

## RESOLUCIÓN DE COMISIÓN ORGANIZADORA N° 641-2017-UNAM

Moquegua, 27 de Noviembre de 2017

VISTOS, el Informe N° 0295-2017-EPIA/VIPAC/UNAM de fecha 20 de Noviembre 2017, Oficio N° 458-2017-VIPAC-CO/UNAM, de 21 de Noviembre 2017, Informe N° 001-2017/D-MRCS/EPIA/UNAM de 13 de Noviembre 2017, Acuerdo de Sesión Ordinaria de Comisión Organizadora del 27 de Noviembre 2017, y;

### CONSIDERANDO:

Que, el párrafo cuarto del artículo 18° de la Constitución Política del Estado, concordante con el artículo 8° de la Ley N° 30220, Ley Universitaria, reconoce la autonomía universitaria, en el marco normativo, de gobierno, académico, administrativo y económico, que guarda concordancia con los artículos 6°, 7°, 8°, 9° y 10 del Estatuto Universitario;

Que, el Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad Nacional de Moquegua, aprobado con Resolución de Comisión Organizadora N° 190-2016-UNAM de 05 de Agosto de 2016, establece en el Artículo 12°, que el proyecto de tesis es un trabajo de investigación individual que presentan los estudiantes del último año académico, egresados o bachilleres al Director de la Escuela Profesional, con la finalidad de resolver un problema objeto de estudio, asimismo, precisa en el Artículo 15° que todo proyecto de tesis debe tener un asesor, quien deberá ser docente ordinario de la Escuela Profesional o en forma facultativa un docente contratado en la especialidad en el área que se investiga. El jurado dictaminador del proyecto, será designado por el Comité Asesor y el Director de la Escuela Profesional, el mismo que estará compuesto por tres miembros elegidos entre los docentes ordinarios y/o contratados, conforme se indica en los artículos 18°, 19° y 20° del precitado Reglamento.

Que, mediante Informe N° 0295-2017-EPIA/VIPAC/UNAM de fecha 20 de Noviembre de 2017, el Director de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial solicita a Vicepresidencia Académica la aprobación del proyecto de tesis denominado: "DETERMINACIÓN DE ASPERGILLUS SO. Y AFLATOXINAS EN ALIMENTOS DESTINADOS ALCONSUMO DE BOVINOS (BOS TAURUS) Y AFLATOXINA EN M1 EN LECHE PROVENIENTES DE LA ASOCIACIÓN FONGAL MOQUEGUA", presentado por la Bachiller Maryori Magali Huaracha Jose, la misma que fue declarada apta según acta de aprobación de proyecto de tesis para optar el título profesional de Ingeniero Agroindustrial de fecha 16 de Octubre de 2017, solicitando se emita el acto resolutive.

Que, con Oficio N° 458-2017-VIPAC-CO/UNAM, de fecha 21 de Noviembre 2017, la Dra. María Elena Echevarría Jaime, Vicepresidenta Académica de la Universidad Nacional de Moquegua, solicita al Dr. Washington Zeballos Gámez, Presidente de la Comisión Organizadora – UNAM, la emisión de acto resolutive de reconocimiento de aprobación de proyecto de tesis, así como la designación de asesor y miembros del jurado dictaminador, conforme se precisa en el Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad Nacional de Moquegua.

Que, en Sesión Ordinaria de Comisión Organizadora de fecha 27 de Noviembre 2017, se acordó por UNANIMIDAD, Aprobar el Proyecto de Tesis en referencia, presentado por la Bachiller Maryori Magali Huaracha José, asimismo se acordó designar como Asesor Principal de Tesis al Mg. Erick Edwin Allcca Alca, Co asesor a la Ing. Raquel Allison Choquehuanca Pineda y a los miembros del Jurado Dictaminador de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la UNAM, encargados de evaluar el trabajo de investigación, conforme a la propuesta remitida.

Por las consideraciones precedentes y en uso de las atribuciones que le concede la Ley Universitaria N° 30220, el Estatuto de la Universidad Nacional de Moquegua y lo acordado en Sesión Ordinaria de Comisión Organizadora del 27 de Noviembre 2017.

### SE RESUELVE:

**ARTÍCULO PRIMERO.- APROBAR**, el Proyecto de Tesis denominado: "DETERMINACIÓN DE ASPERGILLUS SP. Y AFLATOXINAS EN ALIMENTOS DESTINADOS AL CONSUMO DE BOVINOS (BOS TAURUS) Y AFLATOXINA EN M1 EN LECHE PROVENIENTES DE LA ASOCIACIÓN FONGAL MOQUEGUA", presentado por la Bachiller: **MARYORI MAGALI HUARACHA JOSE**, conforme a lo expuesto a la parte considerativa de la presente resolución.

**ARTÍCULO SEGUNDO.- DESIGNAR**, Asesor Principal de Tesis al Mg. **ERIK EDWIN ALLCCA ALCA** y Co asesor a la Ing. **RAQUEL ALLISON CHOQUEHUANCA PINEDA**, aprobado en el artículo primero de la presente resolución.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA  
COMISIÓN ORGANIZADORA

**RESOLUCIÓN DE COMISIÓN ORGANIZADORA  
N° 641-2017-UNAM**

**ARTÍCULO TERCERO.- DESIGNAR** al Jurado Revisor y Dictaminador del Proyecto de Tesis: "DETERMINACIÓN DE ASPERGILLUS SP. Y AFLATOXINAS EN ALIMENTOS DESTINADOS AL CONSUMO DE BOVINOS (BOS TAURUS) Y AFLATOXINA EN M1 EN LECHE PROVENIENTES DE LA ASOCIACIÓN FONGAL MOQUEGUA", presentado por la Bachiller MARYORI MAGALI HUARACHA JOSE, conforme al siguiente detalle:

- Ing. MSc. MARIO ROGER COTACALLAPA SUCAPUCA : PRESIDENTE
- Ing. ROMUALDO VILCA CURO : PRIMER MIEMBRO
- ING. JERONIMO MARTIN SARCO BURGOS : SEGUNDO MIEMBRO

**ARTÍCULO CUARTO.- ENCARGAR**, a los profesionales designados el cumplimiento de lo establecido en el Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad Nacional de Moquegua, asimismo, Vicepresidencia Académica, deberá adoptar las acciones académicas necesarias, para el cumplimiento de la presente resolución.

**Regístrese, Comuníquese, Publíquese y Archívese.**



**DR. WASHINGTON ZEBALLOS GÁMEZ**  
**PRESIDENTE**

Presidencia  
VTPAC  
VPI  
EPIA  
Interesada  
Arch. (2)



**ABOG. GUILLERMO S. KUONG CORNEJO**  
**SECRETARIO GENERAL**



PERÚ

UNAM

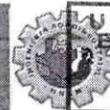
Universidad Nacional de Moquegua

VIPAC

Vicepresidencia Académica

EPIA

Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial



FOLIO N°

005

"Año del Buen Servicio al Ciudadano"

**INFORME N° 295-2017-EPIA/VIPAC/UNAM**



A : DRA. MARIA ELENA ECHEVARRIA JAIME  
Vicepresidenta Académica - UNAM

DE : ING. M.Sc. MARIO ROGER COTACALLAPA SUCAPUCA  
Director de la Escuela Profesional de INGENIERIA AGROINDUSTRIAL

ASUNTO : Aprobación de Proyecto de Tesis, Ratificación de Asesor y Jurado Dictaminador.

REFERENCIA : INFORME N° 001-2017-D-MRCS/EPIA/UNAM

FECHA : Moquegua, 20 de noviembre del 2017

Es grato dirigirme a usted, con la finalidad de saludarla cordialmente, y a la vez mediante el presente informarle que mediante documento de la referencia siendo mi persona presidente de jurado de Proyecto de Tesis con fecha 16 de octubre del 2017, se declara APTO el Proyecto de Tesis denominado "DETERMINACIÓN DE *Aspergillus sp.* Y AFLATOXINAS EN ALIMENTOS DESTINADOS AL CONSUMO DE BOVINOS (*Bos taurus*) Y AFLATOXINA M1 EN LECHE PROVENIENTES DE LA ASOCIACIÓN FONGAL MOQUEGUA presentado por la Bachiller MARYORI MAGALI HUARACHA JOSE; Para lo cual se adjunta un (01) ejemplar del Proyecto de Tesis Aprobado.

En tal sentido y en amparo del Reglamento de Grados y Títulos de la UNAM, según se indica en su art. 30° se inscribe el Proyecto de Tesis en el Registro de Trabajos de Tesis de la Escuela y se notifica al Tesista sobre la aprobación del referido proyecto.

Por lo mismo, solicito a usted que mediante su despacho se realice el trámite correspondiente para la emisión del acto resolutorio según se precisa:

**Artículo Primero:** Aprobar el Proyecto de Tesis denominado denominado "DETERMINACIÓN DE *Aspergillus sp.* Y AFLATOXINAS EN ALIMENTOS DESTINADOS AL CONSUMO DE BOVINOS (*Bos taurus*) Y AFLATOXINA M1 EN LECHE PROVENIENTES DE LA ASOCIACIÓN FONGAL MOQUEGUA presentado por la Bachiller MARYORI MAGALI HUARACHA JOSE.

**Artículo Segundo:** Ratificación de Asesor y Co Asesor de Proyecto de Tesis:

- Asesor : Mg. Erik Edwin Allcca Alca
- Co Asesor : Ing. Raquel Allison Choquehuanca Pineda

**Artículo Tercero:** Ratificación de Jurado Dictaminador y Revisor, según el siguiente detalle:

- Presidente : Ing. M.Sc. Mario Roger Cotacallapa Sucapuca
- Primer Miembro : Ing. Romualdo Vilca Curo
- Segundo Miembro : Ing. Jerónimo Martín Sarco Burgos

Es todo cuanto informo a usted, para su conocimiento y acciones necesarias.

Atentamente,



UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA  
Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial

Ing. M. Sc. MARIO ROGER COTACALLAPA SUCAPUCA  
DIRECTOR

MRCS/DEPIA.  
SCO/Sec.  
C.C.: ARCHIVO





Universidad Nacional de Moquegua  
Vicepresidencia Académica



"Año del Buen Servicio al Ciudadano"

Moquegua, 21 de Noviembre del 2017



**OFICIO N° 458 -2017-VIPAC-CO/UNAM**

**SEÑOR:**

**Dr. WASHINGTON ZEBALLOS GAMEZ  
PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ORGANIZADORA  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA**

**Presente.-**

**ASUNTO : PROYECTO DE TESIS, RATIFICACION DE ASESOR, JURADO DICTAMINADOR Y REVISOR**

**REFERENCIA : INFORME N° 295-2017-EPIA/VIPAC/UNAM**

Mediante el presente es grato dirigirme a usted, para saludarlo cordialmente y a la vez manifestarle que visto el documento de la referencia, presentado por el Ing. MSc. MARIO ROGER COTACALLAPA SUCAPUCA Director de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial, solicita la Aprobación del Proyecto del Tesis denominado "DETERMINACION DE Aspergillus sp. Y AFLATOXIMA M1 EN LECHE PROVENINTES DE LA ASOCIACION FONGAL MOQUEGUA", presentado por la Bachiller Maryori Magali Huaracha José según detalle:

Ratificación de Asesor y Co Asesor de Proyecto de Tesis:

- Asesor : Dr. Rene German Sosa Vilca
- Co Asesor : Ing. Raquel Allison Choquehuanca Pineda

3.- Ratificar de Jurado Dictaminador y Revisor:

- Presidente : Ing. MSc. Mario Roger Cotacallapa Sucapuca
- Primer Miembro : Ing. Romualdo Vilca Curo
- Segundo Miembro : Ing. Jerónimo Martín Sarco Burgos

Por lo expuesto, solicito a través de vuestro despacho la aprobación mediante acto resolutivo del Proyecto de Tesis, Ratificación de Asesor y Co Asesor y Ratificación de Jurado Dictaminador y Revisor.

Agradeciendo la atención al presente, hago propicia la ocasión para reiterarle los sentimientos de mi especial consideración y estima personal.

Atentamente,

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA  
*M. Echevarria Jaime*  
Dra. MARIA ELENA ECHEVARRIA JAIME  
VICEPRESIDENTA ACADEMICA



MEEI/VIPAC  
MASM/Sec.  
C.c./Archivo.

