



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

Laminia Cali, Evelin Tatiana

Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Ing. Romero Saker, Pedro José Rachid

01 de agosto del 2022

Resultado de análisis de COPYLEAKS



Evelin Laminia-Manuscrito.docx

Scanned on: 17:56 August 1, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	321
Words with Minor Changes	29
Paraphrased Words	902
Omitted Words	308



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de titulación denominado: **“Evaluación de la inocuidad de la leche cruda en centros de acopio e industrias lácteas de la provincia de Chimborazo”** fue realizado por la señorita **Laminia Cali, Evelin Tatiana**; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 01 de agosto del 2022

Firma:

Ing.-Mat. Romero Saker, Pedro José Rachid

CC: 1304522962



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de autoría

Yo, **Laminia Cali, Evelin Tatiana**, con cédula de ciudadanía n° 0604092908, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“Evaluación de la inocuidad de la leche cruda en centros de acopio e industrias lácteas de la provincia de Chimborazo”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 01 de agosto del 2022

Firma:

Laminia Cali, Evelin Tatiana

CC: 0604092908



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de publicación

Yo **Laminia Cali, Evelin Tatiana**, con cédula de ciudadanía n° 0604092908, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **“Evaluación de la inocuidad de la leche cruda en centros de acopio e industrias lácteas de la provincia de Chimborazo”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 01 de agosto del 2022

Firma:

Laminia Cali, Evelin Tatiana

CC: 0604092908

Dedicatoria

A Dios en primer lugar, por concederme el don de la vida y permitirme culminar esta etapa de mi vida
rodeada de mi amada familia.

Al Jesucristo por ser mi señor y salvador, mi guía y soporte en los momentos difíciles.

A mi madre, por ser mi mayor ejemplo de valentía y amor incondicional. Mami eres el más grande tesoro que tengo en la vida, gracias por no darte por vencida y ser el pilar fundamental de este logro.

A mi padre, por su apoyo y fortaleza. Por mostrarme que la única batalla que se pierde es la que no se
lucha.

A mi segunda madre María Tránsito Gusqui, mi adorada “vejita”. Tu amor y acompañamiento durante
toda mi vida han sido el regalo más hermoso e inesperado que Dios me concedió.

A mis hermanos Russvelth Adrian y Antony Ariel, por ser mis mejores amigos y confidentes; por secar
mis lágrimas y dibujar una sonrisa en mi rostro cada día.

A mis abuelitos y a mi tío Manuel Cali Llamuca, que están en el cielo y sé que desde donde están me
acompañan. Siempre estarán en mi mente y en mi corazón.

Agradecimientos

A Dios por haberme permitido recorrer todo este camino en compañía de mis seres amados e iluminarme en los momentos más oscuros.

A mis padres por apoyarme en cada uno de mis proyectos, por no limitarme e impulsarme a cumplir mis sueños.

A mi madre, a pesar de la distancia que nos separaba a través de tus llamadas podía sentir tu amor y apoyo en los momentos difíciles. Gracias por tu fortaleza y por tus oraciones. Tu nobleza y bondad marcaron mi vida y me hicieron la persona que soy. Tu sonrisa me acaricia el alma y tus abrazos me reconfortan, eres mi lugar feliz.

A mi padre, por ser ese guerrero que sin importar las circunstancias siempre está luchando. Gracias por enseñarme a caminar por el sendero de la vida y mostrarme que a pesar de las caídas hay que aprender a levantarse y seguir adelante.

A mi mami María Tránsito, por haber dejado todo atrás y acompañarme durante mi vida universitaria, me consolaste cuando más lo necesité y en los momentos alegres reímos juntas. No existen las palabras suficientes para expresar lo que tu amor y compañía significaron para mí.

A Russvelth Adrian, gracias por ser tan bondadoso, eres la prueba que una persona con un carácter fuerte puede tener el corazón más noble y dulce. Gracias por ser la persona menos individualista que conozco, por priorizar el bien común antes que el propio. Te mereces lo mejor del mundo hermano.

A Antony Ariel, mi hermanito menor. Te agradezco por los momentos que hemos vivido, me alegras la vida desde el día que naciste, me motivas a seguir adelante y me enseñas a reírme de mi

misma, me encanta tu actitud ante la vida, tu facilidad para buscarle una solución a todo y si no existe solución pasas página y sigues adelante.

A mi alma máter, la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, por acogerme en sus aulas para mi formación profesional.

A todos mis profesores, gracias por transmitirme sus conocimientos y ayudarme a mi formación profesional y personal. Especialmente a la Dra. Blanca Naranjo, porque además de ser una excelente profesora, me brindó su amistad.

A la Dra. Alma Koch por apoyarme cuando este proyecto apenas comenzaba.

Al director de este proyecto: Ing. Pedro Romero Saker, por su apoyo incondicional y su amistad. Gracias por sus enseñanzas y su paciencia durante el desarrollo de este trabajo de titulación.

A la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario Dirección Distrital 8 Tipo B Chimborazo (AGROCALIDAD) por abrirme sus puertas para el desarrollo de mis prácticas pre-profesionales y de mi trabajo de titulación.

Al Ing. Ramiro Jaramillo, codirector de este trabajo y coordinador del área de Inocuidad de los Alimentos de la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario Dirección Distrital 8 Tipo B Chimborazo (AGROCALIDAD) por darme la oportunidad de desarrollar este proyecto, gracias por orientarme con sus conocimientos.

Al Dr. Vinicio Llerena e Ing. Carlos Mancheno, técnicos del área de Inocuidad de los Alimentos, por su paciencia y apoyo incondicional durante la toma de muestras de leche cruda.

A mis amigos y compañeros, por todos los momentos que compartimos en esta etapa universitaria.

Índice

Resultado de análisis de COPYLEAKS	2
Certificación	3
Responsabilidad de autoría.....	4
Autorización de publicación.....	5
Dedicatoria	6
Agradecimientos.....	7
Índice de Tablas	13
Índice de Figuras	15
Listado de Abreviaturas	18
Resumen.....	19
Abstract	20
Capítulo 1: Introducción	21
Formulación del problema	21
Justificación del problema	22
Objetivos de la investigación	23
<i>Objetivo General</i>	23
<i>Objetivos Específicos</i>	23
Hipótesis	24
Marco Teórico.....	24
Leche cruda.....	24

	10
<i>Características</i>	25
Inocuidad de la leche	25
<i>Leche alterada</i>	26
<i>Leche adulterada</i>	26
Parámetros de evaluación	26
<i>Estabilidad proteica</i>	26
<i>pH</i>	27
<i>Acidez</i>	28
<i>Aflatoxina M1</i>	29
<i>Cloruros</i>	29
<i>Peróxido de hidrógeno</i>	30
<i>Antibióticos</i>	30
<i>Neutralizantes alcalinos</i>	31
<i>Células somáticas</i>	31
<i>Bacterias totales</i>	32
Provincia de Chimborazo	33
Capítulo 2: Materiales y Métodos.....	34
Toma de muestras	34
Determinación de estabilidad proteica	34
Determinación de pH y acidez mediante potenciómetro	35

Determinación de Aflatoxina M1	35
Determinación de peróxidos.....	37
Antibióticos en leche cruda.....	38
<i>Determinación de antibióticos β-lactámicos, Tetraciclinas y Sulfamidas</i>	38
<i>Determinación de antibióticos aminoglucósidos</i>	38
Análisis estadístico	40
Capítulo 3: Resultados	41
Estabilidad proteica	42
pH	45
Acidez	47
Aflatoxina M1	49
Cloruros	49
Peróxidos	52
Antibióticos β -lactámicos, tetraciclinas y sulfas.....	53
Antibióticos aminoglucósidos	56
Neutralizantes alcalinos.....	56
Células somáticas.....	59
Bacterias totales	61
Capítulo 4: Discusión.....	63
Capítulo 5: Conclusiones.....	70

Capítulo 6: Recomendaciones.....	72
Capítulo 7: Bibliografía.....	72
Capítulo 8: Apéndices	82

Índice de Tablas

Tabla 1 Parámetros de evaluación, criterios y límites permisibles según la Norma Técnica Ecuatoriana 9:2012.....	33
Tabla 2 Tabla de contingencia de centros de acopio e industrias lácteas de la provincia de Chimborazo.	41
Tabla 3 Volumen (L) de leche cruda acopiada y procesada diariamente en los cantones de la provincia de Chimborazo.....	42
Tabla 4 Resultados obtenidos en la ronda 1 para la prueba de estabilidad proteica.....	43
Tabla 5 Resultados obtenidos en la ronda 2 para la prueba de estabilidad proteica.....	43
Tabla 6 Resultados obtenidos en la ronda 3 para la prueba de estabilidad proteica.....	44
Tabla 7 Resultados obtenidos en la provincia de Chimborazo para la prueba de estabilidad proteica. ...	45
Tabla 8 Promedio de pH de leche cruda calculado por cantón de la provincia de Chimborazo.....	46
Tabla 9 Promedio de acidez (% de ácido láctico) de leche cruda en cada cantón de la provincia de Chimborazo.....	48
Tabla 10 Resultados obtenidos en la ronda 1 para la prueba de cloruros.	50
Tabla 11 Resultados obtenidos en la ronda 3 para la prueba de cloruros.	50
Tabla 12 Resultados obtenidos en la provincia de Chimborazo para la prueba de cloruros.....	51
Tabla 13 Resultados obtenidos en la ronda 1 para la prueba de detección de ANT1.	53
Tabla 14 Resultados obtenidos en la ronda 2 para la prueba de detección de ANT1.	54
Tabla 15 Resultados obtenidos en la ronda 3 para la prueba de detección de ANT1.	54
Tabla 16 Resultados obtenidos en la provincia de Chimborazo para la prueba de detección de ANT1....	55

