



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

“Evaluación de la inocuidad de la leche cruda en centros de acopio e industrias lácteas de la provincia de Chimborazo”

Autora: Laminia Cali, Evelin Tatiana

Director del proyecto: Ing.-Mat. Romero Saker, Pedro José Rachid.

Director externo del proyecto: Ing. Jaramillo Bayas, Ramiro Germán M. Sc.

Sangolquí, 22 de agosto del 2022





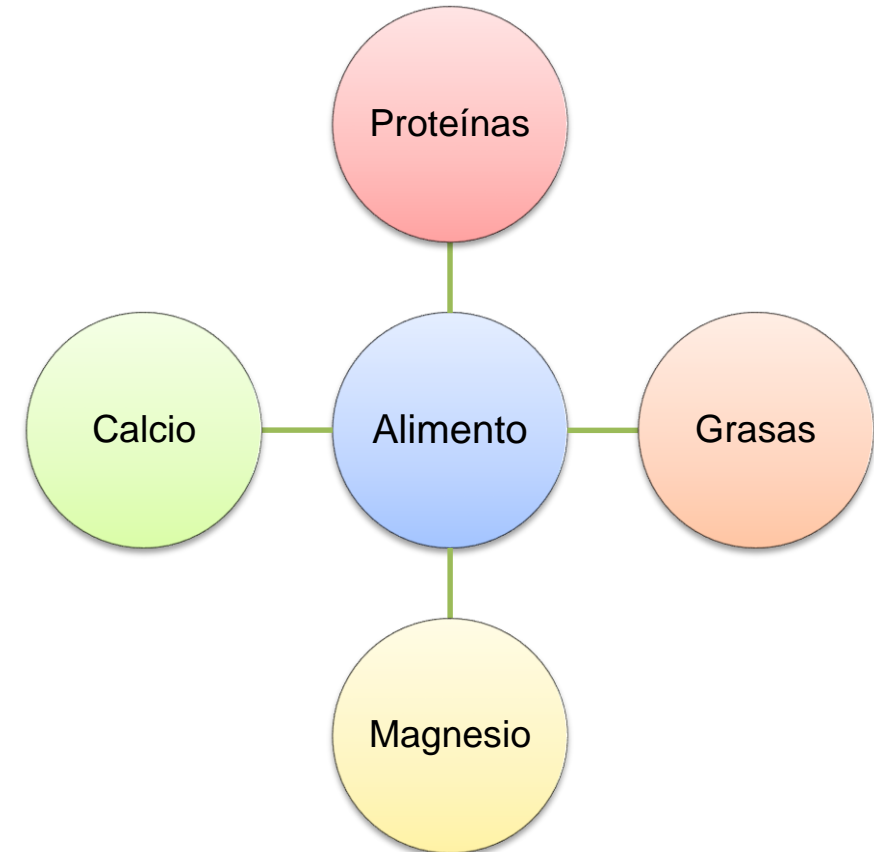
- Introducción
- Objetivos
- Hipótesis
- Metodología
- Resultados y discusión
- Conclusiones y recomendaciones
- Agradecimientos

INTRODUCCIÓN

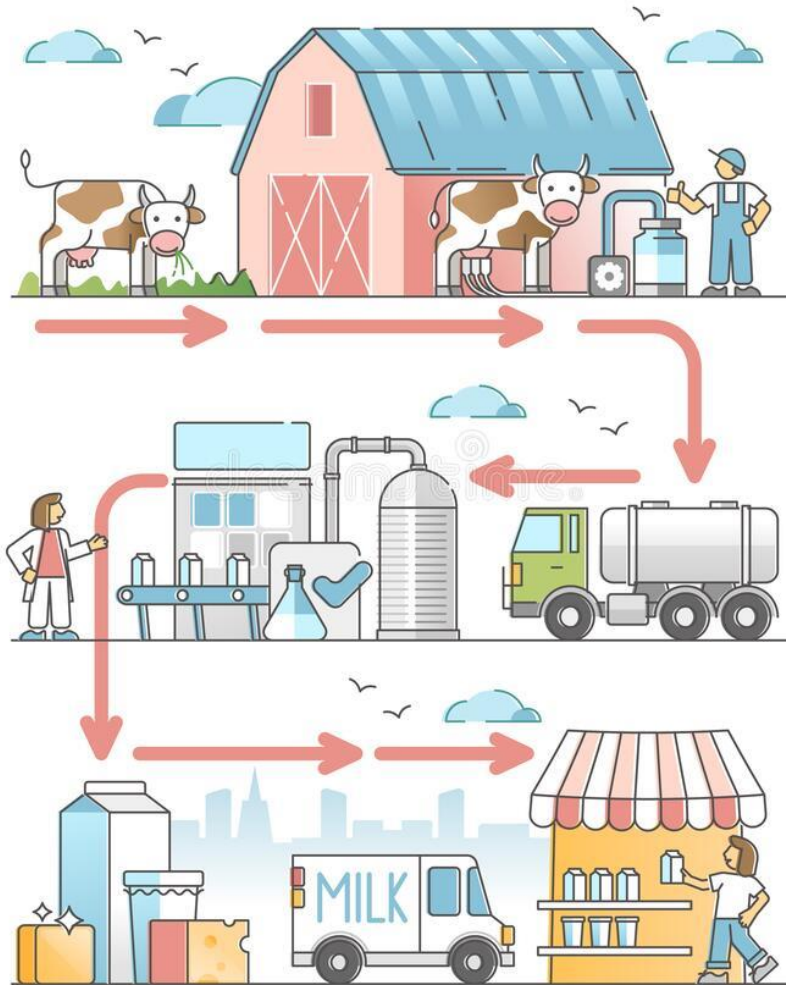
Leche cruda



- Color: blanco opalescente o ligeramente amarillento.
- Olor lácteo suave.
- Aspecto homogéneo.
- Libre de materias extrañas.



Leche cruda



Leche alterada:
características fuera de los
parámetros normales.

Leche adulterada:
cuando se agregan
sustancias para ocultar
características no
deseadas.

Producción de leche cruda en el Ecuador



294 mil
productores

6.15 millones de
litros diarios de
leche cruda

Chimborazo
produce 436 mil
litros diarios de
leche cruda

Normativa
Técnica
Ecuatoriana
INEN 9: 2012



AGROCALIDAD

AGENCIA DE REGULACIÓN Y
CONTROL FITO Y ZOOSANITARIO

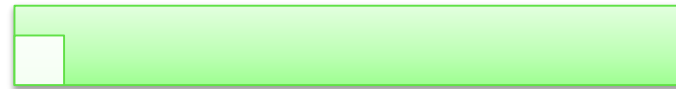
Parámetros de la leche

Estabilidad proteica



- No producir precipitación o coagulación
- Se emplea alcohol etílico o solución de alizarina
- Aumento de población bacteriana, calostro, mastitis
- NTE INEN 9:2012 : Sin reacción de estabilidad proteica (Negativa)

pH



- Concentración de H^+ .
- Normal: 6.6 – 6.8; Mastitis: 6.9 – 7.5; Calostro: 6.0.
- Edad del animal, etapa de lactancia, temperatura
- Determinación: métodos colorimétricos y potenciométricos

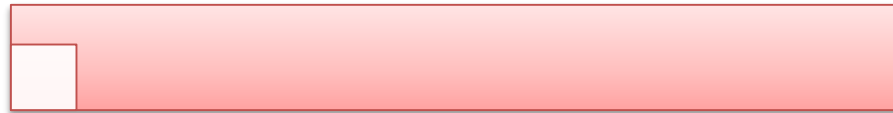
Acidez (% de ácido láctico)



- La caseína, CO_2 y fosfatos influyen en la acidez inicial
- Microorganismos transforman lactosa en ácido láctico
- Determinación: Potenciómetro, análisis volumétrico de titulación
- NTE INEN 9:2012 : 0.13 – 0.17% de ácido láctico

Parámetros de la leche

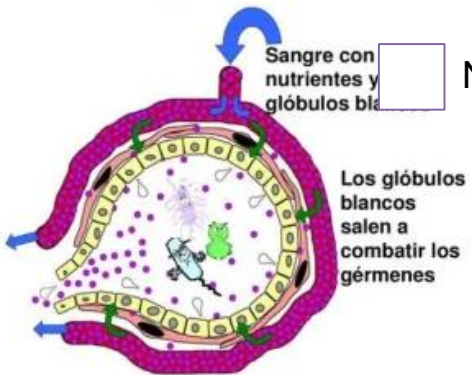
Células somáticas



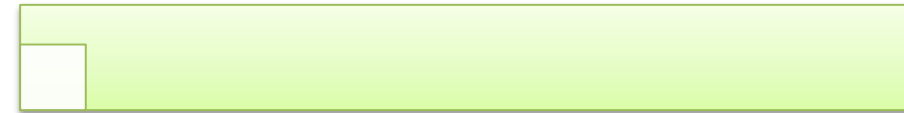
Son parte del sistema inmune innato

Métodos: citometría de flujo, conteo microscópico, prueba de mastitis California, contador infrarrojo, prueba de Wisconsin

NTE INEN 9:2012 : Hasta 700mil células/cm³



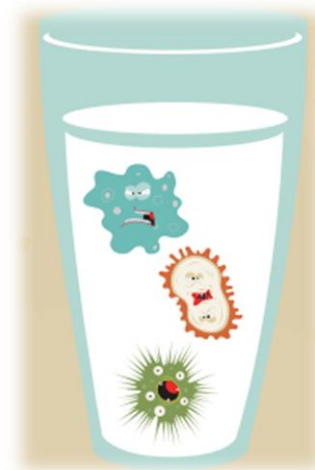
Bacterias totales



Se ha logrado aislar *Mycobacterium* spp., *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*

Métodos: siembra en placas Petri, citometría de flujo

NTE INEN 9:2012 : Hasta 1.5 millones UFC/cm³



Contaminantes de la leche

Aflatoxina M1



- Son micotoxinas del género *Aspergillus*.
- Producto del metabolismo de un animal
- Toxina mutagénica, carcinogénica y teratogénica.
- NTE INEN 9:2012 : Hasta 0.5 µg/kg.

Antibióticos



- Tratamiento de enfermedades causadas por microorganismos patógenos
- Se puede eliminar a través de la orina y leche materna y se pueden detectar por cromatografía en capa fina
- Alergia, intoxicación, resistencia antimicrobiana
- NTE INEN 9:2012 : Límite máximo de residuos (LMR), establecidos en el CODEX Alimentarius CAC/MRL 2



Adulterantes de la leche

Cloruros



- Mastitis: ósmosis equilibrada
- Cloruro de sodio: aumentar la densidad y reducir el punto de congelación
- Detección: método colorimétrico y potenciométrico
- NTE INEN 9:2012 : Ausencia (negativo)

Peróxido de hidrógeno



- Sustancia líquida incolora y amarga, causa daños en la salud
- Inhibe crecimiento de microorganismos
- Detección: métodos colorimétricos
- NTE INEN 9:2012 : ausencia (negativo)

Neutralizantes alcalinos



- Se añaden para disminuir la acidez de la leche cruda
- Hidróxido de sodio, orina, jabones, carbonatos
- Determinación: método colorimétrico, prueba de alizarina
- NTE INEN 9:2012 : Ausencia (negativo)



Objetivo General

Evaluar la inocuidad de la leche cruda en centros de acopio e industrias lácteas de la provincia de Chimborazo.

Objetivos Específicos

Evaluar la estabilidad proteica, pH y acidez en muestras de leche cruda, con base en la normativa técnica ecuatoriana INEN 9:2012.

Determinar la presencia de Aflatoxina M1, cloruros, peróxidos, antibióticos y neutralizantes alcalinos en muestras de leche cruda, con base en la normativa técnica ecuatoriana INEN 9:2012.

Establecer el número de células somáticas y bacterias totales en muestras de leche cruda, con base en la normativa técnica ecuatoriana INEN 9:2012.

Hipótesis

Los parámetros de inocuidad de la leche cruda en centros de acopio e industrias lácteas de la provincia de Chimborazo, se ajustan a la normativa técnica ecuatoriana INEN 9:2012 utilizada por la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario (AGROCALIDAD).

