

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la

Producción

“Propuesta de un método biológico para la detección de
Aflatoxinas en alimentos”

TESIS DE GRADO

Previo a la obtención del Título de:

INGENIEROS DE ALIMENTOS

Presentada por:

Cristian Javier Vargas Farías

Verónica Patricia Velásquez Figueroa

GUAYAQUIL – ECUADOR

Año 2013

AGRADECIMIENTO

A Dios, a mis padres, mi familia y a
la M.Sc. Ma. Fernanda Morales R.

Cristian

AGRADECIMIENTO

A Dios, a mis padres, mi familia y a
la M.Sc. Ma. Fernanda Morales R.

Verónica

DEDICATORIA

A Dios,

A mis padres,

A mi familia

Cristian

DEDICATORIA

A mi familia, por su apoyo incondicional en todo lo que he alcanzado académicamente y a lo largo de mi vida, por depositar su confianza en mí, sus consejos, valores y motivación constante.

Verónica

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

Dr. Kléber Barcia V.
DECANO DE LA FIMCP
PRESIDENTE

M.Sc. Ma. Fernanda Morales R.
DIRECTORA DE TESIS

M.Sc. Haydee Torres C.
VOCAL

DECLARACIÓN EXPRESA

La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, nos corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL”

(Reglamento de Graduación de la ESPOL).

Cristian Javier Vargas Farías

Verónica Patricia Velásquez Figueroa

RESUMEN

Es bien sabido por muchos en el área de alimentos la existencia de micotoxinas cancerígenas en su gran mayoría, en alimentos especialmente granos como por ejemplo el maíz, una de las micotoxinas más difundida en nuestra región por las condiciones climáticas es la aflatoxina producida por los hongos *Aspergillus* tales como *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius*, con efectos normalmente hepatocancerígenos; en este trabajo de investigación queremos dar una alternativa diferentes a las existentes, para la detección de las Aflatoxinas, que básicamente es una propuesta de un “método biológico” para la detección indirecta de aflatoxina, el cual gira en torno a la hipótesis científica planteada: “Que existe un efecto antimicrobiano de las Aflatoxinas” en palabras resumidas. En el siguiente trabajo de investigación se probó en primera instancia esta hipótesis, para lo cual se utilizó tres microorganismos de prueba y se seleccionará aquel que sea congruente con la hipótesis planteada, en caso de existir más de un microorganismo que ratifiquen esta hipótesis se seleccionará uno solo según nuestro criterio, a éste se le denominará microorganismo de prueba. La existencia o no de

éste microorganismo determinará en gran parte la vialidad técnica del método.

Una vez que se determinó el microorganismo de prueba apto para el método, se establece la dosis mínima con letalidad total en una dilución determinada, con este dato se diseña una metodología que establezca como límite de detección la concentración máxima permitida según la norma NTE INEN 187:95; el método determinará la presencia o no de la micotoxina basándose en la inhibición o no del microorganismo de prueba en las placas de PCA (Plate Count Agar) incorporado con la extracción de micotoxina del alimento a analizarse.

De ser exitoso este método serviría como incentivo para futuras investigaciones bajo el mismo principio no probado antes y tomando como base ésta propuesta para perfeccionarlo buscando microorganismos más adecuados y/o evolucionando el método en uno cuantitativo también y/o usándolo para detección de otras toxinas comunes en alimentos.

Este método tendría desventajas frente a los ya tradicionales (por el tiempo que llevan en el mercado mas no por su estandarización) métodos rápidos que se basan en antígeno-anticuerpo, una de ellas es el tiempo que tomaría, ya que tratándose de bacterias el tiempo mínimo para un resultado no será

menos de 24 horas, pero tendría ventajas como las del costo del método y además sería una incursión en un campo poco explorado en la biotecnología.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN	II
ÍNDICE GENERAL.....	V
ABREVIATURAS	IX
SIMBOLOGÍA	X
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
ÍNDICE DE TABLAS	XIII
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1	3
1. GENERALIDADES.....	3
1.1. Planteamiento del problema.....	4
1.2. Objetivos	5

1.2.1. Objetivo general	5
1.2.2. Objetivos específicos:.....	5
1.3. Antecedentes.....	6
CAPÍTULO 2.....	9
2. MARCO TEÓRICO	9
2.1. Aflatoxinas en los alimentos.	9
2.1.1. Definición y hongo productor.....	10
2.1.2. Composición química	12
2.1.3. Clasificación de las Aflatoxinas	13
2.1.4. Características morfológicas y bioquímicas	16
2.1.5. Alimentos que se encuentra	21
2.1.6. Niveles permitidos	23
2.2. Efectos en la salud.	26
2.2.1. Órgano Target.	26
2.2.2. Efectos tóxicos sobre el organismo.....	27
2.3. Métodos comunes de medición de Aflatoxinas en alimentos.	30
CAPÍTULO 3.....	36

3. METODOLOGÍA A PARTIR DEL PLANTEAMIENTO DE UNA HIPÓTESIS CIENTÍFICA	36
3.1. Exposición de la Hipótesis a Probar	36
3.2. Metodología para probar la hipótesis científica.	37
3.2.1. Selección de los microorganismos a probar	44
3.2.2. Pruebas de metanol residual en el crecimiento microbiano ...	50
3.2.3. Inoculación de Microorganismos Seleccionados en el Medio de Cultivo con Aflatoxinas en Diferentes Concentraciones.	52
3.3. Materiales y equipos.....	54
3.4. Análisis de Costos.	56
CAPÍTULO 4	59
4. RESULTADOS.....	59
4.1. Resultados y análisis de las pruebas de metanol residual.	59
4.2. Resultados y Análisis por microorganismos de la inoculación en el medio de cultivo con Aflatoxinas a diferentes concentraciones.....	71
4.3. Análisis y planteamiento final del método.....	85
4.4. Estudio comparativo de costos.....	87

CAPÍTULO 5.....	91
5. APLICACIONES EN LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS	91
5.1. Perspectivas de investigaciones futuras con la misma base biológica	92
5.2. Aplicabilidad del método en la industria	94
5.3. Ventajas y desventajas frente a otras pruebas.....	95
CAPÍTULO 6.....	98
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	98

ANEXOS

BIBLIOGRAFÍA

ABREVIATURAS

A.	<i>Aspergillus</i>
NTE	Norma Técnica Ecuatoriana
INEN	Instituto Ecuatoriano de Normalización
PCA	Plate Count Agar
ELISA	Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a la Enzima
AF	Aflatoxina
etc.	Etcétera
spp.	Species
FDA	Food and Drug Administration
ADN	Ácido Desoxinucléico
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
CDD	Cromatografía de Capa Delgada
CG	Cromatografía de Gases
PROTAL	Programa de Tecnología en Alimentos
M.	Microorganismo
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
ml	Mililitro
min	Minuto
uni	Unidad
g	Gramos
kg	Kilogramo
ppb	Partes por millón
L	Litro
c/	con
aprox.	Aproximadamente
ppb	Partes por billón

SIMBOLOGÍA

°C	Grados Celcius
\$	Dólar
Ho	Hipótesis Nula
H1	Hipótesis Alterna
GL	Grados de Libertad
N	Número de Muestras
P	Valor P
%	Porcentaje
~	Aproximación

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Género <i>Aspergillus</i> (13)	11
Figura 2: Clasificación de las Aflatoxinas (4)	14
Figura 3: Composición química de otros tipos de Aflatoxinas (15)	15
Figura 4: Ruta Metabólica para la producción de Aflatoxinas (16).....	17
Figura 5: Morfología Microscópica del <i>Aspergillus spp.</i> (10).....	20
Figura 6: Maíz y trigo contaminados con Aflatoxinas	22
Figura 7: Carcinoma Hepatocelular	27
Figura 8: Proceso HPLC (25).....	31
Figura 9: Cromatografía en capa delgada (26)	32
Figura 10: Cromatografía de gases (27).	33
Figura 11: Proceso de análisis de ELISA competitivo (28).	35
Figura 12: Pasos del Método Propuesto	39
Figura 13: Diseño de Experimento.....	43
Figura 14: Estadística Descriptiva de Recuento con Metanol Residual	
Microorganismo A	62

Figura 15: Estadística Descriptiva de Recuento sin Metanol Residual	
Microorganismo A	63
Figura 16: Estadística Descriptiva de Recuento con Metanol Residual	
Microorganismo B	64
Figura 17: Estadística Descriptiva de Recuento sin Metanol Residual	
Microorganismo B	65
Figura 18: Estadística Descriptiva de Recuento con Metanol Residual	
Microorganismo C	66
Figura 19: Estadística Descriptiva de Recuento sin Metanol Residual	
Microorganismo C	67
Figura 20: Prueba Estadística de Kruskal-Wallis en Microorganismo A	68
Figura 21: Prueba Estadística de Kruskal-Wallis en Microorganismo B	69
Figura 22: Prueba Estadística de Kruskal-Wallis en Microorganismo C	70
Figura 23: Diseño de la Prueba de Hipótesis Realizada	83

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1: Tabla de distribución en edad y sexo de los pacientes afectados....	8
Tabla 2: Rangos de temperatura y actividad de agua de varias especies del género <i>Aspergillus</i> (10).....	21
Tabla 3: Niveles de acción para aflatoxinas permitidos por la FDA de U.S.A en alimentos para animales y leche (21).....	24
Tabla 4: Determinación de Cargas Iniciales....	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 5: Materiales y Equipos Usados.....	54
Tabla 6: Costos del Método Propuesto	57
Tabla 7: Resultados de Metanol Residual.....	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 8: Concentraciones para la Primera Corrida	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 9: Recuento en Primera Corrida del Microorganismo a	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 10: Recuento en Primera Corrida del Microorganismo b	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 11: Recuento en Primera Corrida del Microorganismo c.....	¡Error! Marcador no definido.

Tabla 12: Concentraciones para la Segunda Corrida**¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 13: Recuento en Segunda Corrida del Microorganismo Seleccionado
.....**¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 14: Mililitros de Metanol al 70% de Extracción a agregar según el
Método Diseñado.....**¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 15: Costos del Análisis con la Prueba Rápida para la Detección de
Aflatoxina “Reveal for Aflatoxin”**¡Error! Marcador no definido.**

INTRODUCCIÓN

A lo largo del tiempo y desde sus inicios en civilización el hombre ha almacenado granos principalmente para su supervivencia, pero sólo desde hace unas pocas décadas es sabido que un mal almacenamiento de estos granos puede causar la presencia de micotoxinas, que son producidas por ciertos hongos en condiciones especiales de humedad, tiempo y temperatura, que son muy comunes en los llamados mal almacenamiento de granos en silos generalmente improvisados o cuando el tiempo de almacenamiento es excesivamente largo. Una de las micotoxinas que primero se descubrió y más abundante en nuestra región y el mundo es la aflatoxina, que se la asocia comúnmente a granos como el maíz, ésta toxina se descubrió en la década de los 60's por la muerte de aves domésticas y se la llamo inicialmente la enfermedad X por desconocerse en primera instancia su origen.

Actualmente la mayor parte de países en el mundo y el 100% de los países llamados desarrollados tienen normativa para controlarla en alimento animal y humano; lo cual también ha venido de la mano con pruebas de detección y cuantificación cada vez más simples y accesibles gracias a la biotecnología; congruente con esta historia nosotros como investigadores del área de alimentos e interesados en que nuestro país se desarrolle más el control para la toxina en mención, queremos poner nuestro granito de arena proponiendo un nuevo método de detección indirecta con base en principios biológicos, para esta mortal micotoxina, el cual lo describiremos y desarrollaremos en este trabajo de investigación.

CAPÍTULO 1

1. GENERALIDADES

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos específicos, que representan un riesgo directo a la salud del consumidor (1). Existen varias micotoxinas en el mundo, estas varían de acuerdo del tipo de alimento que se esté tratando, así como también a las condiciones en las que se encuentre el alimento, y otros factores que se mencionarán posteriormente.

La presente tesis trata específicamente acerca de las aflatoxinas, que es una micotoxina hepatotóxica principalmente (10); lo que se tratará es una nueva metodología para la detección, la cual a diferencia de las existentes en el mercado posee la innovación de que se basa en un principio biológico como es el crecimiento microbiano.

1.1. Planteamiento del problema

Existen muy pocas pruebas de detección cualitativa indirecta de aflatoxina en el país y se basa en el principio antígeno-anticuerpo como el que se utiliza para la medición en el método ELISA; ésta es una tecnología totalmente extranjera y los materiales utilizados son importados en su totalidad, lo que encarece un poco estas pruebas y no las hace accesibles a las medianas y pequeñas empresas de alimentos que la pudieran necesitar para mantener un adecuado control de sus productos; sin sumarle a esto las políticas de gobierno para encarecer las importaciones exceptuando a las materias primas.

En la siguiente tesis, se propone como solución un nuevo método cualitativo para detección indirecta de aflatoxinas, este método es una propuesta radical en el mundo de las pruebas biotecnológicas, debido a que la base del mismo es netamente biológica y no bioquímica como tradicionalmente presentan este tipo de pruebas. Además que se califica como un paso importante la incursión de investigadores ecuatorianos en esta rama de la tecnología, la cual siempre ha sido propiedad de países desarrollados en cuanto a origen de patentes.

1.2. Objetivos

A continuación se plantean los siguientes objetivos para el proyecto de tesis propuesto:

1.2.1. Objetivo general

Propuesta de un método biológico para la detección de Aflatoxinas en los alimentos.

1.2.2. Objetivos específicos:

- Proponer y demostrar que es posible determinar la existencia de toxinas en alimentos, por métodos de detección con base biológica.
- Diseñar una metodología para determinar la presencia de aflatoxinas en alimentos alternativa a las existentes.
- Dar una alternativa económica, adicional a las que se encuentran en el mercado, para la detección de aflatoxinas en alimentos.
- Dar un primer paso como investigadores ecuatorianos en este campo de la tecnología y demostrando que no está

reservado a instituciones de países desarrollados con equipos de alta sofisticación.

- Presentar un bosquejo de análisis de costos por medio del cual se determinará la viabilidad del proyecto a nivel comercial.

1.3. Antecedentes

Mediante el paso de los años han ocurrido varios brotes de aflatoxicosis en varios países, provocando así muertes y generando dudas para la apertura de investigaciones acerca de las causas de este fenómeno.

La aflatoxicosis es una toxinfeción causada debido al consumo de alimentos que contienen aflatoxinas.

A continuación se presentan los brotes más relevantes de aflatoxicosis en el mundo:

AFLATOXICOSIS EN ANIMALES

- En el año 1960, en Inglaterra, ocurrió la muerte de 100.000 pavipollos que fue denominada en ese entonces la enfermedad “X”. Al corto tiempo, hubieron brotes similares en aves de corral (7).
- En el año 1997, en Colombia, se reportó la presencia de AFB1 en alimentos tanto de consumo animal como humano (6).
- En el año 2005, en Venezuela, se presentó el Caso Purina que establece que los alimentos “Dog Chow” y “Cat Chow”, fabricados en Venezuela por PURINA, tienen presencia de aflatoxinas; lo que provocó la muerte de centenares de mascotas (6,9).

AFLATOXICOSIS EN HUMANOS

- En el año 1981, en el oeste de India, debido a la ingestión de pan que había sido elaborado con harina procedente de maíz enmohecido, ocasionado por un mal almacenamiento con alta humedad por un tiempo prolongado, la aflatoxicosis afectó a

más de 200 personas causando la muerte en el 10% de ellas y la hospitalización por aproximadamente 8 semanas del 80% de ellas (8).

Tabla 1: Tabla de distribución en edad y sexo de los pacientes afectados

EDAD (AÑOS)	HOMBRES	MUJERES	TOTAL
1	0	0	0
1-4	3	5	8
5-9	17	10	27
10-14	21	12	33
15-24	26	7	33
25-34	37	18	55
35-44	17	6	23
45-54	16	2	18
55-64	3	0	3
más de 65	0	0	0
TOTAL	140	60	200

- En el año 2004, en las zonas rurales de Kenia, el consumo de maíz, y productos elaborados a base de esta materia prima, contaminadas con aflatoxinas, afectó aproximadamente a unas 317 personas, provocando la muerte de 125 de ellas (8).

CAPÍTULO 2

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Aflatoxinas en los alimentos.

Debido a su frecuencia de aparición en diversos tipos de alimentos las aflatoxinas representan un gran riesgo a la salud humana, por lo que se decidió realizar un estudio para corroborar sus características como el posible efecto antibiótico, (que se piensa tienen todas la micotoxinas), frente a otros tipos de microorganismos diferentes al hongo productor (11), y permitiendo su prevalencia, por lo que, se desea sacar beneficio de dichas propiedades para diseñar un método de detección de la misma aflatoxina basado en ese efecto.

Hace unas pocas décadas una de las que hoy identificamos como micotoxina, específicamente patulina era usada como antibiótico

para humanos, hasta que se descubrió sus efectos toxicológicos. Esta propiedad antibiótica de la patulina le asegura al hongo productor su prevalencia frente a otros microorganismos cuando se compite por un mismo recurso (12).

En el siguiente capítulo se habla de las aflatoxinas de forma general, presentando su definición, características como agente tóxico, y el riesgo que podría presentar a la salud humana, debido a la gran importancia de esta micotoxina en la actualidad.

2.1.1. Definición y hongo productor

Las aflatoxinas son un tipo de micotoxinas hepatotóxicas producidas por cepas toxigénicas de los hongos del género *Aspergillus*, principalmente por el *Aspergillus Flavus* y el *Aspergillus Parasiticus*, siendo el *Aspergillus Flavus* el principal productor de la Aflatoxina B1 y B2, el *Aspergillus Parasiticus* el principal productor de B1, B2, G1 y G2 (6,2).

En la Figura 2.1, se presenta una foto microscópica tomada del género *Aspergillus*.

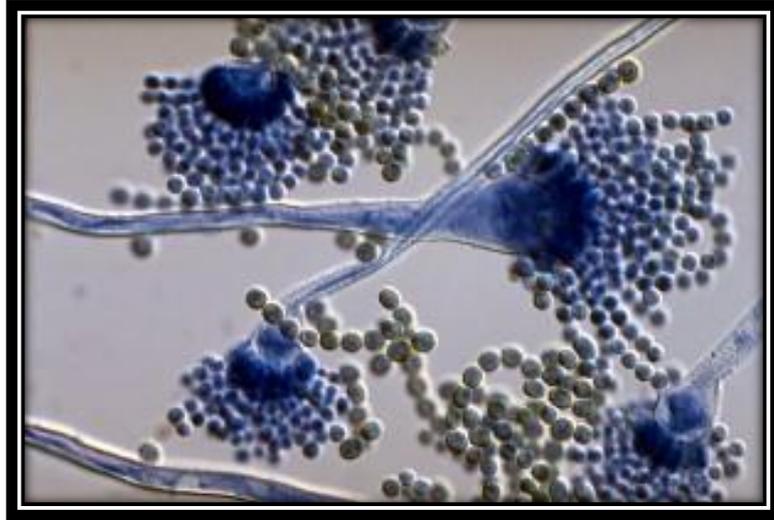


Figura 1: Género *Aspergillus* (13)

Existen otros tipos de hongos productores de esta micotoxina, así como de su tipo específico, de los cuales se hablará posteriormente. Estos hongos son; el *Aspergillus pseudotamarii*, el *Aspergillus caelatus* y el *Aspergillus nomius*, reconocido por ser productor de las Aflatoxinas G1 y G2 (10).

Cabe recalcar que los factores de crecimiento del hongo productor, no necesariamente son los mismos que los de la micotoxina, debido a la existencia de cepas no toxigénicas en el hongo; así como, la ausencia del hongo productor, no implica que el alimento esté libre de aflatoxinas, ya que las aflatoxinas, poseen mayor resistencia, ante ambientes adversos, que el *Aspergillus* (14).