Moquegua, Prolongación Calle Ancash S/N Telefax 053 – 461227 053 – 463514 Anexo (202) 053-461471

www.unam.edu.pe

Vice\_presidencia@unam.edu.pe

“Año del Buen Servicio al Ciudadano”

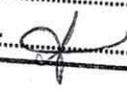
INFORME N° 001-2017-D-MRCS/EPIA/UNAM

A : Ing. M. Sc. MARIO ROGER COTACALLAPA SUCAPUCA  
Director de la EPIA - UNAM

DE : Ing. M. Sc. MARIO ROGER COTACALLAPA SUCAPUCA  
Presidente Jurado dictaminador de tesis

ASUNTO : Informe de dictamen de tesis

FECHA : Moquegua, 13 de Noviembre del 2017

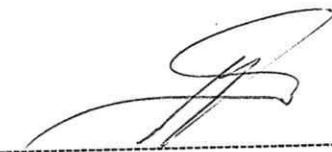
UNAM EPIA	FOLIO N° 004
UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL	
RECIBIDO	
14 NOV 2017	
Hora: 16:00	N° de Reg: 1039
Firma: 	Folio: 04 y 4 Anexos

Es grato dirigirme a usted, con la finalidad de informarle, respecto al dictamen de tesis de la egresada **Maryori Magali Huaracha José**, con el proyecto de tesis titulado "DETERMINACIÓN DE ASPERGILLUS SP Y AFLATOXINAS EN ALIMENTOS DESTINADOS AL CONSUMO DE BOVINOS Y AFLATOXINA M1 EN LECHE PROVENIENTES DE LA ASOCIACIÓN FONGAL MOQUEGUA"; la misma que con fecha 16 de Octubre se llevó a cabo el dictamen correspondiente, en la que el jurado ha visto por conveniente dictaminar como **APTO**, previo al levantamiento de las observaciones a que el jurado tuvo a bien de realizar.

Por consiguiente hago alcance la ficha de evaluación correspondiente con los vistos de los jurados, asesor y tesista y los ejemplares correspondientes.

Es todo cuanto informo a usted, para su conocimiento y fines que corresponda,

Atentamente,



Ing. M.Sc. Mario R. Cotacallapa Sucapuca  
Docente EPIA-UNAM

MRCS / .C.e./Archivo

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA  
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

Pase a: *secretaria*

Para: *mf. VIPAC*

.....

Fecha: *14/11/2017* V°B°



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA  
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL**

**FICHA DE EVALUACIÓN DEL PROYECTO DE TESIS**

Esta ficha deberá se llenada por el jurado dictaminador y revisor del Proyecto de Investigación, en una reunión conjunta con todos sus miembros y después de haber compatibilizado sus sugerencias:

TITULO DEL PROYECTO : DETERMINACIÓN DE *Aspergillus* sp. y AFLATOXINAS  
EN ALIMENTOS DESTINADOS AL CONSUMO DE BOVINOS  
(*Bos taurus*) y AFLATOXINA M1 EN LECHE  
PROVENIENTES DE LA ASOCIACIÓN FONGAL MOQUEGUA.

AUTOR : Maryori Magali Huaracha José  
DIRECTOR : Mg. Erik E. Allica Alca  
ASESOR :

- ¿El título tentativo refleja el problema objeto de estudio? SI (✓) NO (.....)  
Se sugiere.....
- ¿El problema de estudio concuerda con las líneas, programas y áreas de investigación de la EPIA? SI (✓) NO (.....)  
Se sugiere.....
- ¿El problema de estudio ayuda al conocimiento y/o solución de los problemas que aquejan a la realidad nacional y/o regional? SI (✓) NO (.....)  
Se sugiere.....
- ¿El planteamiento del problema objeto de estudio tiene sustento teórico y precisa con claridad lo que se sugiere investigar? SI (✓) NO (.....)  
Se sugiere.....
- ¿Se expone como antecedentes los resultados o avances de estudios anteriores relacionados con el problema objeto de investigación? SI (✓) NO (.....)

Se sugiere.....

6. ¿Los objetivos están elaborados de acuerdo con el problema objeto de estudio?  
 SI (~~X~~) NO (....)  
 Se sugiere.....

7. ¿Se precisa en los objetivos los logros que se espera alcanzar? SI (~~X~~) NO (....)  
 Se sugiere.....

8. ¿En el marco teórico expone suficientemente las teorías que sirven de sustento y explicación al problema objeto de investigación? SI (~~X~~) NO (....)  
 Se sugiere.....

9. ¿Se ha revisado la suficiente bibliografía para la elaboración del marco teórico?  
 SI (~~X~~) NO (....)  
 Se debe incluir además los siguientes conceptos .....

10. ¿Se incluyen todos los conceptos que intervienen en la investigación? SI (~~X~~) NO (....)  
 Se debe incluir además los siguientes conceptos .....

11. ¿Los conceptos están adecuadamente definidos? SI (~~X~~) NO (....)  
 Se debe incluir además los siguientes conceptos .....

12. LAS HIPÓTESIS:  
 a) ¿Tienen relación y responden al problema formulado)  
 SI (~~X~~) NO (....) Se deben de: .....

13. Método de la Investigación:  
 a) ¿Cuál es el tipo de investigación a ser desarrollada en el proyecto?  
 - Investigación Básica o Pura (....)  
 - Investigación aplicada (~~X~~)

SEÑOR DIRECTOR DE LA EPIA:

En mérito a la evaluación del proyecto, el jurado lo declara:

A) APTO (X...)

Por tanto debe ser inscrito en el Libro de Proyectos de Investigación de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial.

B) NO APTO (.....)

Por tanto, el Tesista debe de corregir las observaciones efectuadas por el Jurado Dictaminador y Revisor en el Presente formato y presentarlo oportunamente para una nueva revisión y evaluación.

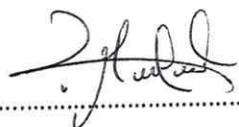
Moquegua C.U. a los 16 días del mes de octubre del 2017

  
.....  
PRESIDENTE  
Héctor Cabacallapan S.

  
.....  
Ing. Romulo Vilca Curo  
PRIMER MIEMBRO

  
.....  
Ing. Jerónimo M. Saino Burgos.  
SEGUNDO MIEMBRO

  
.....  
DIRECTOR O ASESOR DE TESIS  
Ing. ERIC E. ALCCA ALCA

  
.....  
TESISTA  
Maryori M. Huaracha José

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA**  
**AGROINDUSTRIAL**

**DETERMINACIÓN DE *Aspergillus sp.* Y AFLATOXINAS**  
**EN ALIMENTOS DESTINADOS AL CONSUMO DE**  
**BOVINOS (*Bos taurus*) Y AFLATOXINA M1 EN LECHE**  
**PROVENIENTES DE LA ASOCIACIÓN**  
**FONGAL MOQUEGUA**

**TESIS**

**PRESENTADO POR:**

**MARYORI MAGALI HUARACHA JOSÉ**

**Para optar el Título Profesional de:**

**INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

**MOQUEGUA – PERÚ**

**2017**

  
Ing. Rommelito Ulca Luis

  
Ing. Jeronimo Senca

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS .....	V
ÍNDICE DE CUADROS .....	V
ÍNDICE DE FIGURAS .....	VI
I. EL PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN.....	7
1.1. DESCRIPCIÓN DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA .....	7
1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA .....	8
1.2.1. Interrogante General .....	8
1.3. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN..	9
1.4. OBJETIVOS .....	10
1.4.1. Objetivo General .....	10
1.4.2. Objetivos Específicos .....	10
1.5. HIPÓTESIS .....	10
1.5.1. Hipótesis General.....	10
1.5.2. Hipótesis Específicas .....	11
II. MARCO TEÓRICO .....	12
2.1. ANTECEDENTES DEL ESTUDIO .....	12
2.2. BASES TEÓRICAS .....	14
2.2.1. Alimentación del ganado bovino .....	14
2.2.1.1. Tipos de alimentos en la dieta.....	15
2.2.2. La Leche .....	16
2.2.2.1. Generalidades .....	16
2.2.2.2. Producción .....	18
2.2.2.3. Propiedades físico-químicas de la leche .....	18
2.2.3. Hongos .....	19
2.2.3.1. Generalidades .....	19
2.2.3.2. Principales hongos aflatoxigénicos .....	20
2.2.3.2.1. <i>Aspergillus sp.</i> .....	21
2.2.3.3. Presencia de hongos toxigénicos en alimentos para bovinos ...	23
2.2.4. Micotoxinas .....	24
2.2.4.1. Aflatoxinas.....	26
2.2.4.1.1. Aflatoxina M1 .....	26

2.2.5.	Principales alimentos contaminados con aflatoxinas .....	27
2.2.6.	Efectos tóxicos de las aflatoxinas.....	27
2.2.7.	Aspectos legislativos en el control de aflatoxinas .....	29
III.	MARCO METODOLÓGICO .....	30
3.1.	LUGAR DE EJECUCIÓN .....	30
3.2.	TIPO Y DISEÑO.....	30
3.3.	NIVEL DE INVESTIGACIÓN.....	30
3.4.	OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES .....	30
3.4.1.	Variable Independiente .....	30
3.4.2.	Variable Dependiente.....	31
3.5.	Población y muestra.....	31
3.5.1.	La población.....	31
3.5.2.	Muestra .....	31
3.6.	TÉCNICAS E INSTRUMENTOS PARA RECOLECCIÓN DE DATOS VALIDACIÓN Y CONFIABILIDAD DE LOS INSTRUMENTOS.....	31
3.6.1.	Materia Prima .....	31
3.6.2.	Insumos.....	32
3.6.3.	Materiales y Equipos .....	32
3.6.3.1.	Materiales e Instrumentos de Laboratorio .....	32
3.6.3.2.	Equipos .....	33
3.6.4.	Metodología Experimental.....	33
3.6.4.1.	Etapas preliminares.....	34
3.6.4.2.	Determinación de la carga fúngica .....	35
3.6.4.3.	Identificación de cepas de <i>Aspergillus sp.</i> .....	37
3.6.4.4.	Cuantificación de aflatoxinas totales .....	38
3.6.4.5.	Cuantificación de aflatoxina M1 .....	38
3.7.	DISEÑO EXPERIMENTAL O MÉTODOS Y TÉCNICAS PARA LA PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS.....	38
IV.	ASPECTOS ADMINISTRATIVOS .....	40
4.1.	CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.....	40
4.2.	RECURSOS HUMANOS.....	42
4.3.	BIENES .....	42

4.4.	SERVICIOS.....	42
4.5.	FUENTES DE FINANCIAMIENTO Y PRESUPUESTO.....	42
V.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
VI.	ANEXOS.....	50

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición general de la leche en diferentes especies (por cada 100 g) .....	17
Tabla 2. Requisitos físico-químicos de la leche .....	18
Tabla 3. Principales hongos micotoxigénicos y sus micotoxinas .....	21
Tabla 4. Tabla de registro de datos.....	38

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Diagrama de Gantt .....	40
Cuadro 2. Presupuesto .....	43

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras morfológicas del género <i>Aspergillus</i> sp. ....	23
Figura 2. Fase de crecimiento fúngico y localización de la síntesis de mocotoxinas. ....	25
Figura 3. Metodología experimental del proyecto .....	34

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Encuesta de inspección .....	50
Anexo 2. Técnica de "M" para el muestreo de alimentos (NOM-247- SSA1-2008).....	51
Anexo 3. Método del cuarteo Tejada (1992) .....	51
Anexo 4. Método horizontal para la enumeración de mohos y levaduras. Parte 1: Técnica de recuento de colonias en productos con actividad acuosa ( $A_w$ ) superior a 0.95 .....	53

## I. EL PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN

### 1.1. DESCRIPCIÓN DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA

El FONGAL Moquegua, es una Asociación dedicada a la producción de leche mediante la cría de ganado bovino, donde se utilizan técnicas de producción y manejo del cultivo del maíz, así como también el almacenamiento de los concentrados para la alimentación del ganado. La técnica utilizada depende mucho del nivel económico con el que cuenta cada productor asociado a FONGAL, donde se tienen identificados productores semi-intensivos y extensivos, presentándose diferentes problemas en la crianza y el manejo de los animales, así como también durante la producción de leche.

