considerándose no apta para el consumo humano.

Dado el carácter explotario de la presente investigación, es importante impulsar que instituciones como el MAGA, profundicen en la investigación en los centros urbanos como a nivel de la industria láctea nacional, importada y otras fuentes.

I. INTRODUCCION

Las micotoxinas son metabolitos secundarios fúngicos que se asocian a ciertas enfermedades en animales y seres humanos. La toxicidad producida en animales es tan diversa, como las especies fúngicas que producen estos compuestos. Además de ser compuestos muy tóxicos, algunas micotoxinas se relacionan con ciertos tipos de cáncer hepático y otras enfermedades, este aspecto es el que ha llevado a evocar la inocuidad tanto en los animales como el humano, para tomar precauciones sobre los alimentos.

En la actualidad existen distintos tipos de micotoxinas asociados a intoxicaciones alimentarias; se conocen más de una veintena de aflatoxinas distintas pero relacionadas estructuralmente. Estas toxinas provienen tanto del metabolismo de los hongos aflatoxigénicos, como de las transformaciones que sufren estos compuestos al ser ingeridos y metabolizados por los animales. Sin embargo, la mayor parte de los estudios realizados sobre estas micotoxinas, desde su descubrimiento hasta la actualidad, se han referido fundamentalmente a las aflatoxinas B1, B2, G1, G2, M1 y M2.

Sólo ciertas cepas de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* son capaces de sintetizar aflatoxinas, cuando las condiciones ambientales y nutricionales son las adecuadas. No obstante, las cepas aflatoxigénicas del género *Aspergillus*, son muy comunes y están ampliamente distribuidas en la naturaleza, sobre todo en zonas de clima cálido y húmedo. Esto aumenta en gran medida el riesgo de contaminación de alimentos, por hongos capaces de sintetizar estas sustancias.

Por lo tanto la inocuidad de la leche fluida se ve afectada, por el forraje con que se alimenta el ganado, que está contaminado o enmohecido, en el cual existe proliferación de hongos del genero *A. flavus*, que producen la Aflatoxina B1 (AFB1). Al ingerir las vacas lecheras estos alimentos o raciones contaminadas con AFB1.

Se estima que el 25% de la producción mundial de cereales se encuentra contaminada con algún tipo micotoxinas. Se ha demostrado el efecto carcinogénico, teratogénico e inmunosupresor de ambas aflatoxinas en diferentes especies, lo que ha permitido que la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) haya clasificado a las aflatoxinas B1 y M1 en el grupo 1 como carcinógenos humanos.

A pesar del riesgo que involucra en la salud pública, la contaminación de un alimento tan importante como la leche con este metabolito, pocos o ningún estudio han sido realizados en el país, para evaluar su presencia en la leche cruda; por tal razón, se propone la realización de la siguiente investigación, la cual determinó el grado de contaminación con aflatoxina M1, en la leche fluida de los expendios del municipio de Esquipulas, departamento de Chiquimula; utilizando el kit para aflatoxinas M1, con el método ELISA directa.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La FAO y la Organización Mundial de la Salud (2003), han definido a las aflatoxinas B1 y M1 como potentes carcinógenos humanos, sin embargo, existen pocos datos acerca de la toxicología y/o contaminación de los alimentos concentrados para animales de cría y los derivados de origen animal.

Últimamente se ha argumentado acerca de enfermedades transmitidas por alimentos contaminados con aflatoxinas, lo que demuestra la importancia y repercusión de este tema en la inocuidad de los alimentos y en la salud pública.

Desde la perspectiva más general, las enfermedades transmitidas por los alimentos con aflatoxina, afectan la salud en forma importante y más gravemente a niños, mujeres embarazadas, ancianos y a personas ya afectadas por otras enfermedades. Miles de millones de animales y personas se enferman y muchas mueren como resultado de la ingesta de alimentos no inocuos.

Los brotes probablemente sean el único aspecto más visible de un problema más amplio y más persistente, es decir, los efectos son difíciles de vincular con un alimento en particular y no se manifiestan como epidemia repentina sino que silenciosamente van dañando al organismo y por ende, originan a largo plazo males como el cáncer, síndromes gastrointestinales y nefrológicos, inmunosupresión, entre otros.

Es evidente entonces, que la falta de información en Guatemala, referente a enfermedades de transmisión alimentaria (Aflatoxicosis), tanto en humanos como en animales, es el mayor impedimento para llevar a cabo intervenciones gubernamentales fundamentadas en datos.

III. JUSTIFICACION

Guatemala es un país que posee un clima tropical, y por ende la existencia de mohos como el *Aspergillus flavus* y el *Aspergillus parasiticus*, es considerada casi inevitable, estos mohos se consideran unos de los principales productores de aflatoxinas. Dichos mohos pueden producirse en la alimentación del ganado bovino, y al consumirla puede infectarse e iniciar la producción de aflatoxinas M1, que llegarán a la leche fluida, por esta razón las aflatoxinas se convierten en un problema para la población guatemalteca, debido a que ésta, en su mayoría incluye leche bovina cruda en su alimentación diaria.

Estas toxinas son el carcinógeno más potente producido en la naturaleza, por los diferentes cambios climáticos, que se traduce en el estrés de las plantas productoras de granos, aunado con la falta de manejo y prevención por parte de los productores de ganado; ocasionando efectos mutagénicos teratogénicos y hepatotóxicos en los animales, afectando inclusive a los humanos que consumen productos lácteos contaminados.

Debido a que no existe información sobre la contaminación de leche fluida con aflatoxina M1 en Guatemala, es necesario investigar sobre la presencia de ésta, por el riesgo que presenta en el consumo humano, debido a que son causales de la mayor actividad carcinogénica hasta ahora descubiertas.

Por tal razón y tomando en cuenta la cantidad de leche que se produce en el municipio de Esquipulas, del departamento de Chiquimula, es necesario realizar pruebas que determinen la presencia de aflatoxinas M1 en los expendios lecheros, utilizando pruebas confiables y modernas que presente datos fidedignos del análisis.

IV. OBJETIVOS

General:

- ✓ Determinar la incidencia de aflatoxinas M1 en la leche fluida bovina, que se comercializa en los expendios del municipio de Esquipulas departamento de Chiquimula.

Específicos:

- ✓ Establecer la población total de expendios de leche fluida entera de bovino, existentes en el municipio de Esquipulas, Chiquimula, como población sujeta a estudio.
- ✓ Determinar la incidencia de aflatoxina M1 por el método ELISA Directo, en la leche fluida de los expendios lecheros del municipio de Esquipulas departamento de Chiquimula.

V. HIPOTESIS

Al menos una de las muestras colectadas en los expendios lecheros del municipio de Esquipulas, departamento de Chiquimula, evidencia la existencia de aflatoxina M1, en nivel alto de toxicidad.

VI. MARCO TEORICO

6.1 Generalidades

Las micotoxinas son compuesto policetónicos resultantes de las reacciones de condensación, que tienen lugar cuando en determinadas condiciones físicas, químicas y biológicas, se interrumpe la reducción de los grupos cetónicos en la biosíntesis de los ácidos grasos realizada por los mohos. Estos ácidos grasos son metabolitos primarios utilizados por los mohos como fuente de energía. Las micotoxinas se suelen formar al final de la fase exponencial, o al principio de la fase estacionaria del crecimiento del moho (Gimeno *et al.* 2003).

Se han identificado hasta ahora más de 200 Micotoxinas, sin embargo, las que se pueden encontrar de una forma más frecuente, como contaminantes naturales en los alimentos para animales y para humanos, son: aflatoxinas, ocratoxinas, zearalenona, toxinas tricotecenas (toxina T-2, diacetoxyscirpenol, deoxinivalenol o vomitoxina, nivalenol, monoacetoxyscirpenol, triacetoxyscirpenol), citrinina, patulina, ácido penicílico, sterigmatocistina, toxinas de alternaría (alternariol, alternariol monometil éter, alténuene, alténuisol, etc.), alcaloides del cornezuelo del centeno (ergotamina, ergotoxina, ergometrina), toxinas tremorgénicas (penitrem A y B), rubratoxinas A y B, luteoskirina, islanditoxina, rugulosina, citreoviridina y fumonisinas B1 (Gimeno *et al.* 2003).

Todas ellas reportan en mayor o menor grado, una serie de cuadros clínicos patológicos, trastornos y efectos tóxicos en los animales y en los humanos de forma a ocupar un lugar muy importante en el mundo de los alimentos (Gimeno *et al.* 2003).