2.1.2. Composición química

Debido a su composición química, las aflatoxinas pertenecen a la familia de las difurano-cumarinas. De acuerdo a ella se han clasificado en dos grupos, las que pertenecen a la serie 1-difuro-cumaro-ciclo-pentanona, que son la AFB1, AFB2, AFB2A, AFM1, AFM2, AFM2A y aflatoxicol; y las que pertenecen a la serie 2-difuro-cumaro-lactonas, que son la AFG1, AFG2, AFG2A, AFGM1, AFGM2, AFGM2A y AFB3 (4). De las cuales se hablará en mayor proporción posteriormente.

De su composición química su parte más reactiva es el anillo lactónico. Gracias a la presencia del núcleo bifurano, las aflatoxinas poseen gran rigidez lo que favorece la interacción con algunos componentes celulares (5).

2.1.3. Clasificación de las Aflatoxinas

Existen variedades de aflatoxinas, dependiendo del tipo de hongo productor, se han identificado hasta el momento 18 variedades de aflatoxinas (2), entre las cuales se podría indicar que las más importantes, debido a su frecuencia en los alimentos, son la B1, B2 producidas por el *Aspergillus Flavus*, como se mencionó anteriormente.

La B1, B2, G1, G2 producidas por el *Apergillus Parasiticus*, y las M1 y M2 que son metabolitos hidroxilados de la Aflatoxina B1 (3).

A continuación, en la figura 2.3, se presenta una breve clasificación de las aflatoxinas más importantes, como lo son la AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2.

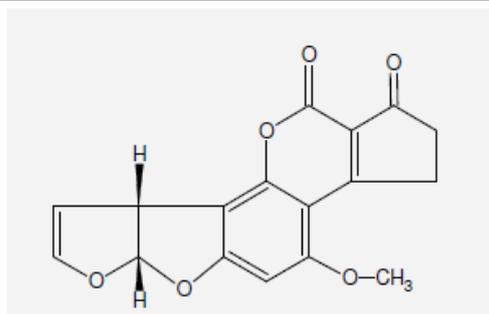


Figura 1. Aflatoxina B₁ (AFB₁): 2,3, 6a á, 9a á-TETRAHIDRO-4-METOXICICLOPENTA (C) FURO (3',2':4,5) FURO (2,3-h) (1) BENZO-PIRANO-1,11-DIONA.

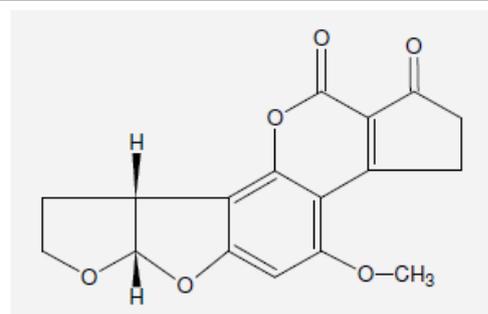


Figura 2. Aflatoxina B₂ (AFB₂): 2, 3, 6a, 8, 9, 9a á-HEXADIDRO-4-METOXICICLOPENTA (C) FURO (3',2':4,5) FURO (2,3-h) (1) BENZO-PIRANO-1,11-DIONA.

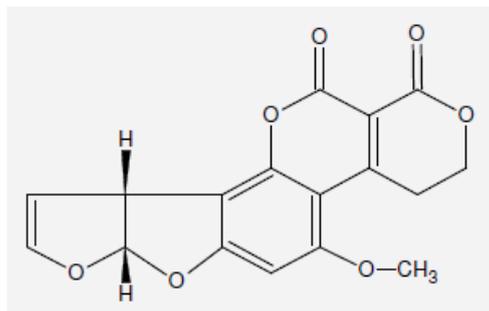


Figura 3. Aflatoxina G₁ (AFG₁): 3,4,7a, 10 á-TETRAHIDRO-5-METOXI-1H, 12H-FURO-(3',2': 4,5) FURO (2,3-

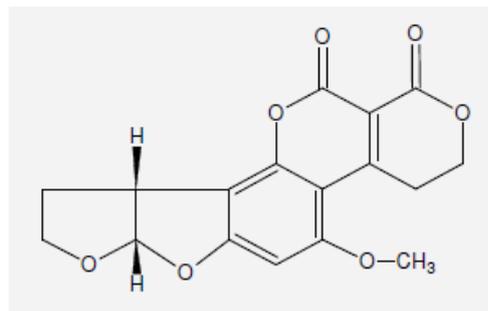


Figura 4. Aflatoxina G₂ (AFG₂): 3,4,7a, 9, 10, 10a á-HEXAHIDRO-5-METOXI-1H, 12H-FURO (3',2':4,5) FURO

Figura 2: Clasificación de las Aflatoxinas (4)

En general se podría decir que las Aflatoxinas más conocidas se clasifican en tres grandes tipos; la Aflatoxina B, la cual se divide en B1 y B2, la Aflatoxina G, que se divide en G1 y G2, y la Aflatoxina M, que a su vez se divide en M1 y M2.

Se les dio el nombre de AFB y AFG debido al color fluorescente que presentan bajo luz ultravioleta siendo la B de color azul: "blue"; y la G de color verde: "green" (4).

Las principales aflatoxinas son la B1 y la G1, mientras que los otros tipos de aflatoxinas son derivados de estas mencionadas; como lo es la AFB2 y la AFG2, que son dihidroderivados de la AFB1 y la AFG1; las aflatoxinas M1 y M2 son derivados hidroxilados de la AFB1 y AFB2, como ya se mencionó previamente; y así con diversos tipos de aflatoxinas (4).

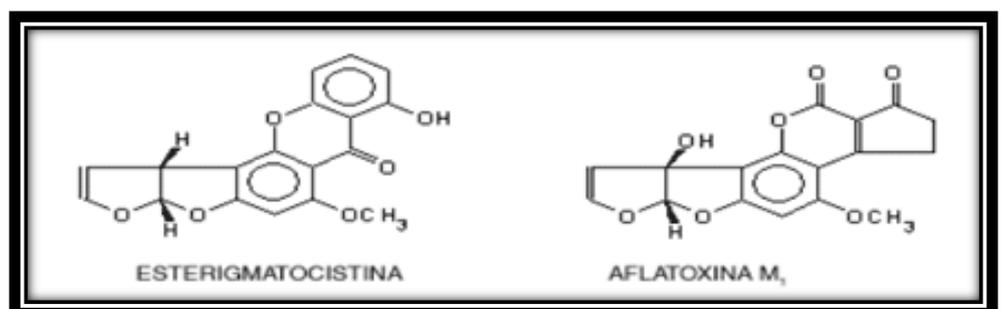


Figura 3: Composición química de otros tipos de Aflatoxinas (15)

2.1.4. Características morfológicas y bioquímicas

Se comenzará describiendo las rutas bioquímicas que utiliza el hongo para la producción de la aflatoxina, posteriormente se describirán las características culturales y morfológicas respectivamente. Se tomará en cuenta el *A. flavus* y el *A. parasiticus*; debido a que son productores de los principales tipos de aflatoxinas (B1 y G1) o de las más conocidas.

Según Guzman 2007, la aflatoxina se sintetiza por la ruta metabólica de los policétidos y las reacciones involucradas incluyen condensación, oxidación, reducción, alquilación y halogenación, llevando a la formación de una molécula que consiste en un anillo cumarín unido a una unidad bisdihidrofurano y a una ciclopentanona. Estos metabolitos se forman por la condensación del acetil-coenzima A y malonil coenzima A, dando lugar al acetil-S Coenzima A, la cual será la molécula iniciadora de la AFB1. Dentro de la vía biosintética, la formación de la versicolorina A es particularmente relevante, ya que es la primera molécula en la vía de la AFB1 que contiene un doble enlace en la posición de la molécula del bisfurano.

Este doble enlace es el blanco para la activación de una molécula altamente reactiva (16).

A continuación, en la figura 2.4 Se presenta paso a paso los productos formados en la ruta metabólica para la producción de Aflatoxinas.

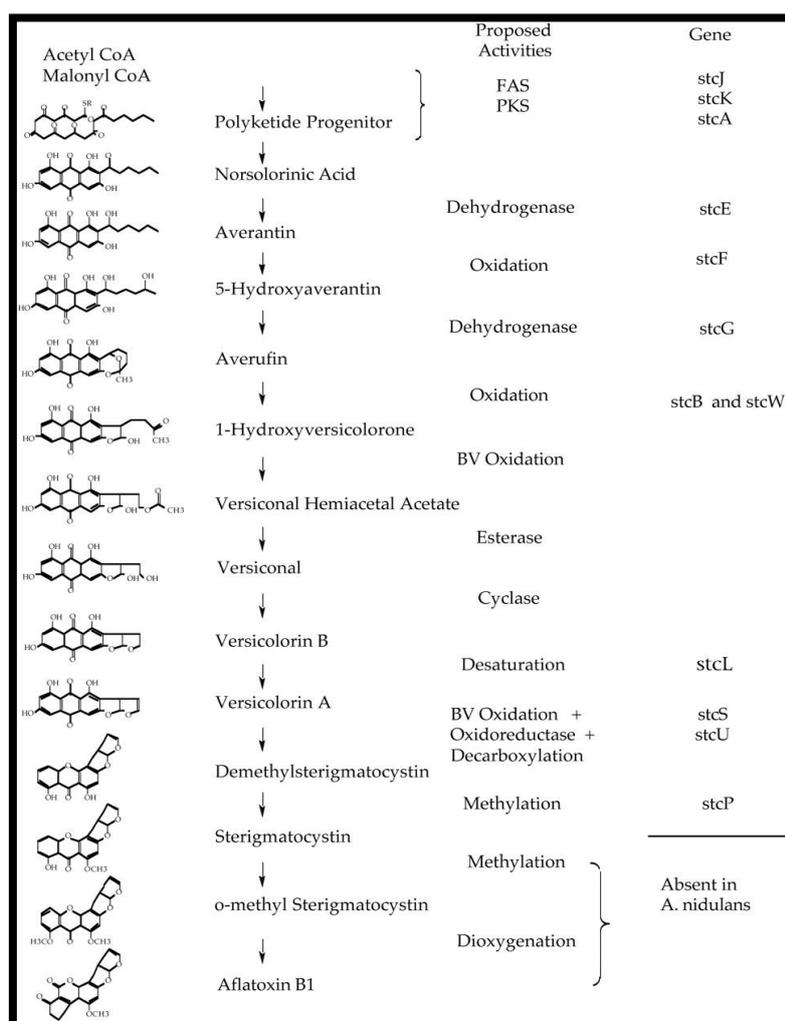


Figura 4: Ruta Metabólica para la producción de Aflatoxinas (16)

Las características culturales a considerar son la temperatura, el pH y la actividad de agua, es decir, los factores generales de crecimiento del hongo productor.

Las características culturales para el desarrollo del *Aspergillus flavus* son las siguientes; una temperatura que oscile entre los 10°C y los 43°C, pero cabe recalcar, que la temperatura óptima de este hongo es entre 20 y 30°C; una actividad de agua óptima de 0.99; y máxima de 0.998; y un pH que oscila entre los valores de 2,1 y 11,2 (17).

En cuanto al *Apergillus parasiticus*, se indicaron las siguientes características; en cuanto a la temperatura, el crecimiento del hongo productor se da a partir de los 30°C, mientras que el de la aflatoxina, se da desde los 28°C, de manera óptima; la actividad de agua requerida para el crecimiento de este hongo es relativamente menor que el del *Aspergillus flavus*, óptimamente es necesaria una actividad de agua igual a 0.87; y este hongo es más sensible al pH, debido a que su crecimiento es viable en un rango de 4 como mínimo, ya se inhibe el crecimiento a un pH menor, y como máximo tiene un valor de 7 (17).

En las características morfológicas del género *Aspergillus*, podemos encontrar que este tipo de hongo posee cabezas conidiales, que pueden tener 4 tipos de formas diferentes, pueden ser de forma globosa, radiada, columnar o claviforme (10).

Existen dos formas de ver la morfología de este tipo de hongo, de forma macroscópica, y de forma microscópica; de forma macroscópica en sí, lo que se puede apreciar es la coloración proporcionada por el hongo, la cual varía dependiendo del hongo específico que se esté tratando, como por ejemplo es de color verde-amarillento en caso de *A. Flavus*, blanco o verde-azulado en caso del *A. fumigatus*, etc.; y también se puede apreciar la textura del hongo, que puede ser de tipo granular, aterciopelada, etc. Mientras que la morfología microscópica nos permite tener una mejor visualización de la forma del hongo que se está tratando, para así obtener una correcta identificación del género tratado (10).

A continuación se presenta una figura de la morfología microscópica del *Aspergillus spp.*, detallando sus partes.

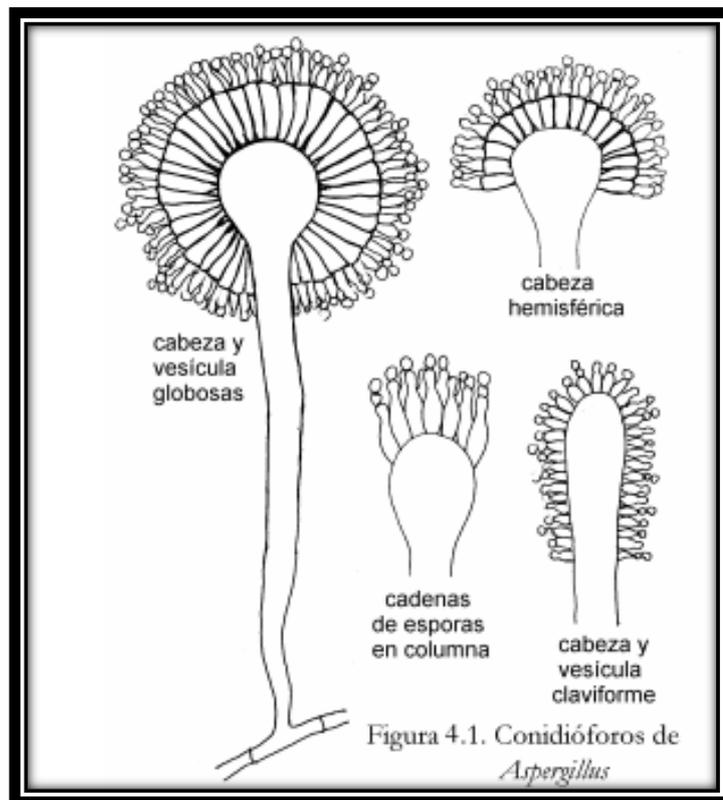


Figura 5: Morfología Microscópica del *Aspergillus* spp. (10)

Es importante indicar los factores de crecimiento del género *Aspergillus* de forma general, para lo cual se presenta una tabla, con valores de temperatura y actividad de agua para diversas especies del género *Aspergillus*.

Tabla 2: Rangos de temperatura y actividad de agua de varias especies del género *Aspergillus* (10)

Especies	Temperatura °C		Actividad de Agua		
	Rango	Optimo		Minimo	Optimo
<i>A. flavus</i>	6 a 45	35 a 37		0,78	0,95
<i>A. vesicolor</i>	4 a 39	25 a 30		0,78	0,95
<i>A. candidus</i>	3 a 44	25 a 32		0,75	0,90 a 0,98
<i>A. fumigatus</i>	10 a 55	40 a 42		0,85	0,98 a 0,99
<i>P. roquefortii</i>	<5 - 35	25		0,83	0,99

2.1.5. Alimentos que se encuentra

Los alimentos más propensos al ataque micótico de aflatoxinas son los cereales, semillas y frutos secos, en general los alimentos en los que se ha encontrado gran producción y crecimiento de aflatoxinas es en maíz, trigo y arroz (20).

A continuación, se presenta la siguiente figura 2.6, donde podemos apreciar el ataque micótico a los alimentos más sensibles, que son el maíz y el trigo.

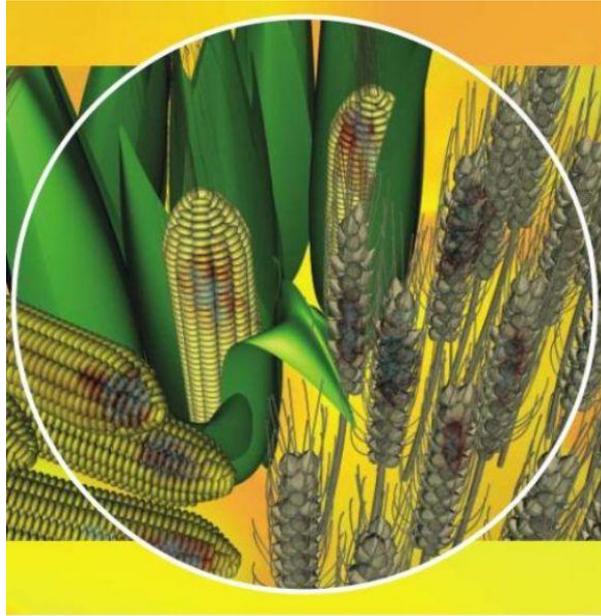


Figura 6: Maíz y trigo contaminados con Aflatoxinas

Existen varias fuentes de alimentos contaminados, estas dependen del tipo de aflatoxinas que se esté tratando, por ejemplo, la aflatoxina M1 y M2 por lo general es encontrada en la leche, debido a que esta micotoxina es un hidroxilado de la aflatoxina B1, esta es generada debido a la ingesta del animal, de alimento contaminado con aflatoxina B1, y así excretada mediante la leche, como aflatoxina M1 (8).

Existen otras variedades de alimentos, cuyo proceso de contaminación es debido a la ingesta del animal de un alimento contaminado con aflatoxinas, en estos casos se puede mencionar los huevos, el hígado, y la leche, como se indicó previamente.

2.1.6. Niveles permitidos

A continuación se presenta un cuadro con los niveles de acción permitidos por la FDA de Estados Unidos en alimentos para animales y leche:

Tabla 3: Niveles de acción para aflatoxinas permitidos por la FDA de U.S.A en alimentos para animales y leche (21)

Producto	Nivel Acción (ppb) ^{1,2,3}
Productos de maíz y maní con intención de terminar ganado de carne (por ejemplo: feedlot)	300
Harina de semilla de algodón con intención de alimentar ganado de carne, cerdos, o aves (sin tener en cuenta edad o estado de crecimiento)	300
Productos de maíz y maní con intención de terminar cerdos de 100 libras o más	200
Productos de maíz y maní con intención de cría de de ganado de carne, cerdos, o aves maduras	100
Productos de maíz, maní y otros alimentos e ingredientes para animales, excluyendo harina de semilla de algodón (para animales inmaduros)	20
Productos de maíz, maní, harina de semilla de algodón y otros ingredientes para alimento de ganado de leche, especies animales o usos no especificados antes, o cuando el uso de intención es desconocido	20
Leche	0.5 (Aflatoxina M ₁)

A continuación se presentan datos bibliográficos de los niveles de acción y tolerancia para aflatoxinas totales establecidos por la FDA para los alimentos más propensos al ataque micótico: (22)

“Los niveles de acción vigentes en la actualidad para aflatoxinas totales, establecidos por la FDA para el maíz y maní, son los siguientes:

- Hasta 20 ppb de aflatoxinas en maíz y maní para consumo de humanos, animales jóvenes, vacas lecheras y cuando su uso es desconocido.
- Hasta 100 ppb en maíz y maní para consumo de pie de cría en bovinos, pie de cría de porcinos y para aves.
- Hasta 200 ppb en maíz y maní destinado para el acabado de cerdos de engorde (cerdos de más de 45kg).
- Hasta 300 ppb en maíz y maní para consumo de bovinos de engorde”

2.2. Efectos en la salud.

Las aflatoxinas poseen carácter hepatotóxico, como ya se mencionó previamente, y son consideradas carcinogénicas, por lo cual representan una gran preocupación para los consumidores, también son consideradas teratogénicas y mutagénicas (10).