Tabla 17 Resultados obtenidos en la ronda 1 para la prueba de detección de neutralizantes alcalinos. .	57
Tabla 18 Resultados obtenidos en la ronda 2 para la prueba de detección de neutralizantes alcalinos. .	57
Tabla 19 Resultados obtenidos en la ronda 3 para la prueba de detección de neutralizantes alcalinos. .	57
Tabla 20 Resultados obtenidos en la provincia de Chimborazo para la prueba de detección de neutralizantes alcalinos.	58
Tabla 21 Promedio de conteo de células somáticas/cm ³ presentes en leche cruda en cada cantón de la provincia de Chimborazo.	60
Tabla 22 Promedio de bacterias totales presentes en muestras de leche cruda (UFC/cm ³) en cada cantón de la provincia de Chimborazo.....	62

Índice de Figuras

Figura 1 Mapa de la provincia de Chimborazo.....	34
Figura 2 Interpretación de resultados del kit Aflasensor.....	36
Figura 3 Escala de colores del kit QUANTOFIX Cloruro.....	36
Figura 4 Escala de colores del kit QUANTOFIX™ Peróxidos.....	37
Figura 5 Interpretación de resultados del kit Trisensor.....	38
Figura 6 Interpretación de resultados del kit Aminosenor.....	39
Figura 7 Gráfico de barras del volumen (L) de leche cruda acopiada y procesada diariamente en los cantones de la provincia.....	42
Figura 8 Positivo a prueba de estabilidad proteica.....	43
Figura 9 Porcentaje de resultados obtenidos en la prueba de estabilidad proteica.....	44
Figura 10 Gráfico de barras de la función de masa de la distribución de Bernoulli para estabilidad proteica.....	45
Figura 11 Porcentaje de cumplimiento del parámetro pH en leche cruda en la provincia de Chimborazo.....	46
Figura 12 Gráfico de barras del promedio de pH de leche cruda de la provincia de Chimborazo.....	47
Figura 13 Porcentaje de cumplimiento del parámetro acidez (% de ácido láctico) en leche cruda en la provincia de Chimborazo.....	48
Figura 14 Gráfico de barras del promedio de acidez (% de ácido láctico) de leche cruda de la provincia de Chimborazo.....	49
Figura 15 Tira reactiva del kit Aflasensor indicando un resultado negativo.....	49

Figura 16 Tira colorimétrica del kit QUANTOFIX Cloruro.	50
Figura 17 Porcentaje de resultados obtenidos en la prueba de cloruros en leche cruda en la provincia de Chimborazo.....	51
Figura 18 Gráfico de barras de la función de masa de la distribución de Bernoulli para la presencia de cloruros en muestras de leche cruda.	52
Figura 19 Tira colorimétrica del kit QUANTOFIX Peróxidos indicando un resultado negativo.	52
Figura 20 Tiras reactivas del kit de antibióticos β -lactámicos, tetraciclinas y sulfamidas.	53
Figura 21 Porcentaje de resultados obtenidos de la prueba de ANT1 en leche cruda de la provincia de Chimborazo.....	54
Figura 22 Gráfico de barras de la función de masa de la distribución de Bernoulli para la detección de ANT1.	55
Figura 23 Tira reactiva del kit 3 Aminosensores.	56
Figura 24 Análisis para determinar la presencia de neutralizantes alcalinos en leche cruda.....	56
Figura 25 Porcentaje de resultados obtenidos en la prueba de detección de neutralizantes alcalinos en leche cruda de la provincia de Chimborazo.	58
Figura 26 Gráfico de barras de la función de masa de la distribución de Bernoulli para la detección de neutralizantes alcalinos.	59
Figura 27 Porcentaje de cumplimiento de conteo de células somáticas/cm ³ presentes en leche cruda de la provincia de Chimborazo.	60
Figura 28 Gráfico de barras del promedio de células somáticas/cm ³ presentes en leche cruda de la provincia de Chimborazo.	61

Figura 29 Porcentaje de cumplimiento de conteo bacterias totales UFC/cm³ presentes en leche cruda de la provincia de Chimborazo. 62

Figura 30 Gráfico de barras del promedio de bacterias totales presentes en leche cruda de la provincia de Chimborazo..... 63

Listado de Abreviaturas

NTE: Normativa Técnica Ecuatoriana

INEN: Instituto Ecuatoriano de Normalización

CA: Centro de acopio

IL: Industria láctea

L: litro

mL: mililitro

μL: microlitro

cm³: centímetro cúbico

kg: kilogramo

μg: microgramo

ANT1: antibióticos betalactámicos, sulfas y tetraciclinas)

ANT2: antibióticos aminoglucósidos

Neut.: Neutralizantes alcalinos

LMR: Límite máximo de residuos

CCS: Conteo de células somáticas

CBT: Conteo de bacterias totales

IBC: Conteo individual de bacterias

UFC: Unidad formadora de colonias

Resumen

La leche de vaca es un alimento con un alto valor nutricional, tiene una alta demanda pues es empleada en la industria láctea como materia prima para la elaboración de quesos, yogurt, mantequilla, manjar y otros derivados. A la leche cruda en ocasiones le adicionan sustancias para enmascarar los cambios que ocurren en su composición normal a causa de un manejo no apropiado en la cadena de producción. La adición de estas sustancias o adulterantes disminuyen el valor nutricional de la leche y representan un riesgo para la salud pública. La Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario (AGROCALIDAD) se encarga de vigilar y controlar la inocuidad de la leche cruda que se encuentra distribuida en los centros de acopio e industrias lácteas del territorio ecuatoriano. Este trabajo de investigación consistió en evaluar la inocuidad de la leche cruda distribuida en veintiocho centros de acopio y ciento sesenta y cinco industrias lácteas de la provincia de Chimborazo, a través de diez parámetros: estabilidad proteica, pH, acidez (% de ácido láctico), antibióticos, Aflatoxina M1, peróxido de hidrógeno, neutralizantes alcalinos, cloruros, células somáticas y bacterias totales. Se analizaron 593 muestras, de las cuales el 82% no presentaron reacción al aplicar la prueba de estabilidad proteica, el 48% presentó pH normal, el 80% presentó acidez dentro de los límites permisibles, en el 98% no se detectó la presencia de antibióticos, no se detectó la presencia de Aflatoxina M1 y peróxido de hidrógeno, la presencia de neutralizantes alcalinos y cloruros no se detectó en el 99% de muestras, en el 69% de muestras se obtuvo un número de células somáticas por debajo del límite máximo (7.0×10^5 células somáticas/cm³) y en el 48% de muestras se obtuvo un número de bacterias totales por debajo del límite máximo (1.5×10^6 UFC/cm³).

Palabra clave: leche cruda, inocuidad, adulterante, centro de acopio, industria láctea.

Abstract

Cow's milk is a food with a high nutritional value and is in high demand because it has been using in the dairy industry as a raw material for the production of cheese, yogurt, butter, butter and other derivatives. Sometimes substances have added to raw milk to mask the changes that occur in its normal composition due to improper handling in the production chain. The addition of these substances or adulterants reduces the nutritional value of milk and represents a risk to public health. The Agency for Phytosanitary and Zoosanitary Regulation and Control (AGROCALIDAD) is responsible for monitoring and controlling the safety of raw milk distributed in collection centers and dairies in Ecuador. This research work consisted of evaluating the safety of raw milk distributed in twenty-eight collection centers and one hundred and sixty-five dairy industries in the province of Chimborazo, through ten parameters: protein stability, pH, acidity (% lactic acid), antibiotics, Aflatoxin M1, hydrogen peroxide, alkaline neutralizers, chlorides, somatic cells and total bacteria. A total of 593 samples were analyzed, of which 82% showed no reaction when applying the protein stability test, 48% showed normal pH, 80% showed acidity within the permissible limits, 98% did not detect the presence of antibiotics, the presence of Aflatoxin M1 and hydrogen peroxide was not detected, the presence of alkaline neutralizers and chlorides was not detected in 99% of samples, in 69% of samples the number of somatic cells was below the maximum limit (7.0×10^5 somatic cells/cm³) and in 48% of samples the number of total bacteria was below the maximum limit (1.5×10^6 CFU/cm³).

Keyword: raw milk, safety, adulterant, collection center, dairy industry.

Capítulo 1: Introducción

Formulación del problema

En Ecuador existen aproximadamente 294000 productores de leche y se producen al día 6.15 millones de litros de leche, según cifras del 2020 de la Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria (ESPAC) (El Universo, 2021). La provincia de Chimborazo produce aproximadamente 436 mil litros de leche por día (Ministerio de Agricultura y Ganadería [MAG], 2020).

El fraude alimentario representa un riesgo constante a nivel mundial, principalmente en países en desarrollo (Azad & Ahmed, 2016). Un producto está adulterado cuando su composición es diferente a lo que se ofrece, se le han agregado sustancias químicas o ha sido sometido a procesos físicos que oculten su alteración (Reyes et al., 2007). La leche es uno de los alimentos que se puede adulterar con la adición de agua, suero, neutralizantes alcalinos, peróxidos y cloruros. Todo esto con fines económicos que desencadena una competencia desleal y problemas de salud a corto y largo plazo en los consumidores de leche adulterada y sus derivados (Azad & Ahmed, 2016).

La leche reúne las características nutricionales necesarias para ser incluida en nuestra dieta, además de ser un caldo de cultivo para una gran variedad de microorganismos, por lo que su producción y posterior distribución en el mercado son muy importantes en las estrategias de control y vigilancia de la seguridad alimentaria en muchos países (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO], 2021). El estudio microbiológico de la leche es esencial para descartar una posible contaminación con microorganismos patógenos o sus toxinas, capaces de provocar enfermedades en el consumidor (Servicio de Acreditación Ecuatoriano [SAE], 2018).

El conteo de bacterias totales (CBT) y el conteo de células somáticas (CCS) son pruebas importantes para evaluar la inocuidad de la leche. Un número elevado de bacterias psicrotróficas en la leche cruda evidencian la presencia de enzimas termoestables: proteasas y lipasas, capaces de resistir a

los procesos de pasteurización y causantes de la descomposición de las proteínas y grasas de la leche pasteurizada, influyendo directamente en su tiempo de vida útil (Barbano et al., 2006).