En la Asociación FONGAL Moquegua, el ensilado de maíz y el alimento concentrado se emplean constantemente durante la alimentación del ganado, haciendo que estos suplementos formen parte de la dieta diaria de los animales, las materias primas para la producción de estos alimentos son cultivados, procesados y en algunos casos solo almacenados (alimento concentrado) por los mismos productores. El limitado conocimiento y las escasas capacitaciones a los productores en temas del manejo del cultivo, procesamiento y almacenamiento del ensilado y alimento concentrado, han originado en la actualidad una posible contaminación con hongos del género *Aspergillus sp.* y la producción de aflatoxinas en estos alimentos, afectando el estado sanitario de los animales, (Cotty y Jaime-García, 2007) contribuyen a la posibilidad de esta contaminación al mencionar que pueden ocurrir en regiones con regadío de desiertos cálidos y en zonas templadas con época de sequía definida.

Los *Aspergillus sp.* son considerados hongos potencialmente aflatoxigénicos, cuando se dan las condiciones de humedad y temperatura estos hongos producen metabolitos secundarios llamados aflatoxinas que son las micotoxinas más importantes debido a su alto efecto carcinogénico,

ocasionando una serie de factores perjudiciales en el crecimiento y desarrollo de animales que consumen alimentos contaminados con estas toxinas.

Estos metabolitos son tóxicos para los seres humanos y los animales cuando se consume o se inhala, y la exposición a micotoxinas a través de alimentos contaminados es uno de los principales riesgos que afectan a la salud de los rumiantes (Bennett y Klich, 2003; Kalac y Woolford, 1982).

Las aflatoxinas son toxinas cancerígenas potentes, la ingestión de hepatotóxicos aflatoxina B1 (AFB1) por los animales lactantes puede inducir la presencia de aflatoxina M1 en la leche (Corbett *et al.*, 1988). La M1 es muy importante porque se acumula en leche, tejidos y huevo aproximadamente 24 h después del consumo de alimento (Fernández, *et al.*, 1997; Montaña *et al.*, 2007).

En una investigación realizada en Lima por Caballero *et al.* (2001) determinó el contenido de aflatoxinas en muestras de maíz para consumo animal, el estudio se basó en muestras de maíz nacional he importado, encontrándose niveles máximos de 37.8 µg/kg y 12.5 µg/kg respectivamente, concluyendo que el maíz nacional presenta una mayor contaminación por aflatoxinas que el maíz importado.

No habiendo estudios en nuestra localidad para estos contaminantes, es por ello que el presente estudio plantea determinar la presencia del hongo del género *Aspergillus sp.* y aflatoxinas totales en alimentos destinados al consumo de bovinos (*Bos taurus*) y aflatoxina M1 en la leche.

## **1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA**

### **1.2.1. Interrogante General**

¿Los niveles de aflatoxinas en los alimentos destinados al consumo de ganado bovino (*Bos taurus*) estarán influenciadas por la presencia del hongo del género *Aspergillus sp.*?

### 1.3. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN

El estudio de la determinación de hongos del género *Aspergillus sp.* y la cuantificación de aflatoxinas totales en el ensilado y alimento concentrado destinados al consumo de bovinos (*Bos taurus*) y aflatoxina M1 en la leche, beneficiará a los productores de la Asociación FONGAL Moquegua, debido a que el conocimiento de la existencia de estos contaminantes o la posible contaminación que pudiera presentarse en el ensilado durante cualquier etapa de la producción del alimento, así como el almacenamiento del concentrado, permitirá que el productor mejore el manejo de la producción del maíz y las condiciones de almacenamiento de los alimentos, permitiéndoles obtener un producto de mejor calidad, asegurando de esta manera el estado sanitario del ganado, con un buen crecimiento y desarrollo, incrementando los niveles económicos de las familias dedicadas a la producción de ganado.

Por otro lado, el estudio también permitirá conocer la calidad microbiológica de los alimentos que se obtienen comercialmente para la alimentación del ganado.

Así mismo este estudio será el inicio para nuevas investigaciones por parte de las universidades y/o centros de investigación, los cuales promoverán nuevos conocimientos sobre la determinación de hongos y aflatoxinas totales en el ensilado y alimento concentrado destinados al consumo de bovinos (*Bos taurus*) y aflatoxina M1 en leche, contando con profesionales especializados y laboratorios debidamente equipados e implementados. Permitiendo de esta manera evaluar los niveles de aflatoxinas en los alimentos y aflatoxina M1 en leche fresca.

## **1.4. OBJETIVOS**

### **1.4.1. Objetivo General**

- Determinación de la presencia de *Aspergillus sp.* y la contaminación por aflatoxinas totales en el ensilado y alimento concentrado destinados al consumo de bovinos (*Bos taurus*) y aflatoxina M1 en leche provenientes de la Asociación FONGAL Moquegua.

### **1.4.2. Objetivos Especificos**

- Determinar la carga fúngica en el ensilado y alimento concentrado destinados al consumo de bovinos (*Bos taurus*) mediante recuentos de unidades formadoras de colonias (U.F.C./g).
- Identificar cepas de *Aspergillus sp.* en el ensilado y alimento concentrado destinados al consumo de bovinos (*Bos taurus*).
- Cuantificar los niveles de aflatoxinas totales en el ensilado y alimento concentrado destinados al consumo de bovinos (*Bos taurus*) mediante Ensayo Inmunoenzimático Ligado a Enzimas (ELISA).
- Cuantificar los niveles de aflatoxina M1 en leche mediante Ensayo Inmunoenzimático Ligado a Enzimas (ELISA).

## **1.5. HIPÓTESIS**

### **1.5.1. Hipótesis General**

- Los niveles de aflatoxinas en los alimentos destinados al consumo de ganado bovino (*Bos taurus*) está influenciada por la presencia del hongo del género *Aspergillus sp.*

### 1.5.2. Hipótesis Específicas

- La determinación de la carga fúngica en el ensilado y alimento concentrado mediante recuentos de unidades formadoras de colonias (U.F.C./g) permitirá conocer el nivel de contaminación por estos microorganismos.
- La identificación de cepas de *Aspergillus sp.* en el ensilado y alimento concentrado permitirá conocer la contaminación del alimento destinado al consumo de bovinos (*Bos taurus*) por estos mohos.
- La cuantificación de aflatoxinas totales mediante Ensayo Inmunoenzimático Ligado a Enzimas (ELISA) permitirá establecer si el ensilado y alimento concentrado se encuentran dentro de los límites permisibles por el Codex Alimentarius.
- La cuantificación de aflatoxina M1 mediante Ensayo Inmunoenzimático Ligado a Enzimas (ELISA) permitirá establecer si la leche se encuentra dentro de los límites permisibles por el Codex Alimentarius.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. ANTECEDENTES DEL ESTUDIO

Keller *et al.* (2013) estableció la presencia de especies de hongos toxigénicos y determinó las aflatoxinas (AFS), en ensilaje de maíz destinados a los bovinos antes y después de la fermentación. El recuento fúngico se realizó por el método de dispersión en la superficie, la contaminación natural por aflatoxinas mediante HPLC. Los recuentos totales de hongos eran generalmente altos, se aislaron cepas toxigénicas donde las especies predominantes fueron *Aspergillus Flavus*, *Penicillium citrinum* y *Fusarium verticillioides*. Los niveles de aflatoxinas difirieron ( $P < 0,0001$ ) de 2 a 45  $\mu\text{g g}^{-1}$  y de 2 a 100  $\mu\text{g g}^{-1}$  en muestras pre y post-fermentación, respectivamente. Las micotoxinas y hongos toxigénicos estaban presentes antes y después de la fermentación en el ensilaje de maíz destinado a bovinos. Aflatoxina B 1 (AFB1) aumentó durante el almacenamiento.

Vázquez (2014) determinó los niveles de aflatoxinas totales (AFT) en el alimento y aflatoxinas M1 (AFM1) en la leche cruda, se realizó un estudio en 20 ranchos lecheros ubicados en cuatro municipios (Villaflores, Villacorzo, Ocozocoautla y Berriozabal) de Chiapas. Los análisis de AFT y AFM1 realizados en muestras de alimento y leche se realizaron empleando técnicas de ELISA. Los resultados no mostraron diferencias en los niveles de AFT entre municipios ( $p > 0.05$ ). Sin embargo, se observó que Villaflores ( $27.65 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) superó el valor permitido en la norma sanitaria de alimento. En relación a AFM1 existieron diferencias ( $P < 0.05$ ) entre municipios, siendo Villaflores y Villacorzo de ( $0.348, 0.096 \mu\text{g L}^{-1}$ ) los que alcanzaron mayores niveles, pero no superaron la norma. Además, se observó que las dietas con grano de maíz y pollinaza fueron las que se asociaron con una mayor contaminación con AFT.

Reyes *et al.* (2009) determinó los niveles de aflatoxinas totales (AFT) en alimento y AFM1 en leche cruda en 40 hatos lecheros. Se obtuvieron muestras de raciones de bovinos (n=40) y se analizó AFT mediante ELISA de tipo competitivo directo. Las muestras de leche (n=40) fueron analizadas para AFM1 empleando ELISA de inhibición directa. Los resultados mostraron contaminación con AFT en el 92.5 % de las raciones, con niveles entre 4.82 a 24.89  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  (media =  $10.84 \pm 5.84 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ). Del total de las muestras contaminadas, 9.3 % contenían niveles superiores al valor permitido por las Normas Oficiales Mexicanas (20  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ). AFM1 se presentó en el 80 % de las muestras de leche, los niveles detectados fluctuaron de 0.006 a 0.065  $\mu\text{g L}^{-1}$  (media =  $0.023 \pm 0.016 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Ninguna de las muestras sobrepasó el nivel permitido por la regulación (0.5  $\mu\text{g L}^{-1}$ ).

(Landeros *et al.*, 2012) estudió la presencia de AFM1 en leche cruda de vaca de 10 centros de acopio (n=50) y 7 marcas de leche pasteurizada (n=84) comercializadas en la zona metropolitana de Guadalajara, Jalisco, México. La determinación de AFM1 se realizó mediante un juego de reactivos tipo ELISA competitivo- directo (Agraquant® Aflatoxina M1, Romer Labs). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante una prueba de ANOVA de una sola vía con el programa Sigma Stat 3.0. Se detectó AFM1 en el 100% de las muestras estudiadas, con niveles en el rango de < 0.005 a 0.100  $\mu\text{g/L}$  y de < 0.005 a 0.637  $\mu\text{g/L}$  en leche cruda y pasteurizada respectivamente. El 18.6 % (25/134) de las muestras superaron el LMR establecido por la Unión Europea (0.05  $\mu\text{g/kg}$ ), presentándose porcentajes en leches cruda y pasteurizada de 0.7% (1/134) y 17.9% (24/134) respectivamente, pero sólo el 0.7 % (1/134) excedió el límite de AFM1 establecido para México en la NOM-243-SSA1-2010, que es de 0.5  $\mu\text{g/kg}$ . Se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre los meses analizados, con los niveles mayores en el mes de diciembre, pero no se encontraron diferencias entre centros de acopio (leche cruda) y tampoco entre marcas de leche pasteurizada.

Caballero *et al.* (2001) determinó el contenido de aflatoxinas totales en muestras de maíz amarillo importado y de cosecha nacional para consumo animal. Se tomaron al azar 50 muestras de maíz amarillo (*Zea mays*) variedad indurata, de origen importado (30) y nacional (20), adquiridos en los principales mercados de Lima y Callao. Los análisis de aflatoxinas se determinó utilizando la técnica de ELISA. Los resultados mostraron contaminación por aflatoxinas en muestras de maíz nacional he importado, encontrándose niveles máximos de 37.8 µg/kg y 12.5 µg/kg respectivamente, concluyendo que el maíz nacional presenta una mayor contaminación por aflatoxinas que el maíz importado.

## **2.2. BASES TEÓRICAS**

### **2.2.1. Alimentación del ganado bovino**

Según Fink (2008) define a los bovinos como seres rumiantes, que se caracterizan por una fermentación pre-sistémica y a la digestión de componentes de plantas como celulosa por la flora ruminal, requieren regímenes de alimentación que incluyan suficiente cantidad de fibra para mantener el funcionamiento óptimo de la flora ruminal.

La modificación de la alimentación del ganado trae consigo beneficios productivos para el ganadero, pero a la vez se generan algunos problemas para el ganado que es sometido a límites metabólicos y esto deriva en enfermedades que inciden en la producción (Fink, 2008).

En la mayoría de los países, los componentes principales de las dietas alimenticias del ganado bovino son los ensilajes de maíz, forrajes y concentrados. Una consecuencia directa de la composición compleja de la dieta de los rumiantes es el riesgo a la exposición de alguna micotoxina (Fink, 2008).