2.2.1. Órgano Target.

El principal órgano que se ve afectado por la contaminación de aflatoxinas es el hígado, causando en este la producción de hígado graso, necrosis y hemorragias, por lo general (14).

Debido a que es una micotoxinas hepatotóxica, los órganos más afectados son el hígado principalmente, y los riñones, pero también se ha encontrado que puede afectar el sistema inmune, el sistema nervioso y también el sistema reproductivo (14).

Una de las enfermedades más conocidas, que causa este tipo de micotoxina, es el carcinoma hepatocelular, que se da

específicamente a la contaminación por aflatoxina B1, que en sí es cáncer al hepático, y tiene mayor incidencia en regiones de Asia y Africa (23).

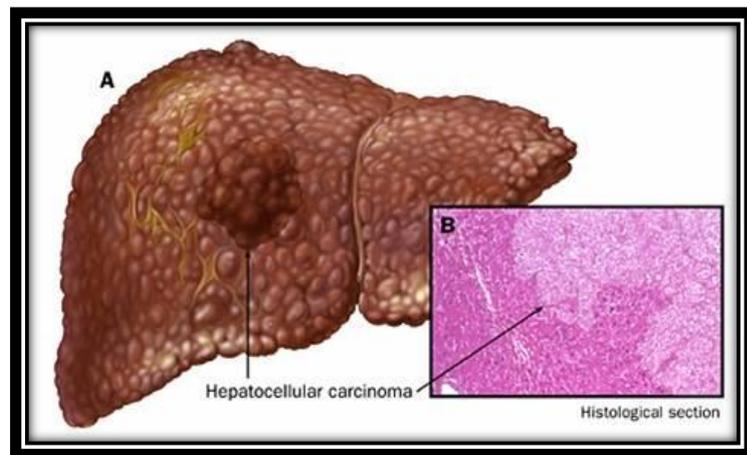


Figura 7: Carcinoma Hepatocelular

2.2.2. Efectos tóxicos sobre el organismo.

Existen dos tipos de efectos tóxicos debido al consumo de aflatoxinas, el agudo y el crónico. Al referirse a una exposición aguda, se entiende que el afectado ha estado en contacto con un tóxico, durante periodos cortos de tiempo, pueden ser días, pero a dosis elevadas del tóxico, y al referirse a una exposición crónica, esto indica que el afectado ha estado en contacto con el

tóxico por periodos largo, a dosis no necesariamente elevadas, esta última presenta sus efectos de forma tardía y después de un largo periodo de la contaminación (14).

En el efecto agudo del consumo por aflatoxinas existen varias sintomatologías para la detección del tóxico, como lo son diarreas, fiebre, vómitos, falta de hambre, depresión, lo que conllevan a enfermedades como la hepatitis aguda, las cuales, dependiendo del tipo que se presente, y el momento en que sea detectada, puede llegar hasta a la muerte (14).

La exposición crónica es más común, y posee efectos más adversos y dañinos, y debido a su largo periodo es más difícil su detección y su tratamiento. Este tipo de exposición permite la formación de células cancerígenas en el cuerpo, debido a la biotransformación que sufren las aflatoxinas en el organismo, la cual afecta en su mayoría y de forma más drástica al ADN, dividiendo así la exposición crónica en tres efectos, el mutagénico, el carcinogénico y el teratogénico (10, 14).

El efecto mutagénico tiene gran importancia, debido a que este es heredable a futuras generaciones. Mediante la realización

de varios estudios a bacterias y levaduras, se ha concluido que las aflatoxinas son unos potentes mutagénicos, debido a la gran cantidad de cambios producidos en la cadena de ADN, especialmente en aquellas ricas guanina-citosina.

El efecto carcinogénico se da debido a la unión de la AFB1-8,9 epóxido con el N7- de la Guanina del ADN, lo que conlleva como producto final a la formación de formamidopirimidina permitiendo así la formación de tumores en el organismo, y la mutación de la cadena d ADN de guanina a timina (14).

Para tener presente los efectos tóxicos producidos en el organismo, es importante conocer las posibles vías de entrada de la toxina al organismo. La única vía de entrada de las aflatoxinas es por vía oral, y así esta se absorbe en el organismo, produciendo los efectos previamente mencionados.

2.3. Métodos comunes de medición de Aflatoxinas en alimentos.

Es de gran importancia en la industria alimenticia la capacidad de determinar la presencia de este tipo de tóxicos en la materia prima, antes de ofrecer un producto a la venta, debido a los riesgos que esta conlleva y al atentado ante el consumidor, por lo tanto, se presentan a continuación varios métodos para la detección de aflatoxinas.

Existen tres métodos conocidos para la detección de aflatoxinas en una muestra determinada, estas son (24):

- Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)
- Cromatografía en capa delgada (CDD)
- Cromatografía de gases (CG)
- Ensayo de inmunoabsorción ligado a la enzima (ELISA)

Estos son los métodos más comunes que existen para la medición de aflatoxinas en el medio.

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTO RENDIMIENTO

Este método emplea diversas columnas dependiendo del tipo y estructura química de la micotoxina que se esté tratando. En sí, permite la detección mediante fluorescencia con luz ultravioleta u otros detectores de fluorescencia una vez aislada la toxina y purificada la muestra (24).

Este método es el más aplicado en la industria, debido a su precisión y a los diversos tipos de aplicaciones que se han encontrado en este método, como lo es el uso de espectrometría de masas, lo que permite la realización de mayor cantidad de análisis (24).

A continuación, en la figura 2.8, se presenta el proceso de medición de aflatoxinas mediante cromatografía líquida de alto rendimiento.

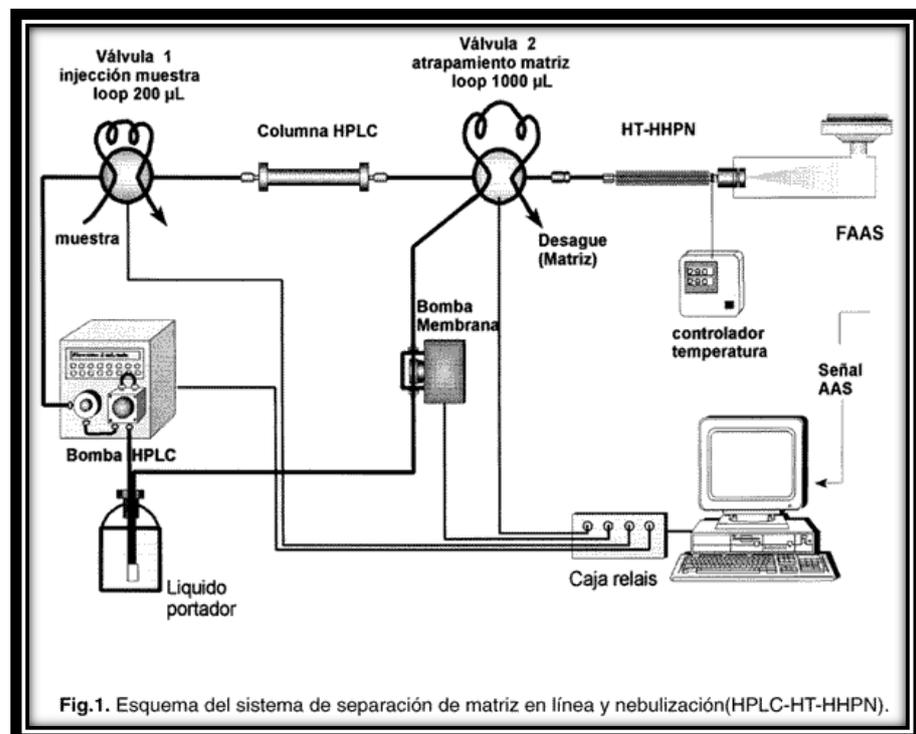


Figura 8: Proceso HPLC (25)

CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA

Este método proporciona varias ventajas, debido a que permite analizar gran cantidad de muestras por análisis, lo cual lo hace en un método económico y fácil de aplicar, debido a que sólo es necesaria su determinación la ayuda de luz ultravioleta, o luz visible. Los compuestos usados en este tipo de análisis son fáciles de conseguir y no son de gran costo, por lo cual se podría indicar que es otra ventaja económica del uso de este método (24).

A continuación, en la figura 2.9, se presenta el resultado de la cromatografía de capa delgada.

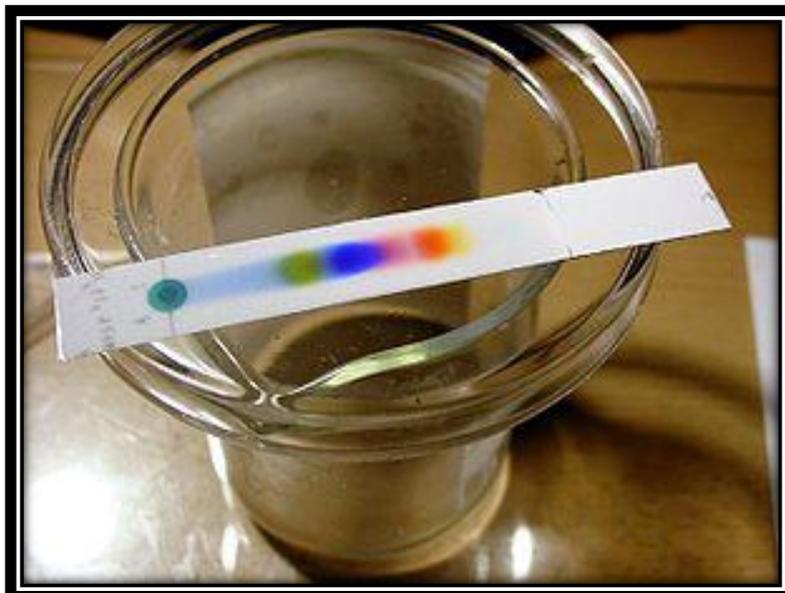


Figura 9: Cromatografía en capa delgada (26)

CROMATOGRAFÍA DE GASES

Esta técnica es muy usada en la industria alimentaria debido a su capacidad de detección en muestras como semillas y cereales. Está ligada con varios tipos de tecnologías, como lo es la espectrometría de masas, detectores de ionización, o detectores de captura de electrones, haciéndolo así un método avanzado para la detección y cuantificación de aflatoxinas o micotoxinas presentes en una muestra determinada (24).

En la figura 2.10 se presenta el proceso de la cromatografía de gases para la medición de aflatoxinas.

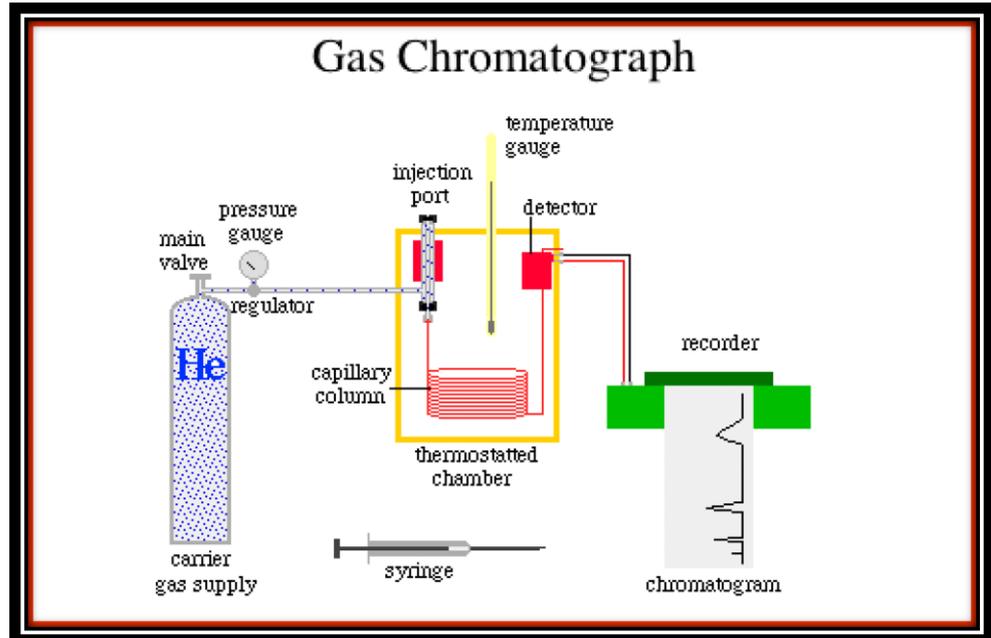


Figura 10: Cromatografía de gases (27).

ENSAYO DE INMUNOABSORCIÓN LIGADO A LA ENZIMA

Este es el método más conocido de todos, también conocido como ELISA, cuya función principal es formar un complejo antígeno-anticuerpo, para así ver la competencia que existe entre la micotoxina y la micotoxina conjugada, por la unión de sitios con los anticuerpos, después es añadida la enzima, proporcionando así una coloración dependiendo del tipo de reacción que ha ocurrido (24).

A continuación, en la figura 2.11, se presenta el proceso de ELISA competitivo para la detección de aflatoxinas.

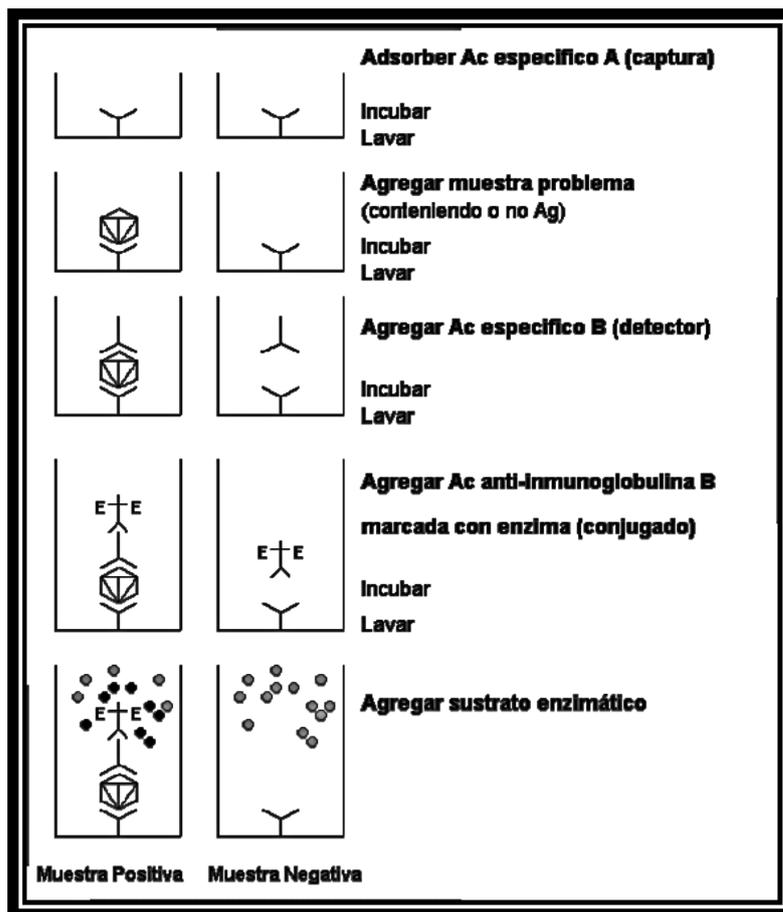


Figura 11: Proceso de análisis de ELISA competitivo (28).

CAPÍTULO 3

3. METODOLOGÍA A PARTIR DEL PLANTEAMIENTO DE UNA HIPÓTESIS CIENTÍFICA

3.1. Exposición de la Hipótesis a Probar

Desde hace algunos años se manejan hipótesis de que en el futuro no se usarán animales para probar medicamentos sino únicamente bacterias como modelos de experimentación, e incluso se ironiza con el derecho de las bacterias. Estas proyecciones se basan en que algunas bacterias son muy similares a los seres humanos en algunos aspectos enzimáticos; según estas perspectivas se planteó que ciertas bacterias y el hombre podrían compartir sensibilidades a un determinado número de toxinas comunes, entre estas toxinas de

interés en alimentos se tiene a las aflatoxinas que es en la que se basará el presente trabajo de investigación.

En caso de que una bacteria presente sensibilidad esto se reflejará en la inhibición del crecimiento microbiano, lo cual se puede usar para determinar si existiere o no aflatoxinas en niveles no permitidos en un alimento con un procedimiento adecuado.

A pesar que los sistemas biológicos tienen muchas variables que controlar, que podría ser una razón para no usarlos en métodos de detecciones indirectos como el que se plantea; se cree que este planteamiento podría probar que bajo ciertas condiciones se pueden obtener resultados repetitivos y confiables.

3.2. Metodología para probar la hipótesis científica.

El método de detección que se diseña en caso de probarse la hipótesis científica y de ser viable, consiste en los siguientes pasos: primero, se usará un método de extracción de aflatoxina convencional con metanol al 70% del alimento a analizar (sugerido por la USDA de USA); segundo, se agregará un determinado volumen en mililitros de

esta extracción a una fiola con un agar PCA previamente esterilizado (el volumen exacto que se debe agregar se determinará en la experimentación con la que se probará la hipótesis científica y se describe más adelante en esta misma sección); tercero, se inoculará en este agar descrito por siembra en masa (18) un microorganismo de prueba sensible a la toxina que determinará con su crecimiento o inhibición total (no aparición de ninguna colonia) a las 24, 48 o 72 horas de incubación la presencia o no de la aflatoxina respectivamente en el alimento analizado. A continuación se muestra un esquema en el que se resume y grafica de mejor manera los pasos del método.

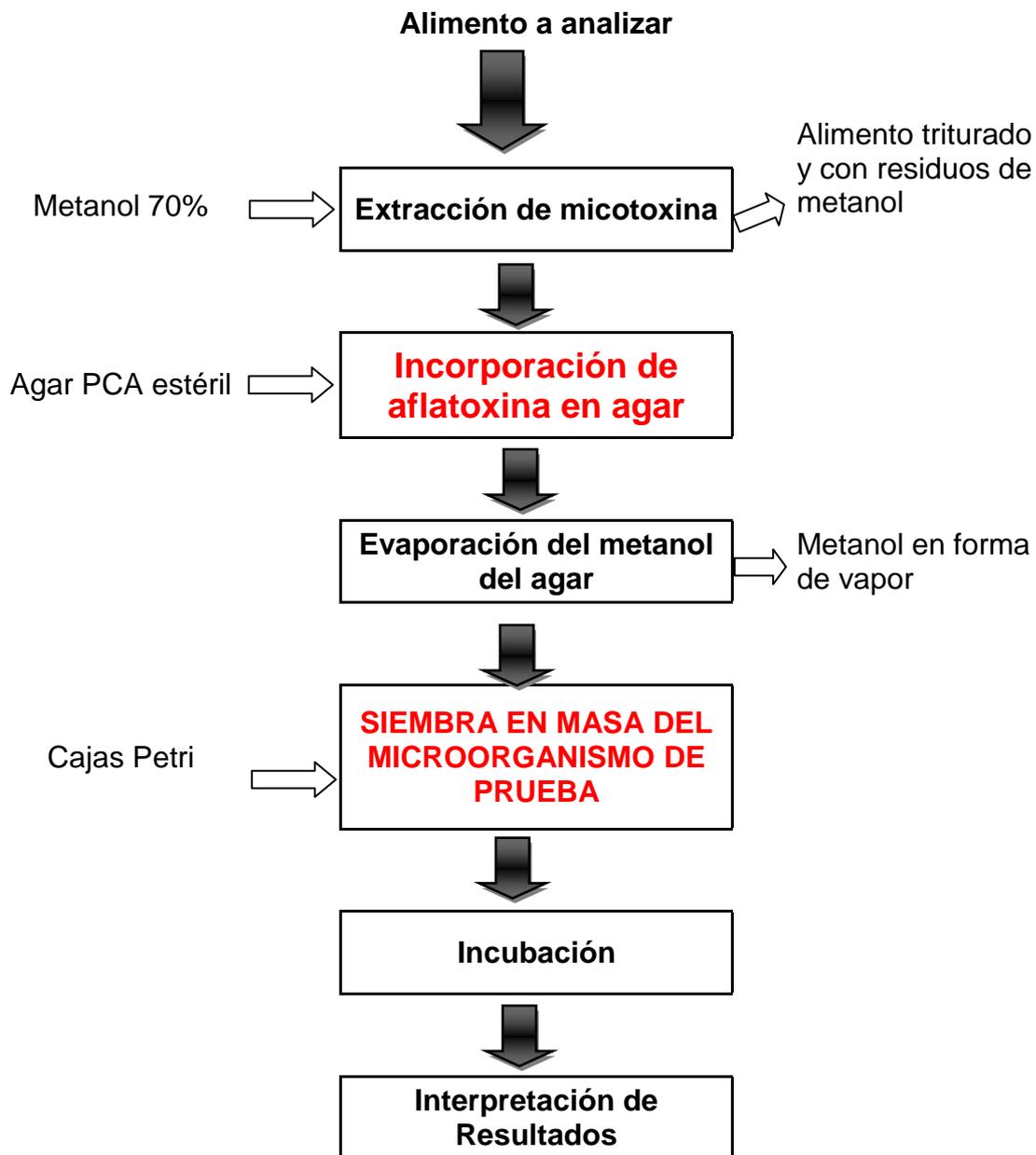


Figura 12: Pasos del Método Propuesto

Elaborado por: Vargas & Velásquez, 2013.