METODOLOGÍA



Toma de muestras



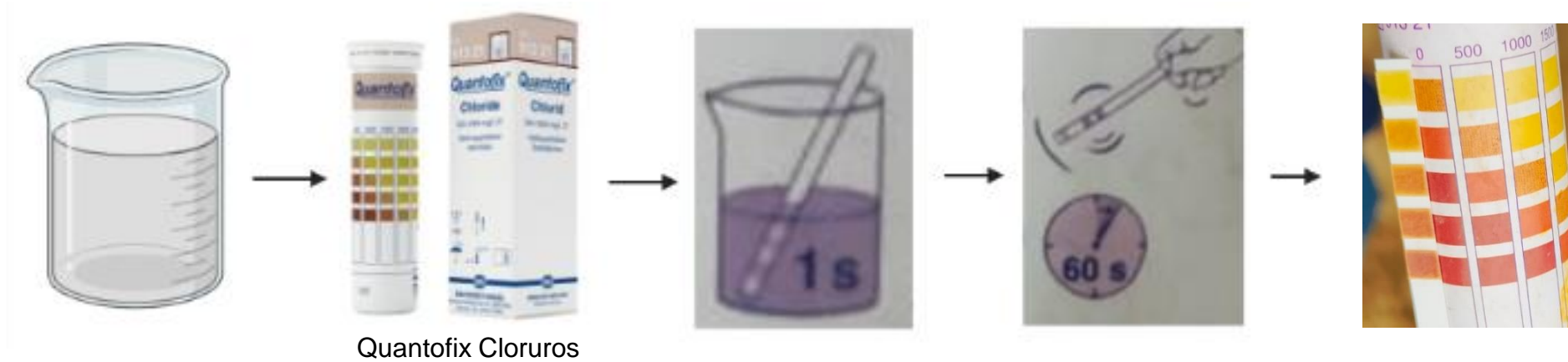
Prueba de estabilidad proteica



Determinación de pH y acidez (% de ácido láctico)



Prueba de cloruros



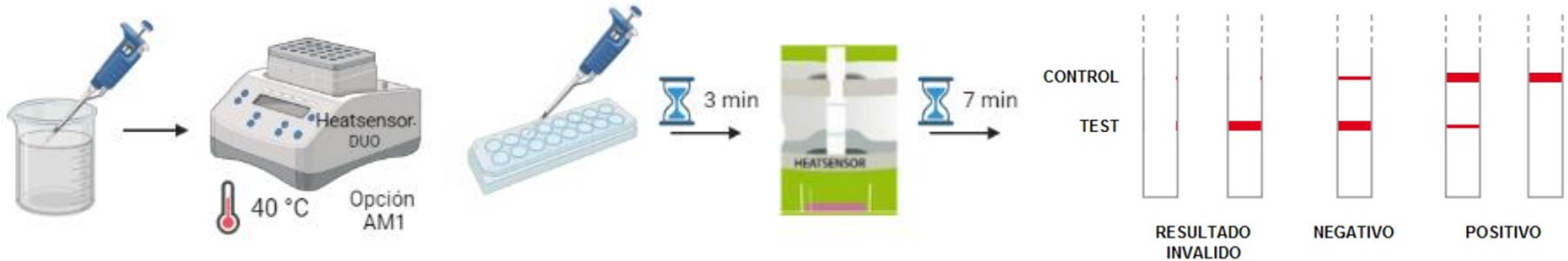
Prueba de peróxido de hidrógeno



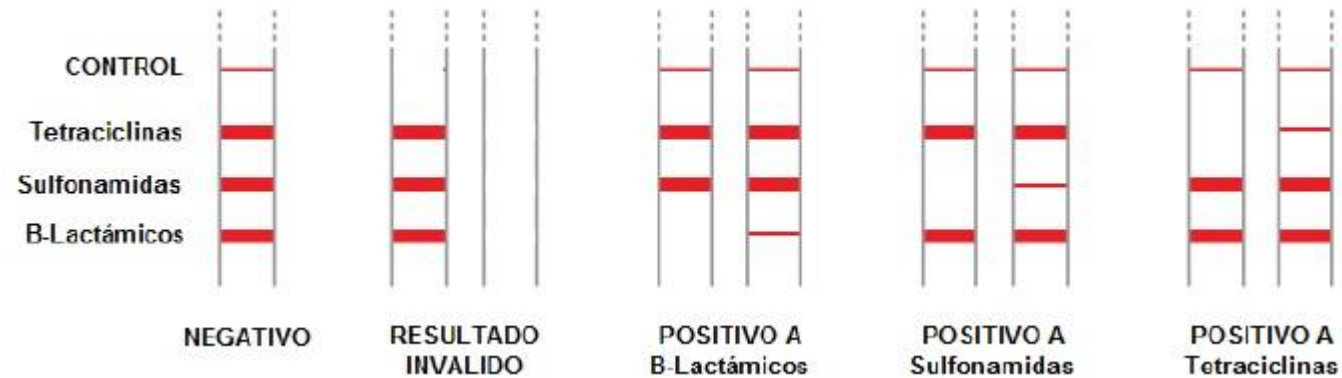
Prueba de neutralizantes



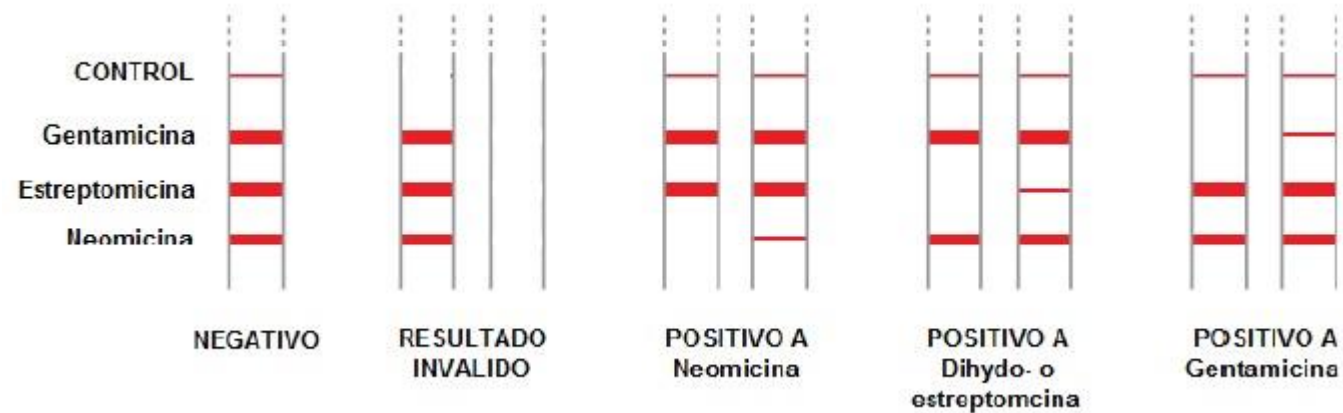
Prueba de Aflatoxina M1



Prueba de antibióticos β -lactámicos, tetraciclinas y sulfonamidas (ANT1)



Prueba de antibióticos aminoglucósidos (ANT2)



Toma de muestras



Frascos con azidiol y bronopol

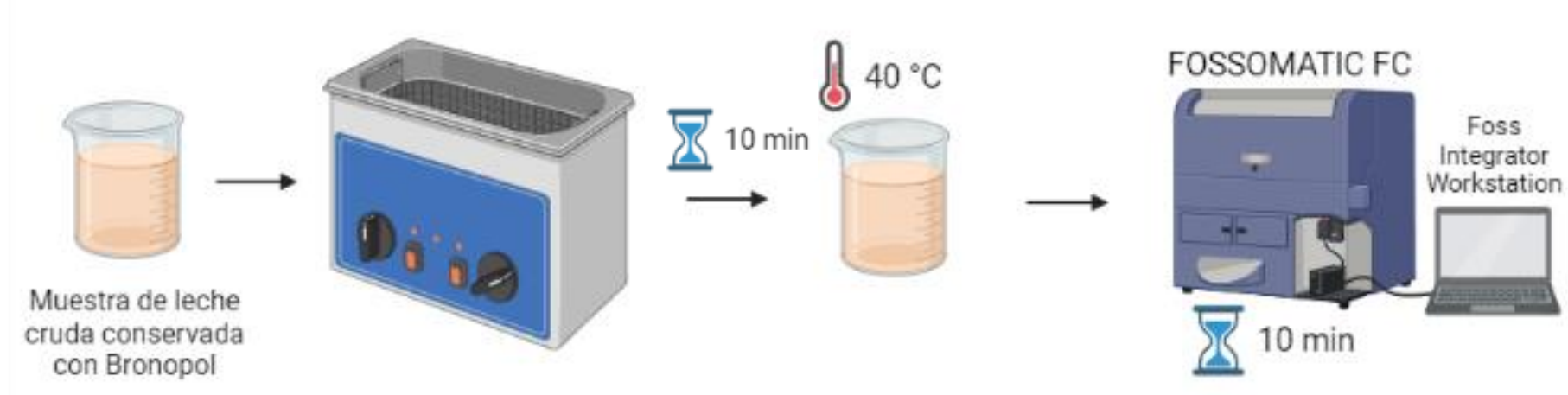


Laboratorio

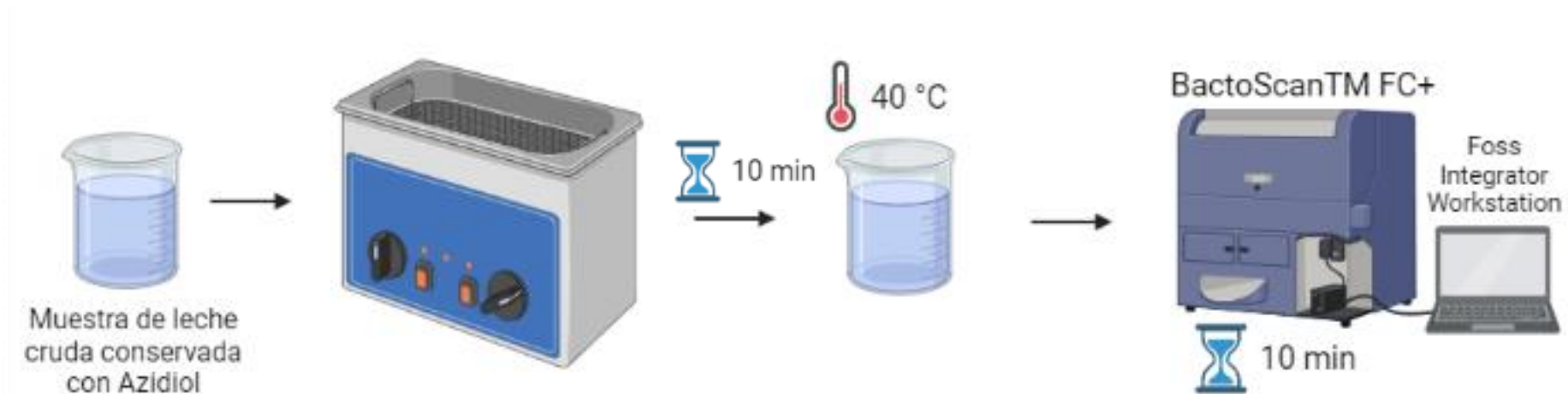


Fase de análisis en el laboratorio

Conteo de células somáticas (CCS)



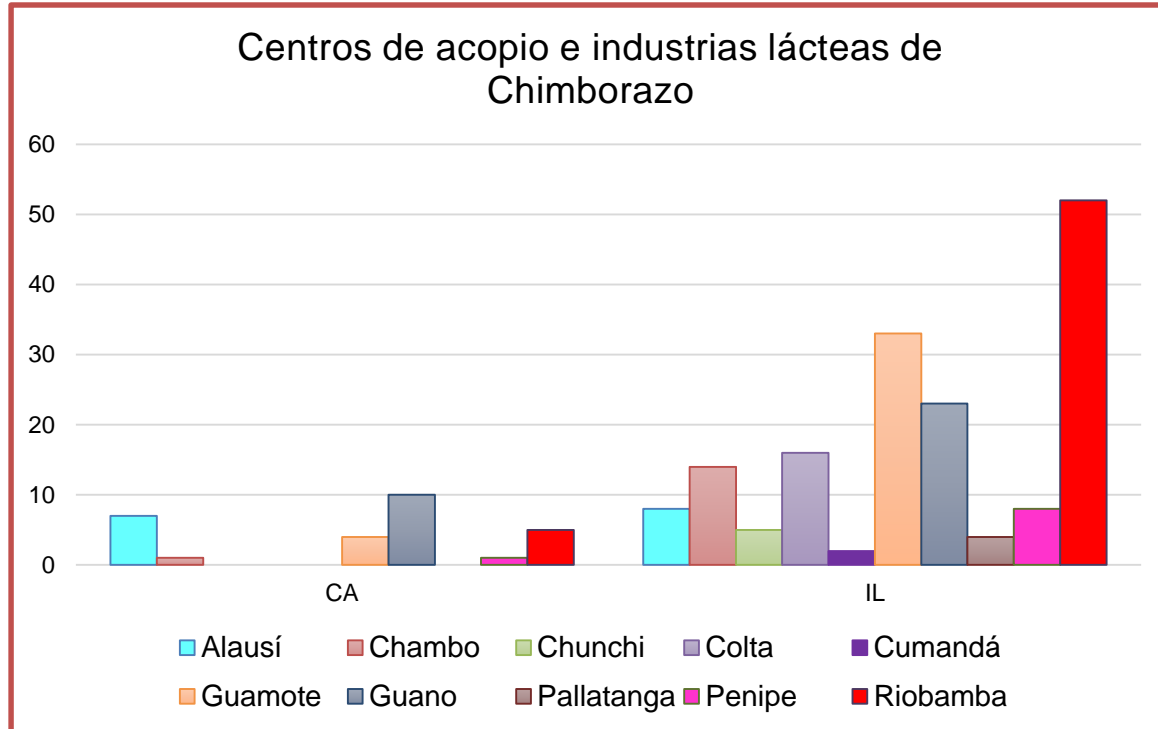
Conteo de bacterias totales (CBT)



$$\log(UFC) = \log(IBC) \times 1.03466 - 1.05124$$

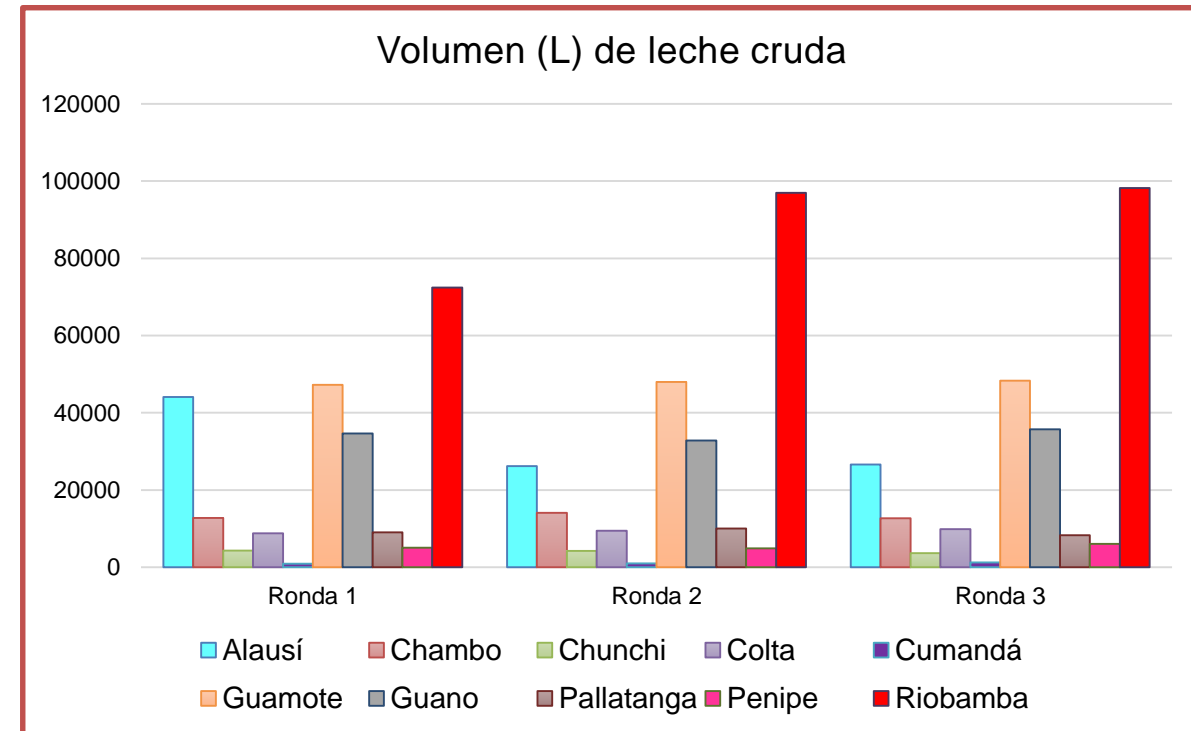
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Centros de acopio (CA) e industrias lácteas (IL) de la provincia de Chimborazo