### **2.2.1.1. Tipos de alimentos en la dieta**

#### **a. Forrajes**

Las vacas, como seres vegetarianos y rumiantes que son, requieren que la base de su alimentación provenga de forrajes verdes. La importancia de los forrajes en la ración se debe principalmente a su aporte en fibras, carbohidratos y proteínas (Watson, 2011).

Desde el punto de vista nutricional los forrajes pueden variar, desde ser alimentos muy buenos (pastos jóvenes y succulentos, leguminosas en su estado vegetativo) a muy pobres (pajas). Algunos forrajes deben de ser suplementados con alimento concentrado, para cubrir la mayoría de los requerimientos nutricionales del animal (FAO, 2007).

#### **b. Ensilado de maíz**

El ensilaje es una práctica generalizada para conservar forraje durante periodos de tiempo prolongados. La producción de ensilaje de maíz implica la incorporación de toda la planta y su almacenamiento se basa en el principio de conservación en condiciones anaeróbicas con el crecimiento de bacterias de ácido láctico. Estas bacterias promueven una fermentación natural que reduce el pH a un nivel que se considera desfavorable para el crecimiento de clostridios y la mayoría de los mohos (Richard *et al.*, 2007 ).

Oude *et al.* (1999) afirma, que durante el proceso de conservación del ensilaje se pueden distinguir cuatro fases:

- Fase aeróbica. – Ocurre durante las primeras horas luego del cierre del silo, el oxígeno atmosférico presente en la masa vegetal disminuye rápidamente debido a la respiración de los materiales vegetales y a los microorganismos aeróbicos.

- Fase de fermentación. - Esta fase comienza al producirse un ambiente anaeróbico. Dura de varios días hasta varias semanas, si la fermentación se desarrolla con éxito, la actividad BAC proliferará y se convertirá en la población predominante. A causa de la producción de ácido láctico y otros ácidos, el pH bajará a valores entre 3,8 a 5,0.
- Fase estable. – Al mantenerse el ambiente sin presencia de aire, ocurren pocos cambios, alcanzando su nivel de estabilidad. Los microorganismos presentes reducen su actividad, permitiendo la conservación del producto.
- Fase de deterioro aeróbico. – Esta fase comienza con la apertura del silo y la exposición del ensilaje al aire. Esto es inevitable cuando se requiere extraer y distribuir el ensilaje, pero puede ocurrir antes de iniciar la explotación por daño de la cobertura del silo (por ejemplo: roedores o pájaros).

### **c. Concentrado**

Es aquel alimento de origen animal y vegetal y que pueden ser proteicos o energéticos, pueden estar contenidos en frutos, granos, subproductos de procesamiento de grano o en alimentos basados en harinas de algunos animales como la harina de pescado. Generalmente son menos voluminosos y presentan una mejor digestibilidad y valor nutritivo. Los granos de cereales son ricos en carbohidratos, proteínas y lípidos dependiendo de la especie (gramínea o leguminosa). Por ejemplo, el maíz, trigo y sorgo son ricos en almidón, la soya es rica en proteínas y el girasol y las semillas de ajonjolí son ricos en lípidos (INATEC, 2016).

## **2.2.2. La Leche**

### **2.2.2.1. Generalidades**

La leche es uno de los alimentos más antiguos consumidos por el hombre, tiene un valor nutricional muy alto, ya que posee una gran cantidad de

energía, proteínas de fácil asimilación, grasa, calcio, fósforo y varias vitaminas necesarias para muchas etapas en la vida del ser humano (Maza y Logorreta, 2011).

De acuerdo a la Norma Técnica Peruana 202.001 (2003) la leche se define como el producto íntegro no alterado ni adulterado del ordeño higiénico, regular y completo de vacas sanas y bien alimentadas, sin calostro y exento de color, olor, sabor y consistencia anormales y que no ha sido sometido a procesamiento o tratamiento alguno.

La definición de leche está dada por su origen y hace referencia al producto de la secreción normal de la glándula mamaria de animales bovinos sanos, obtenida por uno o varios ordeños diarios, higiénicos, completos e ininterrumpidos (Agudelo y Bedoya, 2005).

La leche es una compleja mezcla de distintas sustancias, presentes en suspensión o emulsión y otras en forma de solución verdadera y presenta sustancias definidas: agua, grasa, proteína, lactosa, vitaminas, minerales; a las cuales se les denomina extracto seco o sólidos totales. Los sólidos totales varían por múltiples factores como lo son: la raza, el tipo de alimentación, el medio ambiente y el estado sanitario de la vaca entre otros (Lerche, 2005). La composición de la leche varía en función a cada especie como se aprecian en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición general de la leche en diferentes especies (por cada 100 g)

<b>Nutriente (gr) Baca</b>	<b>Vaca</b>	<b>Búfala</b>	<b>Mujer</b>
Agua	88.00	84.00	87.50
Energía (Kcal).	61.00	97.00	7.00
Proteína	3.20	3.70	1.00
Grasa	3.40	6.90	4.40
Lactosa	4.70	5.20	6.90
Minerales	0.72	0.79	0.20

Fuente: Wattiax (2005)

### 2.2.2.2. Producción

Actualmente la región de Moquegua produce aproximadamente 15 TM de leche fresca al año, siendo la Provincia de Mariscal Nieto el de mayor producción con más de 10 TM de leche fresca anuales (MINAG, 2015).

La producción de especies de vacunos en el año 2015 alcanzó los 22 981 cabezas de ganado, donde la Provincia de Mariscal Nieto tubo una producción de 9 740 cabezas de ganado, dentro de los distritos de esta provincia la de mayor producción fue Moquegua con 5 336 cabezas de ganado (MINAG, 2015).

### 2.2.2.3. Propiedades fisicoquímicas de la leche

Desde el punto de vista físico-químico, la leche es una mezcla homogénea de un gran número de sustancias (lactosa, glicéridos proteínas, proteínas, sales, vitaminas, enzimas, grasas, etc.) (Ordoñez, 1998).

En la Tabla 2 se muestran los requisitos físico-químicos que debe cumplir la leche cruda según la NTP 201.001.

Tabla 2. Requisitos fisicoquímicos de la leche

Requisitos	Valor
Materia grasa (g/100 g)	Mínimo 3.2
Sólidos no grasos (g/100 g)	Mínimo 8.2
Sólidos totales (g/100 g)	Mínimo 11.4
Acidez, expresada en g de ácido láctico (g/100 g)	0.14 - 0.18
Densidad a 15 °C (g/mL)	1.0296 - 1.0340
Índice de refracción del suero, 20 °C	Mínimo 1.34179 (Lectura refractómetra 37.5)
Ceniza total (g/100g)	Máximo 0.7
Alcalinidad de la ceniza total (mL de Solución de Na OH 1 N)	Máximo 0.7
Índice crioscópico	Máximo -0.540 °C
Sustancias extrañas a su naturaleza	Ausencia
Prueba de alcohol (74 % v/v)	No coagulable
Prueba de la reductasa con azul de metileno	Mínimo 4 horas

Fuente: NTP (2003)

## 2.2.3. Hongos

### 2.2.3.1. Generalidades

Los hongos son pequeños organismos, generalmente microscópicos, eucariotas, usualmente filamentosos, ramificados, que carecen de clorofila (Agrios, 2005).

Se da el nombre de mohos a ciertos hongos multicelulares, filamentosos, cuyo crecimiento en los alimentos se conoce fácilmente por su aspecto aterciopelado o algodonoso. Para vivir, proliferar y ejercer su acción requieren de ciertas condiciones: características del sustrato (disponibilidad de nutrientes, oxígeno y dióxido de carbono) y factores ambientales (pH, humedad y temperatura). En lo que respecta a la humedad relativa, requieren menos humedad que las levaduras y las bacterias. La humedad relativa óptima para el crecimiento de los hongos es de 85%. En cuanto a la temperatura la mayoría de los hongos pueden considerarse mesófilos, es decir, crecen bien a la temperatura ambiente óptima de 25 a 30°C, y con relación al pH la mayoría crecen a un intervalo amplio. Los mohos que invaden a las semillas en el campo, previo a la cosecha, son *Fusarium sp.*, *Alternaria sp.*, algunos *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.* y *Mucor sp* (Raybaudi y Martínez, 2000).

Los hongos en su mayoría poseen un cuerpo vegetativo filamentosos llamado micelio. Este se ramifica en todas direcciones, las ramas individuales del micelio son llamadas hifas y son generalmente uniformes, de espesor por lo general de 2 a 10 micrómetros de diámetros (Agrios, 2005).

Los hongos se reproducen por medio de esporas. Las esporas son estructuras reproductivas especializadas para la propagación del hongo, que constan de una o varias células. Estas estructuras pueden formarse asexualmente (mediante la producción de las esporas por el micelio del

hongo, sin intervención de cariogamia o meiosis), o ser el resultado de un proceso sexual (Agrios, 2005).

El papel de los hongos es muy importante, ya que son responsables en gran medida de la descomposición de los restos vegetales y de la sustancia orgánica gracias a su ubicuidad y a su número extremadamente alto (Guzmán, 1981; Bold *et al.*, 1988).

Soriano del Castillo (2007) menciona que los hongos utilizan para su crecimiento una serie de sustancias químicas denominadas metabolitos primarios, como pueden ser ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos y lípidos mayoritariamente. El uso de estos metabolitos primarios se asocia con la fase de rápido crecimiento del hongo.

Los metabolitos secundarios son una serie de compuestos que no son esenciales para el crecimiento vegetativo en cultivo puro. Dentro de este grupo, tenemos a los antibióticos y a las micotoxinas. Las micotoxinas se suelen formar al final de la fase exponencial o al principio de la fase estacionaria del crecimiento del moho (Soriano del Castillo, 2007).

#### **2.2.3.2. Principales hongos aflatoxigénicos**

Los hongos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* son los que producen las micotoxinas de mayor interés en las micotoxicosis humana y animal; menos considerable se muestra el género *Alternaria* (Fernández, 2000). El desarrollo visible de estos hongos en los alimentos, conlleva al riesgo de la producción de micotoxinas; sin embargo, no constituye una evidencia clara de la presencia de las mismas, de igual forma que la ausencia de hongos toxigénicos viables, incluso demostrado mediante análisis de laboratorio, no es un excluyente de que las toxinas se encuentren en el alimento (Fernández, 2000).

Las micotoxinas más importantes desde el punto de vista económico y toxicológico son las aflatoxinas, producidas por hongos del género

*Aspergillus*, ya que, entre sus metabolitos tóxicos, se encuentra la Aflatoxina B1 (AFB1), considerada como la sustancia con potencial carcinogénico más elevado que existe en la naturaleza. *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius* son los principales productores (Rodríguez *et al.*, 2007; Ruíz y Font, 2007). En la Tabla N° 2 se muestran los principales hongos micotoxigénicos y sus respectivas micotoxinas.

Tabla 3. Principales hongos micotoxigénicos y sus micotoxinas

Hongo	Micotoxina
<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoxinas B1 y B2
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Aflatoxinas B1, B2, G1 y G2
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	Toxina T-2; Desoxinivalenol (nivalenol); Zearalenona
<i>Fusarium moniliforme</i> (F. verticillioides)	Fumonisina B1
<i>Penicillium verrucosum</i>	Ocratoxina A
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Ocratoxina A

Fuente: FAO (2007)

#### 2.2.3.2.1. *Aspergillus sp.*

Pertenece a la familia Aspergillaceae, género *Aspergillus*. De este género se conoce 185 especies. Los hongos de éste género están muy difundidos, son oportunistas y viven como saprófitos en el suelo, vegetales en descomposición, cualquier tipo de materia orgánica causando el deterioro de muchos productos alimenticios, entre ellos el maíz (Guzmán, 2008).

Los productos metabólicos de la invasión fúngica suelen ser muy tóxicos (en especial los producidos por *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*), tanto para el hombre como para los animales.