Para probar la hipótesis científica y diseñar el método de detección, primero se dio las condiciones para que se contamine una muestra de alimento en este caso maíz con aflatoxinas, para lo cual se le dio el tiempo, humedad y temperaturas necesarias para aquello; de esta se extrajo por el método convencional, con lo que se obtuvo intencionalmente 3.5 litros de una solución de aflatoxina en metanol al 70% a una concentración de 90 ppb validada por el laboratorio PROTAL-ESPOL, con la solución se trabajó toda la experimentación.

El medio de cultivo que se usó para incorporar la aflatoxina como ya se ha mencionado, fue PCA, porque es un medio de cultivo no selectivo, lo cual hace que el único inhibidor del medio sea la aflatoxina incorporada (descartando con la experimentación que el metanol residual tenga efecto inhibidor sobre los microorganismos de prueba), esto también se refleja en un menor costo del medio.

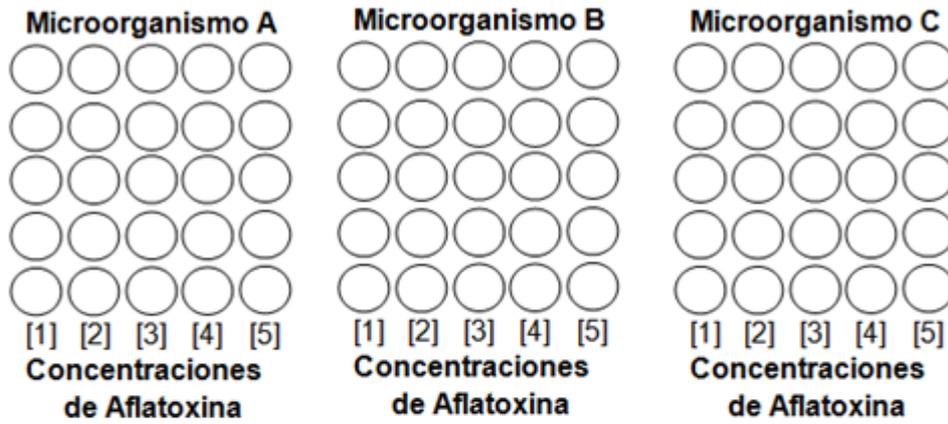
Según lo previsto se seleccionaron 3 microorganismos de prueba congruente con los criterios expuestos en la sección 3.2.1 de este mismo capítulo, los cuales se inocularon por siembra en masa (18) a 25 placas con 5 concentraciones diferentes incluyendo la concentración 0 ppb; se hicieron dos corridas, la primera fue con un

propósito exploratorio y con concentraciones totalmente lejanas según criterio personal, en la segunda corrida de pruebas que ya se hizo con un solo microorganismo también se escogió 5 concentraciones incluida la testigo (0 ppb de aflatoxina) según los resultados obtenidos de la primera corrida exploratoria, es decir, una vez que se encontró la concentración menor de aflatoxina en que se inhibió el 100% del crecimiento microbiano (del microorganismo de prueba seleccionado), se escogieron nuevamente 5 concentraciones menores e igual a la determinada y equidistantes; todo esto para poder encontrar la concentración mínima en que se inhibe el 100% del crecimiento microbiano (ausencia de crecimiento microbiano) con una mayor sensibilidad, en base a esa concentración se diseñó el método, se probaron dos cargas iniciales (10^1 y 10^2), y se escogió la más conveniente según como se presentaron los resultados y tomando en cuenta para este punto aspectos como tamaño y forma de la colonia entre otras; en conclusión se trabajó por quintuplicado.

La primera concentración mínima determinada en la corrida exploratoria tendrá 10 datos por ser el punto de partida para la segunda y asegurarse que no sea un resultado casual. Vale recalcar que al final de la prueba de hipótesis, y en caso de ser exitosa, se escogerá uno de los tres microorganismo de prueba seleccionados el

cual será parte del diseño y concepción del método cualitativo de detección de aflatoxina. En los siguientes sub-numerales de esta sección se detallarán los pasos y métodos seguidos en la metodología expuesta.

CORRIDA EXPLORATORIA.



SEGUNDA CORRIDA

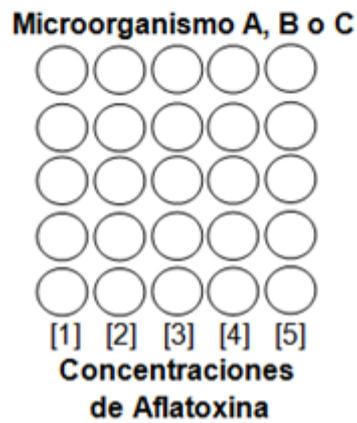


Figura 13: Diseño de Experimento

Elaborado por: Vargas & Velásquez, 2013

3.2.1. Selección de los microorganismos a probar

A los microorganismos se los clasificó convenientemente de la siguiente manera para su selección: Probióticos Humanos, Patógenos Humanos, Tecnológicos (Procesos como pan) y Descomponedores. En esta clasificación expuesta se excluye de forma voluntaria microorganismos extremófilos y en su mayoría se incluyen microorganismos mesófilos, porque lógicamente son los microorganismos más cercanos en cuanto a requerimientos bioquímicos y culturales al del ser humano. A continuación se explica de qué manera se dio la discriminación.

Para la selección de los 3 microorganismos de prueba se tuvieron en cuenta los siguientes aspectos explicados a continuación:

- Disponibilidad y acceso en el medio: Que existan distribuidores en el país y se puedan comprar sin restricción alguna.
- No exista un riesgo para la salud: Que no implique un riesgo a la salud del analista

- Que se declare el microorganismo en la etiqueta del cultivo comercial

Para la discriminación solo se escogerá una “clase” de microorganismo; de dicha clase saldrán tres microorganismos al azar.

“clase”: Esta clasificación divide a los microorganismos involucrados al área de alimentos de la siguiente manera según criterio personal.

Microorganismos Probióticos Humanos: Son todos aquellos microorganismos capaces de sobrevivir y adaptarse en el tracto digestivo de los seres humanos y generar un beneficio mutuo.

Microorganismos Patógenos Humanos: Son todos aquellos microorganismos capaces de causar una toxiinfección alimentaria.

Microorganismos Tecnológicos: Son todos aquellos microorganismo capaces de generar un beneficio

tecnológico u organoléptico a un alimento humano sin que este cause daño alguno al mismo.

Inicio: M. Probióticos Humanos, M. Patógenos Humanos, M. Tecnológicos

- **Disponibilidad y acceso en el medio:** no se discrimina ninguna clase de microorganismo debido a que todos cumplen esta característica, ya sean los patógenos en las empresas que distribuyen pruebas rápidas para los mismos (se obtienen en suspensiones inactivos), los probióticos en las farmacias o los tecnológicos en las empresas distribuidoras de starteres.
- **No exista un riesgo para la salud:** Aquí se discriminó a los microorganismos patógenos humanos, aunque se encuentran cepas puras comercialmente en distribuidoras de pruebas rápidas importadas, y a pesar de venir inactivas, se cree que representan un riesgo potencial a la salud de la persona involucrada en el ensayo, el cual es

innecesario si se puede trabajar con bacterias de otra naturaleza. Además los microorganismos patógenos siempre presentan una tendencia a mutar más rápido que otros tipos, y en algún momento si fueran sensibles podrían desarrollar resistencia a las aflatoxinas como lo hacen con los antibióticos.

- **Que se declare el microorganismo en la etiqueta del envase comercial:** esto es importante porque a pesar que esté disponible la bacteria comercialmente y sea fácilmente accesible, si no se conoce con exactitud cuál es, aumentará la incertidumbre de la experimentación y su entendimiento, siendo esto una variable más desconocida (innecesario si se puede evitar), por eso, en este criterio se descartó microorganismos Tecnológicos porque la mayoría de las marcas no declara la cepa exacta que están vendiendo por asuntos comerciales totalmente entendible, como por ejemplo en el caso de los starter de CHR-HANSEN.

En estas instancias es lógico pensar que se escogerán tres probióticos al azar, también se destaca que sólo existen 4 probióticos de venta libre en las principales farmacias del país de los cuales se seleccionaron aleatoriamente los siguientes:

- *Lactobacillus acidophilus*
- *Bacillus clausii*
- *Saccharomyces boulardii*

A los microorganismos seleccionados se les comprobó las cargas iniciales, tanto declaradas como en el caso del *Bacillus clausii* (Nombre comercial ENTEROGERMINA) y no declaradas como en el caso del *Saccharomyces boulardii* (Nombre comercial FLORATIL) y el *Lactobacillus acidophilus* (Nombre comercial LACTEOL) las cuales se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 4: Determinación de Cargas Iniciales

DILUCIONES	DETERMINACIÓN DE CARGAS INICIALES		
	UFC POR PLACA		
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Bacillus clausii</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
10 ⁻¹	Incontable	Incontable	Incontable
10 ⁻²	Incontable	Incontable	Incontable
10 ⁻³	Incontable	Incontable	Incontable
10 ⁻⁴	Incontable	Incontable	Incontable
10 ⁻⁵	Incontable	320	550
10 ⁻⁶	280	42	68
10 ⁻⁷	21	4	5
10 ⁻⁸	1	0	0
10 ⁻⁹	0	0	0
10 ⁻¹⁰	0	0	0
10 ⁻¹¹	0	0	0
10 ⁻¹²	0	0	0

Elaborado por: Vargas & Velásquez, 2013.

De aquí en adelante se identificará en esta tesis los microorganismos de la siguiente manera:

- *Lactobacillus acidophilus* (**microorganismo a**)
- *Bacillus clausii* (**microorganismo b**)
- *Saccharomyces boulardii* (**microorganismo c**)

3.2.2. Pruebas de metanol residual en el crecimiento microbiano

Como ya se explicó en el punto 3.3 la extracción de micotoxina se realiza en metanol al 70%, pero como es bien sabido el metanol como muchos alcoholes tiene efecto bactericida, porque disuelve las membrana fofoslipidicas, lo que termina con la lisis de las células bacterianas (19), a pesar que se evapora en la plancha eléctrica antes de ponerlos en las placas por siembra en masa (18), con los microorganismos de prueba, el remanente o residual de éste en el agar podría inducir a sesgos en la prueba de hipótesis planteada, si tuviera efecto inhibitor significativo sobre los microorganismos de prueba o si hubiera un deterioro significativo de los nutrientes de medio.

Para descartar esta pequeña posibilidad se realizó una siembra por quintuplicado de la última y penúltima dilución sembrada de cada uno de los tres microorganismos en agar con metanol al 70% previamente evaporado; la cantidad que se le añadió al agar fue de 200ml de metanol al 70% por cada 200ml de agar PCA, la cantidad de metanol añadido aunque pareciera exagerada fue con el objetivo de tener un buen margen de seguridad, para controlar la evaporación del metanol se controló el volumen y el peso de la fiola cada 10 minutos en la plancha eléctrica hasta que ésta llegara al volumen y masa inicial (sin metanol) del agar 200ml y 193g respectivamente.

El tiempo final de evaporación del metanol de la fiolas con el agar fueron de 1.5 horas aproximadamente. A pesar de que estas precisiones no suenen exactas en la manera que se llevaron y registraron, es importante resaltar que la microbiología no es una ciencia exacta sino proximal, razón por la cual no se usan micro-pipetas para sembrar, entre otras.

3.2.3. Inoculación de Microorganismos Seleccionados en el Medio de Cultivo con Aflatoxinas en Diferentes Concentraciones.

*Una vez incorporado la aflatoxina a las fiolas con PCA (Plate Count Agar) y libre de metanol (mediante el proceso de evaporación descrito en la sección anterior), se les colocó a las placas previamente con los microorganismos seleccionados en las diluciones con crecimiento 10^1 y 10^2 UFC/placa (no se inoculó las primeras diluciones por considerarlo un desperdicio de material porque no es posible contar crecimientos mayores a 10^2) por siembra en masa (18), (las diluciones sembradas en **microorganismo a** son 10^6 y 10^7 , **microorganismo b** son 10^5 y 10^6 y en **microorganismo c** son, 10^5 y 10^6), previamente se escogió 4 concentraciones distantes, ascendentes y diferentes en cada fiola; según criterio personal, una vez que se observó el crecimiento se decidió una segunda corrida con el microorganismo seleccionado para determinar con mayor sensibilidad las concentraciones críticas de inflexión para la inhibición total, todas las pruebas se las realizó por quintuplicado con el objeto de tener un análisis estadístico de al menos cinco datos por caso.*

3.2.4. Resultados esperados.

Existen tres resultados posibles de la experimentación de cada microorganismo, las cuales se puede decir que dos son desfavorables para los objetivos de esta investigación, y solo una sería conveniente para la investigación, la cual sería que el microorganismo tenga una sensibilidad moderada a la micotoxina, es decir que exista una dosis mayor a 0.1 ppb en agar en la que el microorganismo inhiba totalmente su crecimiento; y los dos escenarios desfavorables son los dos extremos, una es que la dosis de inhibición sea muy alta (mayor a 30 ppb en agar) o no exista, esta situación haría que el tiempo de evaporación sea demasiado largo y se pueda dañar el agar o sus nutrientes; y el otro extremo es que el microorganismo sea extremadamente sensible y se inhiba a dosis muy pequeñas esto dificultaría la prueba ya que una pequeña variación de volumen daría resultados erróneos.

Todos estos escenarios se pueden dar debido a los diferentes sistemas enzimáticos que posee cada microorganismo, que son muchos más ricos en variedad que en seres

macroscópicos, es por ello que sin duda si no se encuentra el microorganismo adecuado entre los probados, sin duda pudiese existir uno que no se probó y cumple con lo esperado.

3.3. Materiales y equipos

Debido a que se trabajó con microorganismos, metanol y una toxina carcinogénica, los materiales y equipos utilizados por seguridad y necesarios para la obtención de resultados fueron:

Tabla 4: Materiales y Equipos Usados

MATERIALES	OBSERVACIONES
Indumentaria	
Cofia	Son necesarias por normas de bioseguridad y seguridad industrial de cualquier laboratorio.
Mandil	
Guantes	
Mascarilla	
Gafas de seguridad	
Materiales de laboratorio	
Placas Petri	Vidriería mínima para la experimentación según lo planteado
Pipetas	
Balones aforados	
Fiolas o Erlenmeyer	

Embudo	
Espátula	
Lápiz graso	
Mechero de Alcohol	
Insumos de la Experimentación	
Maíz contaminado	Se lo hizo humeciendo maíz y dándole condiciones de temperatura para que se desarrolle el hongo durante mes y medio
Algodón	material básico de laboratorio para prácticas
Papel aluminio	
Agar PCA (Plate Count Agar)	fue escogido por ser un agar no selectivo y permitir el uso de cualquier tipo de microorganismo de prueba
Metanol 70%	es necesaria para la extracción de la aflatoxina
Etanol industrial	material básico de laboratorio para practicas
Mechas para mechero de Alcohol	
Agua de Peptona Bufferada	para hacer las diluciones y el pre-acondicionamiento de las bacterias
Agua destilada	material básico de laboratorio
Papel filtro #1	es necesaria para la extracción de la aflatoxina
Probióticos.	son los microorganismos de prueba para la experimentación
Equipos	
Incubadora BINDER modelo: BD53/EZ	material básico de laboratorio para prácticas
Sorbona QUIMIS modelo: Q21623	necesario para trabajar con metanol
Autoclave STURDY modelo: SA-300UF	material básico de laboratorio para prácticas
Estufa Mermert modelo: UM-500	material básico de laboratorio para prácticas
Triturador BLENDER WARING modelo:51BL30	material básico de laboratorio para prácticas

Balanza Boeco modelo: BLC-500	material básico de laboratorio para prácticas
Plancha de Calentamiento FISHER Surring Hotplate	material básico de laboratorio para prácticas

Elaborado por: Vargas & Velásquez, 2013

3.4. Análisis de Costos.

Debido a la posterior comparación de costos con una prueba rápida “Reveal for Aflatoxin” únicamente se calcularán los costos en los materiales que sean únicos y no comunes con la prueba de contraste económico, además para los cálculos se tomarán en cuenta las siguientes asunciones:

- Sueldo de analista: \$5 por hora de trabajo (según un sueldo de \$800 al mes y 40 horas de trabajo semana)
- Números de análisis por día: 10 (según lo trabajado en el laboratorio de microbiología)
- *Incorporación de micotoxina de la muestra en el agar previamente preparado: 40 min (observado en la experimentación).

Tabla 5: Costos del Método Propuesto

MATERIALES	CANTIDAD DE VENTA	COSTO	CANTIDAD POR MUESTRA	COSTO POR MUESTRA
Placas Petri desechables	1 uni	\$ 0.20	6	\$ 1.20
Tubos de ensayo	1 uni	\$ 1.20	10 unidad por 3 meses de uso y 200 muestras/mes	\$ 0.02
Pipetas de 10 ml	1 uni	\$ 3.50	10 unidad por 3 meses de uso y 200 muestras/mes	\$ 0.06
Agar PCA (Plate Count Agar)	500 g	\$ 112.00	2.5 g	\$ 0.56
Metanol 70%	20 L	\$ 30.00	150 ml	\$ 0.23
Agua de Peptona Bufferada	500 g	\$ 47.04	5 g	\$ 0.47
Papel filtro #1	1 Pliego (aprox. 0.3 m ²)	\$ 1.80	1/2 pliego	\$ 0.90
Probióticos.	1 vial (5 ml)	\$ 0.76	1 vial	\$ 0.76
Incubadora VWR pequeña	1 uni	\$ 1,500.00	1 unidad por 5 años de uso y 200 muestras/mes	\$ 0.13
Autoclave VWR pequeño	1 uni	\$ 1,111.00	1 unidad por 5 años de uso y 200 muestras/mes	\$ 0.09
Plancha de Calentamiento VWR	1 uni	\$ 574.00	1 unidad por 5 años de uso y 200 muestras/mes	\$ 0.05

Mensualidad del analista	160 horas/mes 200 análisis	\$ 800.00	1.5 horas por análisis	\$ 7.50
			COSTO POR MUESTRA	\$ 11.96

Elaborado por: Vargas & Velásquez, 2013

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS

4.1. Resultados y análisis de las pruebas de metanol residual.

A continuación se presenta el cuadro de resultados obtenidos de las pruebas para descartar si existe efecto bactericida significativo del metanol residual, es importante resaltar, que una vez confirmadas las cargas iniciales de los probióticos comerciales, se usó únicamente las diluciones en las que correspondía a un crecimiento de 10^1 (10-99 UFC) y 10^2 (100-999 UFC), siendo estas la última y penúltima dilución sembrada respectivamente (en el capítulo anterior en el numeral 3.2.1 se detalló que dilución corresponde a las denominaciones del cuadro presentado); esto se hizo debido a que se consideró que crecimientos mayores (10^3 o

más UFC) a eso serian muy difícil contar y menores (10^0) a los mismo incurriría en muchos errores.