	Total
CA	28
IL	165
	193

Volumen (L) de leche cruda acopiada y procesada diariamente en los cantones de la provincia



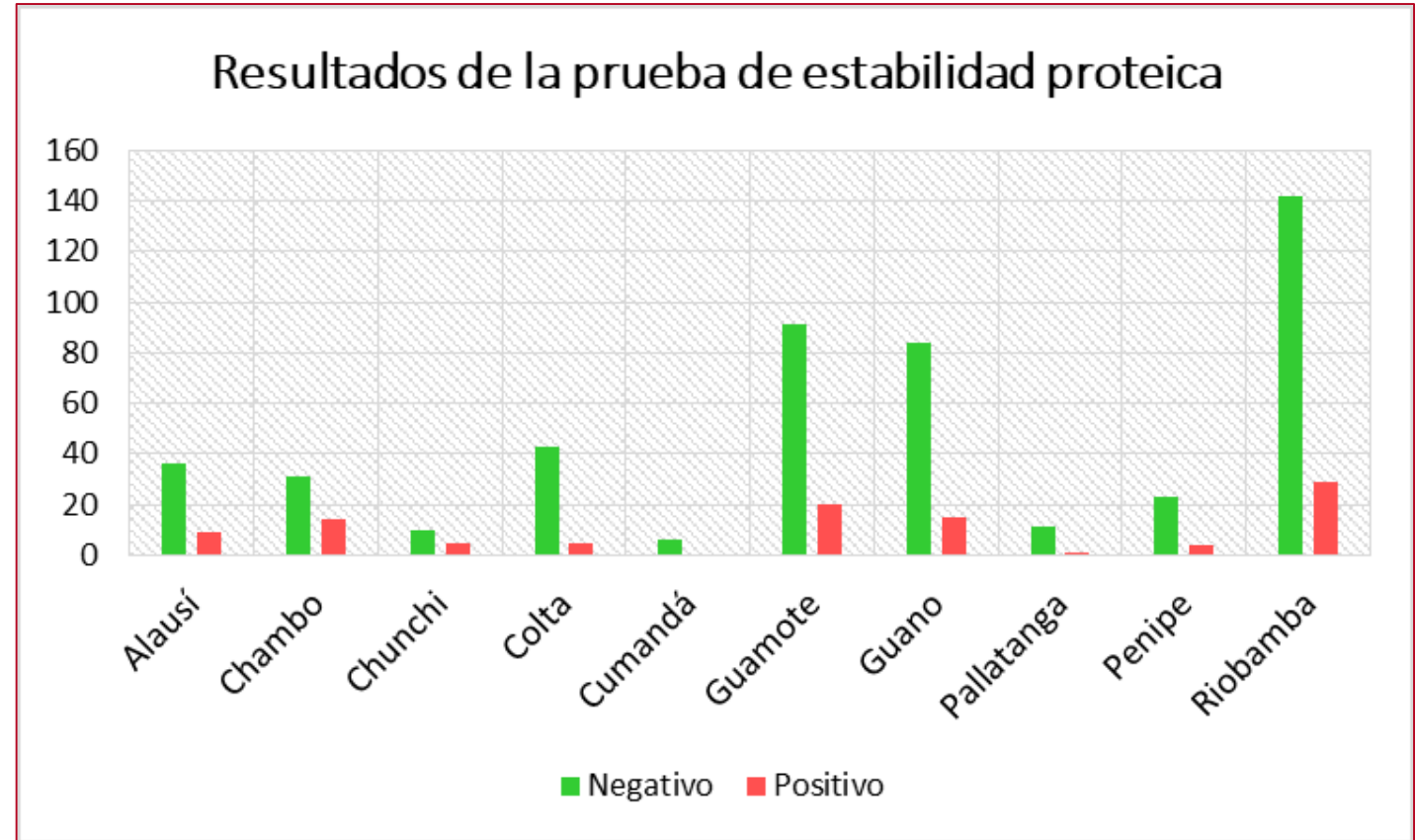
	Promedio
Ronda 1	239168
Ronda 2	247700
Ronda 3	250545

Promedio total:
245804 litros de
leche cruda

Estabilidad proteica



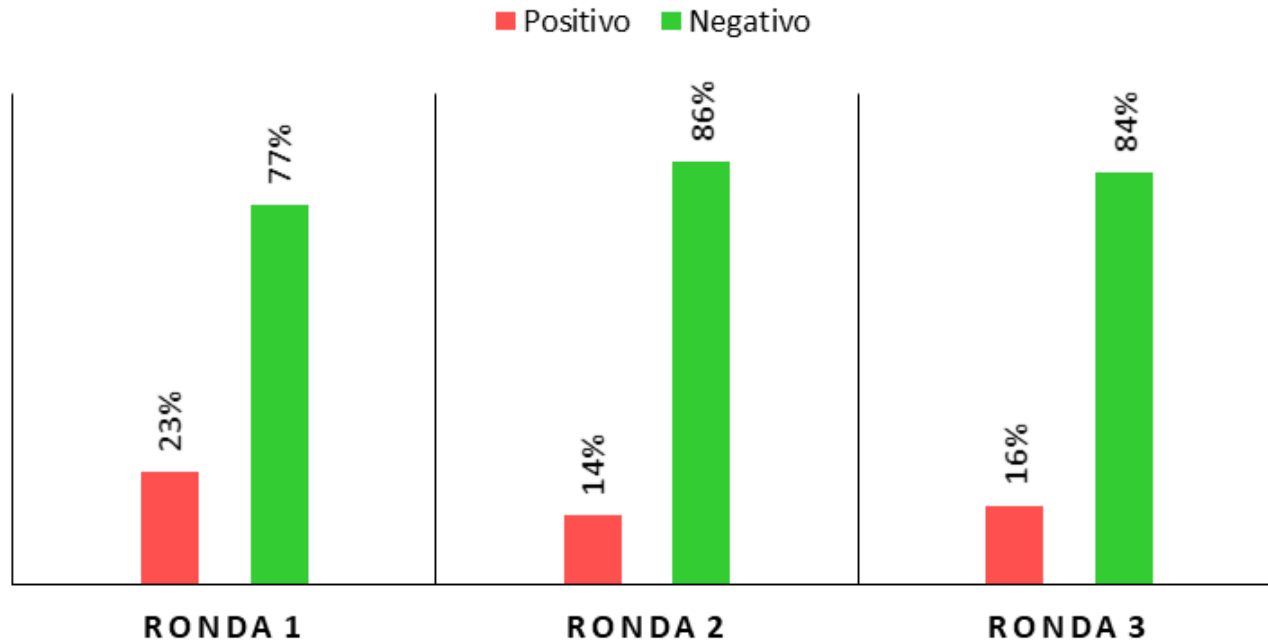
Positivo a prueba de estabilidad proteica



	Total
Negativo	477
Positivo	102

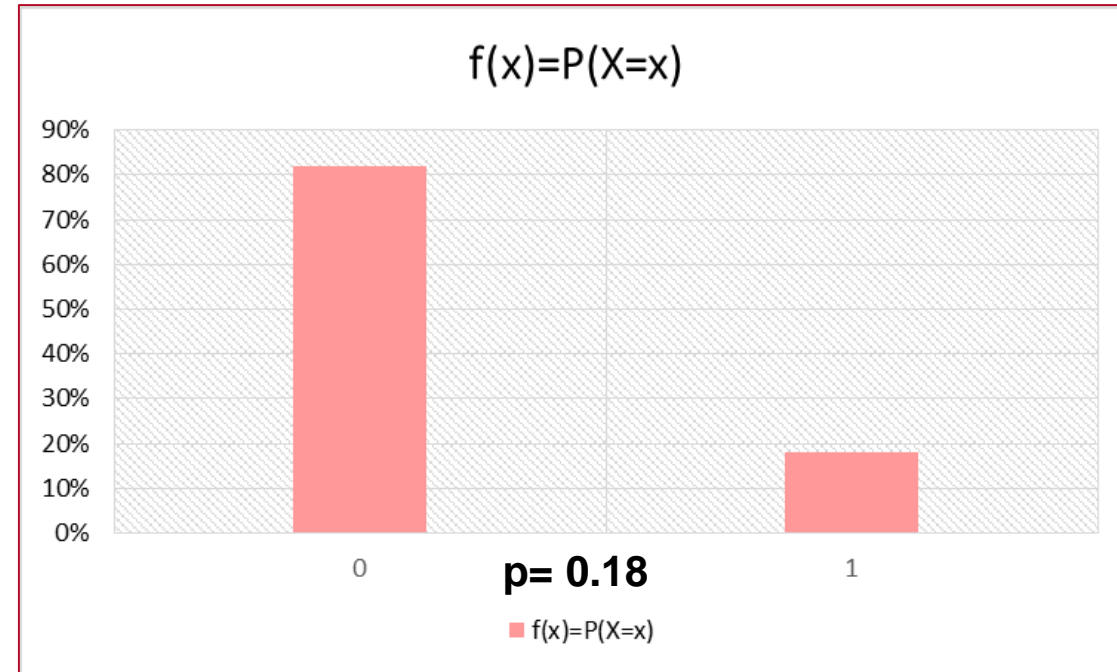
Estabilidad proteica

Porcentaje de resultados obtenidos en la prueba de estabilidad proteica



	Positivo	Negativo
Ronda 1	44	149
Ronda 2	27	166
Ronda 3	31	162

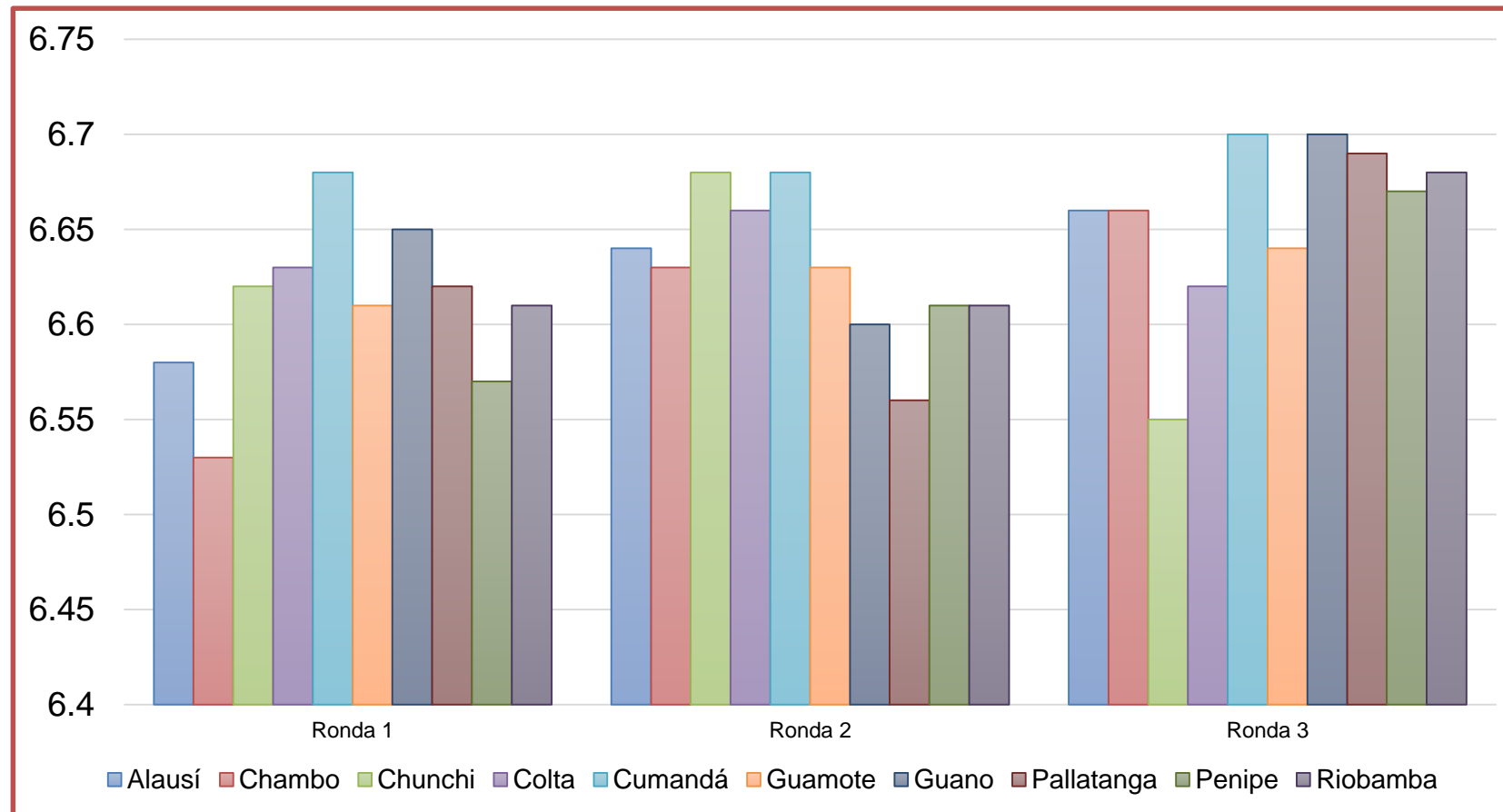
Gráfico de barras de la función de masa de la distribución de Bernoulli para estabilidad proteica