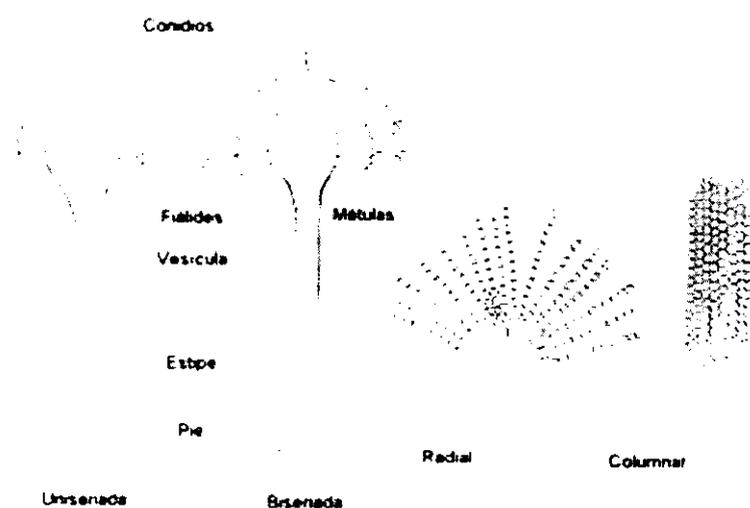
### a. Morfología e identificación

El color es la principal característica macroscópica para la identificación de los grupos de *Aspergillus*. Poseen distintos tipos de verde, pardo, amarillo, blanco, gris y negro. Las cabezas conidiales (conidióforos), presentan bajo el microscopio cuatro formas básicas: globosa, radiada, columnar o claviforme (Carrillo, 2003). Sobre éstas se encuentran las células conidiógenas que originan las esporas asexuales o conidios.

El conidióforo característico de *Aspergillus*, aunque es una estructura unicelular, posee tres partes bien diferenciadas: vesícula (extremo apical hinchado), estipe (sección cilíndrica situada debajo de la vesícula) y célula pie (sección final a veces separada por un septo, que une el conidióforo con el micelio). Sobre la vesícula se disponen las células conidiógenas, denominadas habitualmente fiálides. En muchas especies, entre la vesícula y las fiálides se encuentran otras células denominadas métulas. Las cabezas conidiales que sólo presentan fiálides se denominan uniseriadas, y las que presentan fiálides y métulas biseriadas (Abarca, 2000; Samson et al., 2000).

Los conidióforos de *Aspergillus* se originan en unas células micelares denominadas células basales, éstos se mantienen erectos sobre las hifas somáticas y forman unos abultamientos globosos llamados vesículas (Bold et al., 1988). En la Figura 1 se pueden observar las estructuras que componen los llamados cuerpos fructíferos de *Aspergillus spp.*

Figura 1. Estructuras morfológicas del género *Aspergillus* sp.



Fuente: Samson *et al.* (2000)

#### b. Condiciones para su crecimiento

El rango de temperatura para la mayoría de las especies es de 30-33°C. Si unos granos con un contenido de humedad con el 15% no fueron afectados por *Aspergillus* durante un año es porque la temperatura de almacenamiento estuvo por debajo de 10°C (Carrillo, 2003).

El estrés hídrico en el campo durante la polinización ha sido relacionada con el incremento en el aire, del número de esporas de *Aspergillus*. Por consiguiente, cuando se presenta el estrés de sequía durante esta etapa, se incrementa la carga de inóculo (esporas en el aire) aumentando la oportunidad de que ocurra una infección, ya que, al mantenerse las condiciones de sequía en el campo, *Aspergillus* podría desarrollarse a lo largo de toda la permanencia del cultivo en el campo (Cassel *et al.*, 2001).

#### 2.2.3.3. Presencia de hogos toxigénicos en alimentos para bovinos

La contaminación de alimentos por hongos filamentosos y levaduras es causa de grandes pérdidas económicas en todo el mundo. Muchos hongos son reconocidos agentes de deterioro y pueden alterar las características

organolépticas de los alimentos. Desde el punto de vista sanitario, algunos de ellos producen esporas que generan reacciones alérgicas en el hombre y animales. Otros presentan la capacidad de producir una gran variedad de metabolitos secundarios denominados micotoxinas. Los hongos productores de micotoxinas se encuentran muy difundidos en el ambiente y resultan ser contaminantes frecuentes de los alimentos (Pitt Hocking, 1999).

Las especies que se presentan frecuentemente pertenecen a los géneros *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Byssochlamys*, *Absidia*, *Arthrinium*, *Geotrichum*, *Monascus*, *Scopulariopsis* y *Trichoderma* (Pelhate, 1977; Jonsson *et al.*, 1990; Nout, 1993). Los mohos disminuyen el valor nutritivo, la palatabilidad del ensilaje y son un riesgo para la salud de los animales y las personas.

Los hongos filamentosos presentan una gama óptima de temperatura de crecimiento que se encuentra entre 28 y 37 °C y pueden crecer en un amplio rango, el cual se extiende entre 12 y 48°C. Se presentan en la naturaleza bajo la forma de micelio o esporas sexuales o asexuales llamadas conidios. Bajo condiciones adversas tales como desecación o escasez de nutrientes, forman estructuras de resistencia. De este modo permanecen latentes hasta que las condiciones ambientales cambian y se hacen favorables; es entonces cuando los esporos germinan dando nuevo micelio (Cotty, 1988; Yu *et al.*, 2005).

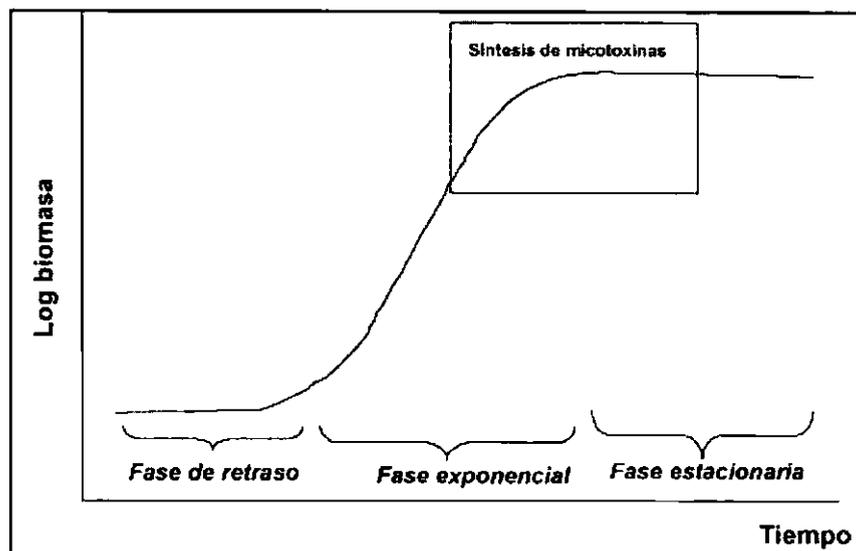
#### **2.2.4. Micotoxinas**

Las micotoxinas son metabolitos secundarios, tóxicos, producidos por algunas especies fúngicas en determinadas condiciones, las cuales pueden contaminar alimentos y cultivos a través de la cadena alimentaria (Prandini *et al.*, 2009).

El término micotoxinas es la combinación de la palabra griega "mykes": hongo y la palabra latina "toxicum": veneno. Se trata, en general, de moléculas relativamente pequeñas ( $PM < 700 \text{ Da}$ ) con estructura química y actividad biológica muy diversa, capaces de desencadenar diversas alteraciones y cuadros patológicos en el hombre y en los animales, denominadas micotoxicosis (Turner *et al.*, 2009).

Las micotoxinas se generan cuando la fase de crecimiento del hongo llega a su etapa final y durante la fase estacionaria, siendo a menudo asociado con la diferenciación y la esporulación (Moss, 1991). En la Figura 2 se puede apreciar la fase de crecimiento del hongo y la etapa de producción de micotoxinas (Soriano del Castillo, 2007).

Figura 2. Fase de crecimiento fúngico y localización de la síntesis de micotoxinas.



Fuente: Soriano del Castillo (2007)

Las micotoxinas pueden contaminar los alimentos, los piensos, las materias primas utilizadas para su elaboración, originando un grupo de enfermedades y trastornos denominados micotoxicosis, y que resulta tóxico para el hombre o los animales (Soriano del Castillo, 2007).

Durante la fase de post-cosecha, la proliferación de hongos y producción de aflatoxinas puede aumentarse en sitios de almacenamiento calientes y húmedos (Díaz, 2006).

#### **2.2.4.1. Aflatoxinas**

Son las micotoxinas más importantes. Se trata de un conjunto de metabolitos secundarios del grupo difuranocumarina, producidos principalmente por tres especies de *Aspergillus* (*flavus*, *parasiticus* y *nomius*) bajo condiciones de humedad y calor; sin embargo, se ha demostrado que la especie *A. flavus* es la cepa contaminante más común en la producción agrícola (Turner *et al.*, 2009).

Hasta ahora han sido identificadas dieciocho aflatoxinas, pero solo cuatro de ellas se han encontrado en alimentos y piensos: B1, B2, G1 y G2 (Heshmati y Milani, 2010). *Aspergillus flavus* produce solo aflatoxinas B, mientras las otras dos especies producen ambas aflatoxinas B y G. (Zinedine *et al.*, 2006). Las demás aflatoxinas conocidas resultan del metabolismo de alguna de estas como son la aflatoxina M1 y M2, que se excretan en leche de hembras de mamíferos que consumen AFB1 en la dieta.

Las aflatoxinas son las sustancias carcinógenas más potentes hasta ahora conocidas, por lo que son las micotoxinas más estudiadas y controladas. Son producidas principalmente por los hongos *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius* (Ruíz y Font, 2007; Smith, 2005)

##### **2.2.4.1.1. Aflatoxina M1**

La inocuidad de la leche se ve afectada, por el forraje que se alimenta el ganado que está contaminado o enmohecido, proliferación de hongos del género *Aspergillus flavus* que producen la aflatoxina B1. Al ingerir las vacas lecheras estos alimentos o raciones contaminadas con aflatoxina B1 en el organismo del animal sufre una biomagnificación, producto del

metabolismo animal, generando la denominada aflatoxina M1, esta se acumula en los tejidos del animal y un porcentaje eliminada a través de los líquidos biológicos como la leche y orina, dentro de las 12 a 24 horas de ingestión del alimento contaminado o enmohecido con el hongo que produce la aflatoxina B1. La leche contaminada con aflatoxina M1 afecta la salud del ser humano y animal de manera alarmante, deteriorando órganos como el cerebro, riñón e hígado principalmente, por ser estas cancerígenas, teratogénicas, hepatotóxicas e inmunosupresivas (CONACYT, 2002).

#### **2.2.5. Principales alimentos contaminados con aflatoxinas**

Ocurre en todos los ensilajes al ser abiertos y expuestos al aire para su empleo, pero puede ocurrir antes por daño de la cobertura del silo (p. ej. roedores o pájaros). El período de deterioro puede dividirse en dos etapas. La primera se debe al inicio de la degradación de los ácidos orgánicos que conservan el ensilaje por acción de levaduras y ocasionalmente por bacterias que producen ácido acético. La segunda fase de deterioro incluye la actividad de otros microorganismos aerobios, también facultativos, como mohos y enterobacterias (Honig, 1980).

#### **2.2.6. Efectos tóxicos de las aflatoxinas**

Las aflatoxicosis o enfermedades causadas por la ingestión de aflatoxinas, pueden ser agudas y llegar a causar la muerte, o crónicas, dando lugar a cáncer, inmunosupresión y otras patologías "lentas" (Hsieh, 1988). Dentro de los efectos agudos se han descrito los síndromes de Kwashiorkor y de Reye. Ambos afectan a niños y adolescentes, y se relacionan con una severa malnutrición, y encefalopatía y degeneración grasa de las vísceras, respectivamente (Hayes, 1980). A largo plazo, estas toxinas pueden reaccionar y modificar el ADN, dando lugar a la formación de lesiones pro-mutagénicas que provocan la activación de protooncogenes y la

inactivación de genes supresores de tumores, son también genotóxicas, teratogénicas y tienen efectos anti nutricionales (Kensler *et al.*, 2003).

Las aflatoxinas son sustancias altamente tóxicas para la especie bovina deteriorando su función homeostática, afectando sus órganos blancos como hígado y riñón y causando la muerte del animal (Camean y Repetto, 2008).

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

En la especie humana cuando son ingeridas a través de los productos alimenticios contaminados los efectos tóxicos son también importantes porque generan cáncer, hepatotoxicidad y mutagénesis, siendo mayor el riesgo para niños y jóvenes por el consumo importante de leche en esta etapa de desarrollo (Camean y Repetto, 2008).

En los animales como las vacas lecheras se ha observado una disminución en la eficiencia reproductiva y en la producción de leche por el consumo de alimento con 120 ppb AFS; existiendo un incremento del 25 % en la producción al retirarse el alimento contaminado (Guthrie, 1979).

Un estudio realizado a 110 muestras de leche pasteurizada de los supermercados de Mashhad-Irán, durante abril a mayo de 2006, registraron concentraciones de 0.008 a 0.034, 0.009 a 0.039 y 0.013 a 0.089 ppb de AFM1, resultando el 100 % de las muestras contaminadas por AFM1, de las cuales el 5.4 % tenían AFM1, superior al límite de la tolerancia máxima (0.05 ppb) aceptada por la Unión Europea (Gholamreza *et al.*, 2007).