Los antibióticos y aflatoxina M1 son contaminantes que pueden encontrarse en la leche vacuna en cantidades necesarias para que su ingesta represente un riesgo para la salud, desencadenando reacciones alérgicas, intoxicación, alteración en la flora intestinal, carcinogénesis e inhibir la síntesis de vitaminas (de Arbo et al., 2020).

Justificación del problema

La leche es una bebida rica en proteínas, grasas, calcio, magnesio y otros nutrientes que le dan las características para jugar un rol muy importante en la dieta de los seres humanos. En poblaciones con acceso limitado a otros alimentos con altos valores nutricionales, su ingesta resulta ideal para suplir la deficiencia grasas y proteínas. Las características del animal lechero, dieta, medio ambiente y época del año, influyen en las cualidades organolépticas y en la composición de la leche (FAO, 2021).

Los productos finales de la cadena de producción de la industria láctea están directamente ligados a la calidad e inocuidad de la leche cruda. La adición de sustancias adulterantes a la leche representa un problema para la industria láctea, pues generan pérdidas económicas debido a la baja calidad de los productos obtenidos, además de afectar la salud de los consumidores (Das et al., 2011). Por ejemplo: los quesos elaborados con leche cruda proveniente de vacas con mastitis tienen problemas de coagulación y su tiempo de vida útil disminuye (Ferraro, s.f.).

El uso de adulterantes en leche cruda tiene como motivación disfrazar su alteración a causa de la ausencia de buenas práctica de ordeño (BPO), deficiencia en su almacenamiento y transporte. Entre las adulteraciones más comunes se encuentran la adición de agua, suero de leche, compuestos nitrogenados (urea o melanina), peróxido de hidrógeno, cloruros, grasas animales o vegetales. Esto deriva en un fraude económico y alimentario (Das et al., 2015).

El conteo de células somáticas y bacterias totales son parámetros que sirven para determinar la inocuidad de la leche cruda. Los microorganismos psicrótróficos producen enzimas que deterioran la leche y los productos lácteos pasteurizados (Tatini & Kauppi, 2002). En casos de mastitis existe un elevado número de células somáticas que fagocitan a los agentes patógenos y reducen la vida útil de la leche y sus derivados (Calderón et al., 2011).

El área de Inocuidad de los Alimentos de la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario Dirección Distrital 8 Tipo B Chimborazo (AGROCALIDAD) realiza constantes operativos con el objetivo de controlar y vigilar la calidad e inocuidad de la leche cruda distribuida en centros de acopio e industrias lácteas de la provincia, precautelando la salud de la población y garantizando que las industrias lácteas y centros de acopio cuenten con la materia prima adecuada para la elaboración de alimentos.

Objetivos de la investigación

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 norma NTE INEN 9:2012.
- Determinar la presencia de Aflatoxina M1, cloruros, peróxidos, antibióticos y neutralizantes alcalinos en muestras de leche cruda, con base en la norma NTE INEN 9:2012.
- Establecer el número de células somáticas y bacterias totales en muestras de leche cruda, con base en la norma NTE 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 norma NTE INEN 9:2012, utilizada por la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario (AGROCALIDAD).

Marco Teórico

Leche cruda

La leche es un fluido secretado por los mamíferos hembras para alimentar a las crías desde su nacimiento y durante los primeros meses de vida (Mercado et al., 2014). La leche de vaca es un fluido que reúne las características necesarias para formar parte de la dieta de los seres humanos. Está constituida de grasas, proteínas, minerales, vitaminas, lactosa, entre otros elementos (Wattiaux, 2014). Además posee microorganismos que influyen en su sabor, color y textura (Quigley et al., 2013).

La leche cruda es un líquido cuyo valor nutritivo es invaluable, sin embargo debe ser sometida a tratamientos térmicos antes de ser segura para el consumo humano. Durante la cadena de producción puede sufrir cambios en sus características organolépticas, fisicoquímicas y microbiológicas. Además que pueden existir compuestos químicos y residuos biológicos ajenos a su composición: antibióticos, pesticidas, metales pesados, entre otros (González et al., 2010).

La NTE 9:2012 define a la leche cruda como: “leche que no ha sido sometida a ningún tipo de calentamiento, es decir su temperatura no ha superado la de la leche inmediatamente después de ser extraída de la ubre (no más de 40°C)” (Servicio Ecuatoriano de Normalización: Norma Técnica Ecuatoriana 9:2012 [NTE INEN 9:2012], 2012).

Características

La leche cruda debe tener un color blanco opalescente o ligeramente amarillento, un olor lácteo suave, además su aspecto debe ser homogéneo, libre de materias extrañas (NTE INEN 9:2012, 2012).

Fuentes de contaminación

La leche puede contaminarse con facilidad, su calidad e inocuidad pueden resultar comprometidas por factores ambientales y condiciones fisiológicas del animal lechero. El consumo de leche cruda no es recomendado. Estudios han revelado que microorganismos patógenos pueden aislarse incluso de leche cruda producida en condiciones higiénicas (Chye et al., 2004; Pyz-Łukasik et al., 2015).

Debido a la dificultad para eliminar los patógenos de la leche cruda, se le siguen atribuyendo brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos. Existe la posibilidad de que las personas que beben leche cruda se enfermen o se conviertan en portadores asintomáticos de enfermedades zoonóticas (FAO, 2021).

La leche pueda estar contaminada con sustancias tóxicas y con microorganismos patógenos inclusive si viniese de animales sanos. Las fuentes de contaminación más comunes son: el animal cuando está atravesando un cuadro infeccioso, infecciones en las ubres, contaminación con residuos fecales y contaminación por malas prácticas antes, durante y después del ordeño (Lucey, 2015).

Inocuidad de la leche

Un alimento inocuo significa que está libre de bacterias y hongos o mohos, productos químicos y otros materiales que puedan ser perjudiciales para la salud, por lo tanto, su consumo es seguro (FAO, 2013).

La leche además de ser un alimento nutritivo debe mantener las condiciones necesarias para que su consumo sea seguro, es decir la ingesta de leche y sus derivados no deben suponer un riesgo para la salud humana. Con el afán de precautelar la salud pública, la leche cruda debe ser monitoreada y

estar sujeta a ciertos parámetros que respalden su calidad e inocuidad: composición fisicoquímica, cualidades organolépticas, número de microorganismos, células somáticas y evaluación de la presencia de adulterantes. En el momento de la recepción, la leche cruda debería estar sometida a una serie de análisis que permitan evaluar estos parámetros y así mismo a su salida de las plantas procesadoras (Vargas, 2001).

Leche alterada

Cuando las características de la leche están fuera de los parámetros normales como consecuencia de factores físicos, químicos y/o biológicos, naturales o artificiales que han alterado su composición original (Mercado et al., 2014).

Leche adulterada

Se considera que una leche está adulterada cuando se le agregan otras sustancias para ocultar o disfrazar su alteración, estas sustancias son capaces de ocultar ciertas características no deseadas de la leche pero su calidad e inocuidad seguirán siendo deficientes (Mercado et al., 2014)

Parámetros de evaluación

Estabilidad proteica

La estabilidad proteica es la propiedad que tiene la leche de no producir precipitación o coagulación en presencia de una solución de alcohol etílico o de una solución alcohólica de alizarina. La formación de coágulos indica que la leche ha sufrido acidificación causada por un aumento en la población bacteriana, presencia de calostro o las vacas tienen mastitis (AGROCALIDAD, 2021).

La estabilidad proteica es un parámetro básico de evaluación en el control de calidad e inocuidad de leche. Con la finalidad de mejorar la estabilidad proteica se adicionan a la leche otras sustancias. Esto representa un problema para la industria láctea, ya que pueden presentarse dos posibles escenarios: que la inestabilidad se detecte antes de que la leche sea sometida a procesos de

pasteurización y se estabilice a tiempo; la otra posibilidad que se presenta es que la inestabilidad se detecte posterior a los procesos de UHT y se deba volver a procesar, causando pérdidas económica (Aya, 2007).

pH

Representa la acidez (concentración de H^+ libres) de la leche, se representa con la Ecuación 1:

$$pH = -\log[H^+] \quad (\text{Ecuación 1}).$$

La concentración de H^+ en leche varía 0,16 hasta 0,32 $\mu\text{mol/L}$. El pH de la leche recién ordeñada proveniente de una vaca saludable puede estar en el intervalo de 6.5 hasta 6.8 (Negri, 2005). Esto debido a la presencia de caseínas, aniones fosfóricos y cítricos (Alais, 1985).

Existen factores capaces de que influyen en el pH de la leche, entre ellos se encuentran la edad del animal, etapa de la lactancia, temperatura (Negri, 2005). El calostro tiene un pH igual a 6.0 porque es rico en proteínas (Alais, 1985). Mientras que al final del periodo de lactancia la leche puede alcanzar pH superiores a 7.4 (Negri, 2005).

La mastitis es otro de los factores que influyen en los valores de pH, porque hay un incremento en la permeabilidad de las membranas de la glándula mamaria y como consecuencia hay un crecimiento en la concentración de iones Na^+ y Cl^- , disminución de lactosa y de fósforo inorgánico soluble. Dando como resultado un rango de pH que oscila de 6.9 a 7.5 (Alais, 1985).

Al aumentar 1°C de temperatura el pH disminuye 0.01 aproximadamente, debido a la insolubilización del fosfato de calcio (Negri, 2005). El pH normal de la leche cruda puede estar de 6.6 hasta 6.8 (López et al., 2015).

Una celda para la medida de pH consiste en un par de electrodos, uno de mercurio o cloruro de mercurio y otro de vidrio, sumergidos en la solución de la que se necesite medir el pH. La varita de

soporte del electrodo es de vidrio común, el bulbo sensible está formado por un vidrio polarizable sensible de pH. (Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario [AGROCALIDAD], 2021).

Acidez

La acidez de la leche cruda es el porcentaje del ácido láctico presente. Es un parámetro que se mide con la finalidad de determinar en qué condiciones se encuentra la leche cruda antes de iniciar con los procesos industriales (Chacón Villalobos, 2004).