Permanentemente aparecen problemas en el mundo asociados a las aflatoxinas como por ejemplo, la muerte repentina de cien mil pavos alimentados con maní infectado con aflatoxina, en Escocia, 1960. Las aflatoxinas pueden encontrarse como contaminantes naturales en los cereales (esencialmente, en el maíz, trigo y arroz) y subproductos de cereales, (algodón, cacahuete, coco, girasol y otros), y toda

una serie de alimentos, para humanos de los que destacamos productos de cereales, frutos secos, productos de salchichería, especias, vinos, leguminosas, frutas, leche y derivados. (Gimeno 2005).

Están presentes en casi la totalidad de las materias primas y alimentos utilizados en la alimentación de animales. Se pueden encontrar en cualquier punto de la cadena alimenticia, desde la siembra y cosecha hasta en la carne y leche que se consume (Bolet y Socarrás 2005).

Los elementos básicos que predisponen el desarrollo de micotoxinas son: humedad, el oxígeno, el tiempo, la temperatura y un sustrato o medio favorable donde desarrollarse. Se debe recordar que la temperatura óptima para el desarrollo de la mayoría de los hongos, se ubica entre los 20° C a 25° C y con niveles de humedad del 15%. La presencia de más de una toxina en un alimento, puede no solo complicar el cuadro de detección del origen del problema, sino agravar la sintomatología y las consecuencias productivas (Saavedra 2008).

Las aflatoxinas han sido asociadas a varias enfermedades, tales como: aflatoxicosis en ganado, animales domésticos y humanos por todo el mundo. La presencia de aflatoxinas depende de ciertos factores ambientales; y además el nivel de contaminación variará con la localización geográfica, de las prácticas agrícolas, y de la vulnerabilidad de las instalaciones a la invasión, por parte de los hongos antes de los periodos de cosecha, del almacenaje, y del procesado (Saavedra 2008).

6.2 Historia

Los primeros casos de micotoxicosis conocidos, datan de la Edad Media, en que se registraron epidemias por ergotismo; cuya enfermedad está provocada por el consumo de centeno, contaminado por *Claviceps purpurea*, también conocida como cornezuelo de centeno. Las micotoxinas pueden producir brotes de distintas enfermedades conocidas como micotoxicosis (Bolet y Socarrás 2005).

Más recientemente, se han descrito otros casos de micotoxicosis, destacar la aleukia alimentaria tóxica de 1947, producida por la ingestión de granos infectados con *Fusarium poae* y *Fusarium sporotrichioides* (Toubes 2005).

El término "aflatoxinas" fue acuñado a comienzos del decenio de 1960, cuando miles de pavos, patos y otros animales domésticos, murieron a causa de una enfermedad (conocida como "enfermedad X de los pavos"), que se atribuyó a la presencia de toxinas de *Aspergillus flavus* en harina de maní importada de Sudamérica (FAO 2003).

(Bolet y Socarrás 2005), coincide que el estudio de los hongos como tóxicos, se inició en los años 60, con una intoxicación masiva que provocó la muerte de 100 000 aves en Inglaterra, por la ingestión de pienso preparado con harina de maíz contaminada con *A. flavus*, detectándose un metabolito altamente tóxico al que denominaron aflatoxina, que poco tiempo después produjo la muerte a 106 personas de 397 que se intoxicaron.

Según la (FAO 2003), el término micotoxina deriva de las palabras griegas "mykes" (hongos) y "toksicons" (veneno).

6.3 Descripción Aflatoxina M1

La AFM1 es el primer producto conocido procedente de la metabolización de las aflatoxinas, y es excretada en la leche de las hembras de mamíferos que consumen AFB1 en la dieta. Debido a esto, es muy importante el control 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 (Combita y Mildemberg 2009).

La aflatoxina B1 es uno de los hepatocarcinógenos más potente conocido, sólo basta ingerir 15 mg/kg diariamente, para ocasionar cáncer, siendo excretada como aflatoxina M1 en leche u orina al hidroxilarse el carbono 4 (Figura 1) (Valle 2000).

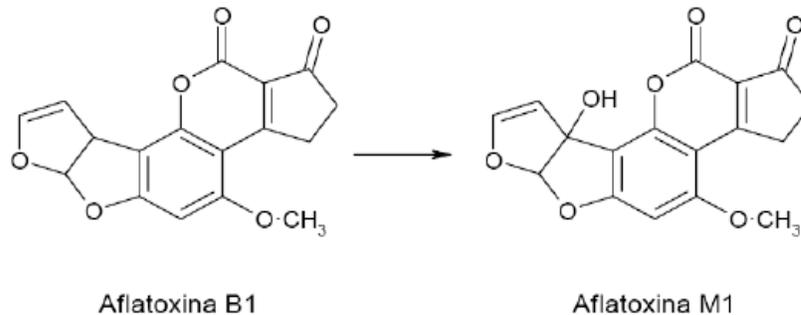


Figura 1 Biotransformación de la aflatoxina B1 en M1 (Combita Mildember 2009).

Tanto la aflatoxina B1 como la aflatoxina M1, son compuestos hepatotóxicos y carcinogénicos, y sus efectos sobre la salud pública constituyen una permanente preocupación. La presencia de aflatoxina M1 ha sido reportada en la leche materna y su detección es considerada como un biomarcador de exposición a la aflatoxina B1 (FAO 2003).

6.4 Características de la Micotoxicosis

- no es una enfermedad transmisible,
- en los brotes observados en el campo, el problema es estacional, debido a que las condiciones climáticas afectan al desarrollo del moho,
- el brote está comúnmente asociado a un alimento o forraje,
- el examen del alimento o forraje sospechoso revela signos de actividad fúngica,
- resistente al calor,
- no los destruye el proceso de cocción,
- no son antigénicas, por lo contrario disminuyen la resistencia de los animales a las enfermedades,

- los propionatos, previenen el crecimiento del hongo pero no tienen efecto sobre las micotoxinas,
- son carcinógenas, mutagénicas, teratogénicas y embriotóxicas, tanto en humanos como a los animales. (Saavedra 2008).

6.5 Principales Micotoxinas en alimentos

Respecto a la Aflatoxina B1, vemos que todas las especies animales son sensibles a la acción tóxica de esta micotoxina, en especial los animales jóvenes (Gimeno, 2011). La Unión Europea establece las siguientes concentraciones máximas permitidas de aflatoxinas B1 en alimentos compuestos y materias primas. Cuadro No. 1.

Cuadro 1: Concentraciones de Aflatoxina B1 en partes por billón (ppb), en alimento completo en diferente especies animales (Gimeno 2011).

Animales	Ppb
Aves jóvenes (pollos, pollitas, patos, pavos)	10
Aves adultas (pollos, patos, pavos)	20
Gallinas ponedoras y reproductoras	20
Cerdos jóvenes (< 34 Kg peso vivo)	20
Cerdos adultos (34-57 Kg peso vivo)	50
Cerdos adultos (> 57 Kg peso vivo)	100
Cerdas	25
Verracos	25
Terneros, Corderos, Cabritos	10
Bovinos, Ovinos y Caprinos adultos no lecheros	25
Bovinos, Ovinos y Caprinos adultos lecheros	5-25
Caballos adultos no reproductores	50
Conejos gazapos	10
Conejos adultos	10
Conejas	10

En lo que respecta a la toxicidad de la aflatoxina B1, se podría también establecer para los bovinos, ovinos y caprinos lecheros, una concentración máxima tolerable de 25 microgramos/kg. Sin embargo, como consecuencia de que la aflatoxina B1 se transforma dentro del animal en aflatoxina M1, y esta última va a la leche; la concentración máxima tolerable para aflatoxina B1, en animales debe ser más rigurosa, concretamente 5 microgramos/kg (ppb), a fin de que la concentración de aflatoxina M1 en la leche no represente riesgo, para los humanos consumidores de ese alimento (Gimeno 2011).

Las Aflatoxinas afectan al hígado de todas la especies animales, llegando a producir, en los casos más graves, muertes súbitas; así como alteraciones metabólicas, petequias en la piel, baja producción de huevos, disminución drástica de la producción de leche, donde aparecerá además, un metabolito secundario de la Aflatoxina B1: la Aflatoxina M1 (Toubes 2005).

6.6 Micotoxinas de importancia mundial

En el Cuadro 2, se muestran los mohos y micotoxinas considerados actualmente de importancia mundial (FAO 2003).

Cuadro 2: Mohos y micotoxinas de importancia mundial.