### **2.2.7. Aspectos legislativos en el control de aflatoxinas**

La Comisión del Codex Alimentarius (CCA), apoyada por la FAO y la OMS, apunta a facilitar el comercio mundial y a proteger la salud de los consumidores mediante el desarrollo de normas internacionales para los alimentos y las raciones. En la actualidad los países miembros del CODEX Alimentario son 168. Dentro de la CCA, el Comité del CODEX para Aditivos Alimentarios y Contaminantes de los Alimentos (CCFAC) establece límites máximos (normas) para los aditivos y los contaminantes en los alimentos los que resultan decisivos en caso de conflictos comerciales. En aflatoxinas totales establece niveles máximos permisibles entre 10 y 15  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para la mayoría de los ingredientes alimenticios (FAO, 2003).

En 2001, el Codex Alimentarius de la Comunidad Europea establece un nivel máximo de 0.05 ppb de aflatoxina M1 en leche cruda. Se considera el nivel de límite permisible de 0.05 ppb el más apropiado teniendo en cuenta los aspectos de la salud pública y alimentaria (Comunidad Europea, 2001; CONACYT, 2002)

### **III. MARCO METODOLÓGICO**

#### **3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN**

Las pruebas de identificación de cepas de *Aspergillus sp.* y la determinación de la carga fúngica se realizarán en el Laboratorio de Microbiología de la E.P.I.A. de la Universidad Nacional de Moquegua.

El acondicionamiento de las muestras de ensilado y alimento concentrado, así como la leche se realizarán en el Laboratorio de Microbiología de la E.P.I.A. de la Universidad Nacional de Moquegua.

La cuantificación de aflatoxinas totales en el ensilado y alimento concentrado se realizarán en el Laboratorio Regional de Salud Moquegua.

La cuantificación de aflatoxina M1 en leche se realizará en el Laboratorio Acreditado de CERPER-PERÚ.

#### **3.2. TIPO Y DISEÑO**

El presente trabajo de investigación es de tipo observacional descriptivo y prospectivo, cuyo diseño es longitudinal el cual se basa en análisis en campo y laboratorio.

#### **3.3. NIVEL DE INVESTIGACIÓN**

El nivel de investigación es descriptiva, comparativa y aplicada.

#### **3.4. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES**

##### **3.4.1. Variable Independiente**

Alimento: Ensilado y concentrado

Leche

### **3.4.2. Variable Dependiente**

Recuento de la carga fúngica (U.F.C./g)

Frecuencia de aislamiento de *Aspergillus sp.* (%)

Aflatoxinas totales (µg/kg)

Aflatoxina M1(µg/L)

### **3.5. POBLACIÓN Y MUESTRA**

#### **3.5.1. La población**

Está constituido por los productores pertenecientes a la Asociación el FONGAL Moquegua.

#### **3.5.2. Muestra**

Está conformada por 6 productores pertenecientes a la Asociación el FONGAL Moquegua, de los cuales se obtendrán los alimentos y la leche para los posteriores análisis.

### **3.6. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS PARA RECOLECCIÓN DE DATOS VALIDACIÓN Y CONFIABILIDAD DE LOS INSTRUMENTOS**

#### **3.6.1. Materia Prima**

Ensilado: Para el recuento de la carga fúngica y la identificación de cepas de *Aspergillus sp.* se emplearán 10 g de muestra, y para la cuantificación de aflatoxinas totales se emplearán 20 g de muestra.

Concentrado: Para el recuento de la carga fúngica y la identificación de cepas de *Aspergillus sp.* se utilizarán 10 g de muestra, y para la cuantificación de aflatoxinas totales se emplearán 20 g de muestra.

Leche: Para la cuantificación de aflatoxina M1 se emplearán 20 ml de leche.

### **3.6.2. Insumos**

- Agar Papa Dextrosa
- Agar de Dicloran Rosa de Bengala y Cloranfenicol (DRBC)
- Azul de lactofenol frasco
- Alcohol etílico (96 %)
- Hipoclorito de sodio 10 % (p/p)
- Agua destilada

### **3.6.3. Materiales y Equipos**

#### **3.6.3.1. Materiales e Instrumentos de Laboratorio**

- Placas petri, medidas: 90 x 15 mm
- Asa de drigalski
- Test de Elisa para la cuantificación de aflatoxinas totales en cereales y alimentos para animales.
- Porta objeto
- Cubre objeto
- Rack vacío para 96 micro puntas
- Probeta de 100 mL
- Probeta de 500 mL
- Vaso de precipitado de 50 mL
- Matraz de erlenmeyer de 500 mL
- Plato de cristal para microondas
- Reutilizable gel congelador
- Bolsa ziploc
- Toalla papel
- Algodón hidrofílico
- Gasa estéril
- Papel aluminio
- Gafas de protección para laboratorio
- Papel kraft en bovina

- Papel de filtro Whatman N°1
- Toca descartable
- Gafas de protección para laboratorio
- Barbijos descartables
- Guantes látex.
- Cinta adhesiva transparente

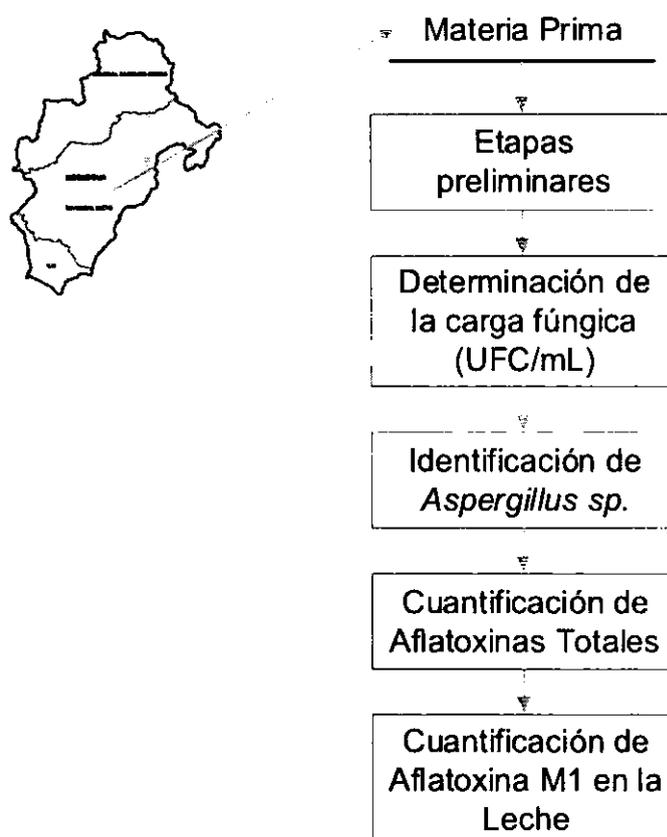
### **3.6.3.2. Equipos**

- Toma muestra de acero inoxidable
- Balanza digital de sobremesa
- Máquina de trituración
- Micropipeta manual de volumen variable: 100 a 1000  $\mu$ L
- Micropipeta manual de volumen variable: 20 a 200  $\mu$ L
- Agitador para leche con disco
- Cazo para líquidos con mango
- Agitador vórtex de mesa, análogo
- Espátula cuchara de laboratorio
- Asa de siembra, material de platino de nicromo
- Aguja de disección, material de acero inoxidable
- Pinza metálica de disección
- Bisturí
- Nevera térmica, Cifrado 600D Oxford Tela + Espuma PE + PEAV

### **3.6.4. Metodología Experimental**

El presente estudio determinará *Aspergillus sp.* y aflatoxinas totales en muestras de ensilado y alimento concentrado destinados al consumo de bovinos (*Bos taurus*) y aflatoxina M1 en leche proveniente de los productores en estudio pertenecientes a la Asociación el FONGAL Moquegua, cuyo flujo de operaciones se muestra en la siguiente Figura 3.

Figura 3. Metodología experimental del proyecto



Fuente: Elaboración propia (2017)

A continuación, detallaremos cada una de las operaciones referidas en el flujograma anterior Figura 3.

#### 3.6.4.1. Etapas preliminares

##### a. Selección de la muestra de estudio

Para la selección de la muestra de productores de la Asociación FONGAL Moquegua se aplicará un muestreo aleatorio simple, cuya metodología es la siguiente:

El método consiste en extraer una muestra de tamaño  $n$ , de una población de tamaño  $N$ , de manera totalmente aleatoria. Para elegir la muestra es

necesario disponer de un "marco", es decir, de un listado de los componentes de esa población, o información equivalente como un mapa, de manera que se puedan elegir mediante un proceso de azar (Elena, 2005).

#### **b. Recolección de información general**

En esta parte se obtendrá toda la información necesaria de los productores en estudio, con el fin de conocer el tipo de alimento, las condiciones de almacenamiento, y otros. Esto se realizará a través de una encuesta, la cual incluye la siguiente información (Ver anexo 1).

#### **c. Recojo de las materias primas para su análisis**

##### **✓ Ensilado**

La recolección de las muestras se realizará de acuerdo a la técnica "M" o zig-zag (ver anexo 2). Las muestras serán tomadas de la superficie de los silos previo a ser administrado al ganado.

La muestra compuesta se reducirá de tamaño empleándose el método del cuarteo (ver anexo 3), obteniendo así una muestra de aproximadamente 1000 g la cual se almacenará en neveras de refrigeración portátil a una temperatura entre 0 a 4 °C utilizando conservadores de frío durante su transporte al laboratorio.

##### **✓ Concentrado**

La recolección de las muestras se realizará en la boca de los sacos, previo a ser administrado al ganado.

La muestra compuesta se reducirá de tamaño empleándose el método del cuarteo (ver anexo 3), obteniendo así una muestra de aproximadamente 1000 g la cual se almacenará en neveras de refrigeración portátil a una temperatura entre 0 a 4 °C utilizando conservadores de frío durante su transporte al laboratorio.

## ✓ Leche

Las muestras de leche se recolectarán al día siguiente de haber tomado la muestra de alimento.

Estas muestras se tomarán de las cantinas de cada productor (de una cantina escogida al azar), inmediatamente después del ordeño (Vázquez, 2006).

Las cantinas seleccionadas se homogenizarán y seguidamente se tomará la muestra introduciendo una cuchara de acero inoxidable a la mitad de la cantina extrayendo la muestra (Combita y Mildenberg, 2009). Se tomará 250 ml de leche, el cual se depositará en frascos previamente esterilizados y rotulados. Las muestras se almacenarán en neveras de refrigeración portátil a una temperatura entre 0 a 4 °C utilizando conservadores de frío durante su transporte al laboratorio.

### **d. Acondicionamiento de las muestras**

Las muestras de ensilado y alimento concentrado llegadas al laboratorio serán secadas en una estufa de alta temperatura con circulación forzada de aire a 60 °C durante 24 h, posteriormente se molerán y almacenarán dentro de bolsas con cierre hermético a 4 °C antes de los análisis de las aflatoxinas totales (Rangel, 2015).

Una alícuota de 10 g se seleccionará aleatoriamente de cada muestra antes de ser secada para el análisis de los hongos.

Las muestras de leche llegadas al laboratorio serán sometidas a una cadena de frío a temperatura de 4 °C.

### **3.6.4.2. Determinación de la carga fúngica**

Los recuentos fúngicos se realizarán por el método adoptado por la NTC-5698-1 (ver anexo 4). Este método se aplicará a todas las muestras de

ensilado y alimento concentrado provenientes de los productores en estudio pertenecientes a la Asociación FONGAL Moquegua.

#### **3.6.4.3. Identificación de cepas de *Aspergillus sp.***

##### **✓ Aislamiento**

Las cepas de *Aspergillus sp.* se aislarán a partir de las placas seleccionadas para el recuento fúngico. El criterio para el aislamiento de estas cepas se basará en la caracterización macroscópica de las colonias fúngicas, teniendo en cuenta las descripciones de Samsom *et al.*, (2000).

Para el aislamiento de las cepas, se prepararán placas petri con 100 ml de agar papa dextrosa, se tomará con una asa de platino una pequeña porción de esporas del inóculo, el cual se colocará en el centro de la placa que contiene el agar y se dejarán incubar de 3 a 5 días a una temperatura ambiente (Beltrán, 2000).