Tabla 7: Resultados de Metanol Residual

RESULTADOS DE METANOL RESIDUAL*									
Dilución sembrada	Microorganismo a			Microorganismo b			Microorganismo c		
	c/ metanol residual	sin metanol residual	c/ metanol residual	sin metanol residual	c/ metanol residual	sin metanol residual	c/ metanol residual	sin metanol residual	
penúltima dilución sembrada	125	300	157	213	~600	~600	~600	~600	
	280	220	180	150	~600	~600	~600	~600	
	190	230	145	180	~600	~600	~600	~600	
	180	200	158	130	~600	~600	~600	~600	
	150	120	203	198	~600	~600	~600	~600	
	12	14	35	41	80	82	82	82	
	20	18	39	53	92	98	98	98	
última dilución sembrada	15	29	30	25	78	69	69	69	
	28	20	27	19	95	92	92	92	
	11	10	31	33	77	78	78	78	

*Los valores en los recuadros son el número de colonias encontradas por placa en la dilución señalada y no corresponde a un reporte microbiológico.
 ~ Corresponde a una estimación del total de colonias, debido a que solo se contó en 1/4. Del área de la placa y se asumió que en los otros 3/4 existía la misma densidad para estimar el total.

Elaborado por: Vargas & Velásquez, 2013

A continuación se muestran resúmenes gráficos para cada variable los cuales mostrarán además de la estadística descriptiva para cada uno, los valores P de la prueba de normalidad individual con un alfa de 0.05, se concluirá de aquí en adelante con respecto al valor P rechazando H_0 si es menor 0.1 y aceptando H_0 si es mayor.

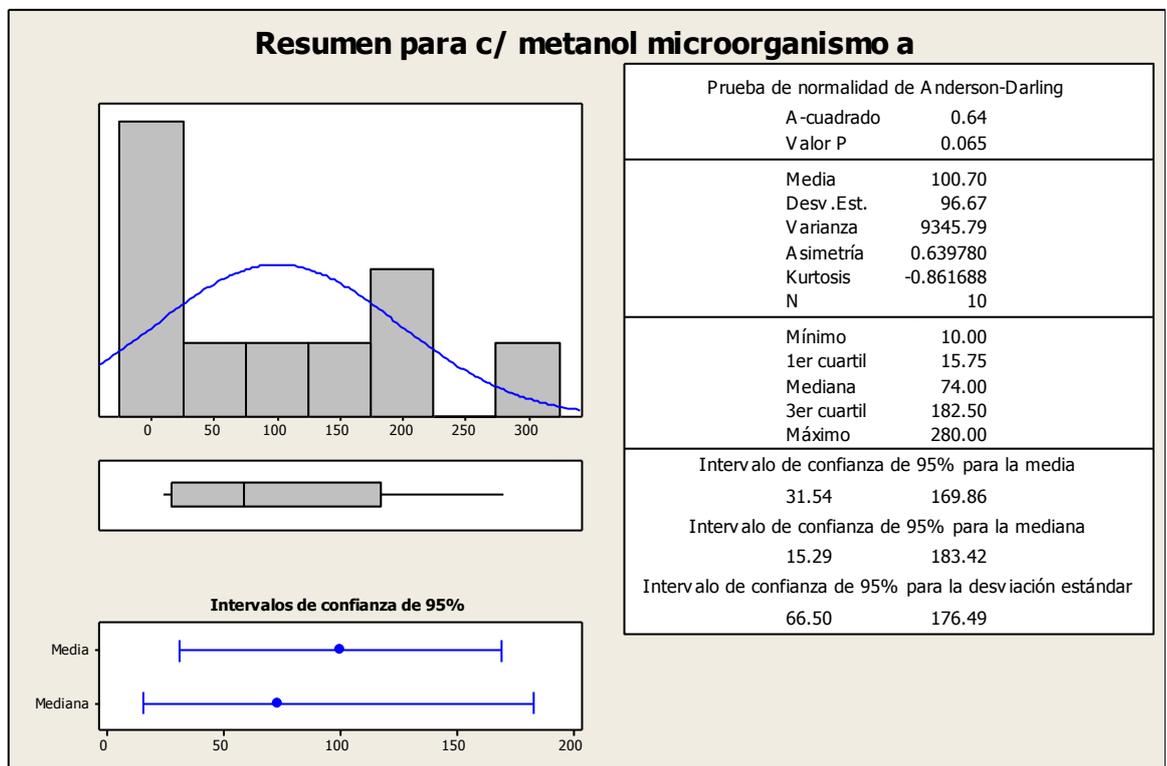
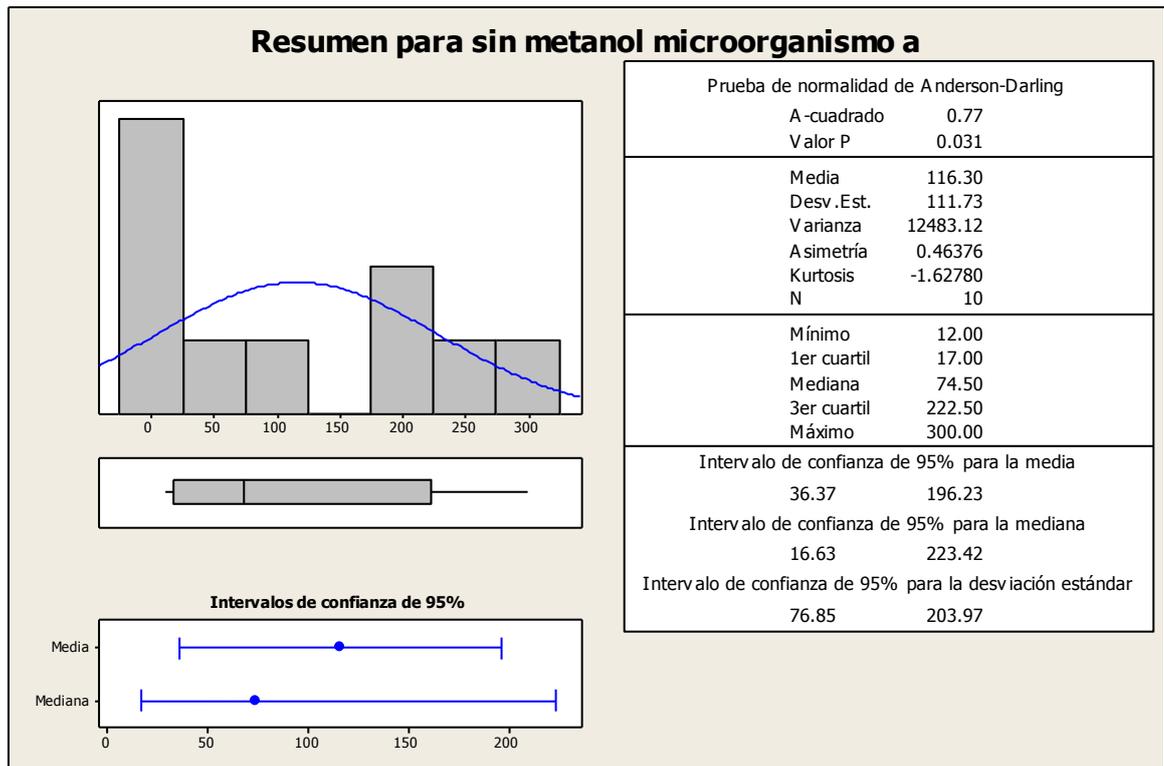


Figura 14: Estadística Descriptiva de Recuento con Metanol Residual Microorganismo a

Elaborado por: Vargas & Velásquez, 2013

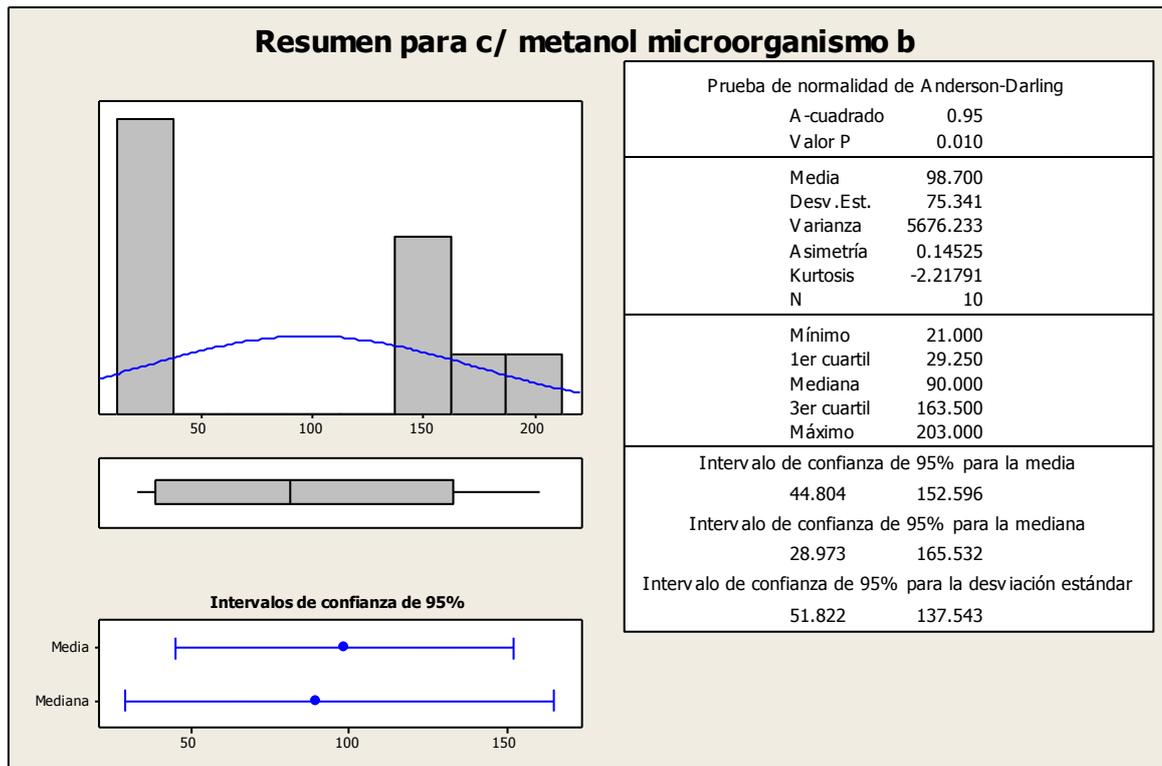
Fuente: 2010 Minitab Inc.



**Figura 15: Estadística Descriptiva de Recuento sin Metanol Residual
Microorganismo a**

Elaborado por: Vargas & Velásquez, 2013

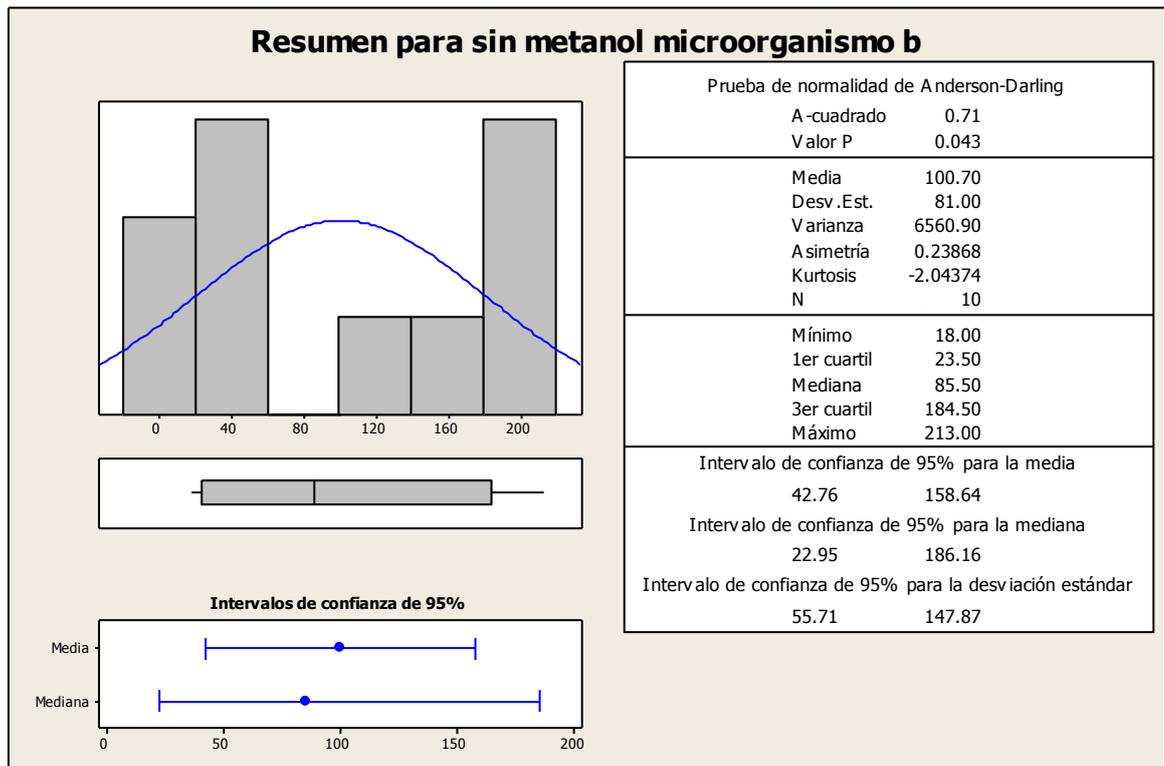
Fuente: 2010 Minitab Inc.



**Figura 16: Estadística Descriptiva de Recuento con Metanol Residual
Microorganismo b**

Elaborado por: Vargas & Velásquez, 2013

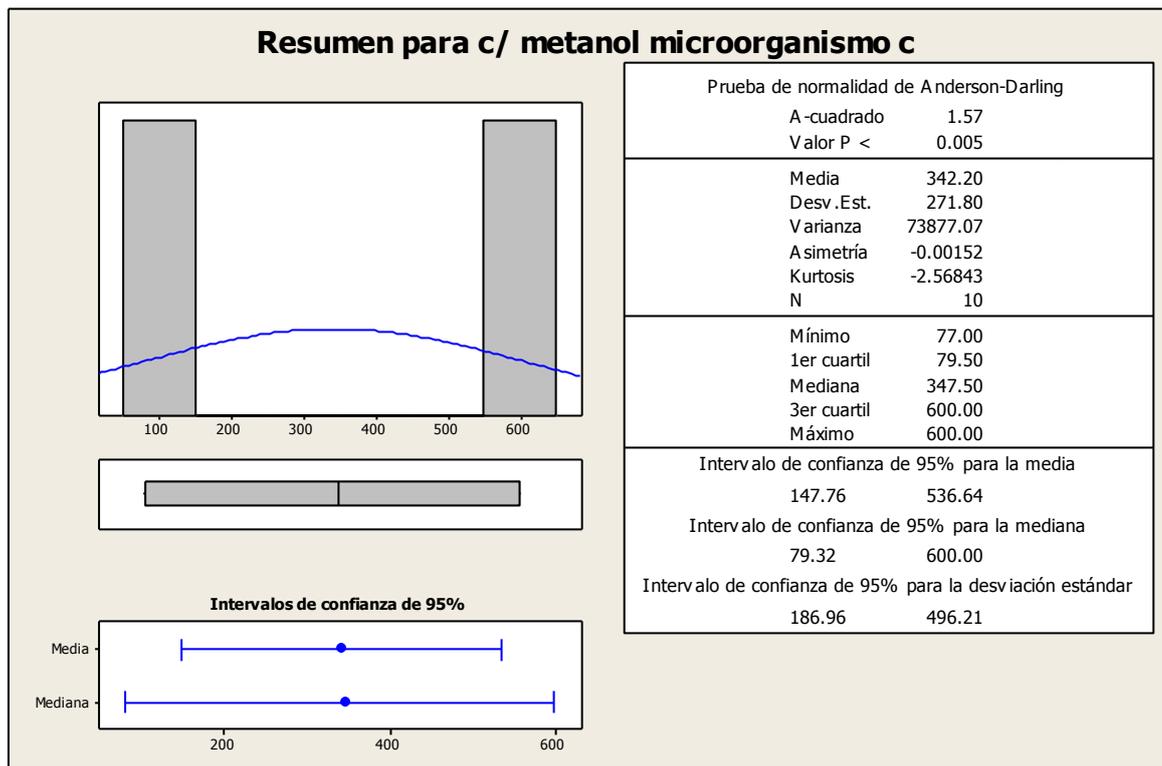
Fuente: 2010 Minitab Inc.



**Figura 17: Estadística Descriptiva de Recuento sin Metanol Residual
Microorganismo b**

Elaborado por: Vargas & Velásquez, 2013

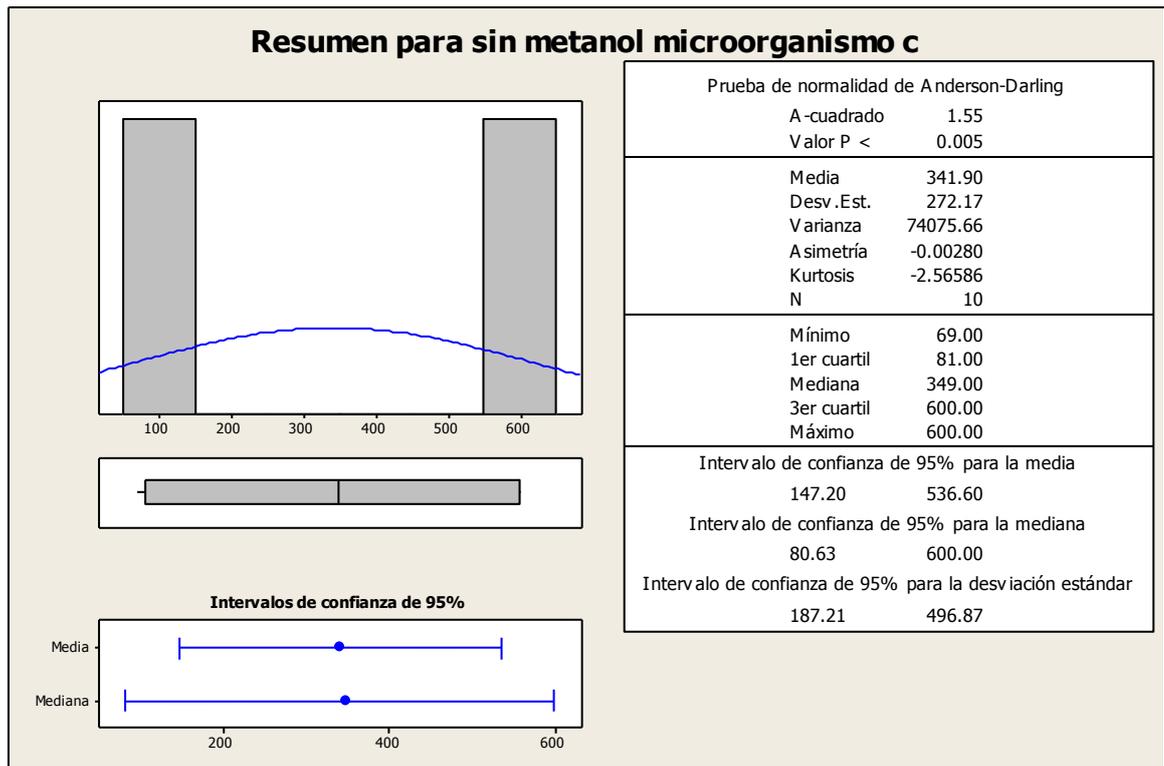
Fuente: 2010 Minitab Inc.