La caseína, CO₂ y fosfatos influyen en la acidez inicial de la leche cruda, que normalmente debe rondar entre 0.15 y 0.16% (Chacón Villalobos, 2006). Ciertos factores influyen en la variación de este parámetro: prácticas de ordeño, almacenamiento y transporte. Dichos factores influyen en la carga bacteriana.

La deficiencia en la higiene durante el proceso de producción y transporte de leche cruda provocan su contaminación con microorganismos capaces de fermentar la lactosa desencadenando un aumento en los niveles de ácido láctico (Chacón Villalobos, 2006). En leche proveniente de vacas con mastitis existen también niveles elevados de acidez (Chacón Villalobos, 2004). Cuando la acidez de la leche supera 0.18% de ácido láctico es un indicador de que existe una alta carga bacteriana y no es apta para los procesos industriales.

La NTE 9:2012 señala que el porcentaje de ácido láctico aceptable oscila entre 0.13 y 0.17%. La importancia de este parámetro en la vigilancia y monitoreo de la calidad e inocuidad de leche radica en la acidez que influye en la calidad, sabor y vida útil de los productos finales derivados de la leche (Chacón Villalobos, 2006).

Aflatoxina M1

Las Aflatoxinas M1 son micotoxinas producidas por el género *Aspergillus*, es producto del metabolismo de un animal que ingiere alimento contaminado con Aflatoxina B1. La Aflatoxina M1 afecta a la producción ganadera y es representa una amenaza para la salud humana (Cravero et al., 2020).

El interés por estudiar los efectos de la ingesta de micotoxinas ha ido creciendo a través de los años. La Aflatoxina M1 afecta gravemente a la salud de las personas al tratarse de una toxina mutagénica, carcinogénica y teratogénica, que además afecta el funcionamiento normal de los riñones, hígado y cerebro (Razquin, 2013). Puede ser secretada a través de la leche materna.

Para leche cruda, la legislación comunitaria europea señala 0.05 µg/L o kg (50 ppt) como el límite máximo permitido de Aflatoxina M1, en alimentos infantiles únicamente se permite un límite máximo de 0.02 µg/L (20 ppt) (Razquin, 2013). La NTE 9:2012 indica que el límite máximo permisible es 0.05 µg/kg.

Cloruros

La presencia de cloruros en leche cruda es un parámetro que se debe tomar en cuenta durante la evaluación de la inocuidad. Los iones cloruros son indicadores de una posible contaminación derivada de un cuadro de mastitis o de la adición de cloruro de sodio para aumentar la densidad y reducir el punto de congelación (Chen et al., 2018).

La leche tiene niveles inferiores de lactosa cuando hay problemas de mastitis o contaminación con microorganismos. En estos casos, los iones de cloruro presentes en la sangre pasan a la leche para mantener una ósmosis equilibrada (Chen et al., 2018).

Una adulteración común es el adicionamiento de agua en la leche. Para ocultar esta práctica, en ocasiones se añade cloruro de sodio, con la finalidad de aumentar la densidad de la leche y reducir su punto de congelación (Calderón-Rangel et al., 2013; Chen et al., 2018).

Peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es una sustancia líquida no inflamable, incolora y amarga. Se descompone en oxígeno y agua fácilmente con temperaturas altas (Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades [ATSDR], 2016).

Se usa como adulterante de leche cruda, es una medida para evitar pérdidas a causa de la descomposición de la leche por acción de microorganismos y de altas temperaturas ambientales; pues es capaz de inhibir el crecimiento de microorganismos que aceleran la descomposición y acidificación de la leche (Afzal et al., 2011). Es una sustancia dañina para la salud, al ser ingerida puede causar cuadros de gastritis, úlceras, enteritis y diarrea con sangre (Murthy et al., 1981).

Antibióticos

Los tratamientos para enfermedades causadas por microorganismos patógenos incluyen antibióticos. Son medicamentos de origen natural o sintético, sirven para tratar enfermedades como la mastitis, neumonía y diarrea (Diaz & Pena, 2019).

Los residuos de antibióticos se pueden eliminar a través de la orina y leche materna. Esto provoca un problema tanto para la industria láctea como para la salud pública. Incluso en pequeñas cantidades pueden causar problemas graves de salud, sobre todo si el consumo de leche contaminada con estas sustancias se da de forma periódica. Pueden ocasionar alergia, intoxicación, provocar resistencia antimicrobiana (Diaz & Pena, 2019). La leche contaminada con residuos de antibióticos no es recomendada para el consumo humano ni animal.

En la industria láctea, la presencia de antibióticos en la leche cruda afecta a los productos derivados, la mantequilla no tiene el mismo sabor, los quesos tienen problemas en el proceso de cuajado y maduración (Diaz & Pena, 2019).

Existen varias familias de antibióticos como los β -lactámicos, tetraciclinas, sulfamidas, aminoglucósidos, entre otros. Son empleados debido a su amplio espectro y efectividad para tratar cuadros infecciosos, sin embargo hay que tener en cuenta el tiempo que tarda en eliminar el cuerpo los residuos de antibióticos.

La NTE 9:2012 indica que los límites permisibles para residuos de medicamentos veterinarios en leche cruda son los LMR establecidos por el CODEX Alimentarius CAC/MRL 2. Este nos señala que el LMR para antibióticos β -lactámicos (penicilina) es 4 $\mu\text{g/L}$, tetraciclinas 100 $\mu\text{g/L}$, sulfamidas 25 $\mu\text{g/L}$, neomicina 1500 $\mu\text{g/kg}$, dihydro-estreptomicina 200 $\mu\text{g/kg}$ y gentamicina 200 $\mu\text{g/kg}$ (FAO & WHO, 2018).

Neutralizantes alcalinos

La leche cruda puede cambiar sus características originales por problemas de higiene, deficiencia en su transporte. Esto ocasiona cambios en la acidez principalmente, como consecuencia existen dificultades para procesar la leche acidificada (Ibrahim et al., 2021).

Para disminuir la acidez se agregan adulterantes como el hidróxido de sodio, orina, jabones y carbonatos. Estas sustancias permiten que la leche sea considerada apta para el procesamiento, sin embargo resultan peligrosas para la salud de las personas que ingieren productos lácteos derivados de leche con neutralizantes alcalinos (Ibrahim et al., 2021).

Células somáticas

Son todas las células del cuerpo excepto los óvulos y espermatozoides. También se las puede hallar en leche y son un parámetro importante a evaluar. El número de células somáticas presentes en la leche sirven para determinar el estado de salud de las ubres de la vaca e indican la calidad e inocuidad de la leche (Li et al., 2014).

El aumento de células somáticas presentes en la leche se puede asociar a que existe una proliferación de células epiteliales que al desprenderse de la ubre se unen a la leche cruda, los glóbulos blancos son la respuesta a procesos inflamatorios como la mastitis y se eliminan a través de fluidos corporales como la leche (Blowey & Edmondson, 1995; Li et al., 2014).

La higiene, el ordeño, la desinfección de la ubre y factores ambientales están relacionados con la mastitis. El recuento de células somáticas en la leche nos da a conocer la función y estado de salud de la glándula mamaria y es un parámetro importante de inocuidad (Hernández & Bedolla, 2008).

Las células somáticas son parte del sistema inmunitario innato, por lo tanto forman el sistema de defensa ante posibles infecciones. Entre los factores externos que influyen en el conteo de células somáticas están la raza del animal, etapa de lactancia, tipo de ordeño y el ambiente (Li et al., 2014). La Norma Técnica Ecuatoriana de Leche Cruda señala que el límite máximo permisible es 7.0×10^5 SC/mL.

Bacterias totales

La leche en el interior de las ubres de una vaca saludable está libre de microorganismos. Los microorganismos que se encuentran en el medio ambiente se movilizan a través de los canales de los pezones e ingresan a la ubre. Entre estos microorganismos se encuentran bacterias patógenas provenientes del suelo, excremento, restos de alimento y equipo de ordeño no desinfectado (te Giffel & Wells-Bennik, 2010).

En leche cruda se han logrado aislar bacterias patógenas como *Mycobacterium* spp., *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (te Giffel & Wells-Bennik, 2010).

El recuento bacteriano es un indicador de la inocuidad de la leche cruda. La inocuidad de la leche cruda es proporcional al número de microorganismos presentes en la leche, pues mientras el

número de bacterias aumenta, en igual proporción aumenta el riesgo de que la leche esté contaminada con algún microorganismo patógeno (Donnelly, 2004). La Norma Técnica Ecuatoriana de Leche Cruda señala que el límite máximo permisible es 1.5×10^6 UFC/mL.

Tabla 1

Parámetros de evaluación, criterios y límites permisibles según la Norma Técnica Ecuatoriana 9:2012.

Variables	Mínimo	Máximo
Reacción de estabilidad proteica		Negativo
Acidez (% de ácido láctico)	0.13	0.17
Presencia de conservantes (peróxido de hidrógeno, cloruros)		Negativo
Presencia de neutralizantes		Negativo
Residuos de medicamentos veterinarios	LMR, establecidos en el CODEX Alimentarius CAC/MRL 2	
Aflatoxina M1 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	-	0.5
Recuento de células somáticas/ cm^3	-	7.0×10^5
Recuento de microorganismos aeróbios mesófilos REP, UFC/ cm^3	-	1.5×10^6

Nota. La Norma Técnica Ecuatoriana INEN 9:2012 se basa en parámetros cualitativos y cuantitativos para establecer las características que debe cumplir la leche cruda (NTE INEN 9:2012, 2012).

Provincia de Chimborazo

La provincia tiene una extensión aproximada de 6.593 km². Limita al norte con la provincia de Tungurahua, al sur con Cañar, al este con Morona Santiago y al oeste con Bolívar; ocupando las hoyas de Riobamba y Alausí y parte de la de Chimbo (Avilés, s.f.).