Especie de moho	Micotoxinas producidas
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ y G ₂
<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoxinas B ₁ y B ₂
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	Toxina T-2
<i>Fusarium graminearum</i>	Desoxinivalenol (o nivalenol) Zearalenona
<i>Fusarium moniliforme</i> (<i>F. verticillioides</i>)	Fumonisina B ₁
<i>Penicillium verrucosum</i>	Ocratoxina A
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Ocratoxina A

Según (FAO, 2003), una micotoxina se considera "importante" si se ha demostrado, su capacidad para tener efectos considerables sobre la salud de las personas, y la productividad de los animales en diversos países.

6.7 Agentes productores de Micotoxinas

Los principales géneros que producen micotoxinas son *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*; siendo las especies *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus*, *F. moniliforme*, *F. roseum*, *P. verrucosum* y *P. expansum*, las más reconocidas por generar dichas sustancias que son: hepatotóxicas, nefrotóxicas, inmunodepresoras y cancerígenas, para los animales domésticos, bovinos, aves y seres humanos, con una gran implicación sanitaria y económica a nivel mundial (Combata y Mildemberg 2009).

Las cepas aflatoxigénicas del género *Aspergillus*, son muy comunes y están ampliamente distribuidas en la naturaleza, sobre todo en las zonas de clima cálido y húmedo. Esto incrementa en gran medida el riesgo de contaminación de alimentos por hongos capaces de sintetizar estas sustancias, fundamentalmente en el caso de que las condiciones de almacenamiento de estos no sean las adecuadas (Combata y Mildemberg 2009).

6.8 Producción de Micotoxinas

Las micotoxinas son metabolitos secundarios fúngicos formados por reacciones enzimáticas, a partir de intermediarios bioquímicamente simples del metabolismo primario, como: acetato, malonato y ciertos aminoácidos. El desarrollo de los hongos y la producción de micotoxinas, se relacionan con ciertos condicionantes ambientales, entre ellos:

6.8.1 Factores físicos:

Humedad y agua disponible, temperatura, zonas de microbiota (pequeñas zonas del alimento con alto contenido en humedad) e integridad física del grano o alimento.

6.8.2 Factores químicos:

Composición del sustrato, pH, y disponibilidad de oxígeno.

6.8.3 Factores biológicos:

Presencia de invertebrados (genera humedad y distribuyen esporas del hongo en el producto) y estirpe específica (en una misma especie fúngica existen estirpes productoras de micotoxinas, y otras que son incapaces de producirlas) (Gimeno, 2011).

6.9 Impacto sobre la salud y productividad de los animales

La contaminación fúngica influye sobre el valor nutritivo y palatabilidad de los alimentos, y representa un riesgo de toxicosis. Los efectos tóxicos de las micotoxinas son variables, dependiendo de su diferente estructura química, así como de su concentración, duración de exposición y de la especie, sexo, edad y vulnerabilidad del animal afectado. Generalmente, los animales monogástricos y más jóvenes son más sensibles a las micotoxinas, que los animales rumiantes o de mayor edad. La ingestión elevada de micotoxinas puede provocar un elevado deterioro de la salud y producción de los animales. A concentraciones más bajas las micotoxinas pueden provocar pérdidas en la producción, e incrementar el riesgo e incidencia de otras enfermedades (Denli y Pérez 2006).

La AFM1 es el metabolito hidroxilado de la AFB1, se encuentra en la leche y derivados de la leche obtenidos de ganado lechero, que ingirió un alimento contaminado con AFB1. Los residuos de AFM1 en la leche se pueden encontrar de 6-

24 horas después de que una vaca haya ingerido un alimento contaminado con AFB1 (Gimeno 2011).

En vacas lecheras la relación entre la concentración de AFB1 (ppb. Microgramos/Kg) en la ración final, y la de AFM1 (ppb, microgramos/Litro) excretada en la leche podría ser de 300:1, sin embargo esta relación es muy aproximada, ya que el rango oscila entre 34:1 a 1600:1. (Gimeno 2011)

Las aflatoxinas causan daño hepático, disminución de la producción de leche y huevos. La infección recurrente da como resultado la supresión de la inmunidad y el subsecuente ataque por patógenos, como por ejemplo, salmonella (Cornejo *et al.* 2005).

En Argentina se impusieron límites entre 5 µg de aflatoxina B₁/kg y 20 µg de aflatoxinas totales/kg para el contenido en alimentos de consumo humano, pero las FAO y WHO establecieron 15 µg de aflatoxinas totales/kg basadas en los posibles problemas económicos que generaría un nivel menor. Los niveles de contaminación de productos agrícolas con fumonisinas, pueden alcanzar hasta 330 mg/kg, principalmente en los destinados al consumo animal. El nivel medio en maíz de exportación es <0,3 µg fumonisina B₁/g. la “International Agency for Research on Cáncer” clasificó a estas Micotoxinas, como posibles cancerígenos en humanos, pero no se han establecido límites aunque se reconocen los efectos tóxicos cardiovasculares. La ingesta diaria por persona en Latinoamérica oscila entre 0,2 y 17.000 µg (Barahona 2012).

Cuadro 3 Afecciones en el hombre provocada por la ingestión de Micotoxina.

Micotoxinas	Afecciones
Aflatoxina B ₁	Inducción de cáncer hepático
Aflatoxina M ₁	Cancerígena

Fuente: Barahona 2012

En 1965, se efectuó un estudio sobre la prevalencia de hongos en granos de maíz de Guatemala, analizándose 62 muestras de maíz, encontrando que los géneros diseminados frecuentemente en las muestras infectadas fueron: *Penicillium*, *Fusarium* y *Aspergillus*. Los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, abundantes en las muestras que tenían un tiempo largo de almacenamiento y un alto contenido de humedad. En el año de 1976, demostraron que los residuos de aflatoxinas, pueden detectarse en los órganos y músculos del ganado vacuno, cerdos y pollos cuando consumen alimento contaminado con más de 100 ppb de aflatoxinas. (Barahona 2012).

6.10 Impacto económico de Aflatoxinas

Según Cornejo (2005), 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.

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, fumonisinas y vomitoxina) causan pérdidas económicas de 932 millones de dólares anualmente (Medina *et al.* 2010).

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 2005).

6.11 Impacto sobre la salud pública

Entre las micotoxinas como riesgo para los humanos, la AFB1 continúa liderando su potencial carcinogénico, los riesgos a nivel mundial en lo que se refiere a cáncer de hígado. Teniendo en cuenta las preocupaciones con la salud pública, la Unión Europea, continua manteniendo el nivel máximo de 0.05 ppb (50 ppt) en la leche y de 0.025 ppb (25 ppt) en los alimentos lácteos para lactantes. Por lo tanto, Estados Unidos de América y otros países mantiene el limite en 0.50 ppb (500 ppt) (Gimeno 2011).

Los principales factores que tienen influencia sobre la toxicidad de las micotoxinas en los humanos son:

- a) La biodisponibilidad y toxicidad de la micotoxina;
- b) Los sinergismos entre ellas;
- c) La cantidad de micotoxina ingerida diariamente en función de la concentración de micotoxina y de la cantidad de alimento ingerido;
- d) La continuidad o intermitencia de ingestión del alimento contaminado;
- e) El peso del individuo y el estado fisiológico y de salud de éste;
- f) La edad del individuo (Gimeno 2005).

Así pues, los niños y los jóvenes son más susceptibles a la toxicidad de las micotoxinas, debido a una mayor variación del metabolismo basal. Ellos pueden no tener suficientes mecanismos bioquímicos para la detoxificación. En los niños, el cerebro continúa su desarrollo durante muchos años después del nacimiento y esto puede causar, una mayor susceptibilidad a las micotoxinas que afectan al sistema nervioso central (Gimeno 2005).

Aunque la AFM1 tenga un potencial carcinogénico 9 a 10 veces menor que la AFB1, el riesgo adicional de cáncer de hígado es significativo si se excede de 0.05 ppb a 0.50 ppb; la exposición a cualquier nivel, cuando se trata de un carcinógeno

genotóxico, como es el caso de la AFM1, puede suponer el riesgo de la salud para los consumidores, en especial para los niños (Gimeno 2011).

6.12 Influencia del cambio climático

Pareciera que la incidencia de micotoxinas, ha venido aumentando en los últimos años. Desafortunadamente ha habido un aumento en la incidencia de micotoxinas en especies animales en los últimos años. Algunos estudios reportados sugieren que al menos 25-35% de todos los alimentos pueden estar afectados por micotoxinas. Ello puede deberse a un cambio en los patrones climáticos en el mundo, el aumento de la prevalencia de sequías, inundaciones y temperaturas extremas; particularmente durante la época de cosecha. Todo ello incrementa el riesgo de contaminación por micotoxinas en los cultivos y alimentos. (Close 2008)

6.13 Legislación Aflatoxina M1

La legislación de la UE establece para leche cruda, leche destinada a la fabricación de productos a base de leche y leche de consumo tratada térmicamente, la concentración máxima permitida de AFM1 es de 0,05 microgramos/Litro o Kg (0,05 ppb) (Gimeno, 2005).