**Figura 18: Estadística Descriptiva de Recuento con Metanol Residual
Microorganismo c**

Elaborado por: Vargas & Velásquez, 2013

Fuente: 2010 Minitab Inc.



**Figura 19: Estadística Descriptiva de Recuento sin Metanol Residual
Microorganismo c**

Elaborado por: Vargas & Velásquez, 2013

Fuente: 2010 Minitab Inc.

Para determinar si existió o no efecto bactericida del metanol residual en el agar, en cuanto a la inhibición parcial o total del crecimiento microbiano; se usó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis debido a que como se muestran en los gráficos anteriores ninguna variable tuvo distribución normal, esta prueba de hipótesis estadística determinó si existió diferencias significativas o no en el número de colonias a cabo de 48 horas de

los dos quintuplicados de las dos diluciones sembradas en agar con metanol residual y agar sin metanol residual. A continuación se exponen las hipótesis individuales por microorganismo, sus cuadros de resultados y sus respectivas conclusiones.

Ho: En el “**microorganismo a**” no existen diferencias significativas en el número de colonias contadas después de 48 horas entre las placas con metanol residual y las placas sin metanol residual.

H1: En el “**microorganismo a**” si existen diferencias significativas en el número de colonias contadas después de 48 horas entre las placas con metanol residual y las placas sin metanol residual.

Prueba de Kruskal-Wallis en microorganismo a

Variable	N	Mediana	Clasificación del promedio	Z
c/ metanol	10	74.00	9.8	-0.57
Sin metanol	10	74.50	11.3	0.57
General	20		10.5	

H = 0.32 GL = 1 P = 0.571
H = 0.32 GL = 1 P = 0.570 (ajustados para los vínculos)

Figura 20: Prueba Estadística de Kruskal-Wallis en Microorganismo a

Elaborado por: Vargas & Velásquez, 2013

Fuente: 2010 Minitab Inc.

No hay suficiente evidencia estadística para rechazar H_0 a favor de H_1 . Por lo tanto y según los datos se puede decir que el efecto del metanol residual en el **microorganismo a** es nulo en cuanto a inhibición de crecimiento.

H_0 : En el “**microorganismo b**” no existen diferencias significativas en el número de colonias contadas después de 48 horas entre las placas con metanol residual y las placas sin metanol residual.

H_1 : En el “**microorganismo b**” si existen diferencias significativas en el número de colonias contadas después de 48 horas entre las placas con metanol residual y las placas sin metanol residual.

Prueba de Kruskal-Wallis en microorganismo b

Variable	N	Mediana	Clasificación del promedio	Z
c/ metanol	10	90.00	10.7	0.11
sin metanol	10	85.50	10.4	-0.11
General	20		10.5	

H = 0.01 GL = 1 P = 0.910
H = 0.01 GL = 1 P = 0.910 (ajustados para los vínculos)

Figura 21: Prueba Estadística de Kruskal-Wallis en Microorganismo b

Elaborado por: Vargas & Velásquez, 2013

Fuente: 2010 Minitab Inc

No hay suficiente evidencia estadística para rechazar H_0 a favor de H_1 . Por lo tanto y según los datos se puede decir que el efecto del metanol residual en el **microorganismo b** es nulo en cuanto a inhibición de crecimiento.

H_0 : En el “**microorganismo c**” no existen diferencias significativas en el número de colonias contadas después de 48 horas entre las placas con metanol residual y las placas sin metanol residual.

H_1 : En el “**microorganismo c**” si existen diferencias significativas en el número de colonias contadas después de 48 horas entre las placas con metanol residual y las placas sin metanol residual.

Prueba de Kruskal-Wallis en microorganismo c

Variable	N	Mediana	Clasificación del promedio	Z
c/ metanol	10	347.5	10.4	-0.04
sin metanol	10	349.0	10.6	0.04
General	20		10.5	

H = 0.00 GL = 1 P = 0.970

H = 0.00 GL = 1 P = 0.968 (ajustados para los vínculos)

Figura 22: Prueba Estadística de Kruskal-Wallis en Microorganismo c

Elaborado por: Vargas & Velásquez, 2013

Fuente: 2010 Minitab Inc

No hay suficiente evidencia estadística para rechazar H_0 a favor de H_1 . Por lo tanto, y según los datos, se puede decir que el efecto del metanol residual en el **microorganismo c** es nulo en cuanto a inhibición de crecimiento.

4.2. Resultados y Análisis por microorganismos de la inoculación en el medio de cultivo con Aflatoxinas a diferentes concentraciones.

A continuación se presenta el cuadro de concentraciones en las que se probó en la primera corrida de pruebas los microorganismos seleccionados:

Tabla 8: Concentraciones para la Primera Corrida

CONCENTRACIONES PARA LA PRIMERA CORRIDA*						
denominación de la concentración de siembra	ml de concentrado de aflatoxina agregado	g de concentrado agregado	g de aflatoxina agregada	ml de agar en fiola	g de agar en fiola	concentración final en agar
1	0	0	0	200	193	0.0
2	5	4.2715	3.84435E-07	200	193	2.0
3	50	42.715	3.84435E-06	200	193	19.9
4	200	170.86	1.53774E-05	200	193	79.7
5	400	341.72	3.07548E-05	200	193	159.4

*Para cada microorganismo de prueba se destina una fiola de 200ml para sembrar por quintuplicado la muestra

**El concentrado de aflatoxina tiene una concentración de 90 ppb validado por el laboratorio PROTAL-ESPOL.

Elaborado por: Vargas & Velásquez, 2013

En la siguiente tabla se presentan los resultados de la siembra del **microorganismo a:**

Tabla 9: Recuento en Primera Corrida del Microorganismo a

Dilución	Concentración	Microorganismo a*				
		290	310	300	290	289
penúltima	1	3	2	2	1	3
	2	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0
última	1	5	3	7	3	4
	2	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0

*Los valores están en UFC/placa

Elaborado por: Vargas & Velásquez, 2013

Se detectó que en este caso hubo una clara inhibición del crecimiento desde la concentración 1 en las dos diluciones, pero siendo en un 100% solo en la última dilución en la concentración 1.

En la siguiente tabla se presentan los resultados de la siembra del **microorganismo b**:

Tabla 10: Recuento en Primera Corrida del Microorganismo b

		Microorganismo b*						
dilución	concentración	resultados quintuplicados						
penúltima	1	420	390	540	450	500		
	2	2	1	3	2	1		
	3	0	0	0	0	0		
	4	0	0	0	0	0		
	5	0	0	0	0	0		
última	1	53	58	50	49	51		
	2	0	0	0	0	0		
	3	0	0	0	0	0		
	4	0	0	0	0	0		
	5	0	0	0	0	0		

*Los valores están en UFC/placa

Elaborado por: Vargas & Velásquez, 2013

Es fácil detectar que en este caso hubo una clara inhibición del crecimiento desde la concentración 1 en las dos diluciones, pero siendo en un 100% solo en la última dilución en la concentración 1.

En la siguiente tabla se presentan los resultados de la siembra del **microorganismo c**:

Tabla 11: Recuento en Primera Corrida del Microorganismo c

		Microorganismo c*				
dilución	concentración	resultados quintuplicados				
penúltima	1	~600	~600	~600	~600	~600
	2	~600	~600	~600	~600	~600
	3	~600	~600	~600	~600	~600
	4	~600	~600	~600	~600	~600
	5	~600	~600	~600	~600	~600
última	1	85	80	90	92	93
	2	90	83	85	79	78
	3	91	92	78	87	92
	4	86	95	84	86	91
	5	80	82	79	86	89

*Los valores están en UFC/placa

Elaborado por: Vargas & Velásquez, 2013

Se evidenció y sin necesidad de usar una prueba de hipótesis estadística se aprecia con claridad solo observando los datos que este microorganismo no se inhibe con la presencia de aflatoxina en ninguna de las cuatro concentraciones.

Por los resultados presentados, los microorganismos a y b tienen una clara sensibilidad a la micotoxina y por tanto los dos son elegibles para una segunda corrida y ser el probiótico con el que se diseñe el método, pero en este caso se decidió por el **microorganismo b** debido a que el tamaño de su colonia es pequeño y fácil de contar (para el método se trabajará con la última dilución), a diferencia del **microorganismo a** el cual presenta una característica de colonia grande y con tendencia invasiva que dificulta su contaje si no se cuenta con la experiencia necesaria. A continuación se presentan la tabla de concentraciones, los resultados y el análisis de la segunda corrida.

Tabla 12: Concentraciones para la Segunda Corrida

CONCENTRACIONES PARA LA SEGUNDA CORRIDA						
denominación de la concentración de siembra	ml de concentrado de aflatoxina agregado	g de concentrado agregado	g de aflatoxina agregada	ml de agar en fiola	g de agar en fiola	concentración final en agar
a	1	0.8543	7.69E-08	200	193	0.4
b	2	1.7086	1.54E-07	200	193	0.8
c	3	2.5629	2.31E-07	200	193	1.2
d	4	3.4172	3.08E-07	200	193	1.6
e	5	4.2715	3.84E-07	200	193	2.0

Elaborado por: Vargas & Velásquez, 2013

Tabla 13: Recuento en Segunda Corrida del Microorganismo Seleccionado

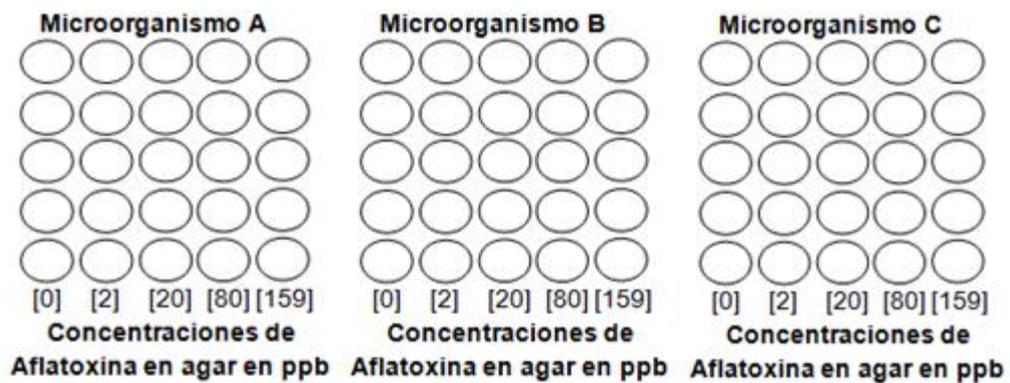
Microorganismo b segunda corrida de prueba*						
dilución	concentración	resultados quintuplicados				
última	a	50	50	60	55	52
	b	45	41	48	40	45
	c	22	19	17	25	20
	d	2	3	1	2	0
	e	0	0	0	0	0

*Los valores están en UFC/placa

Elaborado por: Vargas & Velásquez, 2013

Claramente se aprecia una disminución del número de colonias a medida que la concentración de la aflatoxina se acerca a 2 ppb en agar "e", coincidentemente la concentración mínima en que se inhibe el 100% del crecimiento microbiológico se repite el de la primera corrida, en este caso con un error máximo en el dato de 0.4 ppb . En la siguiente figura 4.10 se muestra de manera simple parte de lo tratado.

CORRIDA EXPLORATORIA



SEGUNDA CORRIDA



Figura 23: Diseño de la Prueba de Hipótesis Realizada

Elaborado por: Vargas & Velásquez, 2013

A continuación se muestra un cuadro en el que se detalla el número de ml necesarios de muestra extraída en metanol al 70% para el método diseñado.

Tabla 14: Mililitros de Metanol al 70% de Extracción a agregar según el Método Diseñado

ml de metanol al 70% de extracción a agregar a una fiola de 200 ml de PCA							
denominación de la concentración de siembra	ml metanol de extracción a agregar	g metanol de extracción a agregar	g de aflatoxina supuestamente agregada	ml de agar en fiola	g de agar en fiola	concentración final en fiola por ppb	# de repeticiones
5ppb	90	76.887	3.84E-07	200	193	2.0	5
20ppb	23	19.6489	3.93E-07	200	193	2.0	5

Elaborado por: Vargas & Velásquez, 2013

4.3. Análisis y planteamiento final del método.

Una vez que se tiene el valor de la concentración mínima de inhibición en agar del microorganismo seleccionado, es necesario establecer el límite menor de detección para el método que se diseña, normalmente las pruebas rápidas de detección que se venden usan como límite inferior el valor indicado en la normativa vigente y de jurisdicción; en el caso del método propuesta en esta investigación se basó en normativa nacional NTE 187:95 segunda revisión la cual indica que el límite máximo permitido de aflatoxina en maíz como alimento de referencia es de 20 ppb (congruente también con lo establecido por FDA para USA), aunque también se tiene presente que en Europa el límite permitido es mucho menor 5ppb, según esto los pasos para usar el método basados en la experimentación son los siguientes:

1. Realizar el proceso de Extracción de la aflatoxina de forma convencional con metanol al 70% al alimento a analizar.
2. Agregar **23 ml** de dicho metanol en una fiola con 200 ml de agar PCA previamente esterilizado.

3. Someter a calentamiento hasta que se evapore la totalidad del metanol de 10 a 20 minutos aproximadamente, controlar este aspecto por peso inicial y final de la fiola.
4. Diluir 1 vial del probiótico de marca comercial Enterogermina (ampolla líquida) en una fiola de 90 ml de agua de peptona estéril, realizar diluciones hasta 10^{-6} sin tomar en cuenta la primera dilución en la fiola de 90 ml.
5. Inocular por siembra en masa únicamente la última dilución en 6 cajas petri estériles de vidrio o plástico, en 5 de ellas se agregará el agar en donde se evaporó el metanol y en la última se agregará PCA sin metanol evaporado y se llamará placa de control.
6. Incubar por 48 horas.

Interpretación de resultados

Caso 1

Si sólo existe crecimiento en la placa de control y ésta es mayor a 10^1 UFC, el resultado es que el alimento analizado tiene una concentración mayor a 20 ppb de aflatoxina.

Caso 2

Todas las placas tienen crecimiento y la placa de control mantiene un crecimiento menor a 10^3 UFC, el alimento analizado tiene una concentración menor a 20 ppb de aflatoxina.

Caso 3

Todas las placas tienen crecimiento y la placa de control tiene un crecimiento mayor a 10^2 UFC, se debe repetir el análisis y asegurarse de seguir todas las buenas prácticas posibles al momento de la siembra o revisar que el probiótico no esté caducado.

4.4. Estudio comparativo de costos.

Los costos de la prueba diseñada se compararán con los costos de la prueba rápida “Reveal for aflatoxin” que es la una de las más usadas en el país, los costos de la prueba cualitativa propuesta en esta tesis están en el capítulo 3 sección 3.2.4; a continuación se detallan los costos de la prueba rápida en condiciones de igualdad con los cálculos de las prueba contrastada.

Tabla 15: Costos del Análisis con la Prueba Rápida para la Detección de Aflatoxina “Reveal for Aflatoxin”

MATERIALES	CANTIDAD DE VENTA	COSTO	CANTIDAD POR MUESTRA	COSTO POR MUESTRA
Micropipeta Plus 8-Channel de 10ul	1 uni	\$ 425.00	1 unidad por 5 años de uso y 200 muestras/mes	\$ 0.04
Puntas desechables para micropipeta	1000 uni	\$ 35.00	10	\$ 0.70
Metanol 70*	20 L	\$ 30.00	150 ml	\$ 0.23
Pape filtro #1	1 Pliego (aprox. 0.3 m ²)	\$ 1.80	1/2 pliego	\$ 0.90
Kit Reveal for Aflatoxin de Neogen	25 uni	\$ 135.00	1	\$ 10.00
Mensualidad del analista	160 horas/mes	\$ 800.00	0.5 horas por análisis	\$ 2.50
			COSTO POR MUESTRA	\$ 14.36

*El tiempo de análisis por muestra es un dato proporcionado por el proveedor del kit.

Elaborado por: Vargas & Velásquez, 2013

En el cálculo de los costos por análisis unitario por los dos métodos (el propuesto y el Reveal for aflatoxin) se hicieron asunciones en cuanto al sueldo del analista, número de análisis por día y jornada laborable; también se despreciaron los costos de la luz y el agua consumido por los equipos utilizados, porque el objetivo de este análisis de costos tiene un espíritu únicamente comparativo y se hizo de manera superficial.

Según los costos calculados del método propuesto en el capítulo 3 (\$11.96), éste representa un ahorro por muestra de \$2.38 que corresponde al 17% menos del análisis por el kit Reveal for Aflatoxin, aunque aquí no se toman en cuenta costos intangibles como el tiempo de duración del análisis, se podría decir sin considerar el aspecto mencionado que se cumplió el objetivo específico referente al costo, aunque se recomienda un análisis de costo más profundo para verificar la afirmación.

CAPÍTULO 5

5. APLICACIONES EN LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS

En el siguiente capítulo, se presentarán posibles aplicaciones del método propuesto en la industria de alimentos.

También se mostrarán las ventajas y desventajas de este método frente a otros métodos ya conocidos y aplicados en la actualidad en el medio, y también se presentarán varias ideas derivadas de algunos resultados de este trabajo para investigaciones futuras.

5.1. Perspectivas de investigaciones futuras con la misma base biológica

El método propuesto, es de tipo cualitativo, como fue mencionado anteriormente. Pero se puede observar al menos en primera instancia y antes de usar pruebas estadísticas que en la segunda corrida hay una marcada tendencia, que si es posible modelar con una adecuada precisión, se podrá evolucionar este método en uno cuantitativo además de cualitativo, aunque para ello se necesitará realizar corridas de pruebas no menores a 30 datos y con diferentes matrices de alimentos para probar su efectividad, lo que implicará un uso importante de recursos físicos y humanos para la culminación en una técnica confiable, sólo en caso de obtener resultados adecuados en la experimentación.

Una vez que se logre transformar el método en cuantitativo se podría explorar la posibilidad de combinar este método con técnicas y métodos modernos de microbiología como Petrifilm de 3M, Compact Dry de Nissue o sistemas como el Soleris de Neogen para reducir el tiempo de obtención de resultados de 48 horas hasta 5 ó 6 horas en sistemas como el Soleris de Neogen, para ello se deben

idear formas de evaporar el metanol o probar con otras sustancias que no tengan efecto inhibitor.

Por otra parte, el éxito en cuanto a viabilidad técnica del método propuesto abre nuevas posibilidades a usar este principio con otras toxinas, microorganismos y matrices de alimentos, aunque para nuestro parecer la incógnita más interesante a tratar en el futuro a partir de los resultados de esta investigación, será saber si la tolerancia que presentó el *Saccharomyces boulardii* es compartida con el *Saccharomyces cerevisiae* del mismo género, el cual es utilizado para la producción de alcohol etílico, en caso de llegar, determinar una alta tolerancia a la aflatoxina del microorganismo mencionado, esto podría evitar la quema o el desecho de los lotes contaminados con aflatoxina y utilizarlos para la producción de etanol para consumo humano si se determinara que no existe riesgo, o sino para biocombustible.