Está formada por los cantones Alausí, Colta, Cumandá, Chambo, Chunchi, Guamote, Guano, Pallatanga, Penipe y su capital Riobamba. Su economía se basa en la agricultura y ganadería, entre sus principales productos están cereales, legumbres, tubérculos, carne y leche (Avilés, s.f.).

Figura 1

Mapa de la provincia de Chimborazo.



Nota. Tomada de Wikipedia, Provincia de Chimborazo, 2022

(https://es.wikipedia.org/wiki/Provincia_de_Chimborazo).

Capítulo 2: Materiales y Métodos

Toma de muestras

Las muestras de leche cruda se tomaron en dos frascos estériles de 50 mL, los cuales contenían una pastilla azidiol y una de bronopol respectivamente. Además se empleó un termo para conservar las muestras (Flores, J, 2020). Se tomaron muestras en tres ocasiones en cada centro de acopio e industria láctea, con un intervalo de tres semanas entre cada toma.

Determinación de estabilidad proteica

Se llenó el tanque de la pistola de alcohol con alcohol etílico al 75 % en volumen. Luego se introdujo la punta de la pistola con un ángulo de 45° de inclinación en el frasco que contenía la muestra. Se colocó la punta hacia arriba y el alcohol (2 mL) y la leche (2 mL) salieron de los tubos de la parte posterior de la pistola, se depositaron en una caja Petri. Al mover suavemente la caja Petri se observó si existió o no la formación de coágulos de leche. Cuando se formaron coágulos o grumos, el resultado de

la prueba se registró como positivo, indicando acidificación por la proliferación de bacterias, en los casos en los que no existió presencia de grumos el resultado es negativo (AGROCALIDAD, 2013).

Determinación de pH y acidez mediante potenciómetro

Esta prueba se realizó utilizando un sensor, consistió en medir el pH a través de una fina membrana de vidrio que separa dos soluciones con diferente concentración de protones (AGROCALIDAD, 2021).

Se calibró el potenciómetro con los Buffers de pH 4, pH 7 y pH 10. El electrodo se introdujo en el recipiente que contenía la muestra y se movió ligeramente en forma circular, para luego dejarlo inmóvil y después de unos segundos se observó la lectura de la acidez (% de ácido láctico) y el pH en la pantalla (AGROCALIDAD, 2021).

Determinación de Aflatoxina M1

El kit Aflasensor es una prueba rápida semi cuantitativa que usa una tira reactiva basada en un inmunoensayo enzimático, prueba competitiva de un receptor y un anticuerpo específico para detectar Aflatoxina M1 (AGROCALIDAD, 2013a).

Con una micropipeta se tomaron 200 μ L de leche cruda y se mezclaron en el pocillo hasta disolver el reactivo. Se programó el incubador Heatsensor-DUO en la opción de AM1 y se incubó la muestra a 40°C durante tres minutos, se ingresó la tira reactiva al pocillo y se continuó con la incubación durante siete minutos. Se retiró la tira y se visualizó el resultado (AGROCALIDAD, 2013a). Para interpretar el resultado se tomó en cuenta lo indicado en la figura 2.

Figura 2

Interpretación de resultados del kit Aflasensor.



Nota. Esta ilustración fue obtenida de la guía proporcionada por los laboratorios de AGROCALIDAD.

Determinación de cloruros

Mediante la técnica colorimétrica se determinó la adición de cloruros en leche cruda, para este ensayo se emplearon las tiras reactivas QUANTOFIX Cloruro. Se sumergió una tira en la muestra y se comparó con la escala de colores que se observa en la figura 3 (AGROCALIDAD, 2013b). Esta prueba determina la presencia de cloruros en un rango de 0 a 3000 mg/L Cl^- , siendo considerado como resultado negativo hasta 1000 mg/L.

Figura 3

Escala de colores del kit QUANTOFIX Cloruro.



Nota. Tomada de VIRESA, No. Catálogo MN-91321, 2020 (<https://viresa.com.mx/tiras-reactivas-quantofix-cloruro-mn--91321?returnurl=%2Ftirasreactivas%2F%3Fcount%3D20>).

Determinación de peróxidos

La peroxidasa transfiere el oxígeno del peróxido a un indicador rédox orgánico. Entonces se forma un producto de oxidación de coloración azul (AGROCALIDAD, 2013c).

Este ensayo se realizó en ausencia de luz durante todo el análisis. Se depositó la muestra de leche en un tubo de ensayo se calentó la muestra a 15°C. La tira reactiva se introdujo en la muestra por un segundo y se retiró, luego de cinco a 15 segundos se observó el resultado. Se comparó el color de la tira reactiva con el panel de colores del tubo QUANTOFIX™ que determina la presencia de peróxidos en un rango de 0 a 25 mg/L (AGROCALIDAD, 2013c).

Figura 4

Escala de colores del kit QUANTOFIX™ Peróxidos.



Nota. Tomada de Comercial Hospitalaria Grupo 3, Tiras QUANTOFIX Peróxido 25 Ref. 883391319RM, 2022 (<https://www.chgrupo3.com/producto/quantofix-91319rm-peroxido-25/>).

Antibióticos en leche cruda

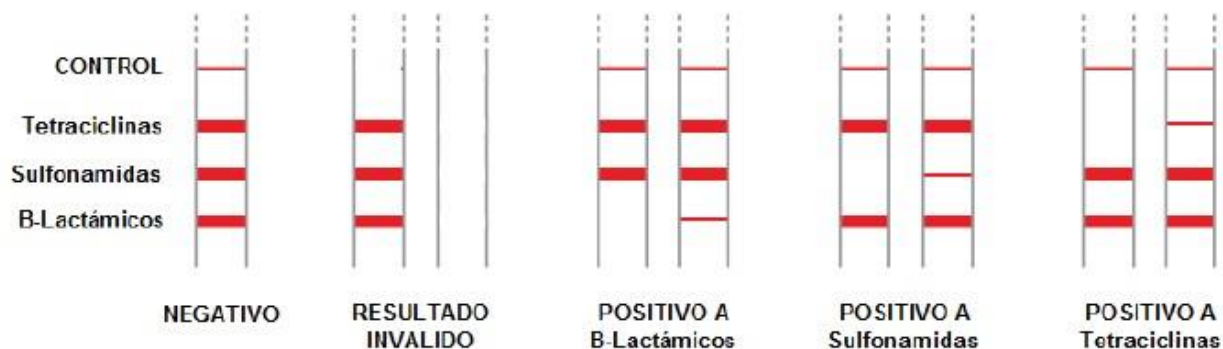
Determinación de antibióticos β -lactámicos, Tetraciclinas y Sulfamidas

El kit Trisensor es una prueba rápida semi cuantitativa que usa una tira reactiva que se basa en el método cromatografía de capa fina, ensayo competitivo que involucra a dos receptores específicos y anticuerpo específico para detectar las tres familias de antibióticos presentes en leche (AGROCALIDAD, 2013d).

Se tomaron 200 μ L de leche cruda con una micropipeta y se mezclaron en el pocillo hasta que el reactivo se disolvió. El incubador Heatsensor-DUO se programó en la opción de TRI y se incubó la muestra a 40°C por el lapso de 3 min, se introdujo la tira reactiva en el pocillo y continuó la incubación durante otros 3 min. Se retiró la tira reactiva del pocillo y se observó el resultado (AGROCALIDAD, 2013d).

Figura 5

Interpretación de resultados del kit Trisensor.



Nota. Esta ilustración fue obtenida de la guía proporcionada por los laboratorios de AGROCALIDAD.

Determinación de antibióticos aminoglucósidos

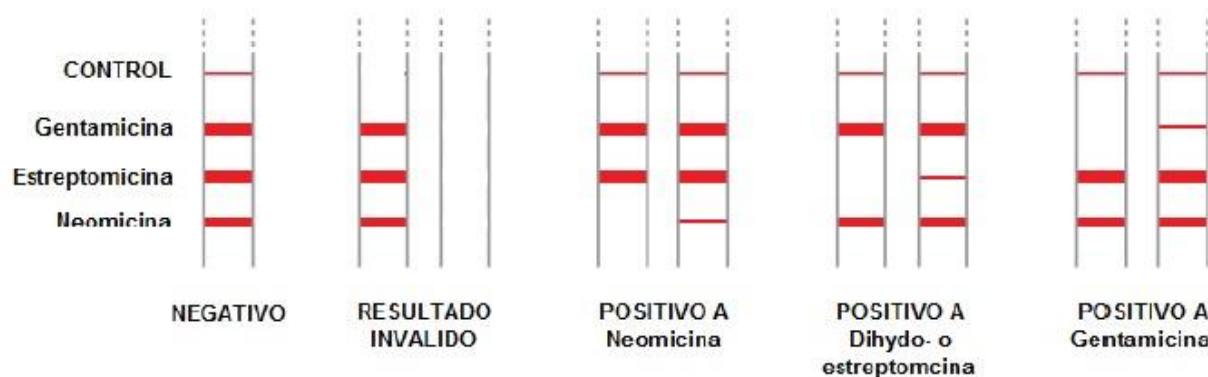
El kit 3 Aminosensor es una prueba rápida semi cuantitativa que usa una tira reactiva que se basa en el método cromatografía de capa fina, ensayo competitivo que involucra a dos receptores

específicos y anticuerpo específico para detectar cinco antibióticos aminoglucósidos: neomicina, estreptomina, dihidroestreptomina, gentamicina y paromomicina, en una sola prueba (AGROCALIDAD, 2013e).

Se tomaron 200 μ L con una micropipeta de muestra y se mezclaron en el pocillo hasta que esté homogénea y completamente disuelto el reactivo. Se programó el incubador Heatsensor-DUO en la opción de TRI y se incubó la muestra a 40°C por el lapso de 3 min, se ingresó la tira reactiva al pocillo y se continuó con la incubación durante otros 3 min. Se retiró la tira reactiva del pocillo y se visualizó el resultado (AGROCALIDAD, 2013e).

Figura 6

Interpretación de resultados del kit Aminosensor.