Según Yalibat 1997, en los Estados Unidos de América, la Administración de Alimentos y Drogas –FDA-, fija como guía para residuos de aflatoxinas totales, una concentración de 20 ppb para todos los productos afectados, excepto para el maní, para el cual ha propuesto una concentración de 15 ppb. En países como Suecia, Italia, Polonia y Holanda, se establece también un límite de 5 ppb, mientras que en Alemania y Francia, no tienen regulación oficial. En suplementos proteínicos para niños desnutridos FAO/OMS (Organización para la Agricultura y la Alimentación/Organización Mundial de la Salud) propone un límite de 30 ppb. para niveles de aflatoxinas en tejido animal específicamente, no existen normas. En Alemania, se discute como posible un límite de 10 ppb. En Guatemala, los límites adoptados por la Comisión Guatemalteca de Normas (COGUANOR) son de 20 ppb

en grano; esta norma se adoptó en el mes de Agosto de 1981. No se dispone de límites para niveles de aflatoxinas en tejido animal. Las aflatoxinas M₁ y aún B₁ pueden aparecer en carne, leche y huevos, si los animales ingieren alimentos contaminados con aflatoxinas B₁ en niveles suficientemente alto (Yalibat 1997).

No hay legislación para la AFM1 en quesos, ni mantequilla, sin embargo, Holanda tiene establecido un máximo de tolerancia de 0,2 y 0,02 microgramos/Kg, respectivamente. Algunos países como Austria y Suiza tienen un límite para quesos de 0,25 microgramos de AFM1/Kg. Vemos pues que en el caso de USA y otros países, el nivel de tolerancia para AFM1 en la leche es 10 veces superior al de la UE (Gimeno 2005).

6.14 Métodos para detectar aflatoxina M1

AFLASENSOR: Test rápido en tira para la detección de Aflatoxina M1 en leche de una manera sencilla, incluye 96 tiras reactivas de lectura visual, lo cual da un resultado en 20 minutos sin necesidad de preparar la muestra. (Zeu-inmunotec 2012)

AFLA M1 FL+: Es un método cuantitativo para la detección de aflatoxina M1 en leche. La tecnología avanzada de VICAM permite la medición de aflatoxina M1 sin el uso de solventes tóxicos como cloroformo o cloruro de metileno. 25 minutos para aislar la toxina, detecta niveles tan bajos como 12.5 ppt y tan altos como 200 ppt sin análisis HPLC (VICAM 2010)

AFLATOXIN M1, 96 tests ELISA (96- well): La aflatoxina M1 HELICA ensayo es un inmunoensayo enzimático competitivo en fase sólida. Un anticuerpo con alta afinidad para la aflatoxina M1 se aplica sobre pocillos de polietileno para luego aplicar los reactivos que trae el kit. Se introduce en un lector de microplacas para obtener la lectura. (Renekabio 2011)

VII. METODOLOGÍA

7.1 Población

Con el presente trabajo de investigación se determinó la incidencia de aflatoxina M1 en la leche fluida de vaca, en una población de 24 expendios de leche, identificados en el municipio de Esquipulas, departamento de Chiquimula.

6.9 Muestra

Se realizó un muestreo aleatorio simple asumiendo varianza máxima, utilizando la fórmula que se describe a continuación:

$$n = \frac{N (Z^2) (p) (q)}{N (D^2) + Z^2 (p) (q)}$$

Donde:

n = Muestra

N = Población

D = Precisión = 0.05

Z95% = 1.96

p = 0.5

q = 0.5

Con un nivel de confiabilidad de la muestra calculada en base al 95%.

Por lo tanto:

$$n = \frac{24 * 1.96^2 * 0.25}{24 * 0.05^2 + 1.96 + 0.25} = 10 \text{ muestras}$$

7.4 Técnicas de observación

- **Identificación**

Se identificaron y ubicaron 24 expendios de leche del municipio de Esquipulas, departamento de Chiquimula; para asignar un código con el cual se sometieron a aleatorización para la toma de las muestras.

- **Recolección**

Se visitaron los expendios un día antes de la recolección de las muestras para confirmar, la compra de leche fluida de vaca el día posterior, colectando una muestra con un contenido de 500 ml por expendio, para hacer un total de 24 muestras a ser analizadas, durante el mes de octubre, correspondiente a la temporada de verano.

Las muestras colectadas fueron llevadas al laboratorio de la Carrera de Zootecnia del Centro Universitario de Oriente (CUNORI), con su respectiva identificación de cada expendio, las cuales fueron incubadas a temperatura de 4⁰ C durante cuatro horas, para aislar las partículas grasas de la leche; Para el proceso de centrifugación se colocó 1ml de muestra en los vacutainer durante cinco minutos para el total aislamiento y colección de leche, manteniéndola a temperatura de 4⁰ C durante el traslado al laboratorio de inmuno diagnóstico de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, donde se realizó el análisis de presencia con el Kit Elisa Aflatoxin M1® (Renekabio 2011).

7.5 Técnicas de recolección y análisis de datos

7.5.1 Técnicas de recolección de datos

a. Identificación

Los expendios fueron nombrados con un código que permitió su posterior aleatorización y recolección de muestras, el cual fue de E1 de forma correlativa.

b. Aleatorización

Posteriormente a la codificación de los expendios se realizó la aleatorización sin sustitución para la selección de los expendios a muestrear en el municipio Esquipulas.

7.6 Técnicas de análisis de datos

En el laboratorio los reactivos fueron llevados a temperatura ambiente (19- 25⁰ C) previo a su uso, luego se retiraron los pozos de la placa a utilizar según el número de muestras colectadas (24), con una micropipeta, utilizando puntas desechables se aplicó 200 µl de leche identificando a cada pozo previamente por expendio, luego se cubrió la placa con cinta aislante para evitar la evaporación y proteger de la luz UV en exceso y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas.

Posteriormente a su incubación se desechó el contenido de los pozos y se lavó con PBS-Tween 20 por tres veces; colocando cara abajo la placa en un papel absorbente para eliminar el tampón de lavado residual. Consiguientemente se añadió 100 µl del conjugado a cada pozo, sellando e incubando a temperatura ambiente durante 15 minutos. Luego se repitió el lavado (tres veces) con PBS- Tween 20 y se añadió 100 µl de sustrato de la enzima (TMB) a cada pozo incubando durante 15 minutos. Inmediatamente se detuvo la reacción añadiendo 100 µl de solución de

parada (SDS5), en un solución de 1/5. Cuando se observó el cambio de color de azul a amarillo se colocó en el lector de microplacas con una calibración de 450 nm con un filtro de aire diferencial de 630 nm.

A partir del Kit para la determinación de Aflatoxina M1 con el método ELISA directa se establecieron los rangos estándar para hacer las conversiones de nanogramo/Litro (ng/L) a Partes por trillón (ppt), de la siguiente manera:

$$N = a * b / c$$

Donde

N = ppt

a = estándar ppt

b = resultado kit ELISA ng/L

c = estándar ng/L

Cuadro 4. Rangos establecidos por Kit para determinación de Aflatoxina M1 con el método de ELISA directa.