Variable aleatoria	Función de masa
X	$f(x) = P(X=x)$
0	82%
1	18%

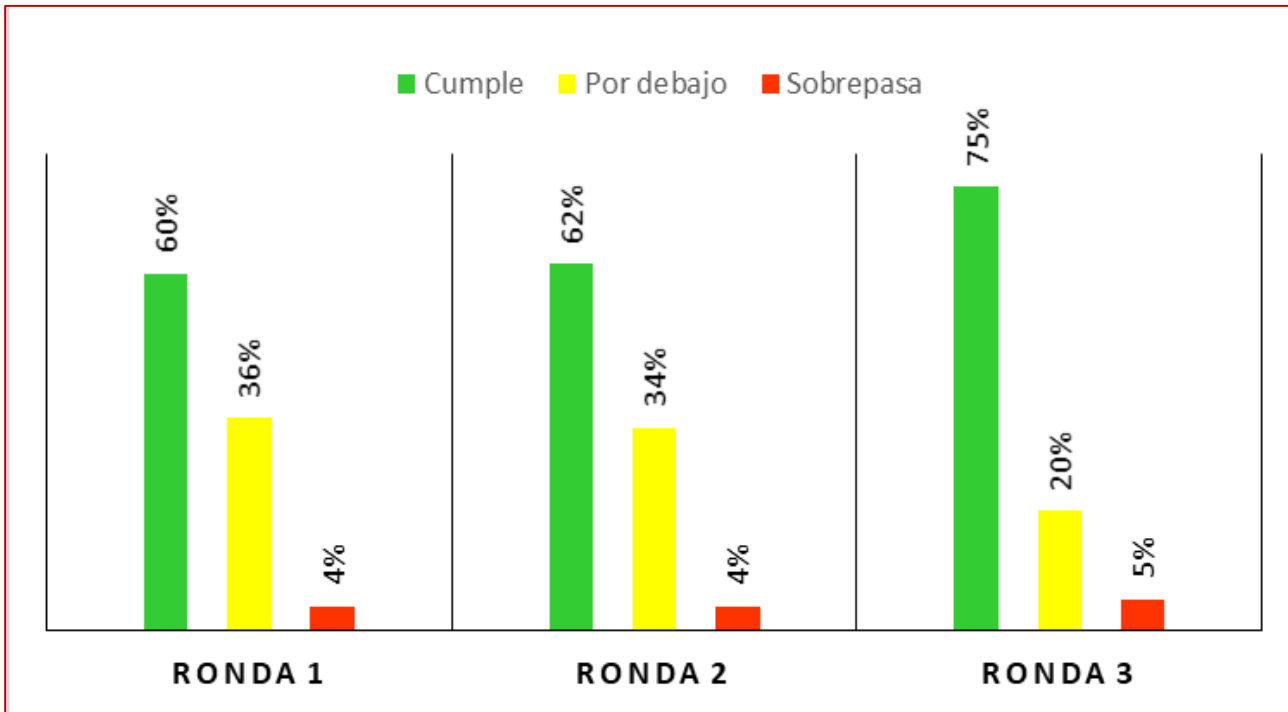
pH

Promedio de pH en leche cruda en cada cantón de la provincia de Chimborazo

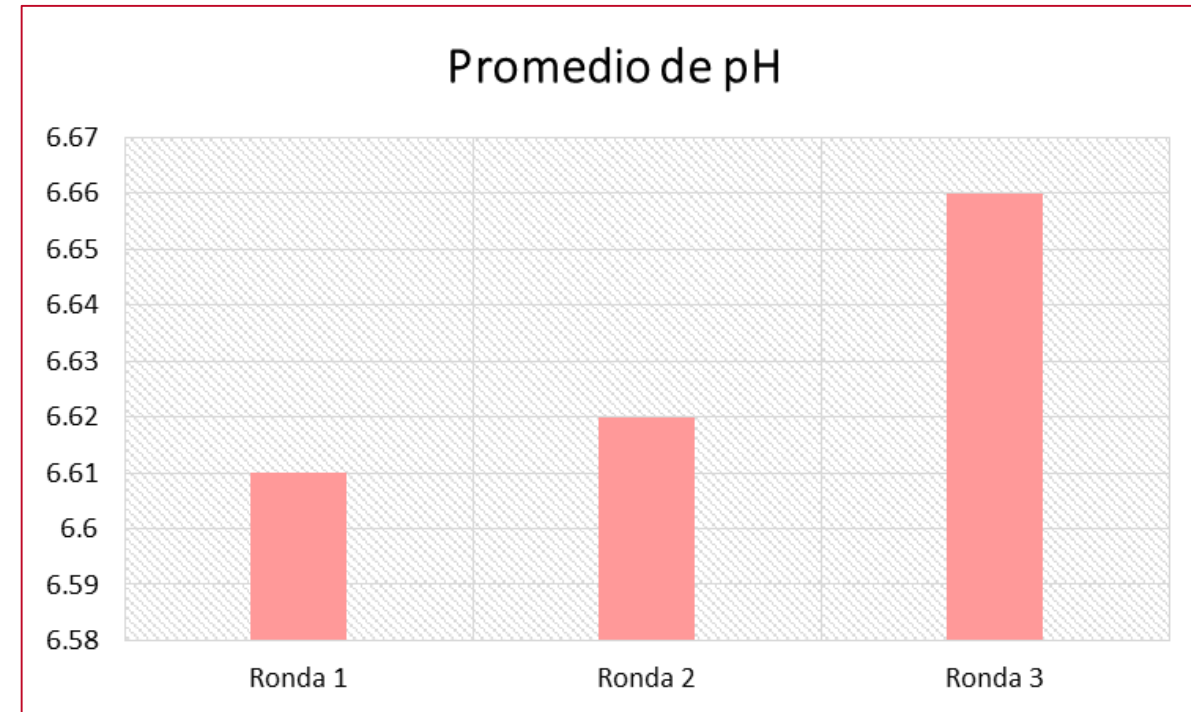


pH

Porcentaje de cumplimiento del parámetro pH en leche cruda en la provincia de Chimborazo



Promedio de pH de leche cruda de la provincia de Chimborazo



Rango permisible:
6.6 -6.8

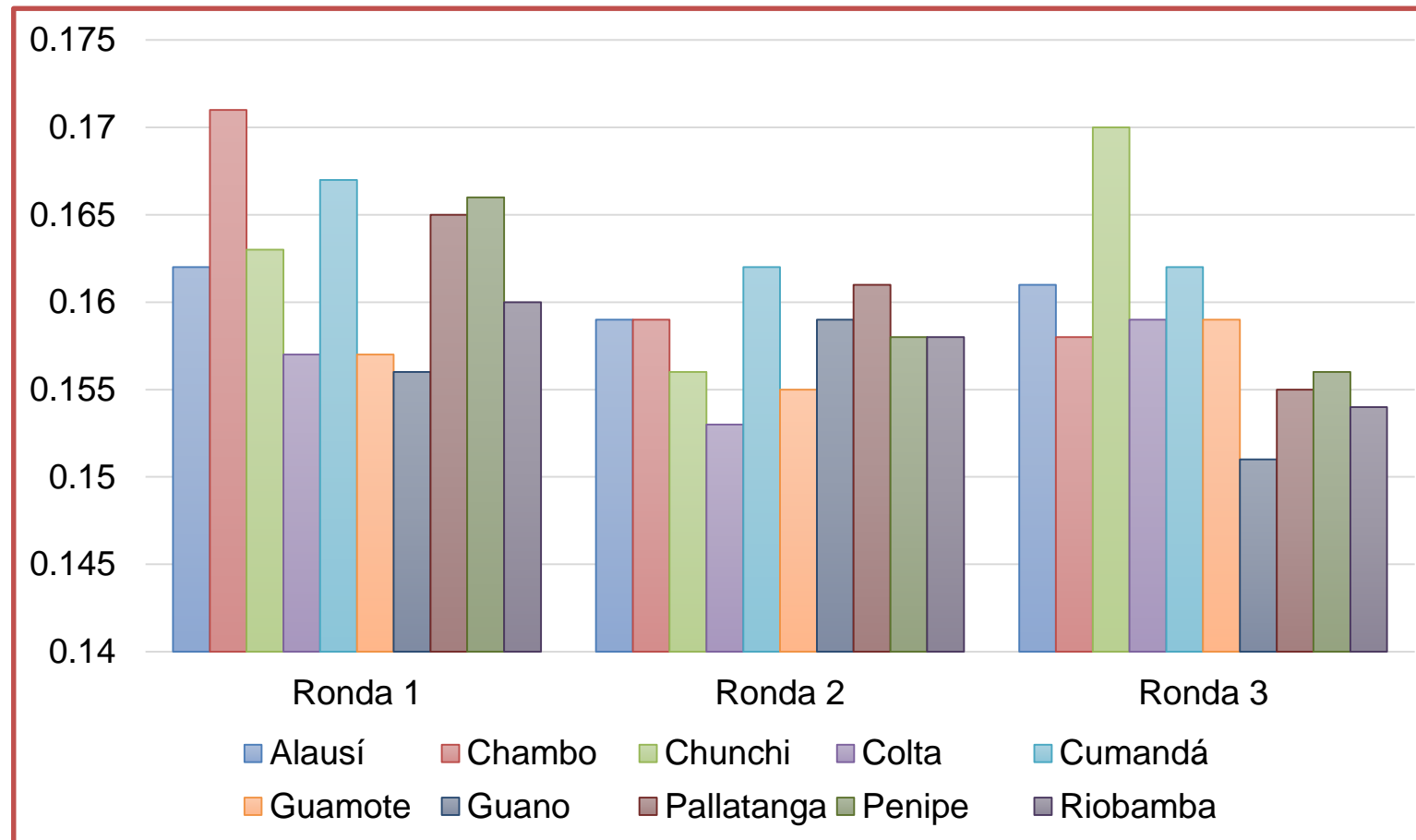
Factores:

- Tiempo
- Mastitis y calostro

	Promedio
Ronda 1	6.61
Ronda 2	6.62
Ronda 3	6.66

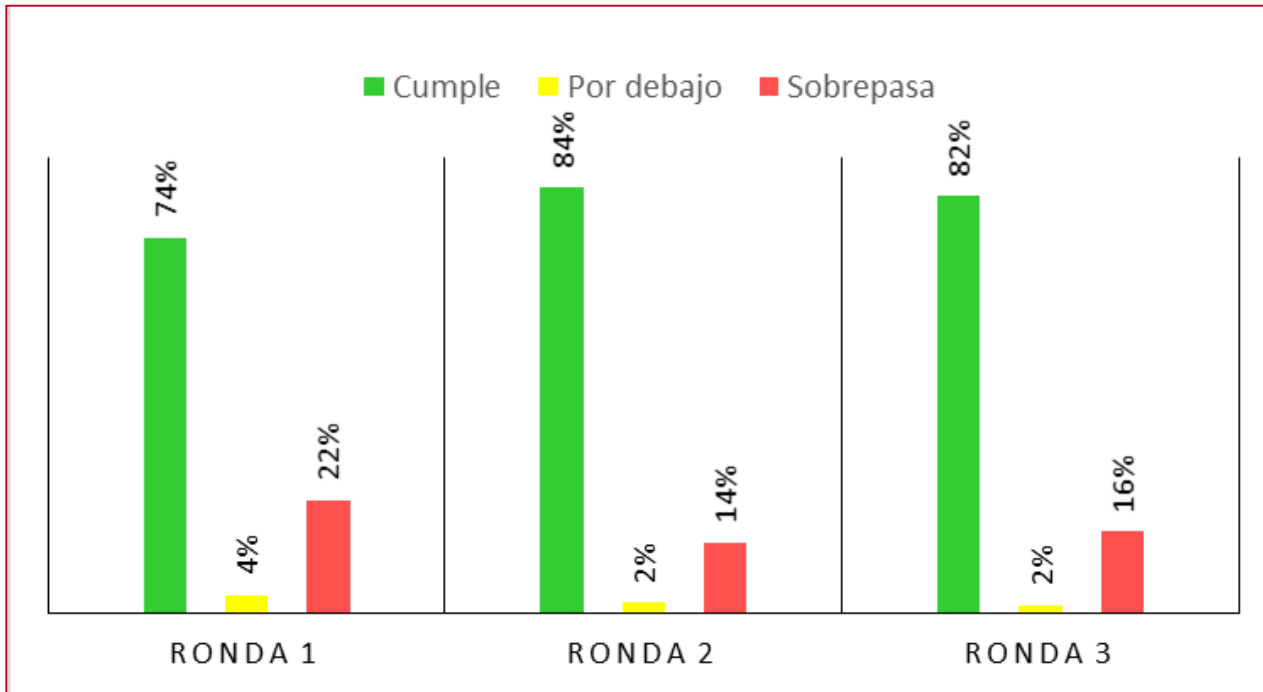
Acidez (% de ácido láctico)