5.2. Aplicabilidad del método en la industria

El método diseñado es factible en cualquier laboratorio de empresa o de servicios que realice pruebas microbiológicas por el método convencional (según normas INEN), debido a que usa los mismos implementos, insumos y equipos, exceptuando por el uso de un triturador y metanol, lo que no representa un gasto mayor, y como se bosquejó en el contraste del costo, es un método relativamente barato, aunque no se toma en cuenta el costo intangible en algunos casos del tiempo; es más accesible que las pruebas rápidas del medio, pero tiene limitaciones como el uso únicamente en producto no elaborados o que no usen ningún aditivo como inhibidor de crecimiento, además se deben tener en cuenta para un óptimo resultado aspectos como el pH de la muestra, entre otros. Aunque para grandes industrias no es un método práctico y no justifique la retención del producto, si es el caso por un método que sólo detecta y no cuantifica como éste y además toma 48 horas, pero para pequeñas industrias que no son clientes importantes para los importadores de estas pruebas rápidas es muy conveniente tener un método como éste, porque no necesitan comprar mucho más de lo que ya tienen y no están supeditados a disponibilidad del importador.

Las industrias que más podrían apreciar un método como éste podrían ser las de balanceados o las haciendas productoras de maíz para llevar un control de sus silos.

5.3. Ventajas y desventajas frente a otras pruebas.

VENTAJAS

Una de las ventajas principales es el bajo costo que representa este método, debido al bajo costo de los materiales utilizados en él, y la facilidad de obtención de estos materiales necesarios para la ejecución del método propuesto. Además, el método adapta sin mayores adquisiciones a laboratorios que realicen pruebas microbiológicas convencionales, por el uso de equipo entre otros, a diferencia de otros métodos en los que se necesita equipos especializados como en ELISA por el colorímetro, entre otros.

Se podría indicar también que otra de las ventajas existentes en este nuevo método es la facilidad de uso, en sí, es un método sencillo, fácil de enseñar y aplicar a un tipo de muestra determinado, solo es necesario tener conocimientos de las normas aplicadas en un laboratorio de microbiología, y tener experiencia en la siembra de

medios de cultivo; es decir, cualquier persona capacitada, en una empresa, podría realizar este método sin problema alguno.

Una última ventaja es el uso de una base biológica para pruebas biotecnológicas de detección de toxinas, que en nuestro caso, es el uso de microorganismos para la detección indirecta de aflatoxinas. Lo cual sería solo el inicio, porque se especula que se podría llevar a un método cuantitativo o incluso en niveles de investigación más avanzados combinarlo con sistemas y pruebas modernas como ya se ha mencionado.

DESVENTAJAS

Las desventajas encontradas en el método son principalmente la prolongación que se tiene para la obtención de los resultados, es decir, éste método no es tan eficiente en cuanto al tiempo que toma su uso, comparando con otros métodos que tienen una durabilidad menor a un día o incluso unas cuantas horas.

Otra desventaja encontrada es la restricción del tipo de muestra a usar en la experimentación, ya que, ésta no puede ser un compuesto elaborado, sino debe ser necesariamente una materia prima neta, por el efecto residual que podría tener, inhibiendo así el crecimiento

microbiano; esto puede ser debido a los ingredientes, aditivos, o conservantes que son utilizados para la elaboración de diversos tipos de alimentos.

Frente a otros métodos, se podría decir que este método es menos eficiente, debido a la cantidad de procedimientos realizados para la obtención de resultados, y al tiempo requerido, como ya se mencionó previamente.

CAPÍTULO 6

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- Como se demostró con pruebas estadísticas y como se aprecia por simple observación sobre los resultados de la prueba de metanol residual, este no tiene ningún efecto inhibitor sobre los microorganismos de prueba, lo cual descarta cualquier especulación de sesgo debido a este factor en toda la experimentación y diseño del método.
- Según la experimentación realizada, se demostró no solo que el método es viable técnicamente, sino que también es factible usar bacterias, por lo menos de manera comprobada en la detección cualitativa indirecta de toxinas en alimentos; y obtener resultados congruente aunque se tiene la intuición por lo observado de manera superficial en esta investigación que también se pudieran usar para la medición de las mismas.

- No se realizaron pruebas en cuanto a descartar agentes antimicrobianos propios en el maíz, que pudieran sesgar los resultados de la experimentación debido a que no existe documentación bibliográfica de esta cualidad del maíz, como si lo existe con otros productos como el ajo, entre otros. Además esta posibilidad también se descarta de forma indirecta debido al comportamiento del *Saccharomyces boulardii* al no inhibirse hasta en concentraciones de 159 ppb de aflatoxina proveniente de maíz.
- Aunque la hipótesis científica fue probada satisfactoriamente se puede concluir en la realización de la experimentación, que el método diseñado no es lo suficientemente práctico como para ser implementado en la industria debido a la simplicidad de los otros métodos de detección en el mercado, sin embargo se considera que bajo los mismos principios biológicos por los cuales se concibió este método de detección cualitativa indirecta, se podría diseñar con más repeticiones en la experimentación con el mismo microorganismo escogido, un método cuantitativo indirecto bajo la hipótesis: la inhibición del crecimiento microbiano es gradual y guarda una correlación con la cantidad de aflatoxina presente en el agar.

- Esta investigación se considera exitosa no solo porque se demostró que la hipótesis bajo la que se planteo fue aceptada según los parámetros de la prueba planteada, sino también porque fue una innovación el uso de microorganismos para la detección de toxinas alimentarias.
- De esta tesis también se derivan preguntas que podrían llevar a futuras investigaciones en niveles más avanzados al pregrado, como la de determinar bajo hipótesis porque el *Saccharomyces boulardii* no se inhibe a ninguna concentración de aflatoxina, estas hipótesis podrían ser tales como que este tiene el sistema enzimático necesario: para metabolizar, inactivar modificando la estructura química de la aflatoxina o simplemente no necesita un sistema enzimático para defenderse porque no tiene sitios activos que la toxina pueda afectar, con cada hipótesis se podría realizar una investigación y en caso de comprobarse una de las dos primeras, quizás se pueda usar ese conocimiento para aplicarlo en la subutilización de alimento contaminado como maíz, o podría usarse este maíz contaminado para la producción de etanol como combustible si la tolerancia a la aflatoxina del *S. boulardii* es compartido con el *S. cerevisiae* que es el comúnmente utilizado para este fin. También se podría probar con modificación genética del probiótico para el mismo fin.

- Se estima que el objetivo general fue cumplido además de los específicos exceptuando de que el método no tiene una viabilidad práctica como para comercializarse, por lo que no tendría un impacto en la industria, pero se piensa que es viable desde el punto de vista de investigación, conocimiento y experiencia generada como para otras tesis con igual o distinto enfoque.
- Es importante delimitar el método desarrollado a alimentos no elaborados, debido a que para usarlo en alimentos elaborados se debería proponer otra investigación en la cual se considere o descarte un sesgo por la dilución de aditivos o agentes conservantes en el metanol de extracción que acaben en el agar además teniendo un efecto inhibitor adicional al crecimiento del microorganismo sumado al de la micotoxina en estudio.
- Se recomienda realizar nuevas repeticiones con muchos más datos para aumentar la confiabilidad del método, así como disminuir su rango de error de 0.4 ppb a un valor menor, repitiendo con mas concentraciones la segunda corrida explicada en el capítulo 3

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Micotoxicosis presentes en avicultura y ganado porcino. Disponible en <http://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/3461/>
- (2) Micotoxinas: Aflatoxinas. Disponible en http://www.euskadi.net/contenidos/informacion/sanidad_alimentaria/es_1247/adjuntos/vigila9511.pdf
- (3) Aflatoxinas. Disponible en <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/434/43446404.pdf>
- (4) Aflatoxinas: Mecanismos de toxicidad en la etiología de cáncer hepático celular. Disponible en: http://www.scielo.unal.edu.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-00112006000200006&lng=pt&nrm=
- (5) Combita, A. (2009). Detección de Aflatoxina M1 en leches frescas comercializadas en la zona del valle del cauca (Colombia) mediante la técnica de ELISA. Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- (6) Aflatoxinas. Disponible en: webdelprofesor.ula.ve/farmacia/lunajr/escuela/aflatoxina.ppt.
- (7) Micotoxinas y salud humana. Disponible en: http://biosalud.ucaldas.edu.co/downloads/Revista%201_7.pdf.

- (8) Aflatoxicosis en humanos provocada por el consumo de alimentos contaminados, que no son de origen animal. Disponible en: <http://www.engormix.com/MA-micotoxinas/articulos/aflatoxicosis-humanos-provocada-consumo-t1662/p0.htm>.
- (9) Caso Purina. Disponible en: http://www.veneconomy.com/site/files/articulos/artEsp4424_3096.pdf.
- (10) Carrillo, L. (2003). Los hongos de los alimentos y forrajes. Universidad Nacional de Salta. Argentina, pp. 1-49
- (11) Carrillo, L. (2003) Micobiología Agrícola. Universidad Nacional de Salta. Argentina, pp. 1 Cap. 6.
- (12) Soriano del Castillo, J. (2007). Micotoxinas en Alimentos. Diaz de Santos. España, pp. 239-240
- (13) Género Aspergillus. Disponible en: <http://mariajoselinares.wordpress.com/>
- (14) Importancia y Efecto de la Aflatoxina en los Seres Humanos. Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/bvstox/e/fulltext/aflatoxi/aflatoxi.pdf>
- (15) Micotoxinas. Disponible en: <http://www.engormix.com/MA-micotoxinas/articulos/micotoxinas-laboratorios-burnet-t464/255-p0.htm>
- (16) Ruta Metabólica de Producción de la toxina por el Hongo Productor. Disponible en: <http://bvs.insp.mx/rsp/articulos/articulo.php?id=001976>
- (17) Arias, E. y Piñeros, P. Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los páramos de Guasca y Cruz

Verde. Trabajo de Grado. Universidad Javeriana, Facultad de ciencias, Carrera de Microbiología Industrial. Bogotá, Colombia.

- (18) Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN). Control Microbiológico de los Alimentos. Bacterias anaerobias mesófilas. Recuento en tubo por siembra en masa. Pp. 3-4
- (19) Efectos del Metanol sobre las membranas biológicas. Disponible en: <http://www.bvs.hn/RMH/pdf/1993/pdf/Vol61-1-1993-4.pdf>
- (20) Aflatoxinas. Disponible en: <http://www.botanical-online.com/aflatoxinas.htm>
- (21) Aflatoxina M1 en Leche. Disponible en: <http://www.engormix.com/MAGanaderia-leche/sanidad/articulos/aflatoxina-leche-t315/p0.htm>
- (22) Las Micotoxinas en la Agroindustria, las Aflatoxinas. Disponible en: http://www.agrobiotek.com/agrobiotek/index.php?option=com_content&view=article&id=58%3Aimportancia-micotoxinas&catid=37%3Aarticulos&Itemid=57&limitstart=1
- (23) 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. Disponible en: <http://www.minsal.gob.cl/portal/url/item/72fd6274dad8792ee04001011f0109e4.pdf>
- (24) Métodos de análisis de micotoxinas en granos y alimentos de uso pecuario. Disponible en: http://www.avicultura.com.mx/avicultura/home/articulos_int.asp?cve_art=936

- (25) High Performance Liquid Chromatography. Disponible en:
http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0366-16442000000400004&lng=en&nrm=iso&ignore=.html
- (26) Placas para cromatografía en capa fina. Disponible en:
<http://www.catrosa.com/images.asp?foto=upfiles/noticies/A12231.jpg&id=>
- (27) Cromatografía de Gases. Disponible en:
<http://www.uib.es/depart/dqu/dquo/dquo2/pau/Cromatograf%92a/chrom10/chrom/GC/concept/main.htm>
- (28) Pruebas Inmunoenzimaticas, ELISA. Disponible en:
http://www.veterinaria.org/revistas/vetenfinf/vet_enf_inf_tripod/vetenfinftripodcomar/5ELISA.htm

ANEXOS

ANEXO A

COTIZACIÓN 1

Guayaquil, 08 de Enero del 2013.

Sres.

ESPOL - TECH

Ing. Christian Vargas

Portable Electric Automatic Steroclaves, Model 25X



Completely self-contained sterilizers have an immersion heating element, automatic thermostatic control, automatic release valve, and pilot light. Ensure complete, efficient sterilization. Only a small amount of water is needed, and the dry steam, at a temperature of 135°C (275°F), penetrates bandages or instruments, making them sterile in 20 or 30 minutes.

Made of high-quality cast aluminum, with stamped aluminum seamless insert crate, cast aluminum racks, flexible metal exhaust tube, dial gauge and valve control, metal-to-metal seal (no rubber gaskets), and Fenwal thermostatic control. Calrod immersion heating elements.

(Continúa...)

UL listed.

Ordering Information: Supplied in 120V or 240V with permanently attached grounded 3-wire power supply cord.

Description	Electrical	Capacity	Supplier No.	VWR Catalog Number	Unit	Your Price	Quantity
Model 25X	120V	13.6 L (0.5 cu. ft.)	25X120V	58617-006	Each	\$1111,00	1

***Precio no incluye IVA**

Marca	VWR
Procedencia	USA
Garantía	1 año contra defectos de Fabricación
Tiempo de Entrega	75 días previa Orden de Compra

**Precio incluye Instalación y puesta en Marcha,
2 mantenimientos sin costo durante el año de Garantía.**

Atentamente,

***Paola Alarcón C.
Representante de Ventas
MERCK C.A.***

ANEXO B

COTIZACIÓN 2



COTIZACION No. 77190303-83

Señor (es): EMPRESA PUBLICA DE SERVICIOS SPOLTECH

Dirección entrega - Cód.		RUC	968592010001
Código	40033774	Dirección	KM 30,5 VIA PERIMETRAL
Ciudad	GUAYAQUIL	Contacto	
Teléfonos	2269739	Representante	PAOLA ALARCON
Condiciones venta	Plazo - 30 días		

Información de la Cotización

Generado por	Paola Alarcon/MECA/Merck	Fecha de emisión	08/01/2013
Validez de la oferta	23/01/2013	Fecha despacho	
Observaciones	Att Christian Vargaz		

Descripción	Código	CNSP	Detalle	Entrega	Cantidad	Precio	IVA	Total
AGAR PLATE COUNT AGAR PEPTONA DE CASEINA	1054630500	NO	500 g	inmediata	1	100.00	Si	112.00
AGUA DE PEPTONA (TAMPONADA), SEGUN ISO 6	1072280500	NO	500g	inmediata	1	42.00	Si	47.04

Total Cotizado	142,00
% Descuento Total	0,00
Total - %Descuento	142,00
IVA	17,04
Total Cotización	159,04

PAOLA ALARCON
MERCK C.A.

ANEXO C

COTIZACIÓN 3

Guayaquil, 08 de Enero del 2013.

Sres.

ESPOL - TECH

Ing. Christian Vargas



VWR® Standard Hot Plate Stirrers

Supplier: VWR International



[VWR 4X4 ALU HOT/STIR 120V](#)

Click to enlarge

Excellent Temperature Uniformity

Enhanced Electronic Features

Cool Touch, Chemical-Resistant Housing

Standard hot plate stirrers are designed for general-purpose laboratory use. These microprocessor controlled, analog units are equipped with easy-to-use, dial-adjustment controls. Enhanced electronics and a robust heater regulate stirring and heating functions. A ramping feature gradually increases speed to prevent splashing, improve magnetic coupling, and provide excellent low end control. Speed is precisely controlled, with consistent stirring at all speeds powered by a dependable, continuous duty motor. A low-profile design requires minimal bench space and permits use within a fume hood. The spill-resistant housing channels fluids away from internal components in the event of a spill.

Hot plate stirrers are available with ceramic or aluminum top plates. Ceramic top plates feature an easy-to-clean, chemical-resistant, reflective white surface. Aluminum top plates will not crack or chip, and offer a more even heating surface. The unit's housing is constructed of a heat-resistant polymer that remains cool to the touch, and is chemical-resistant. For additional safety, a hot symbol warning light is illuminated while the unit is in use, and remains lit until the top plate is sufficiently cooled.

Ordering Information: Units are supplied with a 234cm (92") detachable, 3-wire cord and plug. A 3.8cm (1½") PTFE coated stir bar is also included. Units are supplied with a 2-year limited warranty on parts and labor. The optional support rod and clamp kit includes a 45.7cm (18") long stainless steel support rod, a thermometer/temperature probe extension clamp, a three-prong dual-adjust swivel clamp, and a hook connector. 230V, 50/60Hz models are also available; contact your VWR sales representative for more information.

Operating conditions	5 to 40°C (41 to 104°F)
Speed Range	60 to 1600 rpm
Speed stability	±2%
Temperature Range	5° above ambient to 500°C (932°F) for ceramic top, 5° above ambient to 400°C (752°F) for aluminum top
Temperature Stability	±3% for ceramic top, ±2% for aluminum top

ANEXO D

COTIZACIÓN 4



Electrical	Overall Dimensions	Top Plate Dimensions	Maximum Capacity	Top Plate Material	Shipping Weight	VWR Catalog Number	Unit	Your Price	Quantity
120V, 400W, 3.3A	16.8W x 27.4L x 10.9H cm (65/8 x 1025/32 x 45/16")	10.2 x 10.2 cm (4 x 4")	600 mL	Aluminum	2.8 kg (6.2 lbs.)	97042- 598	Each	\$574,00	1
120V, 400W, 3.3A	16.8W x 27.4L x 10.9H cm (65/8 x 1025/32 x 45/16")	10.2 x 10.2 cm (4 x 4")	600 mL	Ceramic	2.8 kg (6.2 lbs.)	97042- 594	Each	\$576,00	1

Precio Incluye IVA

MARCA VWR PROCEDENCIA USA

➔ <i>FORMA DE PAGO</i>	<i>60 días</i>
➔ <i>ENTREGA</i>	<i>75 días</i>
➔ <i>VALIDEZ DE LA OFERTA</i>	<i>30 días</i>
➔ <i>GARANTÍA CONTRA DEFECTOS DE FABRIC</i>	<i>1 AÑO</i>

PRECIO INCLUYE:
 INSTALACION Y PUESTA EN MARCHA.
 CAPACITACION AL USUARIO EN EL MANEJO DEL EQUIPO.
 DOS MANTENIMIENTOS SIN COSTO DURANTE EL AÑO DE GARANTIA.

Atentamente:

Q.F. Paola Alarcón C
 Representante de Ventas
 Merck C.A

ANEXO E

COTIZACIÓN 5



Guayaquil, 08 de Enero del 2013.

Sres.

ESPOL - TECH
Ing. Christian Vargas

VWR® Symphony™ Gravity Convection Incubators



- Advanced and Adaptive Microprocessor Control
- RS-232C Interface for Monitoring and Controlling with PC
- Equipped with Storage Function (Temperature and Time)
- Digital Backlit LCD Display
- Two-Year Parts and Labor Warranty

VWR® Gravity Convection Incubators are ideal for safe incubation with reduced air changes, providing a stable environment while minimizing the potential of drying out samples. The digital advanced adaptive microprocessor control system provides superior temperature accuracy. The PT100 temperature sensor enables the best overall advantages in repeatability and stability over extended time periods.

(Continúa...)

All incubator units feature a 3.3cm (1.3") stainless steel ventilation cap, two doors (one solid, one glass), high temperature grade foamed silicone rubber door gaskets, over-temperature and over-current protection, and sensor error detection. Units are constructed with a durable, powder-coated steel exterior, stainless steel interior, two stainless steel shelves, and glass wool insulation. A locking mode assists in preventing unintended temperature changes. Units are also equipped with an internal 110V outlet for auxillary equipment.

Ordering Information: Ovens include two shelves. 230V, 50/60Hz models are also available; contact your VWR sales representative for more information.

UL listed. CE marked.