Estándar Ppt	ng/L
0	1.937
5	1.805
10	1.546
25	1.296
50	0.877
100	0.666

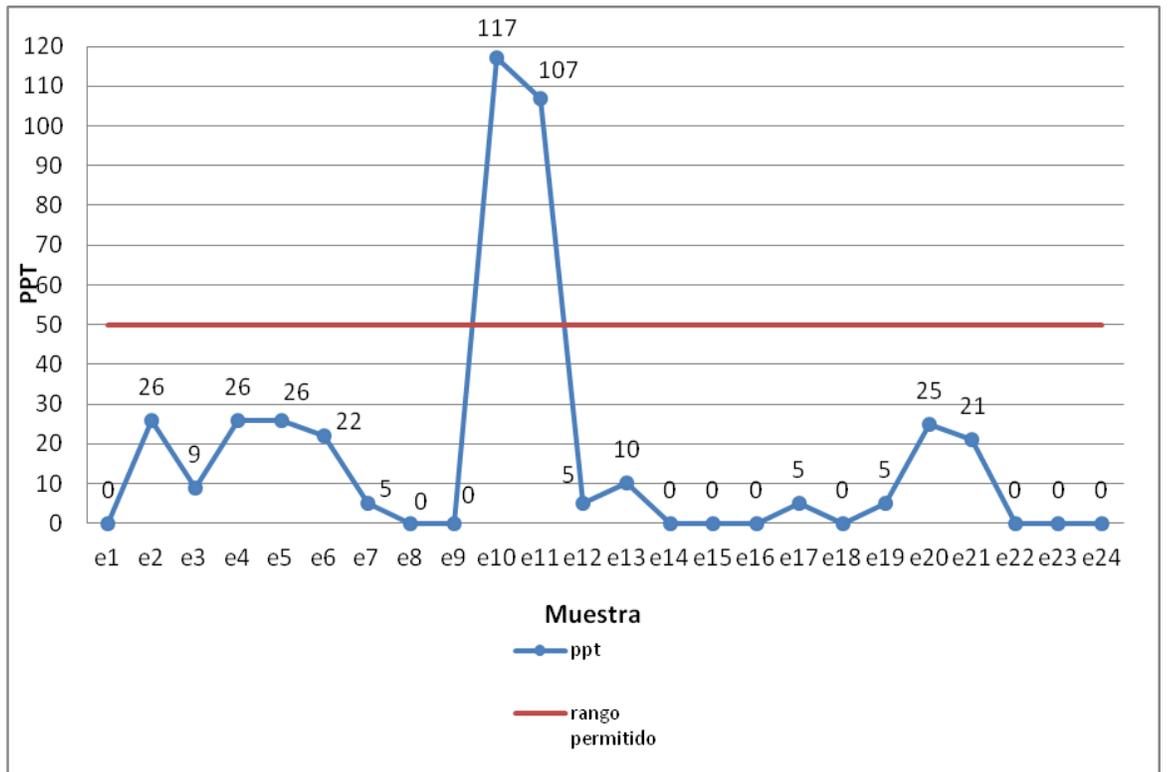
El análisis de los datos obtenidos de la técnica de Elisa para determinación de Aflatoxina M1 se realizó mediante el programa Statistical Analysis System (SAS), partiendo del rango establecido por la Unión Europea que va desde 50 ppt.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo a Barahona (2012), en Guatemala, por no contar con un límite de contaminación de Aflatoxina M1 en leche, en la Comisión Guatemalteca de Normas (COGUANOR), se partió del límite establecido por la Unión Europea (50 ppt); en contraste, con los límites de Estados Unidos de Norteamérica y el Codex Alimentario de FAO, que estiman un límite máximo de 500 ppt).

Para determinar la incidencia de Aflatoxina M1, en los expendios del municipio de Esquipulas, departamento de Chiquimula, se partió según lo establecido por el Codex en la norma del **Reglamento mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones; Cuadro 3: Niveles máximos tolerados para las micotoxinas en los alimentos, en los productos lácteos y en las raciones animales** (2003) adoptado por Honduras. (Cuadro A6)

En la figura No. 2 presenta que del total de muestras colectadas (24), después de efectuado el análisis con el Kit de determinación de Aflatoxina M1, con el método de Elisa directo, se determinó que el 92% se encuentra por debajo del límite máximo establecido según el reglamento antes mencionado. Por el contrario el 8% (2), muestras con los códigos E10 y E11, donde presentan una carga de Aflatoxina M1 de 117 y 107 ppt respectivamente, (anexo A7) cuyos rangos son superiores al límite establecido (50 ppt), dándole a estas últimas una categoría no aptas para el consumo humano.



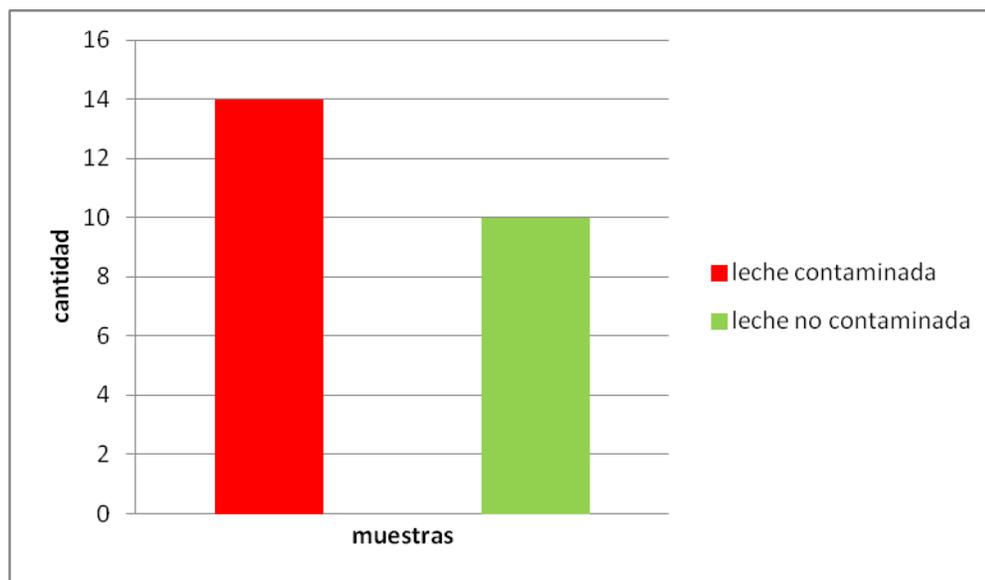
Fuente: Elaboración propia.

Figura 2 Comportamiento de los resultados obtenidos en análisis para aflatoxinas M1 con el método ELISA Directa, en el municipio de Esquipulas, departamento de Chiquimula, 2011.

Debido a esto Combita y Mildemberg (2009), las muestras por arriba del límite establecido, pueden provocar a través del consumo acumulativo, cáncer de hígado en el humano, especialmente a los niños y jóvenes, por no tener los suficientes mecanismos bioquímicos para la detoxificación.

Según Barahona (2012), investigación realizada para determinar la incidencia de aflatoxina M1 en expendios de leche de la ciudad Chiquimula, Guatemala, en el 2011, en 26 muestras, el 65.38% del total presentó contaminación con Aflatoxina M1, y el 15.38% niveles superiores al límite establecido según la reglamentación de la Unión Europea, considerándolas no apta para el consumo humano.

Según Pérez (2008) Investigación realizada en el altiplano mexicano, en leches crudas, ultrapasteurizadas y orgánicas, dieron como resultado que el 59% de las muestras presentaron niveles de aflatoxina M1 y todos los casos se encontraron por encima del límite máximo de residuo de 0.05 µg/Kg (50 ppt) propuesto por la Unión Europea.

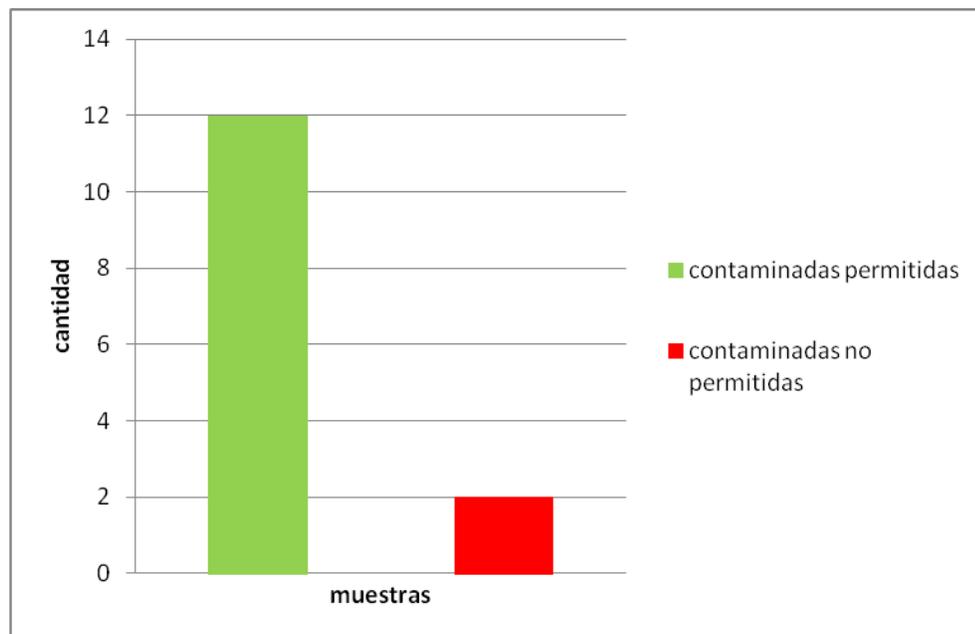


Fuente: Elaboración propia.