Promedio de acidez (% de ácido láctico) de leche cruda en cada cantón de la provincia de Chimborazo



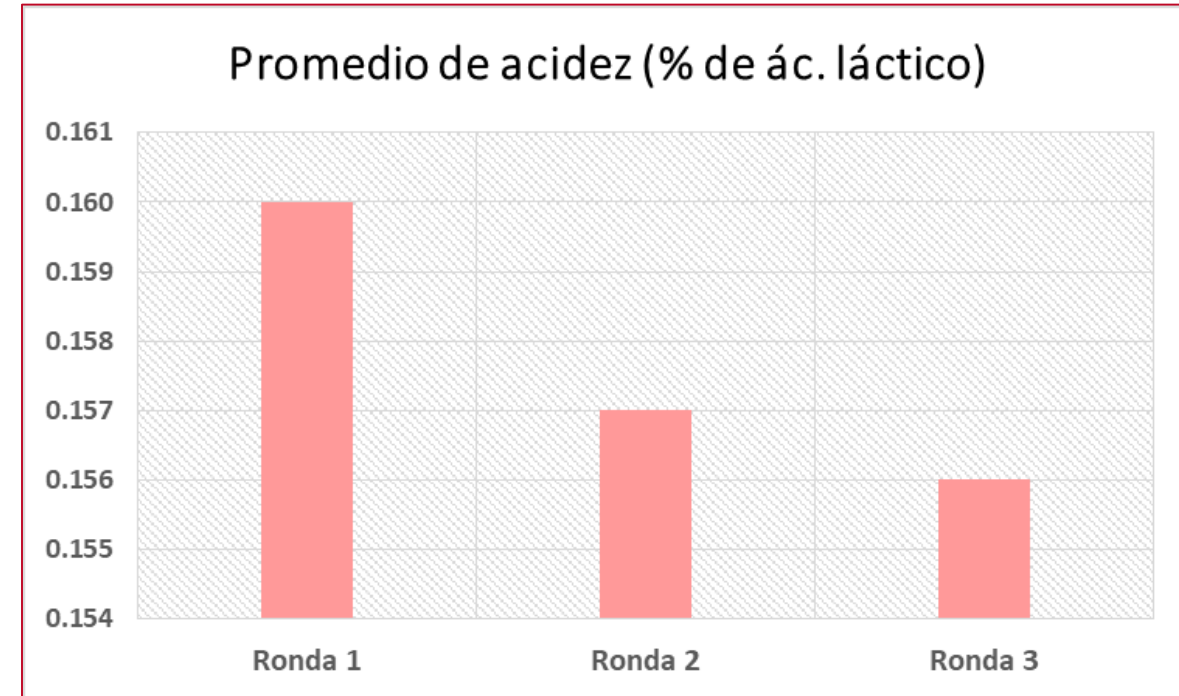
Acidez (% de ácido láctico)

Porcentaje de cumplimiento de la acidez (% de ácido láctico) en leche cruda en la provincia de Chimborazo



Rango permisible:
0.13 – 0.17

Promedio de acidez (% de ácido láctico) de leche cruda de la provincia de Chimborazo



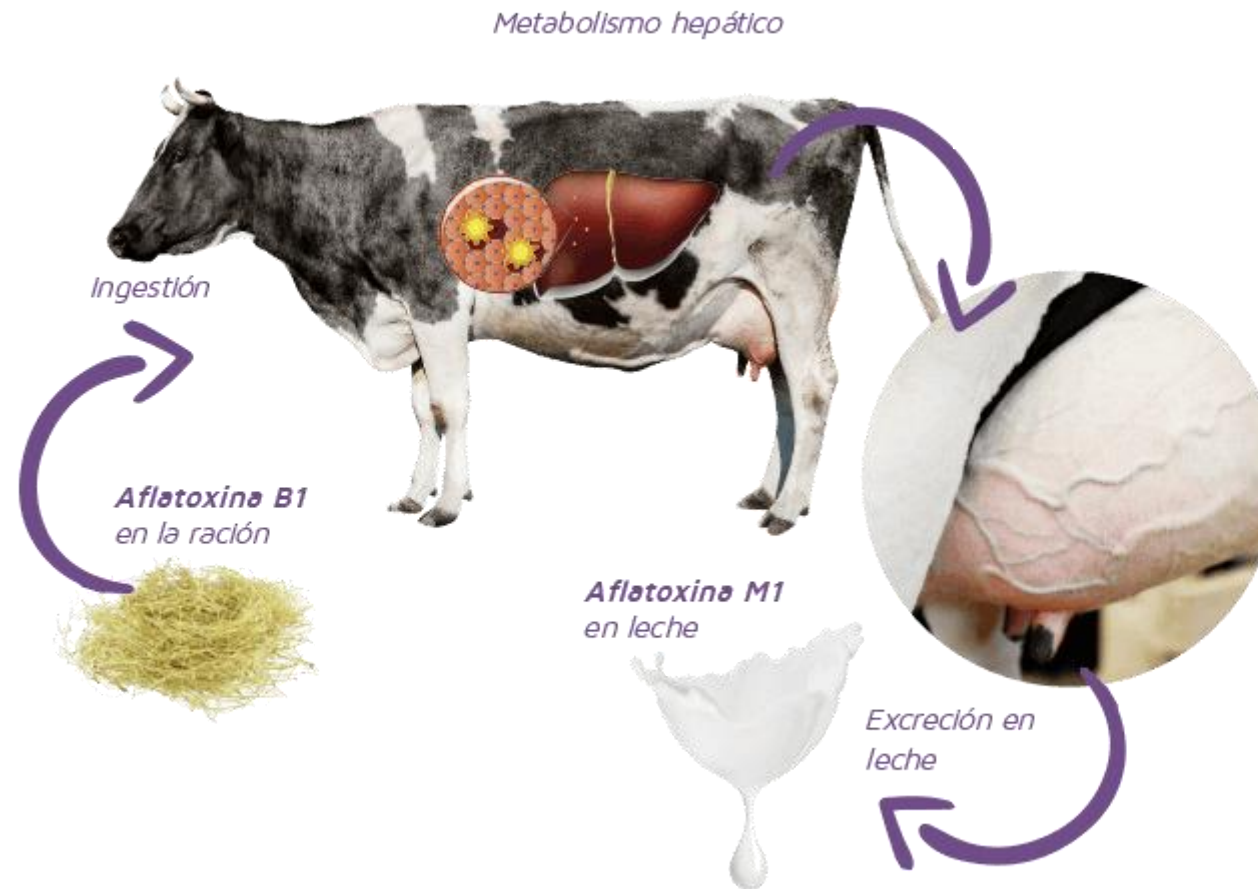
	Promedio
Ronda 1	0.160
Ronda 2	0.157
Ronda 3	0.156

Aflatoxina M1

El kit Aflasensor no detectó la presencia de Aflatoxina M1 en ninguna de las 579 muestras evaluadas.



Prueba de Aflatoxina M1
negativa

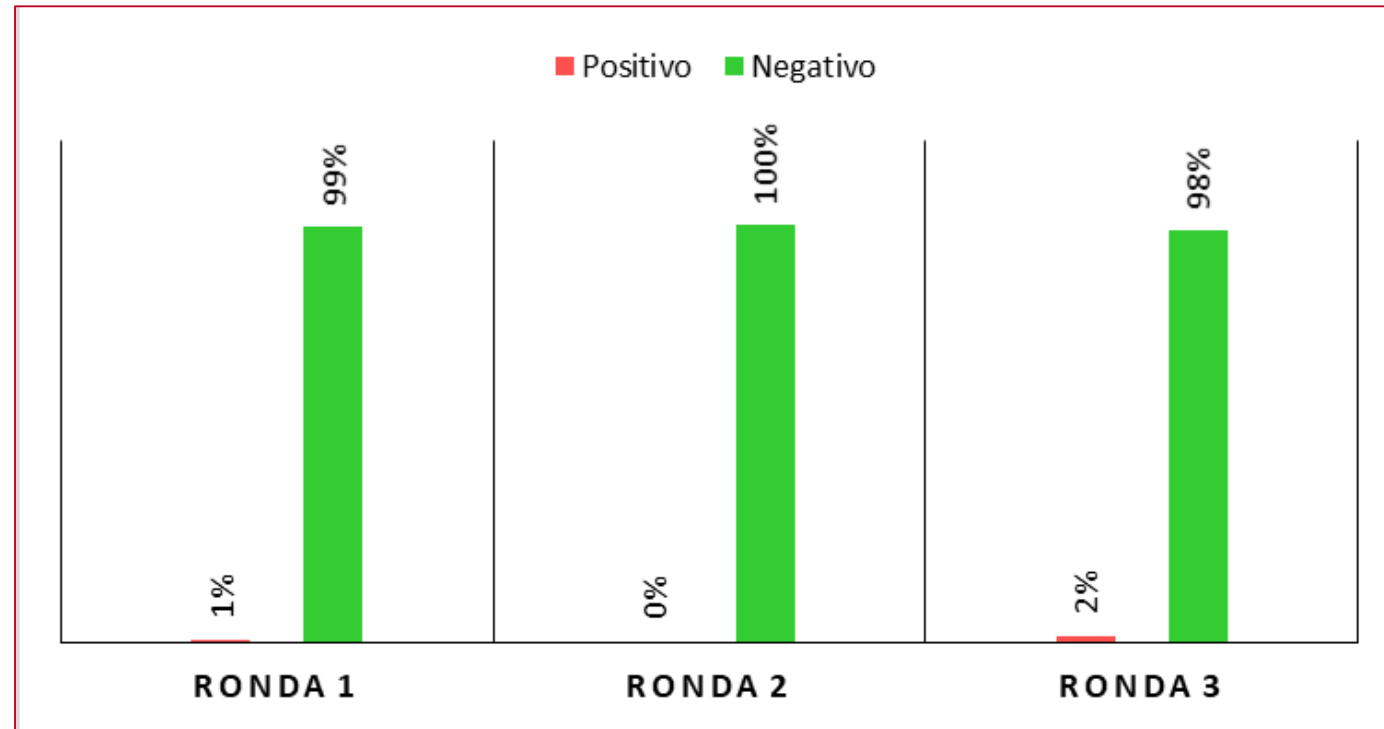


Cloruros

Porcentaje de resultados obtenidos en la prueba de cloruros en leche cruda



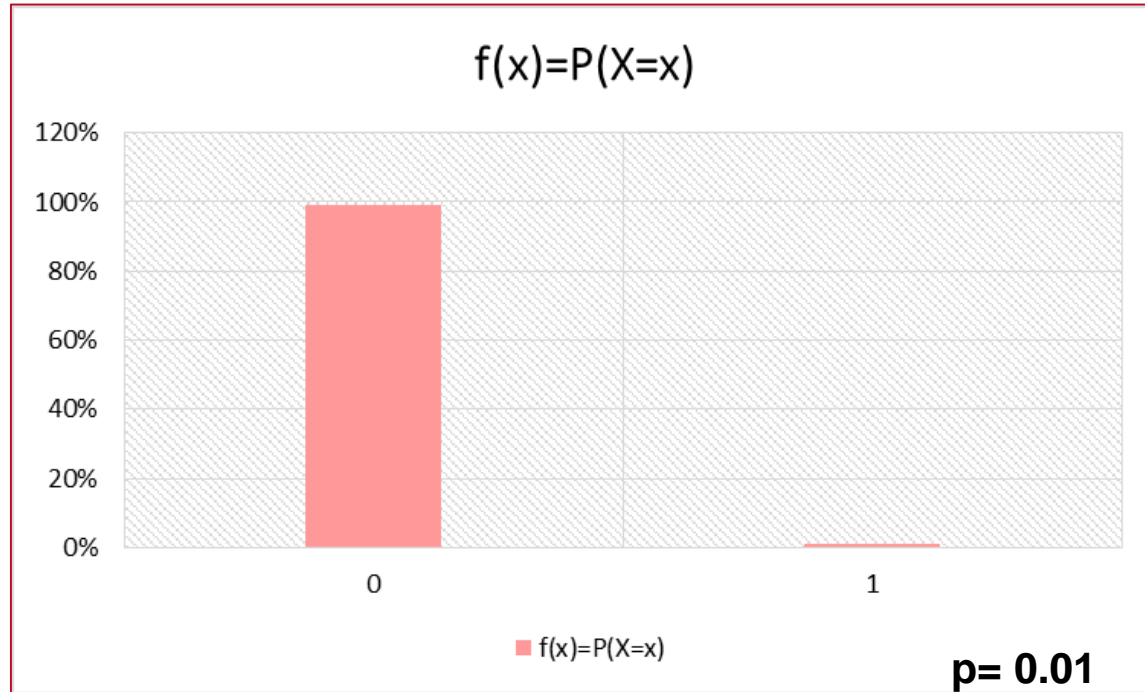
Tiras colorimétricas
Quantofix Cloruro



	Ronda 1	Ronda 2	Ronda 3
Positivo	1	0	3
Negativo	192	193	190

Cloruros

Gráfico de barras de la función de masa de la distribución de Bernoulli para la prueba de cloruros