Nota. Esta ilustración fue obtenida de la guía proporcionada por los laboratorios de AGROCALIDAD.

Determinación de neutralizantes alcalinos

El método de rojo fenol es una prueba cualitativa que consiste en añadir 0.5 mL de rojo fenol a un tubo de ensayo que contiene 5 mL de agua destilada y 5 mL de leche cruda. Se observó el color y aspecto, se reportó el resultado como positivo en casos de existir una coloración roja intensa (Servicio Ecuatoriano de Normalización: Norma Técnica Ecuatoriana 1500 [NTE INEN 1500], 2017).

Conteo de células somáticas

Se realizó el conteo de células somáticas presentes en las muestras de leche cruda por el método de citometría de flujo con el equipo FOSSOMATIC FC. El cálculo se basó en la tinción fluorométrica del material nuclear mediante bromuro de etidio (AGROCALIDAD, 2013f).

Las muestras se calentaron a 40°C en baño maría y se colocaron en el equipo para su análisis. Los resultados se obtuvieron mediante el software Foss Integrator Workstation (AGROCALIDAD, 2013f).

Conteo de bacterias totales

El número de bacterias totales presentes en las muestras de leche cruda se realizó con el método de citometría de flujo, mediante el uso del equipo BactoScan™ FC+. Este método determinó el conteo de bacterias individuales (IBC) presentes en la leche cruda (AGROCALIDAD, 2013g).

Se calentaron las muestras a 40°C. Se emplearon tres soluciones blanco, un control bacteriano y posteriormente se realizó el análisis de cada muestra, los resultados se obtuvieron con ayuda del software Foss Integrator Workstation (AGROCALIDAD, 2013g).

Para transformar IBC a UFC se utilizó la ecuación 2, misma que fue establecida por Contero et al., (2019), como resultado de su trabajo titulado “Estudio en el Ecuador de la curva de calibración para el conteo total de bacterias por citometría de flujo de leche cruda bovina”(Contero et al., 2019).

$$\log(UFC) = \log(IBC) \times 1.03466 - 1.05124 \quad (\text{Ecuación 2}).$$

Análisis estadístico

Se aplicaron técnicas de análisis exploratorio de datos o estadística descriptiva, para representar los datos obtenidos. Se empleó la distribución de Bernoulli para el análisis de variables dicotómicas y se calcularon intervalos de confianza para las variables cuantitativas utilizando Microsoft Excel.

Capítulo 3: Resultados

En la provincia de Chimborazo existen 28 centros de acopio y 165 industrias lácteas distribuidas en los diez cantones. Como se puede observar en la tabla 2.

Tabla 2

Tabla de contingencia de centros de acopio e industrias lácteas de la provincia de Chimborazo.

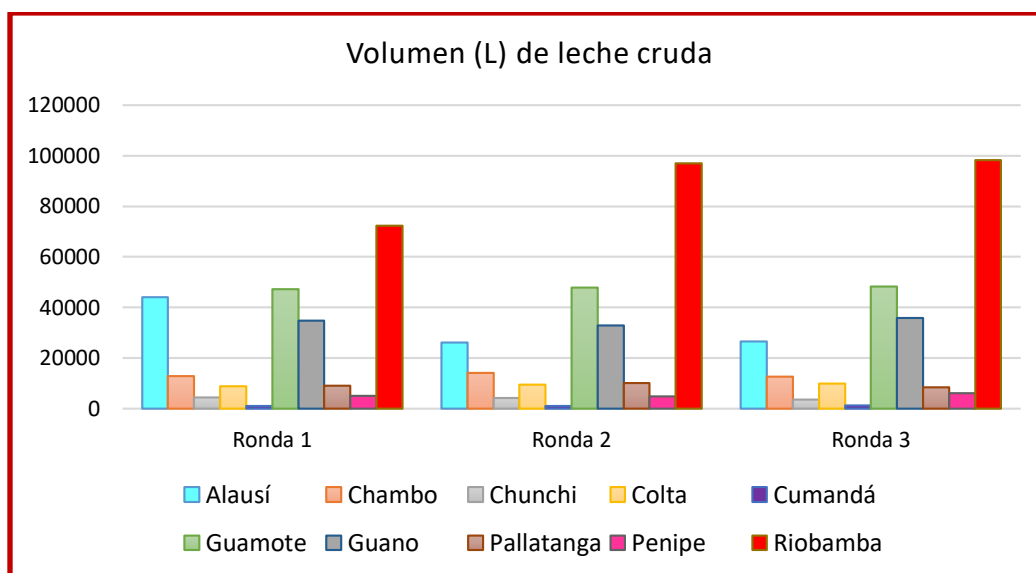
	Alausí	Chambo	Chunchi	Colta	Cumandá	Guamote	Guano	Pallatanga	Penipe	Riobamba	
CA	7	1	0	0	0	4	10	0	1	5	28
IL	8	14	5	16	2	33	23	4	8	52	165
	15	15	5	16	2	37	33	4	9	57	193

Nota. En la tabla se detalla el número de CA e ID que se encuentran en cada cantón de la provincia de Chimborazo.

Para la elaboración de este trabajo de titulación se visitaron 193 sitios diferentes, en los cuales se tomaron muestras de leche cruda en tres ocasiones diferentes (ver apéndices 1, 2 y 3), en un intervalo de tiempo aproximado de tres semanas entre cada ronda de muestreo. En la provincia diariamente se procesan un promedio de 245804 litros de leche cruda. En la figura 7 se observa gráficamente el volumen de leche cruda distribuida en los cantones de la provincia. En la tabla 3 se detalla el número de litros de leche cruda que se encontró en los sitios de muestreo en cada una de las rondas.

Figura 7

Gráfico de barras del volumen (L) de leche cruda acopiada y procesada diariamente en los cantones de la provincia.

**Tabla 3**

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

	Alausí	Chambo	Chunchi	Colta	Cumandá	Guamote	Guano	Pallatanga	Penipe	Riobamba	Total
Ronda1	44050	12768	4300	8800	900	47200	34670	9000	5050	72430	239168
Ronda2	26200	14100	4250	9450	1000	47950	32850	10000	4900	97000	247700
Ronda3	26600	12640	3600	9875	1200	48300	35750	8300	6050	98230	250545

Estabilidad proteica

Se realizó la prueba de estabilidad proteica a las de 579 muestras de leche cruda tomadas durante este estudio, de las cuales 102 presentaron coagulación de 2mL de leche al añadir 2mL de alcohol etílico al 75%, dando como resultado positivo a estabilidad proteica como se puede observar en la figura 8.

Figura 8

Positivo a prueba de estabilidad proteica.



Nota. La formación de coágulos o grumos son un indicador cualitativo de la acidificación de la leche.

En las tablas 4, 5 y 6 se observan de forma detallada los resultados obtenidos para la prueba de estabilidad proteica, en cada uno en los diez cantones de la provincia. En la figura 9 se observa en porcentaje de resultados positivos y negativos obtenidos en las tres rondas de muestreo.

Tabla 4

Resultados obtenidos en la ronda 1 para la prueba de estabilidad proteica.

	Alausí	Chambo	Chunchi	Colta	Cumandá	Guamote	Guano	Pallatanga	Penipe	Riobamba	Total
Negativo	12	8	4	15	2	30	26	4	6	42	149
Positivo	3	7	1	1	0	7	7	0	3	15	44

Tabla 5

Resultados obtenidos en la ronda 2 para la prueba de estabilidad proteica.

	Alausí	Chambo	Chunchi	Colta	Cumandá	Guamote	Guano	Pallatanga	Penipe	Riobamba	Total
Negativo	12	12	4	16	2	34	28	3	8	47	166
Positivo	3	3	1	0	0	3	5	1	1	10	27

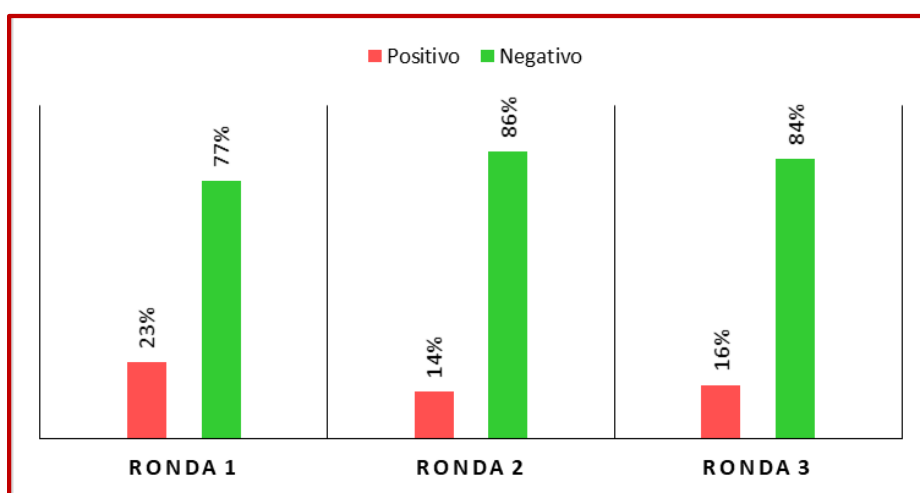
Tabla 6

Resultados obtenidos en la ronda 3 para la prueba de estabilidad proteica.

	Alausí	Chambo	Chunchi	Colta	Cumandá	Guamote	Guano	Pallatanga	Penipe	Riobamba	Total
Negativo	12	11	2	12	2	27	30	4	9	53	162
Positivo	3	4	3	4	0	10	3	0	0	4	31

Figura 9

Porcentaje de resultados obtenidos en la prueba de estabilidad proteica.



Nota: Durante las tres rondas de muestreo un mayor porcentaje de muestras dieron resultado negativo en la prueba de estabilidad proteica.