Figura 3. Cantidad de muestras positivas y negativas de Aflatoxina M1 en la leche fluida de bovinos, colectada en el municipio de Esquipulas departamento de Chiquimula.

Los porcentajes obtenidos del análisis efectuado a las muestras de leche fluida colectadas, son en un 58% positivas (14 muestras), y el 42% (10 muestras) presentaron resultados negativos (figura 3).

En la figura 4 se demuestra que del 58% de las muestras colectadas se encontró presencia de Aflatoxina M1, (14 muestras), donde 86% (12) se encuentran con contaminación, pero están dentro del rango permitido por la Unión Europea, y el 14% de las muestras (2 muestras) se encuentra con presencia, pero no están permitidas para el consumo humano por sobrepasar los límites establecidos.



Fuente: Elaboración propia.

Figura 4 Cantidad de muestras que presentan contaminación permitidas y no permitidas de aflatoxina M1 en leche fluida de bovino del municipio de Esquipulas, Departamento de Chiquimula.

Debido a la naturaleza de los datos obtenidos en las muestras se determinó que existe dispersión en los datos, obteniendo una varianza de 957.69; la desviación estándar fue de 30 y el coeficiente de variación 181; esto indica que el comportamiento de las muestras en los expendios, fue de altas concentraciones en algunos y en otras no existió presencia de Aflatoxina M1.

Se realizó una prueba T student para valores críticos de una cola, la cual determinó que existe diferencia significativa a $Pr \geq 0.01$, para dicha prueba fueron considerados 25 grados de libertad que garantiza que el modelo estadístico está ajustado al conjunto de datos, minimizando de esta forma el error asociado al factor humano; una vez establecido el análisis de la prueba se obtuvo una T calculada de -2.90 y una T tabulado de 1.71; con un nivel de confianza del 99%, que existe la

presencia de Aflatoxina M1, en la leche fluida entera de los expendios muestreados del municipio de Esquipulas, departamento de Chiquimula (ver anexo A10).

Con respecto a los costos necesarios para el desarrollo de la presente investigación se determinó que, los materiales y el transporte e insumos poseen un valor de ciento cincuenta y dos quetzales con sesenta y cuatro centavos exactos por muestra, (Q 152.64) (anexo A9).

IX. CONCLUSIONES

1. Se identificaron un total de 24 expendios de leche fluida en el municipio de Esquipulas, departamento de Chiquimula.
2. El 58% (14) de las muestras colectadas de leche fluida de vaca en los expendios del municipio de Esquipulas muestra presencia de Aflatoxina M1 (< 50 ppt), y el 38% (10) no presente ninguna presencia de Aflatoxina M1.
3. El 92% (22) del total de muestras de leche cruda de bovino colectada en expendios del municipio de Esquipulas, departamento de Chiquimula se encuentra dentro el límite permitido según la reglamentación de la Unión Europea, (50 ppt).
4. El 8% (2) de las muestras presenta niveles superiores al límite, según la reglamentación de la Unión Europea, considerándose no apta para el consumo humano.
5. No existe en el codex alimentarius los niveles permisibles de las cantidades para aflatoxina M1 en Guatemala.

X. RECOMENDACIONES

1. Realizar capacitaciones para concientizar a los productores de leche fluida de vaca, sobre la importancia de no proporcionar a los animales alimento contaminado con Aflatoxina M1 en el municipio de Esquipulas departamento de Chiquimula.
2. Realizar de forma rutinaria análisis de micotoxinas M1 en todos los derivados lácteos, plantas de almacenamiento de leche, granjas y así evitar enfermedades causadas por hongos y sus micotoxinas.
3. Utilizar métodos de campo para la determinación de aflatoxina M1 en diferentes productos y subproductos de origen animal destinados al consumo humano.
4. Realizar comparaciones para la determinación de aflatoxina M1, utilizando pruebas rápidas de campo con pruebas de laboratorios.
5. Realizar estudios en otros departamentos del país para la determinación de aflatoxina M1, en la leche fluida comercializada en distintos expendios.
6. Efectuar estudios similares durante todo el año, debido a que la humedad del ambiente, provocado por el cambio climático, es un factor importante para el desarrollo del *Aspergillus* en los alimentos ofrecidos a los animales.
7. Gestionar apoyo internacional para la implementación de un laboratorio especializado en determinación de Aflatoxina M1 en Guatemala.
8. Dar a conocer a las autoridades de COGUANOR los resultados de dicha investigación, para su consideración.
9. Informar a las autoridades pertinentes como COGUANOR sobre las investigaciones que se llevan a cabo con dicho trabajo.

XI. BIBLIOGRAFIA

1. Barahona Salguero, G. 2012. Determinación de la incidencia de aflatoxina en leche fluida de vaca en los expendios de la ciudad de Chiquimula. Tesis Lic. Zoot. Chiquimula, GT, USAC, CUNORI. 58 p.
2. Bolet, A; Socarrás, S. 2005. Micotoxinas y cáncer (en línea). Cuba, Hospital Universitario General Calixto García. 8 p. Consultado 9 oct. 2011. Disponible en http://bvs.sld-.cu/revistas/ibi/vol24_1_05/ibi07105.pdf
3. Carlson, MP *et al.* 2002. Aflatoxina M1 en leche (en línea). Estados Unidos, Engormix. Consultado 07 jun. 2011. Disponible en <http://www.engormix.com/MA-ganaderia-leche/sanidad/articulos/aflatoxina-leche-t315/p0.htm>
4. Carrillo, L. 2003. Microbiología agrícola, micotoxinas (en línea). Argentina. Universidad Nacional de Salta. Capitulo 6, 7 p. Consultado 9 oct. 2011. Disponible en <http://www.unsa.edu.ar/matbib/micragri/micagricap6.pdf>
5. Combita, A; Mildemberg, S. 2009. Detección de aflatoxina M1 en leches frescas comercializadas en la zona del valle del cauca (Colombia) mediante la técnica de Elisa (en línea). Tesis Dr. Microbiología Industrial. Colombia, Pontificia Universidad Javeriana. 111 p. Consultado 07 jun. 2011. Disponible en <http://www.javeriana.edu.co/-biblos/tesis/ ciencias/tesis202.pdf>

6. Cornejo, JC *et al.* 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 (en línea). Chile, MINSAL. 33 p. Consultado 12 ene. 2012. Disponible en <http://www.minsal.gob.cl/portal/url/item/72fd6274dad8792ee04001-011f0109e4.pdf>
7. Close, B. 2008. Preguntas al experto... (en línea). España, Alltech. Consultado 07 may. 2012. 6p. Disponible en <http://www.knowmycotoxins.com/documents/AsktheexpertBillCloseanswersESP.pdf>
8. Denli, M; Pérez, J. 2006. Contaminación por micotoxinas en los piensos: efectos, tratamiento y prevención (en línea). *In* Curso de especialización FEDNA (22, 2006, Barcelona). Avances en nutrición y alimentación animal. Coord. P García. España, FEDNA. p. 1-17. Consultado 9 oct. 2011. Disponible en http://www1.etsia.upm.-es/fedna/capitulos/06CAP_I.pdf
9. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación, IT) 2003. Manual sobre la Aplicación del Sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC) en la prevención y control de las micotoxinas (en línea). Roma. Consultado 9 oct. 2011. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/005/y1390s/y-1390s00.htm#Contents>
10. Gimeno, A *et al.* 2003. Micotoxinas y micotoxicosis en animales y humanos. Miami, US, Special nutrients, Inc; Talleres gráficos del sur. 159 p.
11. _____. 2011. Micotoxinas y micotoxicosis en animales y humanos (en línea). 3 ed. Miami, US, Special nutrients, Inc. 130 p. Consultado 29 feb. 2012. Disponible en _____ en _____

<http://specialnutrients.com/pdf/book/3%20edicion%20MICOTOXI-NAS-%20LR%-20Secure.pdf>

- 12._____. 2005. Aflatoxina M1 en la leche: riesgos para la salud publica, prevención y control (en línea). Estados Unidos, Special nutrients, Inc. Consultado 07 jun. 2011. Disponible en <http://www.engormix.com/MA-micotoxinas/foros/articulo-aflatoxina-leche-riesgos-t6286/254-p0.htm>

13. Medina, JC *et al.* 2010. Situación actual de la tecnología analítica y los absorbentes de micotoxinas (en línea). México, NUTEK S.A. 18 p. Consultado 13 ene. 2012. Disponible en <http://amena.mx/wp-content/uploads/2010/11/7-JCMedina.pdf>