##### **✓ Identificación**

La identificación de cepas de *Aspergillus sp.* es propuesta por Satibáñez *et al.* (2011); cuya metodología es la siguiente:

Se utilizarán criterios los cuales se basarán en la caracterización macroscópica de las colonias fúngicas y la preparación de la muestra se efectuará según la técnica de la cinta adhesiva propuesta por Rodríguez-Tudela y Aviles (1991), la cual consiste en aplicar una porción de cinta adhesiva transparente sobre la superficie de la colonia y pegarla posteriormente, por presión, sobre un portaobjetos en el que previamente se ha colocado una gota de azul de metileno.

Satibáñez *et al.* (2011) menciona que para la determinación de la morfología microscópica se tomará en cuenta lo siguiente:

- Identificación conidióforo, vesícula, métulas, fiálides y otros.

Para la identificación se utilizarán el manual de Samsom *et al.* (2000).

#### **3.6.4.4. Cuantificación de aflatoxinas totales**

La cuantificación de aflatoxinas totales se realizarán en las muestras de ensilado y alimento concentrado utilizando el kit comercial de ELISA, empleándose la metodología descrita por el fabricante.

#### **3.6.4.5. Cuantificación de aflatoxina M1**

La cuantificación de aflatoxina M1 en la leche se realizará por el método de ELISA en el Laboratorio CERPER-PERÚ.

### **3.7. DISEÑO EXPERIMENTAL O MÉTODOS Y TÉCNICAS PARA LA PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS**

#### **3.7.1. Análisis estadístico**

Los datos se reportarán por triplicado, a los cuales se les aplicará un análisis estadístico descriptivo utilizando el programa MINITAB 17 (21.06.2017), reportando datos como media, desviación estándar (DE) y rango.

Tabla 4. Tabla de registro de datos

<b>Productor</b>	<b>Alimento</b>	<b>Muestra</b>	<b>Repeticiones</b>		
P1	E	P1E			
	C	P1C			
P2	E	P2E			
	C	P2C			
P3	E	P3E			
	C	P3C			
P4	E	P4E			
	C	P4C			
P5	E	P5E			
	C	P5C			
P6	E	P6E			
	C	P6C			

Fuente: Elaboración propia (2017)

### 3.7.2. Operación de variables

Variable independientes		Variables dependientes	
Factor de estudio	Indicador	Análisis	Unidades
Tipo de alimento		Recuento de la carga fúngica	U.F.C/mL
Ensilado	Chala de maíz	Frecuencia de aislamiento de <i>Aspergillus</i> sp.	%
Concentrado	Concentrado	Aflatoxinas totales	µg/kg
Leche		Aflatoxina M1	µg/L

Fuente: Elaboración propia (2017)

**IV. ASPECTOS ADMINISTRATIVOS**  
**4.1. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES**

Cuadro 1. Diagrama de Gantt

Nº	Actividades planificadas	2016												
		Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero Mes 01	Febrero Mes 02	Marzo Mes 03	Abril Mes 04	Mayo Mes 05	Junio Mes 06	Julio Mes 07	Agosto Mes 08	Setiembre Mes 09	Octubre Mes 10
1	Elaboración del proyecto													
2	Aprobación del proyecto													
3	Presentación del plan de trabajo													
4	Requerimiento de materiales, insumos, equipos, etc.													
5	Revisión bibliográfica													
6	Recolección de muestras													
	INFORME TRIMESTRAL DE AVANCE													
7	Caracterización fisicoquímica de la leche													
8	Cuantificación de aflatoxina (AF) M1													
9	Determinación del efecto del tipo de alimento que originó mayor contenido de aflatoxina (AF) M1													
	INFORME TRIMESTRAL DE AVANCE													
10	Análisis del diseño estadístico													
11	Elaboración de borrador de tesis													



#### **4.2. RECURSOS HUMANOS**

Asesor

Co-asesor

Tesista

#### **4.3. BIENES**

- Libros
- Separatas
- Papel bond
- Marcadores
- Lapiceros

#### **4.4. SERVICIOS**

- Contratación de servicio especializado para análisis de aflatoxina M1 en leche fresca bovina mediante el método de ELISA.
- Contratación de servicio de Courier y encomiendas nacionales para el envío de muestras.
- Contratación de servicio de impresión de material de trabajo, formatos y tesis.

#### **4.5. FUENTES DE FINANCIAMIENTO Y PRESUPUESTO**

Fuente de Financiamiento: Canon minero, sobre canon y regalías mineras.

Presupuesto: UNAM-2016

Cuadro 2. Presupuesto

NOMBRE DE LA ACTIVIDAD	UNIDAD	CANTIDAD	COSTO UNIT.	COSTO TOTAL (S/.)
<b>PASAJES Y VIATICOS ASESOR / EGRESADA</b>				
Caracterización fisicoquímica de la leche bovina	2	Global	570.00	1140.00
Determinación del contenido de aflatoxina (AF) M1	1	Global	550.00	550.00
Determinación del efecto del tipo de alimento que origina mayor contenido de aflatoxina (AF) M1	2	Global	570.00	1140.00
				2830.00
<b>SUBCONTRATOS</b>				
Determinación del contenido de aflatoxina (AF) M1	12	Servicios	330.00	3960.00
				3960.00
<b>EQUIPOS</b>				
Caracterización fisicoquímica de la leche bovina	1	Global	4500.00	4500.00
Determinación del contenido de aflatoxina (AF) M1	1	Global	1200.00	1200.00
Determinación del efecto del tipo de alimento que origina mayor contenido de aflatoxina (AF) M1	1	Global	3550.00	3550.00
				9250.00
<b>MATERIAL FUNGIBLE</b>				
Caracterización fisicoquímica de la leche bovina	1	Global	700.00	700.00
Determinación del contenido de aflatoxina (AF) M1	1	Global	900.00	900.00
Determinación del efecto del tipo de alimento que origina mayor contenido de aflatoxina (AF) M1	1	Global	400.00	400.00
				2000.00
<b>PROGRAMAS INFORMATICOS Y BIBLIOGRAFIA</b>				
Caracterización fisicoquímica de la leche bovina	1	Global	600.00	600.00
Determinación del contenido de aflatoxina (AF) M1	1	Global	450.00	450.00
Determinación del efecto del tipo de alimento que origina mayor contenido de aflatoxina (AF) M1	1	Global	900.00	900.00
				1950.00
<b>COSTO TOTAL DEL PROYECTO</b>				<b>19990.00</b>

Fuente: Elaboración propia

## V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abarca, M. L., Bragulat, M. R., Castella, G., Accensi, F., & Cabañes, F. J. (2000). Hongos productores de micotoxinas emergentes. *Rev. Iberoam. Micol.* 17: 63-68.
- Agrios, G. N. (2005). *Plant pathology*. 5th. ed. s.l., Elsevier. pp. 412-417.
- Agudelo, G. D. A., & Bedoya, M. O. (2005). Composición nutricional de la leche de ganado vacuno, 2, 38-42.
- Beltrán, M. J. (2000). *Determinación y cuantificación de cepas fúngicas y aflatoxina B1, B2, G1 y G2 en alimento concentrado para el consumo de bovinos en la región de Ocotlán, Jalisco. Tesis de Pre-Grado.* Universidad de Guadalajara.
- Bennett, J.W., Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* 16,497e516.
- Bold, H., Alexopoulos, C. J., & Delevoryas, T. (1988). *Morfología de las plantas y hongos. Introducción al reino de los hongos. 1a edición.* Ediciones Omega. Barcelona. pp. 699-704, 790-794.
- Caballero, M. J., Arbaiza, F. T., & Lucas, A. O. (2001). Niveles críticos de aflatoxina en muestras de maíz para consumo animal en Lima Metropolitana. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 12(1): 35-40.
- Carrillo, L. (2003). Los hongos de los alimentos y forrajes. Universidad Nacional de Salta. pp. 25-50.
- Cassel, E. K., Campbell, B., Draper, M., & Epperson, B. (2001). Aflatoxins. Hazards in grain. Aflatoxicosis and livestock. Cooperative Extension Service. South Dakota State University/ College of Agriculture & Biological Sciences/USDA. FS 907.
- Combita, P. A., & Mildenberg, O. E. (2009). *Detección de aflatoxina M1 en leches frescas comercializadas en la zona del Valle del Cauca (Colombia) mediante la Técnica de ELISA. Teisi de Grado.* Bogotá.
- Comunidad Europea (2001). Observaciones de la Comunidad Europea para la Comisión del Codex Alimentarius, 24 REUNION- Tema 10. Ginebra, Suiza (2- 7 de julio) p.1-4.
- CONACYT. (2002). Fortalecimiento de los Comités Nacionales del Codex y Aplicación de las Normas del Codex Alimentario, el salvador (10 al 12 junio 2002) p. 5-6. *El salvador (10 al 12 junio 2002)*, 5-6.

- Cotty, P. J. (1988). Aflatoxin and sclerotial production by *Aspergillus flavus*: influence of pH. *Phytopathology*, 78, 1250-1253.
- Cotty, P. J., & Jaime-García, R. (2007). Influencias del clima sobre hongos productores de aflatoxinas y contaminación por aflatoxinas. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 109 - 115.
- Corbett, W.T., Brownie, C.F., Hagler, S.B., Hagler Jr., W.M. (1988). An epidemiological investigation associating aflatoxin M1 with milk production in dairy cattle. *Veterinary and Human Toxicology* 30 (1), 5e8.
- Díaz, G. J. (2006). Micotoxinas y micotoxicosis de importancia en salud humana en Colombia. VII Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de Alimentos COLMIC, Bogota, Colombia.
- Elena, A. I. G. (2005). *Análisis de encuestas*. España: ESIC.
- FAO. (2003). Manual sobre la aplicación del sistema de análisis de peligros y de puntos críticos en la prevención y control de las 107 micotoxinas. Estudio FAO Alimentación y Nutrición 73, Organización de las Naciones Unidas Para la Agricultura y la Alimentación, Roma, Italia.
- FAO. (2007). Animal Feed Impact on Food Safety. Report of the FAO/WHO Expert Meeting, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Headquarters, Rome, 2008.
- Fernández, A., Belio, R., Ramos, J. J, Sanz, M. C. and Saez, T. (1997). Aflatoxins and their metabolites in the tissues, faeces and urine from lambs feeding on an aflatoxin-contaminated diet. *J. Sci. Food Agric.* 74:161-168.
- Fernández, E. E. (2000). *Microbiología e inocuidad de los alimentos*. Universidad Autónoma de Querétaro. 1ª Edición. pp. 65-89, 123-138.
- Fink, J. (2008). Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: A review. *Food Additives and Contaminants*. 25: 172-180.
- Gholamreza, K., Hassanzadeh, M., Teimuri, M., Nazari, F., & Nili, A. (2007). Aflatoxin M1 Contamination in Pasteurized Milk in Mashhad, Iran. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences Summer*. 3(3): 153-156. [www.ijps.ir](http://www.ijps.ir).
- Guthrie , L. D. (1979). Effects of aflatoxins in corn on production and reproduction of dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 62 (suppl.1): 134-142.
- Guzmán, G. (1981). *Hongos ¿ que es un hongo?* México: Editorial Limusa. 2a Edición.

- Hayes, A. W. (1980). Micotoxinas: una revisión de los efectos biológicos y su papel en las enfermedades humanas. *Clinical Toxicology*, 17, 45-83.
- Heshmati, A., & Milani, J. M. (2010). Contamination of UHT milk by aflatoxin M1 in Iran. *Food Control*, 21(1), 19-22.
- Honig, H., & Woolford, M. K. (1980). Changes in silage on exposure to air. En: THOMAS, C.; editor. *Forage Conservation in the 80s*. (11: 1980: Hurley). BGS Occasional Symposium. Hurley: British Grassland Society, p. 76- 87.
- Hsieh, D. (1988). Posibles riesgos para la salud humana de las micotoxinas. *Elsevier*, 69-80.
- INATEC. (2016). *Instituto Nacional Tecnológico-Dirección General de Formación Profesional. Manual del Protagonista-Nutrición Animal*. Obtenido de [https://www.jica.go.jp/project/nicaragua/007/materials/ku57pq0000224spz-att/Manual\\_de\\_Nutricion\\_Animal.pdf](https://www.jica.go.jp/project/nicaragua/007/materials/ku57pq0000224spz-att/Manual_de_Nutricion_Animal.pdf)
- INEI. (2015). *Producción de maíz amarillo duro se incrementó en 36,4%*. Obtenido de <https://www.inei.gob.pe/prensa/noticias/produccion-de-maiz-amarillo-duro-se-incremento-en-364-8743/>
- Kalac, P., Woolford, M.K. (1982). A review of some aspects of possible associations between the feeding of silage and animal health. *The British Veterinary Journal* 138, 305e320.
- Keller, L. A. M., Pereyra, M. L. G., Keller, K. M., Alonso, V. A., Oliveira, A. A., Almeida, T. X., ... Rosa, C. A. R. (2013). Fungal and mycotoxins contamination in corn silage: Monitoring risk before and after fermentation. *Journal of Stored Products Research*, 52, 42–47. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2012.09.001>
- Kensler, T. W., Qian, G. S., Chen, J. G., & Groopm, J. D. (2003). Camino molecular de la desintoxicación de aflatoxinas. *Nature Reviews Cáncer*, 321-329.
- Landeros, P., Noa, M., López, Y., González, D. G., Noa, E., Real, M., ... Medina, M. S. (2012). Niveles de aflatoxina M1 en leche cruda y pasteurizada comercializada en la Zona Metropolitana de Guadalajara, México, 34(1), 40–45.
- Lazo, R., & Sierra, G. (2008). Investigación de micotoxinas en el ser humano. *Revista Iberoamericana de Micología*, pp 7-11.
- Lerche, M. (2005). Inspección veterinaria de la leche. *Acribia*, 188.