Para analizar los resultados al tratarse de variables dicotómicas se empleó la distribución de Bernoulli, para lo cual se asignó valores a los resultados. Siendo “1” para el resultado “positivo” y “0” para el resultado “negativo”. Estas consideraciones fueron tomadas en cuenta para el resto de pruebas cualitativas realizadas a las muestras de leche cruda. En la tabla 7 se observan los resultados obtenidos luego de las tres rondas de muestreo. En la figura 10 se observa la representación gráfica de función de masa, con una probabilidad de éxito “ $p = 0.18$ ”.

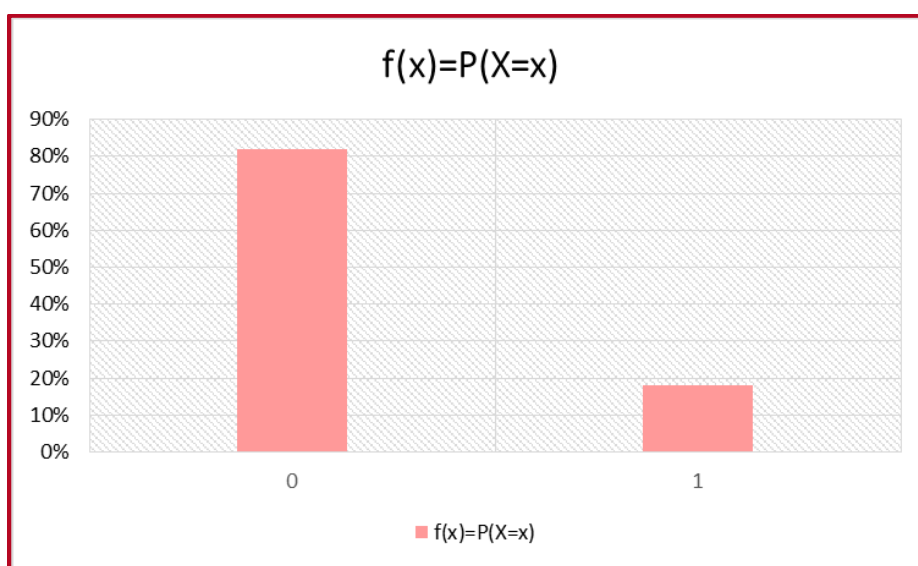
Tabla 7

Resultados obtenidos en la provincia de Chimborazo para la prueba de estabilidad proteica.

	Alausí	Chambo	Chunchi	Colta	Cumandá	Guamote	Guano	Pallatanga	Penipe	Riobamba	Total
Negativo	36	31	10	43	6	91	84	11	23	142	477
Positivo	9	14	5	5	0	20	15	1	4	29	102

Figura 10

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



Nota. La distribución de Bernoulli nos indica que existe un 82% de probabilidad que el resultado obtenido de la prueba de estabilidad proteica sea "0" y un 18% de probabilidad que sea "1".

pH

El potencial de hidrógeno se midió con un potenciómetro, los resultados se anotaron con dos decimales. En la tabla 8 se pueden observar los promedios de los resultados de pH obtenidos en cada cantón de la provincia durante las tres rondas de muestreo. En la figura 11 se observa el porcentaje de cumplimiento del parámetro pH en base a los resultados obtenidos y en la figura 12 se observa el promedio calculado con los resultados obtenidos en toda la provincia. Se realizó el cálculo de los

intervalos de confianza para pH, en cada ronda de muestreo como se puede observar en el apéndice 4. Se obtuvo que en promedio el pH calculado en la primera ronda estuvo entre 6.59 y 6.63, ($1-\alpha= 0.95$); en la segunda ronda estuvo entre 6.60 y 6.64, ($1-\alpha= 0.95$); y en la tercera ronda entre 6.65 y 6.67, ($1-\alpha= 0.95$).

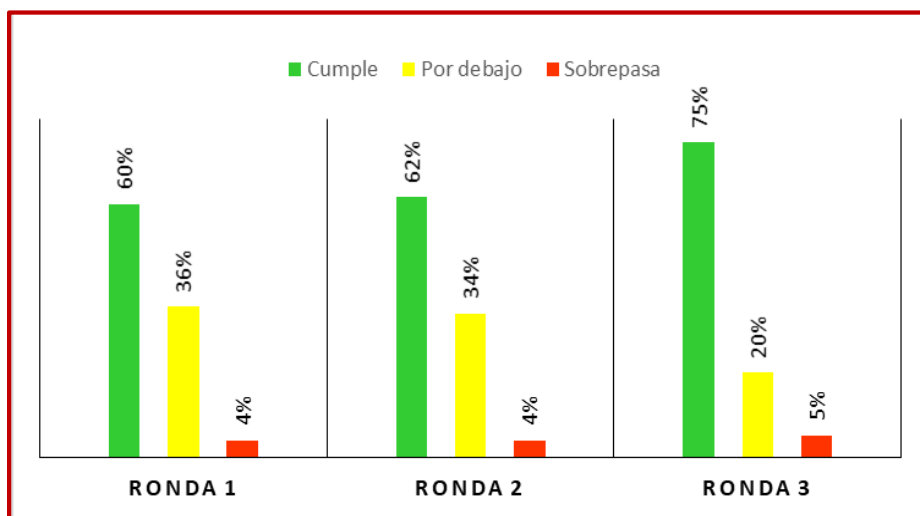
Tabla 8

Promedio de pH de leche cruda calculado por cantón de la provincia de Chimborazo.

	Alausí	Chambo	Chunchi	Colta	Cumandá	Guamote	Guano	Pallatanga	Penipe	Riobamba
Ronda1	6.58	6.53	6.62	6.63	6.68	6.61	6.65	6.62	6.57	6.61
Ronda2	6.64	6.63	6.68	6.66	6.68	6.63	6.6	6.56	6.61	6.61
Ronda3	6.66	6.66	6.55	6.62	6.7	6.64	6.7	6.69	6.67	6.68

Figura 11

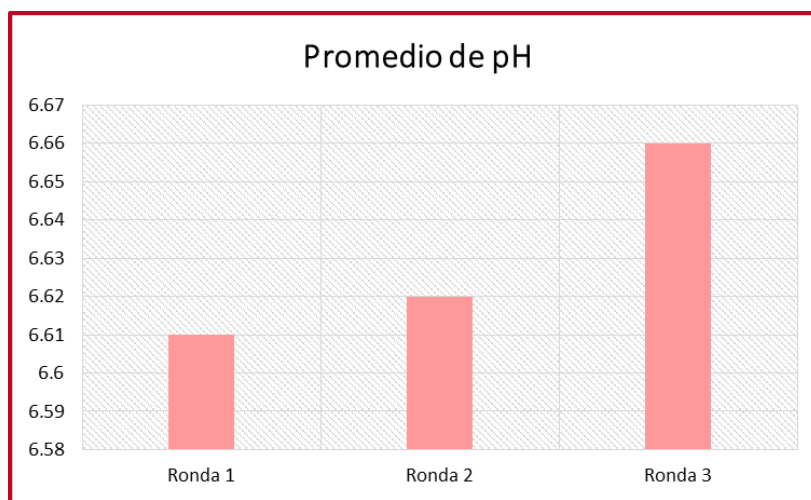
Porcentaje de cumplimiento del parámetro pH en leche cruda en la provincia de Chimborazo.



Nota. El rango permisible de pH de la leche cruda es 6.6- 6.8, el mayor porcentaje de muestras analizadas se encuentran dentro del parámetro, durante las tres rondas de muestreo.

Figura 12

Gráfico de barras del promedio de pH de leche cruda de la provincia de Chimborazo.



Acidez

El porcentaje de ácido láctico obtenido a través de las mediciones efectuadas con el potenciómetro se anotó con tres decimales. En la tabla 9 se observan los promedios de acidez (% de ácido láctico) registrados en cada cantón de la provincia durante las tres rondas de muestreo efectuadas. En la figura 13 se observa el porcentaje de muestras analizadas que cumplen con este parámetro en cada ronda de muestreo y en la figura 14 se observa el promedio calculado con los resultados obtenidos en toda la provincia.

Se realizó el cálculo de los intervalos de confianza para la acidez como se puede observar en el apéndice 5, y se obtuvo que en promedio la acidez (% de ácido láctico) calculada en la primera ronda estuvo entre 0.158 y 0.162, ($1-\alpha= 0.95$); en la segunda ronda estuvo entre 0.155 y 0.159, ($1-\alpha= 0.95$); y en la tercera ronda entre 0.155 y 0.158, ($1-\alpha= 0.95$).

Tabla 9

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

	Alausí	Chambo	Chunchi	Colta	Cumandá	Guamote	Guano	Pallatanga	Penipe	Riobamba
Ronda1	0.162	0.171	0.163	0.157	0.167	0.157	0.156	0.165	0.166	0.160
Ronda2	0.159	0.159	0.156	0.153	0.162	0.155	0.159	0.161	0.158	0.158
Ronda3	0.161	0.158	0.170	0.159	0.162	0.159	0.151	0.155	0.156	0.154