14. Pérez, J *et al.* 2008. Ocurrencia de aflatoxina M1 en leches cruda, ultrapasteurizada y orgánica producidas y comercializadas en el altiplano mexicano (en línea). Revista Salud Animal 30 (2): 103-108. Consultado 6 mar. 2012. Disponible en http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0253570X200800020-0006&script=sci_arttext

15. Raquena, F; Saume, E; Leon, A. 2005. Micotoxinas: riesgos y prevención (en línea). Venezuela, INIA. Consultado 07 jun. 2011. Disponible en http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_ci/ZootecniaTropical/zt2304/arti/requena_f.htm

16. RENEKABIO, US. 2011. Micotoxin ELISA kits (en línea). USA. Consultado 07 may. 2012. Disponible en http://renekabio.com/us_en-/products/mycotoxin-elisa-kits.html

17. Saavedra, SW. 2008. Aflatoxinas en alimentos balanceados para canes (en línea). Tesis Med. Vet. Zoot. Santa Cruz, BO, UAGRM, Facultad de Ciencias Veterinarias. 55 p. Consultado 10 feb. 2012. Disponible en http://www.fcv.edu.bo/sistemabibliotecario/doc_tesis/SAAVEDRA%20WILSON-20101104-164134.pdf
18. Toubes, CG. 2005. Micotoxicosis introducción a la problemática de las micotoxinas en piensos (en línea). España, NUDESA. 2 p. Consultado 21 dic. 2011. Disponible en <http://www.nudesa.com/upload/docs/MICOTOXICOSIS1.pdf>
19. Valle, PG. 2000. Toxicología de alimentos (en línea). México, Instituto Nacional de Salud Pública. 267 p. Consultado 10 feb. 2012. Disponible en <http://www.bvsde.paho.org/eswww/fulltext/toxicolo/toxico/toxico.pdf>
20. VICAM, MX . 2010. Kit para aflatoxinas aprobados por AOAC y FGIS (en línea). MX. Consultado 07 may. 2012. Disponible en <http://vicames.homesightllc.net/aflatoxin-test-kits/afla-m1fl>
21. Yalibat O, JE. 1997. Determinación de aflatoxinas en hígado de res que se comercializa en las carnicerías de la ciudad de Guatemala (en línea). Tesis Lic. Quím. Far. Guatemala, USAC. 42 p. Consultado 01 jun. 2009. Disponible en <http://www.biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06-1806.pdf>
22. ZEU-INMUNOTEC, ES. 2012. Toxinas (en línea). Zaragoza, ES. Consultado 07 may. 2012. Disponible en <http://www.zeulab.com/inicio>

XIII. ANEXOS

Cuadro A5. Cronograma de actividades

Actividad	Semanas														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Identificación de expendios	■	■	■	■											
Previa compra de leche				■											
Recolección de muestras					■										
Transporte de muestras al laboratorio					■										
Análisis de Elisa						■	■	■							
Análisis de SAS									■	■	■				
Informe Final												■	■	■	■

Cuadro A6 Análisis de Varianza para la variable de presencia de Aflatoxina M1.

Media	Varianza	Desviación estándar	Error Estándar	Coefficiente de Variación
1.672	0.493	0.446	0.091	26.7

Cuadro A7. Cuadro 3. Niveles máximos tolerados para las micotoxinas en los alimentos, en los productos lácteos y en las raciones animales (encuesta 2002/2003)

País	Producto	(Suma de) Micotoxina(s)	Límite (µg/kg)	Base legal	Autoridad competente	Método de muestreo		Método analítico		Observaciones
						situación	ref.	situación	ref.	
HONDURAS [HN] 2003: situación 1991 [FAO 1997 ref.1]										
	Alimentos									
	todos los alimentos	afla B ₂ G ₁ G ₂	1							
	maíz (molido o en grano)	afla B ₁	1							
	alimentos infantiles	afla B ₁ B ₂ G ₁ G ₂	0,01							
		afla M ₁	0,02							
	Lácteos									
	leche (productos lácteos)	afla M ₁	0,05							
	queso		0,25							

Fuente: FAO, 2004.

Cuadro A8. Codificación, resultados y conversión a ppt de los resultados de laboratorio de las muestras colectadas.

Código	Resultado	ppt
e1	2.087	0
e2	1.334	26
e3	1.434	9
e4	1.336	26
e5	1.345	26
e6	1.159	22
e7	1.903	5
e8	1.949	0
e9	2.027	0
e10	0.778	117
e11	0.712	107
e12	1.883	5
e13	1.625	10
e14	1.96	0
e15	1.983	0
e16	2.296	0
e17	1.901	5
e18	1.966	0
e19	1.816	5
e20	1.284	25
e21	1.104	21
e22	1.953	0
e23	2.173	0
e24	2.126	0

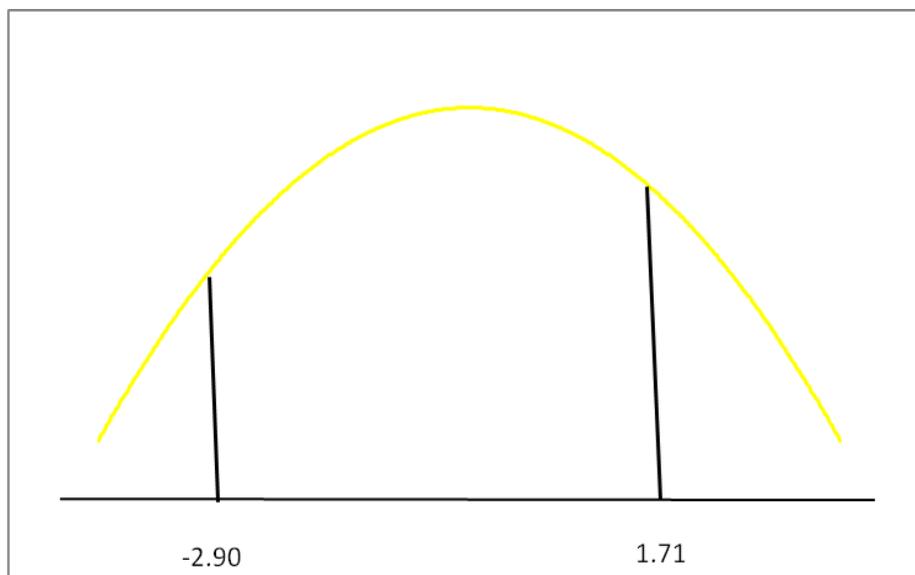
Cuadro A9. Presupuesto general de costo de la investigación.

No.	Concepto	Cantidad	Valor Unitario	Valor Total	Valor en quetzales
	Materiales				
1	*Kit Elisa Aflatoxin M1	24 pozos	\$ 3.38	\$ 81.12	*Q 638.41
2	Leche fluida de vaca	24 litros	Q. 5.00	Q. 120.00	Q 120.00
	Transporte				
3	Kit Elisa	1	\$ 300.00	\$ 300.00	Q 2,355.00*
4	Del lugar de recolección al laboratorio de Zootecnia CUNORI-USAC.	24 muestras	Q. 6.25	Q. 150.00	Q 150.00
5	Traslado de las muestras al laboratorio de la facultad de química y farmacia, USAC Guatemala.	24 muestras	Q. 16.70	Q. 400.00	Q 400.00
	Personal				
6	No definido	-	-	-	-
	Costo laboratorista				
7	No definido	-	-	-	-
Total					Q 3,663.41

* El Kit de ELISA Aflatoxin M1 cuenta con 96 pozos.

* El valor del dólar al momento del cambio fue de Q 7.87.

Cuadro A10. Curva de distribución de los datos de leche y límite permisible de Aflatoxina M1.



Cuadro A11 Mapa de ubicación de los expendios de leche del municipio de Esquipulas, departamento de Chiquimula.