Variable aleatoria	Función de masa
X	$f(x)=P(X=x)$
0	99%
1	1%



AGROCALIDAD
AGENCIA DE REGULACIÓN Y CONTROL FITO Y ZOOSANITARIO

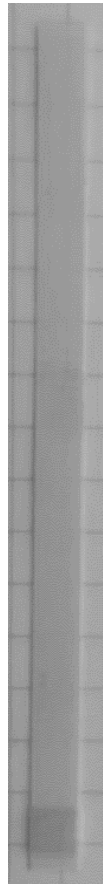
Rango permisible:
0.07 – 0.12%

Límite máximo permisible: 1000 mg/L
o ppm = 0.1%

	Mínimo	Máximo
Sanas	0.077%	0.114%
Transición	0.117%	0.138%
Enfermas	0.140%	0.332%

Peróxidos

El kit QUANTOFIX Peróxidos no detectó la presencia peróxidos en las 579 muestras de leche cruda evaluadas



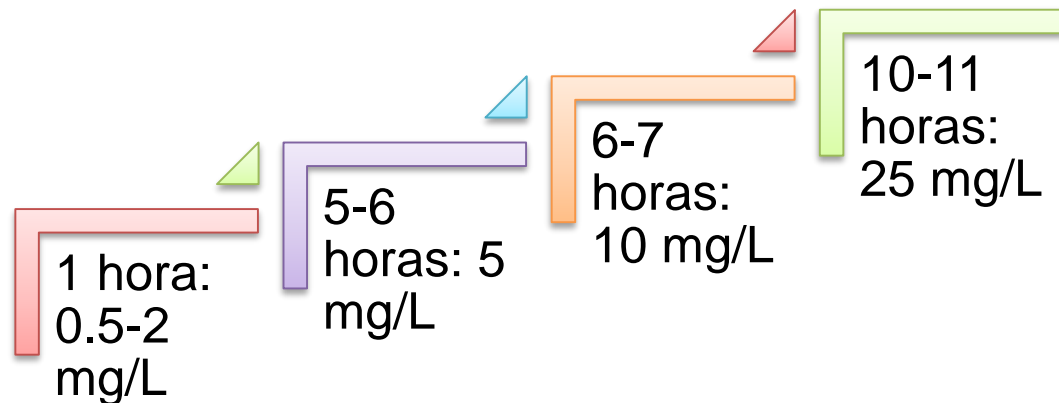
Prueba de peróxido
negativa

- Activa la enzima Lactoperoxidasa
- Deterioro
- Evaporación



AGROCALIDAD

AGENCIA DE REGULACIÓN Y CONTROL FITO Y ZOOSANITARIO

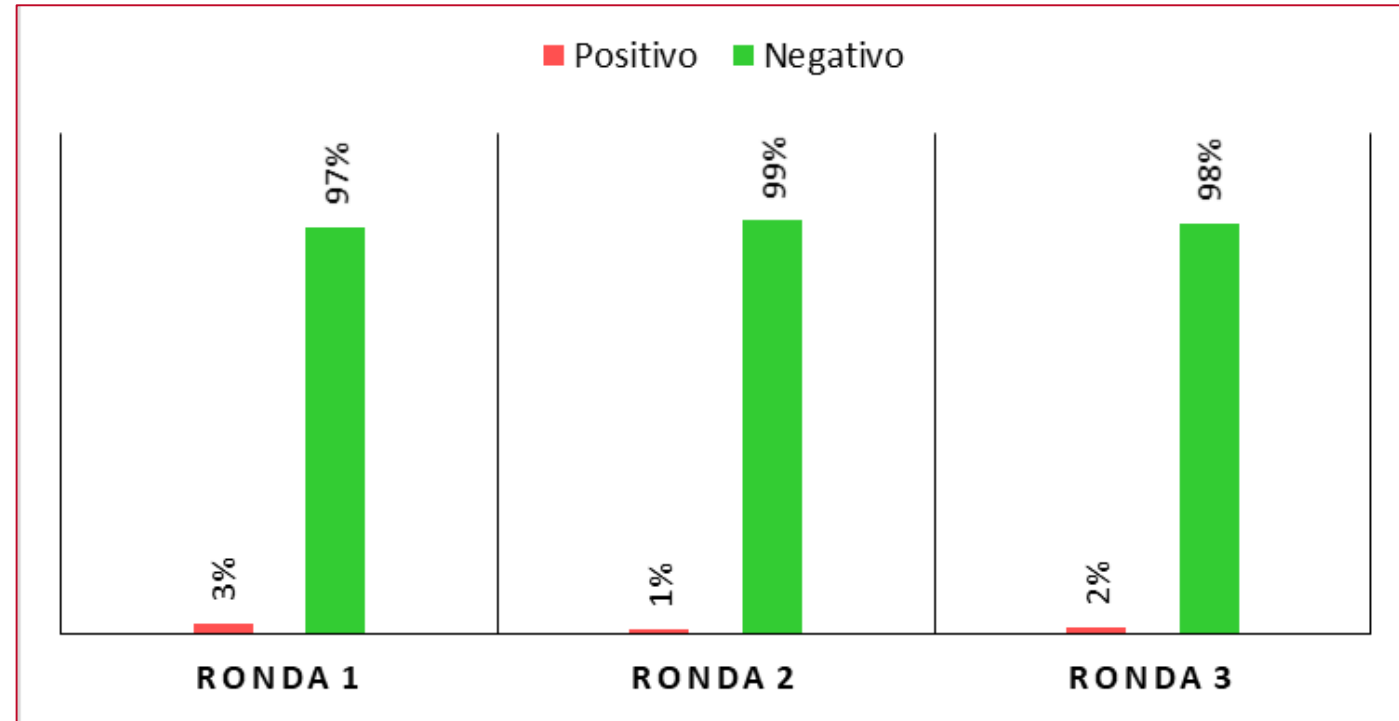


Antibióticos β -lactámicos, tetraciclinas y sulfonamidas

Porcentaje de resultados obtenidos de la prueba de ANT1 en leche cruda



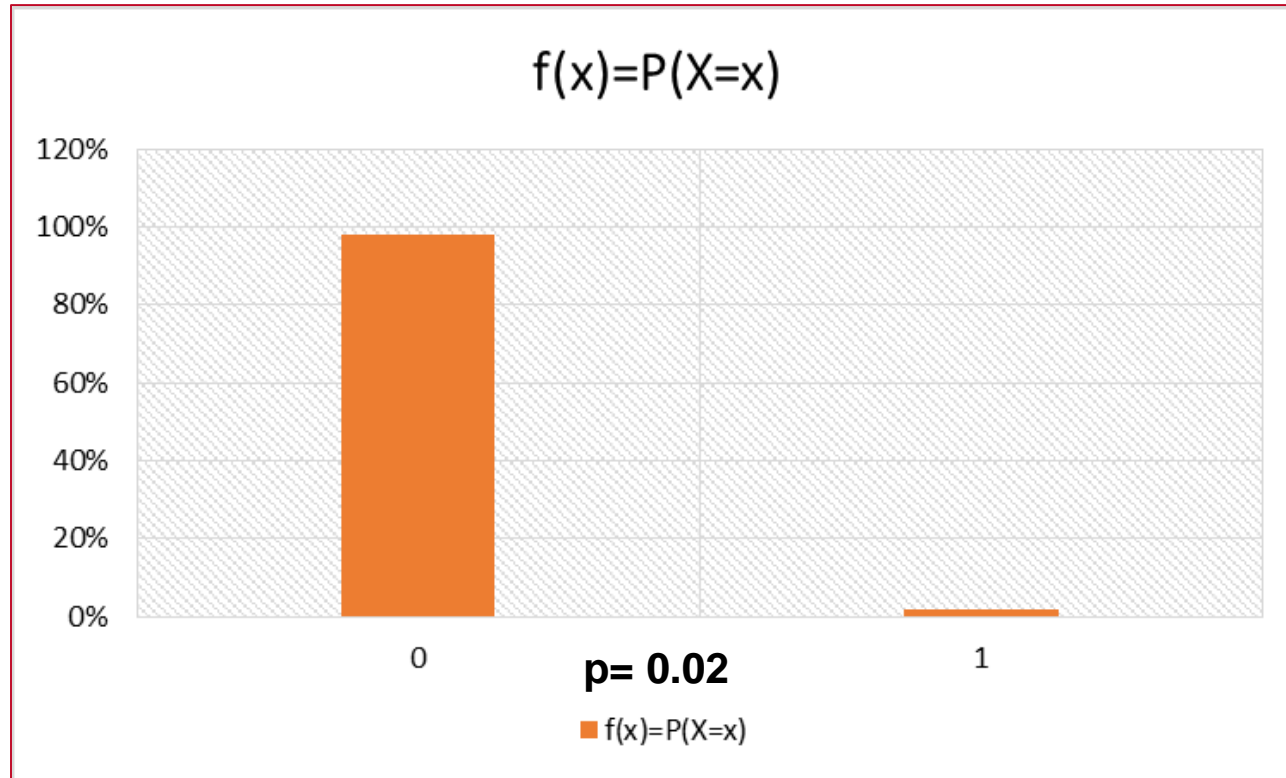
Tiras reactivas: (A) Positivo a antibióticos β -lactámicos, (B) Positivo a antibióticos sulfonamidas y (C) Positivo a antibióticos tetraciclinas.



	Ronda 1	Ronda 2	Ronda 3
Positivo	5	2	3
Negativo	188	191	190

Antibióticos β -lactámicos, tetraciclinas y sulfonamidas

Gráfico de barras de la función de masa de la distribución de Bernoulli para la detección de ANT1



Variable aleatoria	Función de masa
X	$f(x)=P(X=x)$
0	98%
1	2%

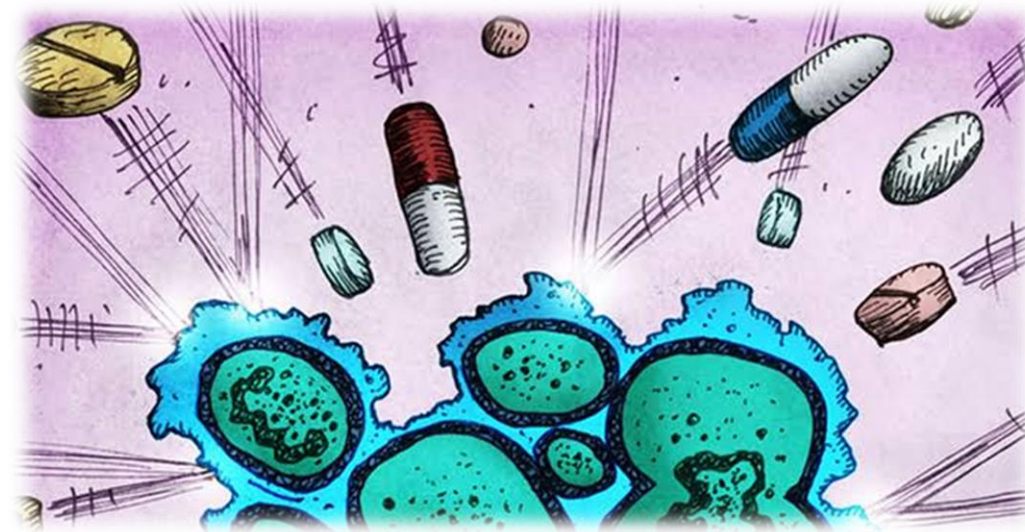
Aroca et al., 2016:
19.4% de muestras
positivas para
antibióticos (78.6%)
y (21.4%)

Antibióticos aminoglucósidos

El kit 3 Aminosenor no detectó la presencia de Neomicina, Dihydro-o-estreptomicina y gentamicina



Prueba de ANT2 negativa



**RAM: Resistencia anti
microbiana**

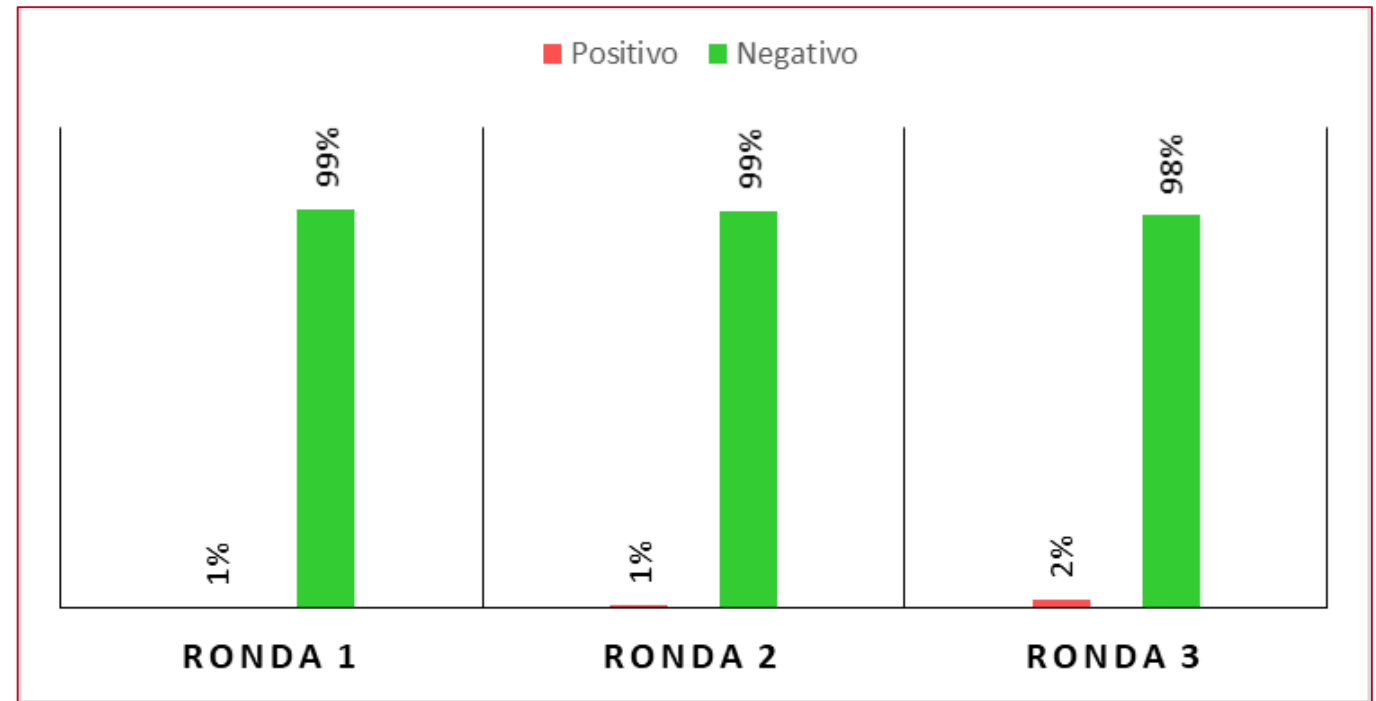
Neutralizantes alcalinos

Porcentaje de resultados obtenidos en la prueba de detección de neutralizantes alcalinos en leche cruda de la provincia de Chimborazo