Especificaciones:

Accuracy	±0.2°C at 37°C
Heat-Up Time	20 min. to 37°C (99°F)
Recovery Time	8 min. to 37°C (99°F)
Temperature Range	25 to 70°C (77 to 158°F)
Temperature Setting Accuracy	±0.1°C
Temperature Uniformity	±0.4°C at 37°C

Interior Dimensions	Exterior Dimensions	Electrical	Shipping Weight	Packaging Size	Volume	VWR Catalog Number	Unit	Your Price	Quantity
31W x 29D x 36.1H cm (127/32 x 113/32 x 147/32")	48W x 45.7D x 62.5H cm (1829/32 x 18 x 245/8")	120V, 60Hz, 300W	36 kg (80 lbs.)	52.1W x 52.1D x 67.3H cm (201/2 x 201/2 x 261/2")	32 L (1.1 cu. ft.)	414004-610	Each	\$1500,00	0

***Precio no incluye IVA**

Marca	VWR
Procedencia	USA
Garantía	1 año contra defectos de Fabricación
Tiempo de Entrega	75 días previa Orden de Compra

**Precio incluye Instalación y puesta en Marcha,
2 mantenimientos sin costo durante el año de Garantía.**

Atentamente,

Paola Alarcón C.
Representante de Ventas

MERCK C.A.

ANEXO F

COTIZACIÓN 6



COTIZACIÓN

SEÑORES: ESPOL TECH
ATENCION: SR. CRISTIAN VARGAS
FECHA: 12 DE ENERO DE 2013

MENSAJE: Reciba nuestro cordial saludo.
A continuación, le detallamos la cotización de la referencia:

COD.	PRODUCTO	VALOR U.	CANT.	VALOR T.
71311204	MicroPette Plus 8-Channel Autoclavable Pipettor, 0.5 - 10 UL	\$425.00	1	\$425.00
KRB687	Pnuntas para 0-200 ul funda por 1000 unidades	\$35.00	1	\$35.00
8015	REVEAL FOR AFLATOXIN 20PPB CAJA DE 25 TIRAS REACTIVAS	135.00	1	135.00
KB646	reactivo de kovac	\$45.00	1	\$45.00
9876	YEMA DE HUEVO CON TELURITO	\$65.00	1	\$65.00

Precio: Lo cotizado mas iva

Tiempo de entrega: 30 dias LA PIPETA , INMEDIATO LOS DEMAS ITEMS.

Forma de pago: Credito a 30 DIAS

Vigencia de la oferta: 30 días

Capacitación: por parte de técnicos de Apracom S.A. sin costo

Entrega: Los productos se los entrega en el almacen del cliente
Atentamente,

René Martínez C.



Apracom S.A. Distribuidor Exclusivo para Ecuador
PBX: (593 4) 2294125 Fax: (593 4) 2283723
mail: amartinez@apracom-ec.com ; cjuarez@apracom-ec.com
Ave. Benjamín Rosales, Urbanización Sta. Leonor, Sector 64 Manzana 11, Lote 21

ANEXO G
COTIZACIÓN 7



VEMATLAB S.A.

**VENTA DE MATERIALES DE LABORATORIO
Y EQUIPOS VEMATLAB S.A.**

PROFORMA N° 011495

Comprador.:	ESPOL S.A. ATT: SR CRISTIAN VARGAS FARIAS	Ref.No.	011495/2012
Cond /pago.:	CONTADO	Fecha.:	08-01-13
Entrega .	INMEDIATA	Validez	5 DIAS

ITEM	CANT.	N	CTGO	DESCRIPCION	P.UNT.	P.TOTAL
1	50	UND		CAJAS PETRI DE VIDRIO 100 X 15	2.95	147.50
2	1000	UND		CAJAS PETRI DESCARTABLES	0.20	200.00
3	10	UND		PIPETAS GRADUADAS DE 10 ML. MARIENFELDS ALEMAN	3.50	35.00
4	100	UND		TUBOS DE ENSAYO DE 20 X 150 TAPA ROSCA ALEMAN MARCA EUROPA LABWARE	1.20	120.00

TODO ESTO MAS EL 12% I.V.A.
SIN OTRO PARTICULAR POR EL MOMENTO ME
SUSCRIBO DE USTEDES, ESPERANDO QUE
NUESTRA OFERTA MEREZCA SU APROBACION.
ATENTAMENTE:

Ing Fátima Vega López

ING. FATIMA VEGA LOPEZ
GERENTE DE VENTAS

ANEXO H

NTE INEN 187:95



INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN

Quito - Ecuador

NORMA TÉCNICA ECUATORIANA

NTE INEN 187:95
Segunda Revisión

GRANOS Y CEREALES. MAIZ EN GRANO. REQUISITOS.

1^{ra} Edición

GRAINS AND CEREALS. GRAIN CORN. SPECIFICATIONS

First Edition

DESCRIPTORES: Productos agrícolas. Cereales. Granos. Maíz.
AG 05.04-404
CDU: 633
CIIU: 1110
ICS: 67.080

(Continúa...)

CDU: 633
ICS: 67.060



CIU: 1110
AG 05.04-404

Norma Técnica Ecuatoriana Obligatoria	GRANOS Y CEREALES MAIZ EN GRANO REQUISITOS	NTE INEN 187:95 (Segunda revisión) 1995-10
<p style="text-align: center;">1. OBJETO</p> <p>1.1 Esta norma establece los requisitos que debe cumplir el maíz en grano al momento de la recepción, y para ser destinado para consumo humano, alimento zootécnico y uso industrial.</p> <p style="text-align: center;">2. DEFINICIONES</p> <p>2.1 Maíz en grano. Es el conjunto de granos procedentes de cualquier variedad o híbrido de la gramínea <i>Zea mays</i>.</p> <p>2.2 Grano dañado por insectos. Grano que ha sufrido deterioro en su estructura (perforaciones, picados, deyecciones, etc.) debido a la acción de insectos.</p> <p>2.3 Grano dañado por hongos. Grano que ha sufrido deterioro en su estructura debido a la acción de hongos.</p> <p>2.4 Maíz infestado. Maíz en grano que contiene insectos vivos en cualquiera de sus estados biológicos.</p> <p>2.5 Grano dañado por el calor. Grano que ha sufrido deterioro en su estructura y presenta un color diferente al característico de la variedad o híbrido (ejemplo: exceso de calor, respiración excesiva, etc.).</p> <p>2.6 Grano cristalizado. Grano que presenta fisuras en el endospermo, debido por ejemplo a: cambios bruscos de temperatura y al excesivo manejo mecánico.</p> <p>2.7 Grano quebrado (partido). Grano de maíz, con menos de 3/4 del tamaño característico de la variedad o híbrido.</p> <p>2.8 Grano germinado. Grano en que resulta evidente el comienzo del proceso de germinación, por ejemplo, la rotura del tegumento a través del cual ha brotado o está por brotar el germen.</p> <p>2.9 Impurezas. Todo material diferente al grano de maíz (tusas, restos de hojas, tallos, otros granos o semillas que no sean de maíz, polvo, tierra, etc.)</p> <p>2.10 Maíz en grano limpio para consumo. Aquel que contiene como máximo el 1% de impurezas.</p> <p>2.11 Madurez comercial. Grano de maíz que ha cumplido su madurez fisiológica, que posee características adecuadas para el consumo y requeridas por el mercado.</p> <p>2.12 Aflatoxina. Grupo de metabolitos altamente tóxicos producidos por algunas cepas de los hongos <i>Aspergillus spp</i>, así como también por otros hongos relacionados con el deterioro de los alimentos.</p> <p style="text-align: right;">(Continúa)</p> <hr/> <p>DESCRIPTORES: Productos agrícolas. Cereales. Granos. Maíz.</p>		

Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN, Casilla 17 01-3999 - Baquerizo 464 y Ave. 6 de Diciembre - Quito-Ecuador - Prohibida la reproducción

(Continúa...)

2.13 **Plaguicida.** Sustancia química o biológica, que se utiliza sola, combinada o mezclada para prevenir, combatir o destruir, repeler o mitigar: insectos, hongos, bacterias, nemátodos, ácaros, moluscos, roedores, malas hierbas o cualquier otra forma de vida que cause perjuicios directos o indirectos a los cultivos agrícolas, productos vegetales y plantas en general.

Igualmente cualquier sustancia o mezcla de sustancias que se las use como defoliantes, desecantes o reguladores de crecimiento.

2.14 **Suiedad.** Toda impureza de origen animal

2.16 Otras definiciones constan en la NTE INEN 2 050.

3. REQUISITOS ESPECÍFICOS

3.1 Malz en grano en la recepolón.

3.1.1 El malz en grano al momento de la recepolón debe cumplir con los requisitos que a continuación se describen y los que se establecen en la tabla 1.

TABLA 1. Requisitos del malz en grano al momento de la recepolón.

REQUISITOS	% MINIMO m/m	% MAXIMO m/m	METODO DE ENSAYO
HUMEDAD	13	30	NTE INEN 1 513
IMPUREZAS	-	10	NTE INEN 1 236
QUEBRADOS	-	5	NTE INEN 1 236
DAÑADOS			NTE INEN 1 236
Calor		2,0	
Hongos		2,0	
Insectos		2,0	
Otras causas		1,5	

3.1.2 El malz en grano no deberá estar infestado, para que durante el almacenamiento no se alteren las características del grano.

3.1.3 El malz en grano tendrá como máximo el 0,5% de granos germinados.

3.2 Malz en grano para consumo y uso industrial

3.2.1 El malz en grano para consumo y uso industrial debe cumplir con los requisitos que a continuación se describen y los que se establecen en la tabla 2.

(Continúa)

(Continúa...)

TABLA 2. Requisitos del maíz en grano para consumo y uso industrial.

Grado	Granos quebrados % Máximo m/m	Granos orientalizados % Máximo m/m
1	hasta 2	menor que 5
2	> 2 a 5	5
3	> 5 a 7	6
4	> 7 a 10	7

GRANOS DAÑADOS POR:				
Grado	Color % Máximo	Hongos % Máximo	Insectos % Máximo	TOTAL
1	0,5	0,5	0,5	1,5
2	1	1	1,0	3,0
3	2	2	1,5	5,5
4	3	3	2,0	8,0

Para determinar el cumplimiento de requisitos (tabla 2), el método de ensayo será el descrito en el NTE INEN 1 236.

m/m = masa sobre masa

3.2.2 El porcentaje máximo de humedad será de 13%, el que será determinado o ensayado de acuerdo a lo establecido en la NTE INEN 1 513.

3.2.3 El porcentaje máximo de impurezas para cualquiera de los grados será de 1%.

3.2.4 El maíz en grano, debe regirse a las normas establecidas por la FAO/OMS, en cuanto tiene que ver con los límites de recomendación de plaguicidas y productos afines, metales pesados hasta tanto se elaboran las regulaciones correspondientes.

3.2.5 Los granos dañados por estas causas que no se citan en los numerales anteriores serán máximo de 0,5% para los cuatro grados.

3.2.6 No se aceptará granos infectados, en ninguno de los grados que se indican en esta norma.

3.2.7 No se aceptará más del 5% de granos de otros colores, cuando se trate de maíz amarillo y de otros colores en tanto que para el caso de maíz blanco no se aceptará más del 2% de maíz de otros colores.

3.2.8 El maíz en grano tendrá un contenido máximo de 20 microgramos por kilogramo (20 ppb) de aflatoxinas. Método de ensayo NTE INEN 1 563.

(Continúa)

(Continúa...)

3.2.9 El maíz en grano deberá estar libre de: olores a moho, fermentado, agroquímicos, o cualquier otro que pueda considerarse objetable.

3.2.10 El porcentaje mínimo de proteína del maíz en grano deberá ser de 8%. Método de ensayo NTE INEN 519.

4. REQUISITOS COMPLEMENTARIOS

4.1 La humedad de almacenamiento de los granos de maíz podrá oscilar entre 12 y 13%.

4.2 La bodega de almacenamiento deberá presentarse limpia, desinfectada, tanto interna como externamente, protegida contra el ataque de roedores y pájaros.

4.3 Cuando se asperje plaguicidas, se deberán utilizar los permitidos por la Ley para formulación, fabricación, importación, comercialización y empleo de plaguicidas y productos afines de uso agrícola (Ley No. 73).

4.4 Los envases conteniendo los granos de maíz deberán ser almacenados sobre palets (estibas).

6. INSPECCIÓN

6.1 Muestreo

6.1.1 El muestreo se efectuará de acuerdo a lo establecido en la NTE INEN 1 233.

6.1.2 Aceptación o rechazo. Si la muestra ensayada no cumple con uno o más de los requisitos establecidos en esta norma, se considerará no clasificada. En caso de discrepancia se repetirán los ensayos sobre la muestra reservada para tales efectos.

8. ENVASADO

8.1 El maíz en grano para consumo deberá ser comercializado a granel o en envases, que aseguren la protección del producto contra la acción de agentes externos que puedan alterar sus características químicas o físicas; resistir las condiciones de manejo, transporte y almacenamiento.

7. ETIQUETADO

7.1 Los envases destinados a contener maíz en grano serán etiquetados de acuerdo a lo establecido en la NTE INEN 1 334.

(Continúa)

(Continúa...)

APENDICE Z

Z.1 DOCUMENTOS NORMATIVOS A CONSULTAR

Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1 233:1987	Granos y cereales. <i>Muestreo</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1 236:1987	Granos y cereales. <i>Método de ensayo. Arroz, soya, maíz.</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1 334:1986	<i>Rotulado de productos alimenticios para consumo humano.</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1 513:1987	Granos y cereales. <i>Maíz. Determinación del contenido de humedad.</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1 563:1986	<i>Determinación del contenido de aflatoxinas B1.</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 2 050:1995	Granos y cereales. <i>Maíz en grano. Definiciones y clasificación</i>

Z.2 BASES DE ESTUDIO

Norma Codex Alimentaria. CAC/Vol. XVIII-1a. Ed. *Normas del Codex para cereales, legumbres, leguminosas y productos derivados.* Roma, 1987.

Norma Colombiana. ICONTEC 366. *Industrias alimentarias. Maíz en grano para consumo.* Bogotá 1981.

Norma Centroamericana ICAITI 34 047. *Granos contaminados. Maíz en grano.* Guatemala 1978.

Roberto W. *Variedades mejorías, métodos de cultivo y producción de semillas.* Editorial Limusa. México, 1987.

Reyes Pedro *flagencina básica y aplicada.* AGT, editor, S.A. México, 1987.

Ramírez M. *Almacenamiento y conservación de granos y semillas.* Editorial Continental. México, 1982.

(Continúa...)

INFORMACION COMPLEMENTARIA

Documento: NTE INEN 187 (2da. Revisión)	TITULO: GRANOS Y CEREALES, MAIZ EN GRANO, REQUISITOS	Código AG.05.04-404
--	--	-------------------------------

ORIGINAL: Fecha de iniciación del estudio: ...1994-01-02.....	REVISION: Fecha de aprobación anterior por Consejo Directivo, 1988-01-28 Oficialización por Acuerdo No. 81 de, 1988-02-04 publicado en el Registro Oficial No. 380 de, 1988-02-21 Fecha de iniciación del estudio, 1994-02-01
--	--

Fechas de consulta pública: de a

Subcomité Técnico (o Comité Interno): Granos y cereales
 Fecha de iniciación: 1994-08-02 Fecha de aprobación: 1994-10-27

Integrantes del Subcomité Técnico (o Comité Interno):

NOMBRE:	INSTITUCION REPRESENTADA:
Ing. César Cáceres (Presidente)	CAMARA DE AGRICULTURA
Sr. Jorge Vaca	MICIP
Ing. César Mayorga	MAG - DIRECCION NACIONAL AGROPECUARIA
	ECUAGRAN
Ing. Juan Sánchez	AFABA
Ing. Luis Daqui	MAG - SUBSECRETARIA DE POLITICAS DE INVERSION
Ing. Wilfrido Salazar	INIAP - PICHILINGUE
	ALTRESA
Ing. Santiago Crespo	ALMAGRO
Ing. Jorge Alvarez	MOLINOS CHAMPION
Sr. Jorge Quintana	VIGOR S. A.
Dra. Blanca Núñez	MICIP
Sra. Paola Reza	MAG - PROGRAMA NACIONAL DEL ALGODON, SOYA, MAIZ
Ing. Xavier Cevallos	OLEICA S. A.
Ing. Milo Rosado	MICIP
	BOLSA DE PRODUCTOS AGROPECUARIOS
Dr. Sergio Minelli	INEN
Sr. Victor Toala	
Ing. Luis Balladares	
Ing. Guido Zurita Z. (Secretario Técnico)	

Otros trámites:

.....

.....

CARACTER: Se recomienda su aprobación como: Obligatoria

Aprobación por Consejo Directivo en sesión de 1995-07-04 como <u>Obligatoria</u>	Oficializada como <u>Obligatoria</u> Por Acuerdo Ministerial No. 0250 de 1995-08-05 ... Registro Oficial No. 783 de 1995-10-02
---	--

ANEXO I

ANÁLISIS DE AFLATOXINA PROTAL

Informe: 12-10/0031-M001

GCR -4.1-01-00-03

Datos del cliente

Nombre: Vargas Farias Cristian Javier	Teléfono: 0991745946
Dirección: Bellavista Mz. 22 V. 33	

Identificación de la muestra / etiqueta

Nombre: CONCENTRADO DE AFLATOXINA	Código muestra: 12-10/0031-M001
Marca comercial: S/M	Lote: N/A
Tipo de alimento: VARIOS	Fecha elaboración: N/A
Envase: PEBD	Fecha expiración: N/A
Conservación: Ambiente 20 °C – 25 °C	Fecha recepción: 03/10/2012
Fecha análisis: 06/09/2012	Vida útil: N/A
Contenido neto declarado: 150 ml	
Contenido neto encontrado: N/A	
Presentaciones: N/A	
Condiciones climáticas del ensayo: Temperatura 22.5 °C ± 2.5 °C Y Humedad Relativa 55% ± 15%	

Análisis Microbiológicos

Ensayos realizados	Unidad	Resultado	Requisitos	Métodos/Ref.
Aflatoxinas *	ppb	90	---	Método Interno HPLC - UV/VIS *

Los resultados emitidos corresponden exclusivamente a la muestra proporcionada por el cliente.

* Observaciones:

Se realizó el parámetro de aflatoxinas solicitados por el cliente.

El dato de aflatoxinas se encuentran registrados en el cuaderno interno de trabajo de microbiología en la página 12-03605.

* Parámetros No Acreditados

^ Representa el Exponente

° Subcontratado

En microbiología los valores expresados como < 1.8, < 2, < 3, y < 10 se estiman ausencia

Los resultados del presente informe son válidos hasta 6 meses a partir de su emisión

Guayaquil, 11 de Octubre del 2012.

Dra. Gloria Bajaña de Pacheco
Directora General y Gerente Técnico

Ing. María Teresa Amador
Gerente de Calidad

ANEXO J

COTIZACIÓN INSUMOS

www.laboratoriocevallos.com

LABORATORIO
Cevallos S.A.

PROFORMA

CLIENTE: ESPOL TECH
ATENCION:
FECHA: ENERO 8 DEL 2013
TELEFONO:

CANTIDAD	DESCRIPCION	V. UNITARIO	V. TOTAL
1	METHANOL X CANECA	30.00	30.00
1	CANECA RECICLABLE	3.00	3.00
5	PAPEL FILTRO LISO X PLIEGO	1.80	9.00

SUB-TOTAL: 42.00
12% IVA: 5.04
VALOR TOTAL: 47.04

SON: CUARENTA Y SIETE 04/100 DOLARES

ATTE,
ING. DAVID CEVALLOS M
GERENTE COMERCIAL

LABORATORIO
Cevallos S.A.

ANEXO K

PLACAS DEL MICROORGANISMO SELECCIONADO