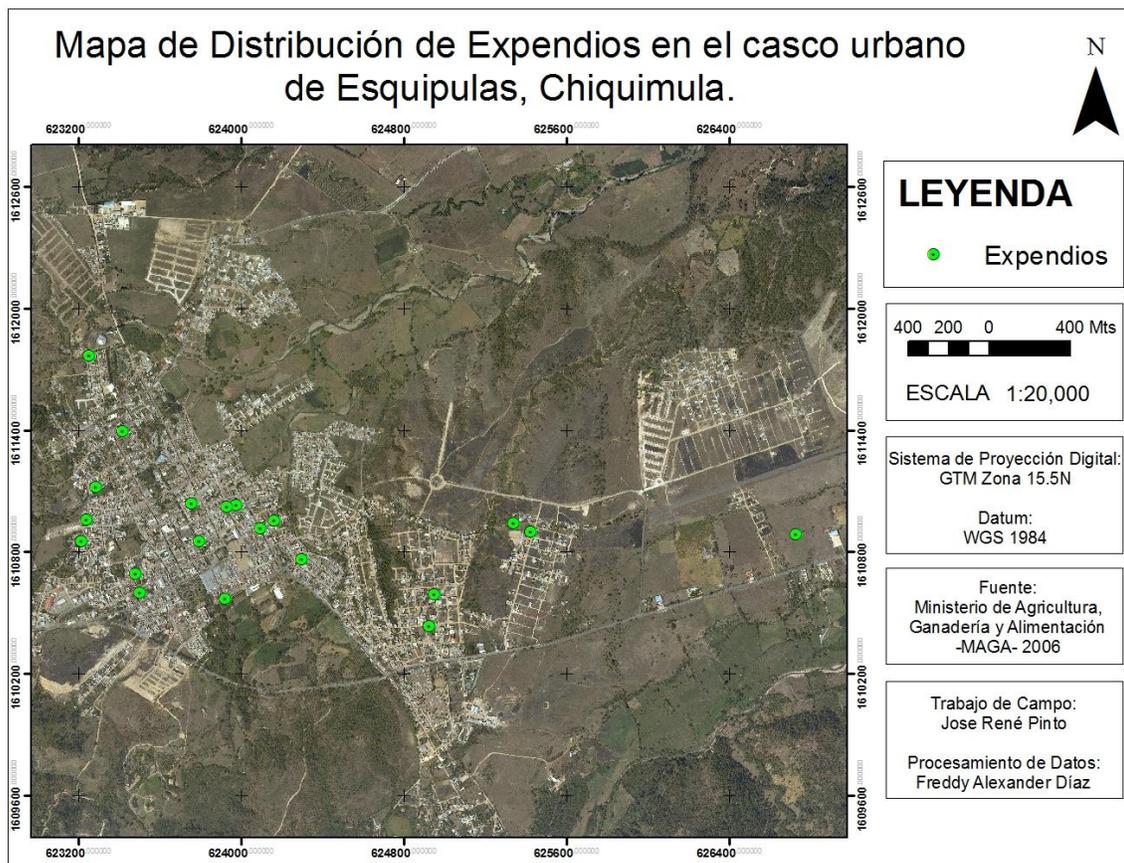


Figura A5. Boleta de resultados de Prueba ELISA Aflatoxina M1 en lector de placas.

STAT FAX 2100 :AD 07/11/2011 13:27:23

Test form feed off *101

ABSORBANCE MODE 12 PAGE 1

LOT NUMBER: ___ EXP. DATE: _____ USER: 07/11/2011 13:27:51

WAVELENGTHS=630 NM

READ MODE: A to H

	A	B	C	D	E	F	G	H
1- 1	1.937	1.805	1.546	1.296	0.877	0.666	2.087	1.334
1- 2	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
1- 3	1.434	1.336	1.345	1.159	1.903	1.949	2.027	0.778
1- 4	0.001	0.001	0.001	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000
1- 5	0.712	1.883	1.625	1.960	1.983	2.296	1.901	1.966
1- 6	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.000
1- 7	1.816	1.284	1.104	1.953	2.173	2.126	0.000	0.000
1- 8	0.001	0.001	0.001	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000
1- 9	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
1- 10	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001

END OF RUN

TEST ENDED

% ABSORBANCE MULTI-PT 8 PAGE 1

LOT NUMBER: _____ EXP. DATE: _____ USER: 07/11/2011 13:48:21

WAVELENGTHS= 450NM 630 NM

TEST ENDED

Figura A6. Reactivos del Kit para Aflatoxina M1 con el método ELISA directo.



Figura A7. Recolección de muestras de expendios en el municipio de Esquipulas departamento de Chiquimula.



Figura A8. Equipo utilizado para separación de ácidos grasos en laboratorio de Bromatología de la carrera de Zootecnia del Centro Universitario de Oriente de la Universidad de San Carlos de Guatemala.



Figura A9. Extracción de leche de los recipientes de recolección.



Figura A10. Centrifugación de leche colectada previo a su transporte al laboratorio de inmuno diagnóstico de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.



Figura A11. Extracción del suero centrifugado de los vacutainer para ser colocado en los viales.



Figura A12. Placa y estándares del Kit ELISA utilizado para el análisis.

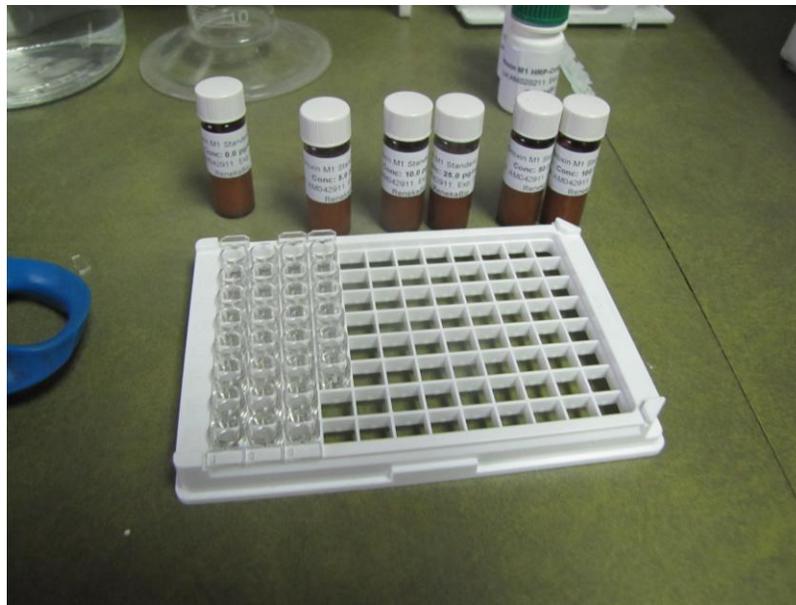


Figura A13. Realización de análisis de laboratorio con el Kit para Aflatoxina M1 con el método ELISA directo.



Figura A14. Aplicación del conjugado a cada uno de los pozos.

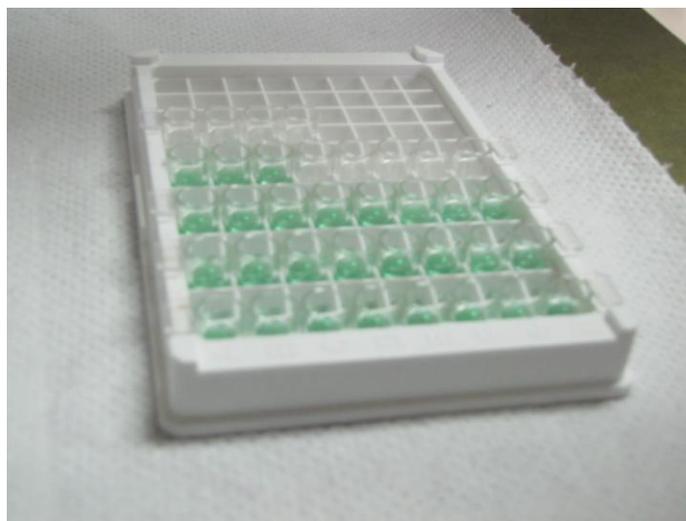


Figura A15. Lavado de los pozos con la solución PBS Tween



Figura A16. Reacción de aplicación del sustrato de enzima.

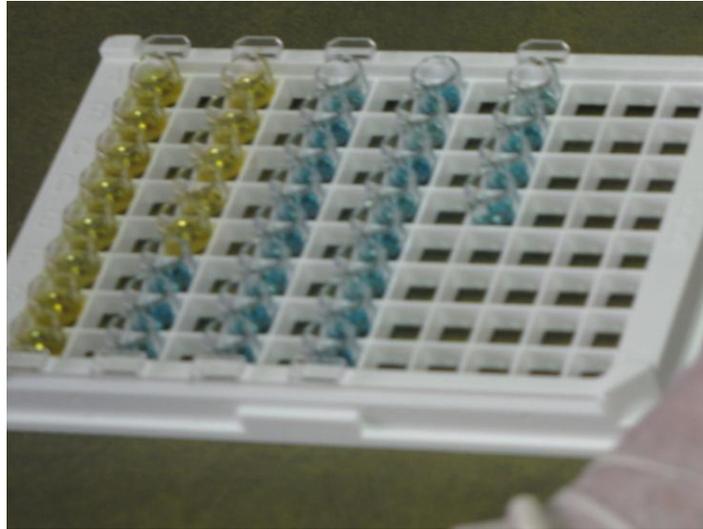


Figura A17. Calibración y lectura de datos presentados por lector de placas ELISA.