(A) Resultado positivo

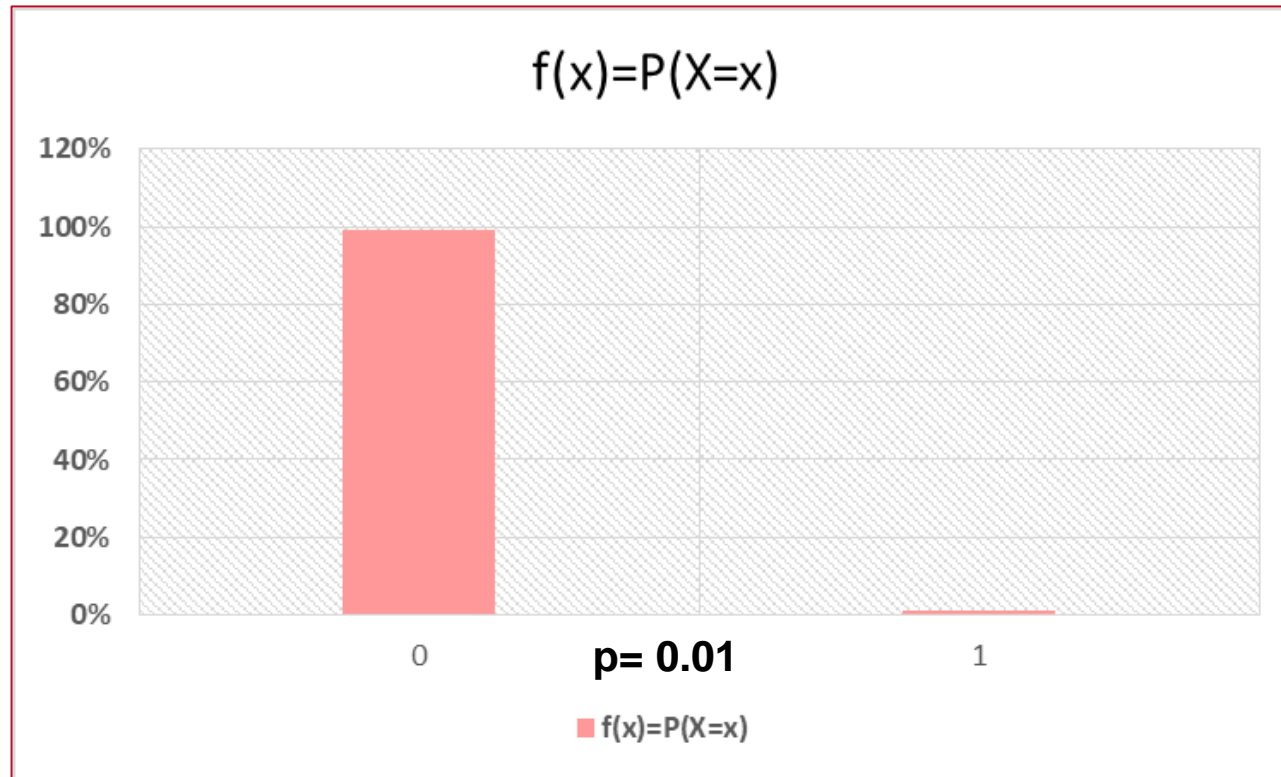
(B) Resultado negativo



	Ronda 1	Ronda 2	Ronda 3
Positivo	1	2	4
Negativo	192	191	189

Neutralizantes alcalinos

Gráfico de barras de la función de masa de la distribución de Bernoulli para la detección de neutralizantes alcalinos

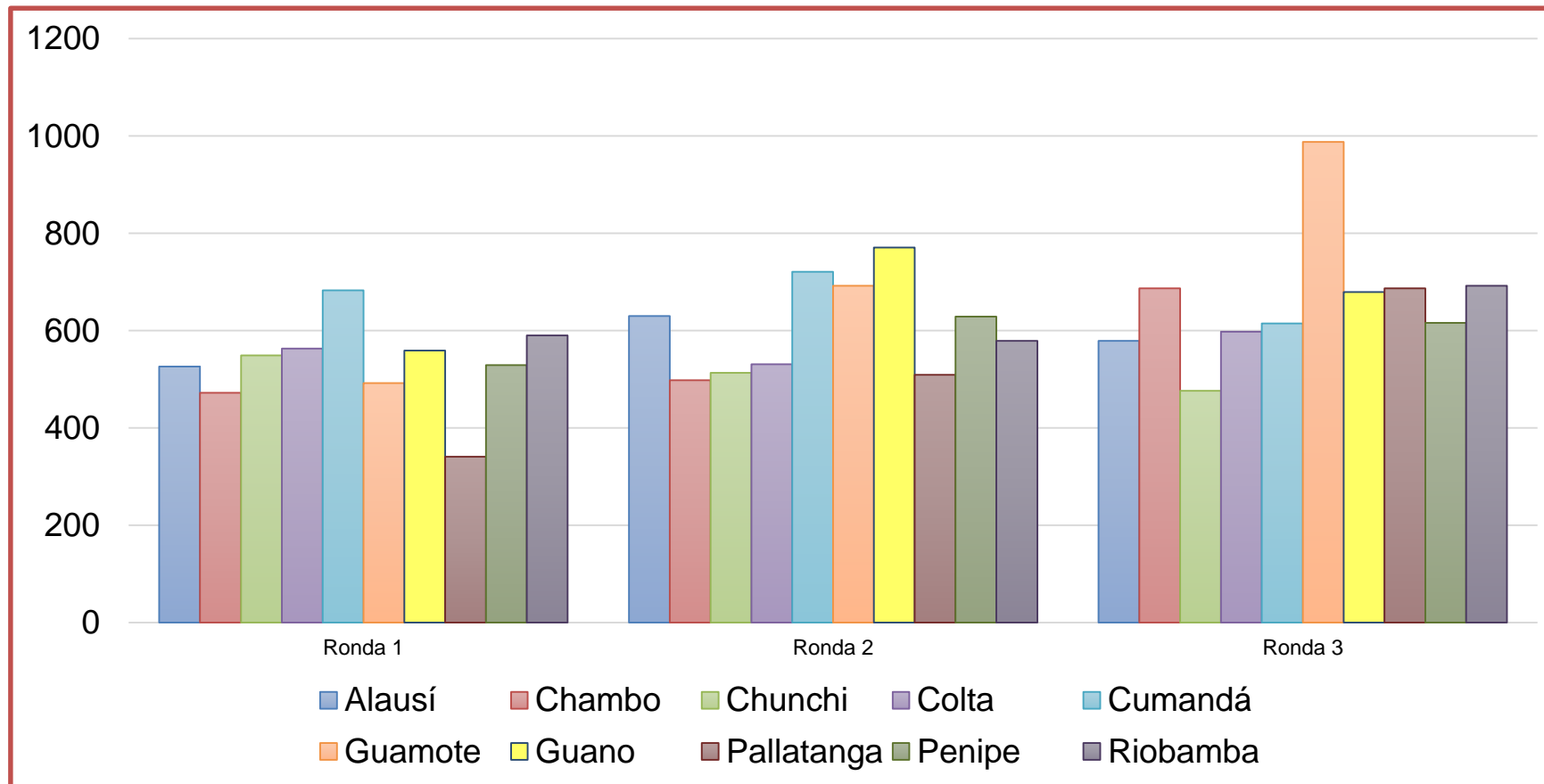


Variable aleatoria	Función de masa
X	$f(x) = P(X=x)$
0	99%
1	1%

Cromatografía líquida
pH: 6.5 – 6.7

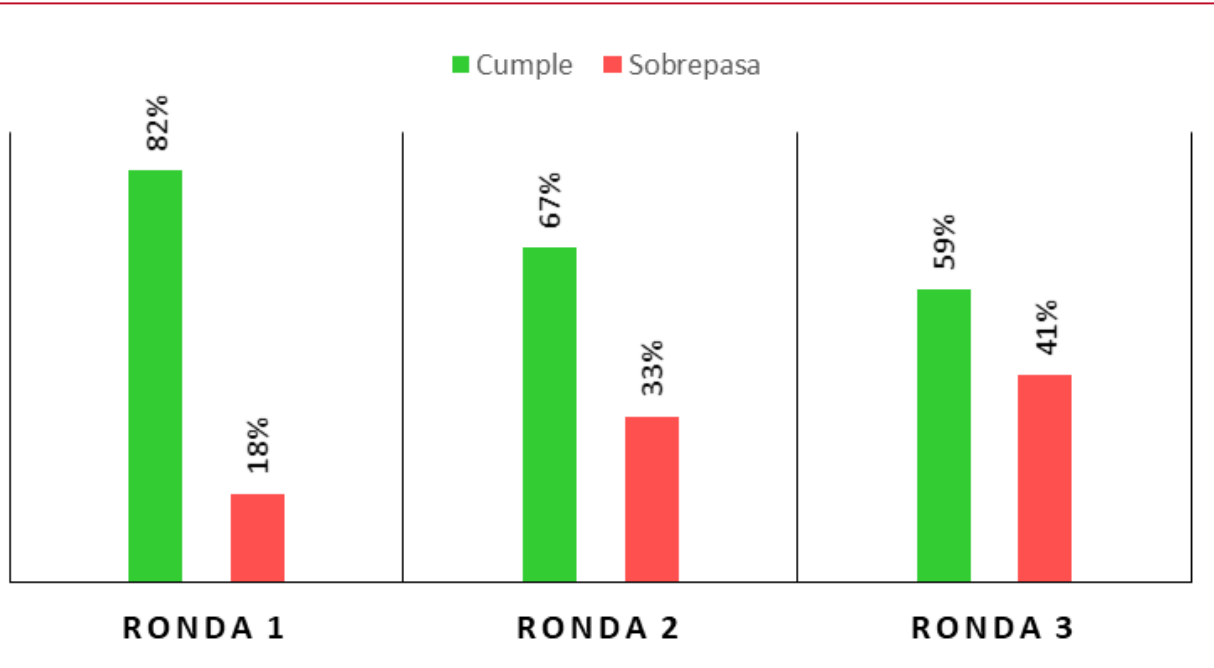
Conteo de células somáticas

Promedio del conteo de células somáticas x1000/cm³ presentes en leche cruda en cada cantón de la provincia



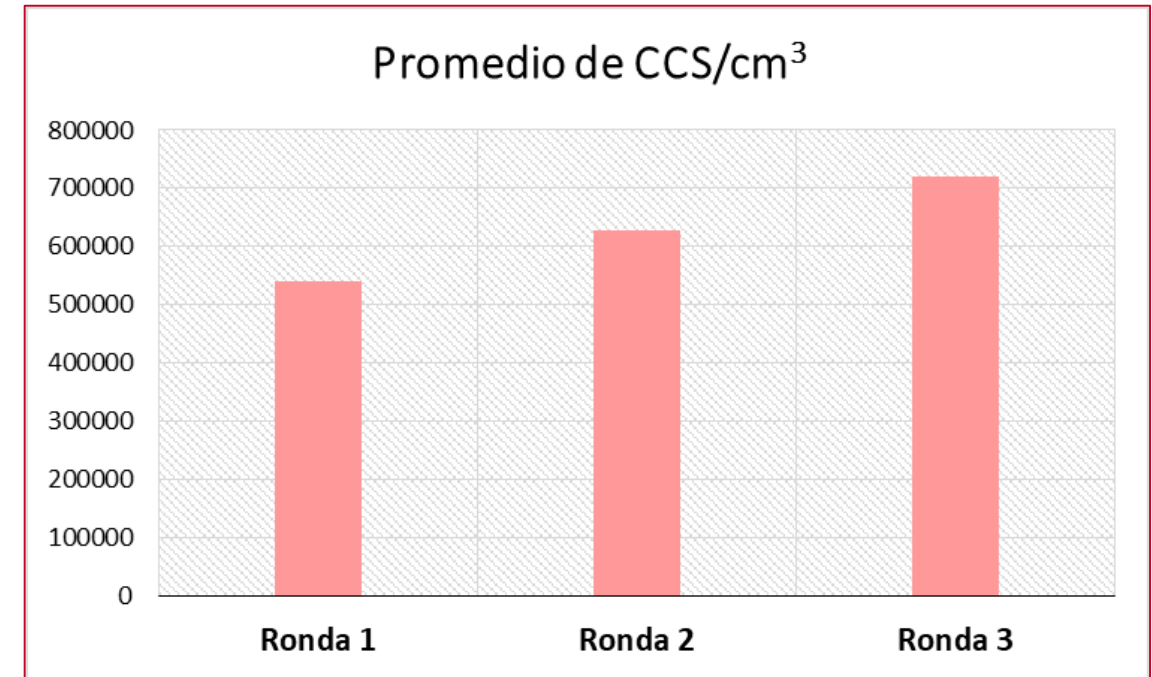
Conteo de células somáticas

Porcentaje de cumplimiento de conteo de células somáticas/cm³ presentes en leche cruda de la provincia de Chimborazo