- Mena, F. (2010). *Evaluación de 4 híbridos de maíz forrajero (Zea mays L.) en la comuna de Futrono. Tesis de licenciatura.* Universidad Austral de Chile.
- Meza, M., & Logorreta, P. (2011). Generalidades de la leche y productos lácteos. En: Libro blanco de la Leche y los Productos Lácteos. México: Editorial Cámara Nacional de Industriales de la Leche (CANILEC).
- MINAG. (2015). Información pecuaria especie vacunos: Producción lechera. *Anuario Estadístico Agropecuario.* Moquegua.
- Montaño, P. B. V., Chirico, M. I. y Gemio R. (2007). Estudio toxicológico de presencia de aflatoxina M1 en leche bovina recolectada del municipio de Achacachi. *Rev. Bol. Quim* 24:90-94.
- Moss, M. O. (1991). The environmental factors controlling mycotoxin formation. En: Smith, JE; Henderson, RS. (eds.) . *Mycotoxins and animal foods.* CRC Press. Boca Raton, págs. 37-56.
- Moss, M. O. (2002). Revisión de micotoxinas, aspergillus y penicillium. *Mycologist*, 16 (3), 116-11.
- NTP 202.001. (2003). Leche y productos lácteos. Leche cruda. Requisitos. Comisión de Reglamentos Técnicos y Comerciales – INDECOPI.
- Ordóñez, J. (1998). *Tecnología de los alimentos. Vol. 1 editorial síntesis, S.A. España 365p.*
- Oude, E., Driehuis, F., Gottschal, J. C., & Spoelstra, S. F. (1999). Los procesos de fermentación del ensilaje y su manipulación. Memorias de la Conferencia Electrónica de la FAO sobre el Ensilaje en los Trópicos. FAO. Roma. P. . 17-30.
- Pitt, J. I., & Hocking, A. (1999). *Fungi and Food Spoilage.* 2a Ed. Aspen Publishers, Inc., UK.593 p.
- Prandini, A., Sigolo, S., Filippi, L., Battilani, P., & Piva, G. (2009). Review of predictive models for fusarium head blight and related mycotoxin contamination in wheat. *Food and Chemical Toxicology*, 47(5), 927-931.
- Rangel, M. E. (2015). *Evaluación de la eficiencia de un programa de control de la contaminación por aflatoxinas en dietas de vacas lecheras del Altiplano Central Mexicano. Tesis de Grado.* Aguascalientes-México.
- Raybaudi, R., & Martínez, A. (2000). Incidencia e identificación de la microbiota de granos de maíz y comparación de los medios de

cultivos para la determinación de mohos toxigénicos. *Fitopatol Venez*, 13(1):15-18.

Reyes, V. W., Patricio, M. S., Isaías, E. V. H., Nathal, V. M. A., De Lucas, P. E., & Rojo, F. (2009). Aflatoxinas totales en raciones de bovinos y AFM 1 en leche cruda obtenida en establos del estado de Jalisco, México Total aflatoxins in cows feed and AFM 1 in milk in dairy herds from Jalisco State, Mexico.

Richard, E., Heutte, N., Sage, L., Pottier, D., Bouchart, V., Lebailly, P., & Garon, D. (2007). Toxigenic fungi and mycotoxins in mature corn silage. *Food Chemical Toxicology*, 45, 2420-2425.

Rodríguez, P., Soares, C., Kozakiewicz, Z., & Paters. (2007). Identification and characterization of *A. flavus* and aflatoxins. Com. Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology. Mendez-Vilas (Ed). 527.

Rodríguez-Tudela, J. L., & Aviles, P. (1991). Improved adhesive method for microscopic examination of fungi in culture. *J.Clin. Microbiol.* 29:2604-2605.

Ruiz, M., & Font, G. (2007). Micotoxinas en Alimentos. Toxicidad y Evaluación de Riesgos. Díaz de Santos. España. P 15-27. Coord. José Miguel Soriano del Castillo.

Ruiz, M., & Font, G. (2007). *Micotoxinas en Alimentos. Toxicidad y Evaluación de Riesgos. Díaz de Santos. España. P 15-27. Coord. José Miguel Soriano del Castillo.*

Samson, R. A., Hoekstra, E. S., Frisvad, J. C., & Filtenborg, O. (2000). Introduction to Food and Airborne Fungi. Editorial CBS. 6th edition. Wageningen, The Netherlands. pp. 37-50, 128-160, 175-196.

Satibáñez, E. R., Hernández, G. M., Montanez, V. O., Tapia, G. J. M., Martínez, I. J. A., & Avellaneda, C. J. H. (2011). Identificación y cuantificación de hongos micotoxigénicos en alimento para bovinos, 4(1), 19–23.

Smith, T. (2005). Update: mycotoxins and adsorbents. *Feed Internacional*, pp 15–20.

Soriano del Castillo, J. M. (2007). *Micotoxinas en Alimentos. España: Ediciones Días de Santos.*

Turner, N. W., Subrahmanyam, S., & Piletsky, S. A. (2009). Métodos analíticos para la determinación de micotoxinas. *Analytica Chimica Acta*, 632, 168-180.

- Vázquez, S. M. (2006). *Evaluación de aflatoxinas en suplementos para vacas lecheras en la Sabana de Bogotá, y su relación con aflatoxina M1 en leche. Tesis de Grado. Bogotá.*
- Vázquez Z, J. A. (2014). *Contaminación con aflatoxinas en leche cruda y alimento de vacas Suizo Americano en la Zona Centro de Chiapas. Tesis de Maestría. Montecillo, Texcoco, EDO. de México.*
- Watson, F. R. (2011). *Estudio de pre-factibilidad para crear una empresa productora de henolaje de broza de espárrago para la alimentación de ganado vacuno lechero en establos de Lima. Tesis de Pre-Grado. Pontificia Universidad Católica del Perú Facultad de Ciencias e Ingeniería.*
- Wattiax , M. (2005). Instituto Babcock para la Investigación y Desarrollo Internacional de la Industria Lechera .
- Yu , J., Cleveland, T., Nierman, W., & Bennett, J. (2005). Genómica de *Aspergillus flavus*: una puerta a la salud humana y animal, seguridad alimentaria y resistencia de las cosechas a las enfermedades. *Revista Latinoamericana de Micología*, 22(4), 194–202.
- Zinedine, A., Brera, C., Elakhdari, S., Catano, C., Debegnach, F., & Angelini, S. (2006). Natural occurrence of mycotoxins in cereals and spices commercialized in Morocco. *Food Control*, 17(11), 868-874.

## VI. ANEXOS

### Anexo 1. Encuesta de inspección

Fecha: \_\_\_\_\_

1. Número de productor:

2. Nombre del encargado: \_\_\_\_\_ Tel.: \_\_\_\_\_

3. Tipo de Alimento: Ensilado  Concentrado  Heno

Otros \_\_\_\_\_

4. Ensilaje: Lo compra  Lo elabora

Ingredientes:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

5. Concentrado: Comercial  Hecho en finca

Ingredientes:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

6. Modo de almacenaje del ensilado:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

7. Modo de almacenaje del alimento concentrado: Bodega  Cuenta con  
tarimas para colocar el alimento  Cuenta con buena ventilación  Se  
cuenta con control de roedores  Almacén techado  Aire libre

Otros:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

8. Número de animales: Total  En ordeño  Sementales

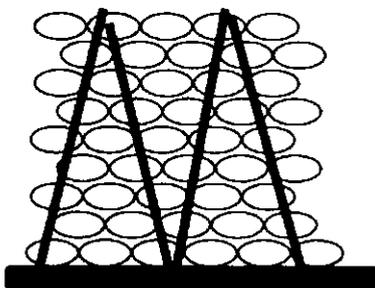
8. Litros de leche producidos por ordeño \_\_\_\_\_

9. Cantidad de alimento ofrecido por animal \_\_\_\_\_

Fuente: Elaboración propia (2017)

## **Anexo 2. Técnica de “M” para el muestreo de alimentos (NOM-247-SSA1-2008)**

Se tomarán una o más muestras primarias en cada uno de los puntos de muestreo de acuerdo a la Figura 4. De la suma de las muestras primarias, se constituirá una muestra compuesta, la que se homogenizará, no debiendo ser menor de 5 kg

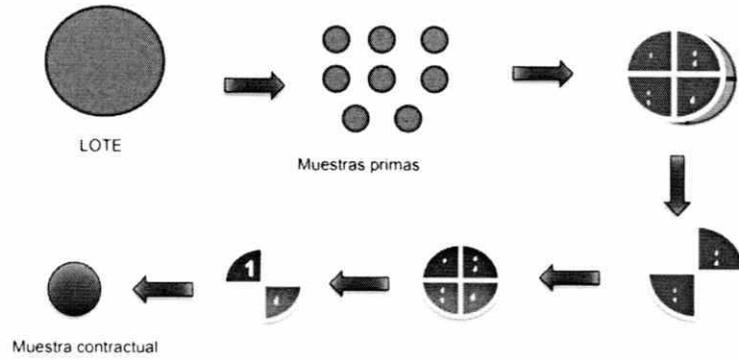


## **Anexo 3. Método del cuarteo Tejada (1992)**

En ocasiones el material obtenido rebasa con mucho la cantidad necesaria para enviar al laboratorio. En este caso, es indispensable realizar el método de cuarteo que consiste en lo siguiente:

- El material homogenizado se coloca en una superficie plana y se extiende en una capa gruesa.
- Se divide en 4 partes iguales.
- Se descartan dos de los cuartos opuestos entre sí eliminando el material contenido en ello.
- Se mezclan las dos partes restantes hasta homogenizar la muestra y se extiende nuevamente sobre la superficie.

- Se repite la operación de reducción y homogenización hasta conseguir el peso o tamaño adecuado de la muestra.



**Anexo 4. Método horizontal para la enumeración de mohos y levaduras. Parte 1: Técnica de recuento de colonias en productos con actividad acuosa (Aw) superior a 0.95**

**NORMA TÉCNICA  
COLOMBIANA**

**NTC  
5698-1**

2009-08-19

**MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS Y ALIMENTOS PARA ANIMALES. METODO HORIZONTAL PARA LA ENUMERACIÓN DE MOHOS Y LEVADURAS. PARTE 1: TÉCNICA DE RECUESTO DE COLONIAS EN PRODUCTOS CON ACTIVIDAD ACUOSA (Aw) SUPERIOR A 0,95**



E: MICROBIOLOGY OF FOOD AND ANIMAL FEEDING STUFFS - WITH HORIZONTAL METHOD FOR THE ENUMERATION OF YEASTS AND MOULDS. PART 1: COLONY COUNT TECHNIQUE IN PRODUCTS WATER ACTIVITY GREATER THAN 0.95.

**CORRESPONDENCIA** esta norma es idéntica (IDT) con respecto a su documento de referencia, la norma ISO 21527-1:2008

**DESCRIPTORES** microbiología de alimentos, método horizontal, enumeración de levaduras, enumeración de mohos, recuento de colonias

I.C.S. 07.100.30

Elaborada por el Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC), Apartado 14237 Bogotá D.C. - Tel: (571) 8078888 - Fax: (571) 2221438

Prohibida su reproducción

Edición 2009-08-19