Límite máximo permisible: 700mil células por cm³

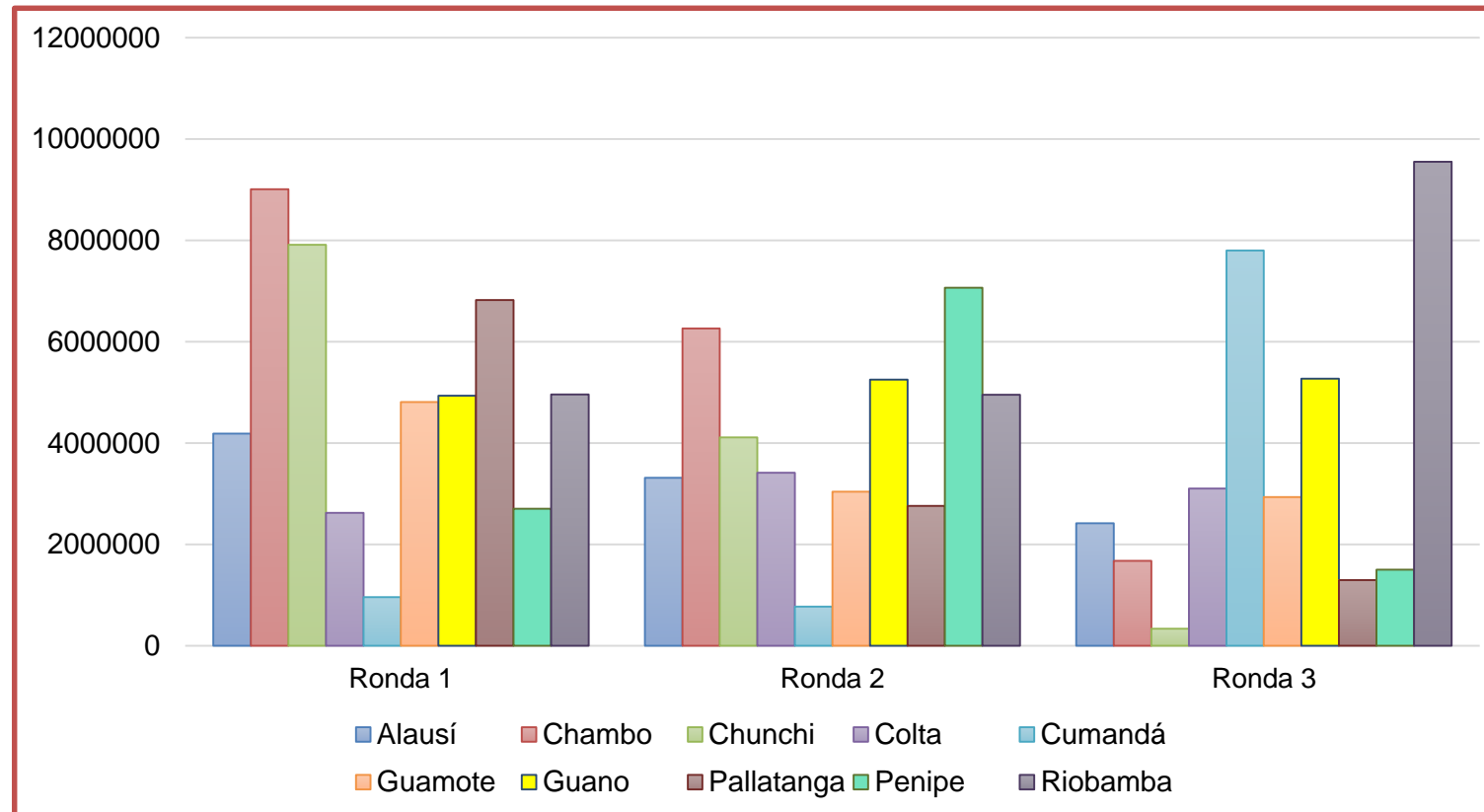
Gráfico de barras del promedio de células somáticas presentes en leche cruda de la provincia de Chimborazo



El CCS promedio para cada ronda fueron: 541503 CCS/cm³, 627549 CCS/cm³ y 719575 CCS/cm³ respectivamente.

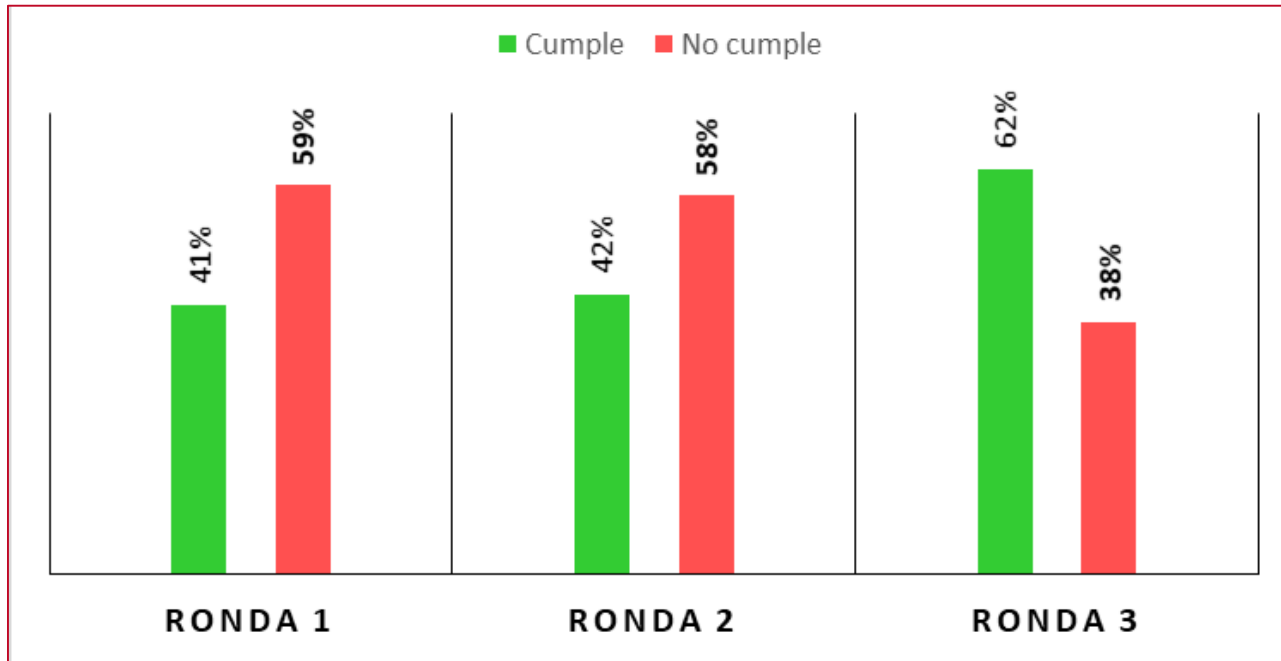
Conteo de bacterias totales

Promedio del conteo de bacterias totales (UFC/cm³) presentes en leche cruda en cada cantón de la provincia



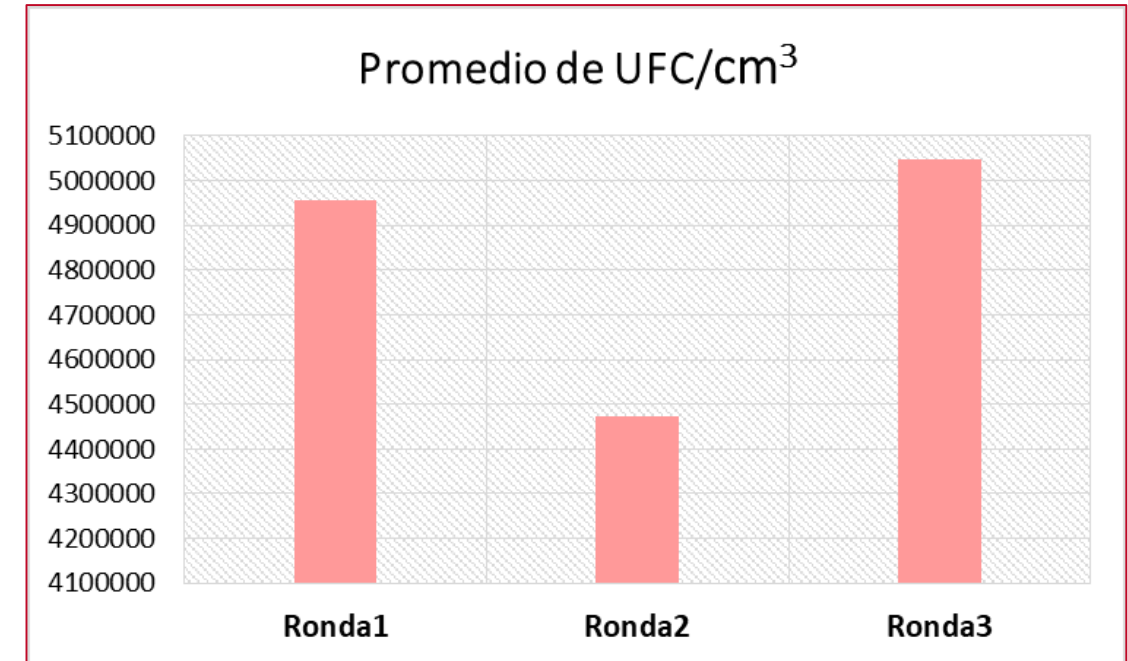
Conteo de bacterias totales

Porcentaje de cumplimiento de conteo de bacterias totales (UFC)/cm³ presentes en leche cruda de la provincia de Chimborazo



Límite máximo permisible: 1.5 millones de UFC/cm³

Gráfico de barras del promedio de bacterias totales presentes en leche cruda de la provincia de Chimborazo



El CBT promedio para cada ronda fueron: 4956380 UFC/cm³, 4474224 UFC/cm³ y 5047652 UFC/cm³ respectivamente.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- El 82% de las muestras recolectadas presentaron estabilidad proteica según la NTE (normativa técnica ecuatoriana) INEN 9:2012, mientras que la acidez (% de ácido láctico) se encuentra, en promedio, dentro de los límites permisibles (0.13 - 0.17) según la misma normativa. El pH no tiene un rango establecido dentro de la NTE INEN 9:2012; sin embargo, en promedio está dentro del rango (6.6 - 6.8) señalado por el Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera de la Junta de Andalucía (López et al., 2015).
- La contaminación por adulterantes como neutralizantes alcalinos y cloruros fue mínima: el 1% de muestras dieron resultados positivos, mientras que la presencia de peróxidos fue nula. De aquí se infiere (valor- $p < 0.0001$) que estas sustancias fraudulentas no fueron añadidas a la leche cruda de los centros de acopio e industrias lácteas de la provincia de Chimborazo; por lo tanto, hay un cumplimiento de la NTE INEN 9:2012.
- La presencia de Aflatoxina M1 y ANT2 no fueron detectadas en este estudio, mientras que el 2% de las muestras analizadas dieron un resultado positivo para ANT1. La nula presencia de Aflatoxina M1 se puede asociar con la dieta del ganado vacuno de la provincia. Los resultados de las pruebas de antibióticos evidencian que el ganado no está siendo tratado con antibióticos y en otros casos se está respetando los tiempos de retiro de la leche cruda. En estos parámetros se cumple con la NTE INEN 9:2012.

- Los resultados del conteo de células somáticas indican que en promedio las muestras de leche analizadas se encuentran por debajo del límite máximo permisible en las dos primeras rondas, mientras que en la tercera ronda (719575 CCS/cm^3) está por encima del límite máximo (7×10^5). El conteo de bacterias totales sobrepasa el límite máximo permitido por a NTE INEN 9:2012 ($1.5 \times 10^6 \text{ UFC/cm}^3$) en las tres rondas de muestreo. Esto nos indica que la carga bacteriana es muy elevada y representa un riesgo para la salud el consumo de la leche sin ser sometida a procesos de pasteurización.
- Se puede concluir a través de los parámetros analizados que la leche cruda distribuida en centros de acopio e industrias lácteas de la provincia de Chimborazo no es inocua porque no todos los parámetros se ajustan a lo establecido en la NTE INEN 9:2012.

- Realizar trabajos de investigación que tomen como referencia un solo cantón de la provincia y así poder analizar más a fondo la realidad del sector productivo de leche cruda del cantón y sus respectivas parroquias.
- Realizar un estudio que abarque únicamente como parámetros: acidez (% de ácido láctico), conteo de células somáticas y bacterias totales, para obtener la información necesaria que relacione dichos parámetros y su relación en casos de mastitis en la provincia de Chimborazo.
- Que AGROCALIDAD continúe dando capacitaciones acerca de las buenas prácticas de ordeño, manejo y transporte adecuado de leche cruda.



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



AGROCALIDAD
AGENCIA DE REGULACIÓN Y
CONTROL FITO Y ZOOSANITARIO



Romero Saker, Pedro José Rachid Ing.-Mat.
Director de Proyecto

Ing. Ramiro Germán Jaramillo Bayas M. Sc.
Dr. Vinicio Javier Llerena Céspedes M. Sc.
Ing. Carlos Osvaldo Mancheno Donoso

Lic. Alma Rosel Koch Kaiser M. Sc.
A mi familia y amigos.