Figura 13

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

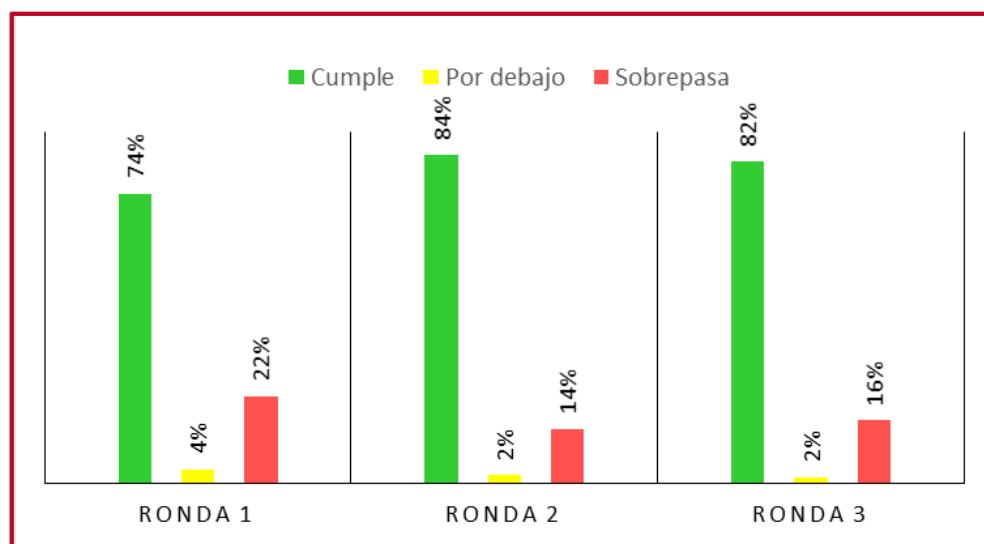
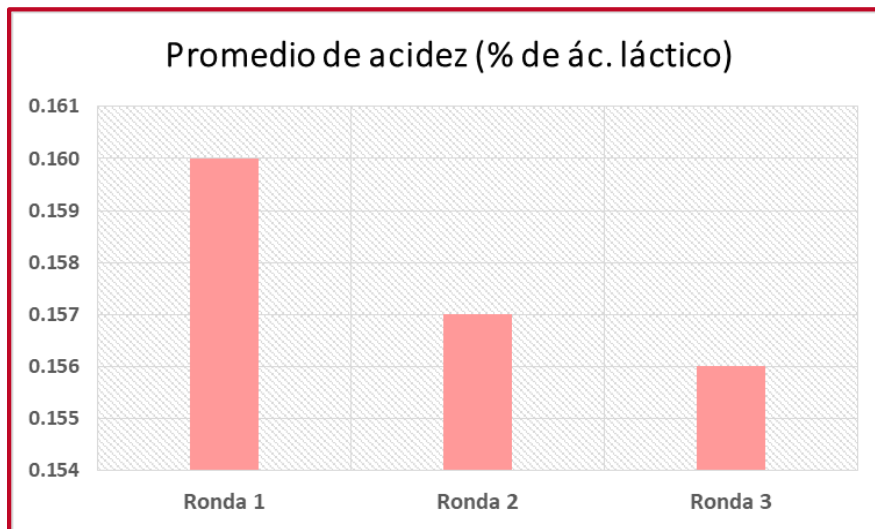


Figura 14

Gráfico de barras del promedio de acidez (% de ácido láctico) de leche cruda de la provincia de Chimborazo.



Aflatoxina M1

El kit Aflasensor no detectó la presencia de Aflatoxina M1 en ninguna de las 579 muestras evaluadas. En la figura 15 se observa una tira reactiva marcando como resultado negativo.

Figura 15

Tira reactiva del kit Aflasensor indicando un resultado negativo.



Cloruros

Esta prueba colorimétrica fue aplicada a las 579 muestras recolectadas a lo largo de este estudio, dando cuatro resultados positivos y 575 muestras arrojaron resultado negativo. En la figura 16 se observan las tiras colorimétricas después del análisis.

Figura 16

Tira colorimétrica del kit QUANTOFIX Cloruro.



A continuación en las tablas 10 y 11 se observan los resultados obtenidos en la ronda 1 y 3 respectivamente, ya que la ronda 2 no se obtuvo ningún resultado positivo. En la figura 17 se observa el porcentaje de resultados positivos y negativos obtenidos en cada ronda de muestreo.

Tabla 10

Resultados obtenidos en la ronda 1 para la prueba de cloruros.

	Alausí	Chambo	Chunchi	Colta	Cumandá	Guamote	Guano	Pallatanga	Penipe	Riobamba	Total
Negativo	15	15	5	16	2	37	33	4	9	56	192
Positivo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1

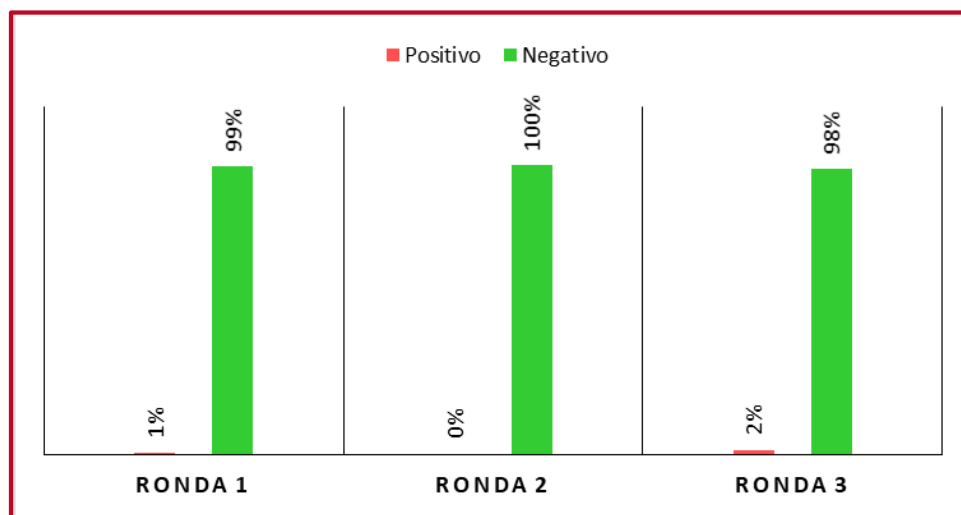
Tabla 11

Resultados obtenidos en la ronda 3 para la prueba de cloruros.

	Alausí	Chambo	Chunchi	Colta	Cumandá	Guamote	Guano	Pallatanga	Penipe	Riobamba	Total
Negativo	15	15	4	16	2	37	32	4	9	56	190
Positivo	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	3

Figura 17

Porcentaje de resultados obtenidos en la prueba de cloruros en leche cruda en la provincia de Chimborazo.



El análisis de resultados se realizó empleando la distribución de Bernoulli, se asignaron los valores: “1” para el resultado “positivo” y “0” para el resultado “negativo”. En la tabla 12 se observan los resultados obtenidos luego de las tres rondas de muestreo. En la figura 18 se observa la representación gráfica de función de masa, con una probabilidad de éxito “ $p= 0.01$ ”.

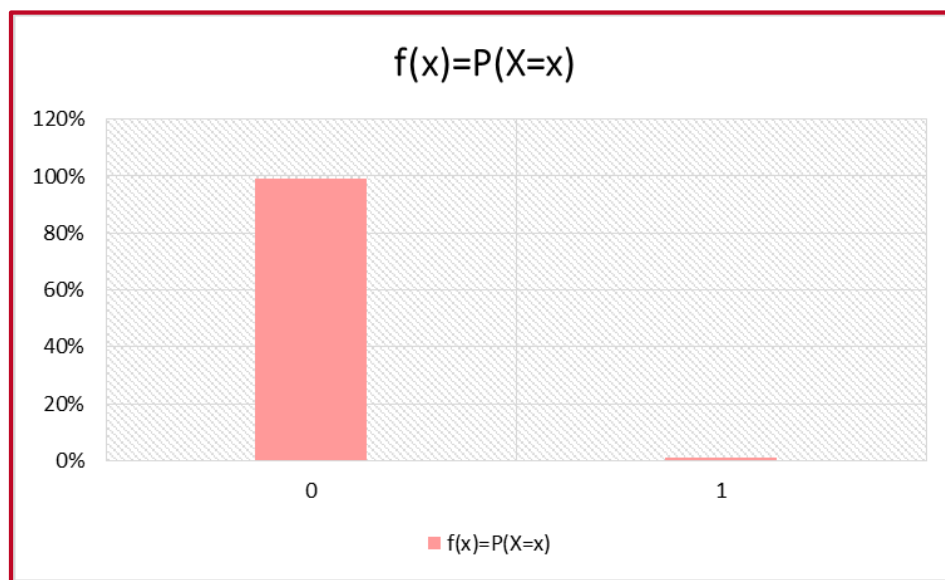
Tabla 12

Resultados obtenidos en la provincia de Chimborazo para la prueba de cloruros.

	Alausí	Chambo	Chunchi	Colta	Cumandá	Guamote	Guano	Pallatanga	Penipe	Riobamba	Total
Negativo	45	45	14	48	6	111	98	12	27	169	575
Positivo	0	0	1	0	0	0	1	0	0	2	4

Figura 18

Gráfico de barras de la función de masa de la distribución de Bernoulli para la presencia de cloruros en muestras de leche cruda.



Nota. La distribución de Bernoulli nos indica que existe un 99% de probabilidad que el resultado obtenido de la prueba de cloruros sea "0" y un 1% de probabilidad que sea "1".

Peróxidos

El kit QUANTOFIX Peróxidos no detectó la presencia de peróxidos en las muestras de leche cruda evaluadas. En la figura 19 se observa una tira reactiva marcando como resultado negativo, ninguna tira reactiva mostró coloración.

Figura 19

Tira colorimétrica del kit QUANTOFIX Peróxidos indicando un resultado negativo.



Antibióticos β -lactámicos, tetraciclinas y sulfas

Se realizó la prueba de detección de antibióticos a las de 579 muestras de leche cruda tomadas durante este estudio, diez muestras dieron positivo en el resultado. En la Figura 20 se observan tiras reactivas con resultados positivos.

Figura 20

Tiras reactivas del kit de antibióticos β -lactámicos, tetraciclinas y sulfamidas.



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

En las tablas 13, 14 y 15 se observan los resultados obtenidos para la prueba de ANT1 en cada ronda en los diez cantones de la provincia.

Tabla 13

Resultados obtenidos en la ronda 1 para la prueba de detección de ANT1.

	Alausí	Chambo	Chunchi	Colta	Cumandá	Guamote	Guano	Pallatanga	Penipe	Riobamba	Total
Negativo	14	13	5	16	2	36	33	4	9	56	188
Positivo	1	2	0	0	0	1	0	0	0	1	5

Tabla 14

Resultados obtenidos en la ronda 2 para la prueba de detección de ANT1.

	Alausí	Chambo	Chunchi	Colta	Cumandá	Guamote	Guano	Pallatanga	Penipe	Riobamba	Total
Negativo	14	15	5	16	2	37	33	4	9	56	191
Positivo	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2

Tabla 15

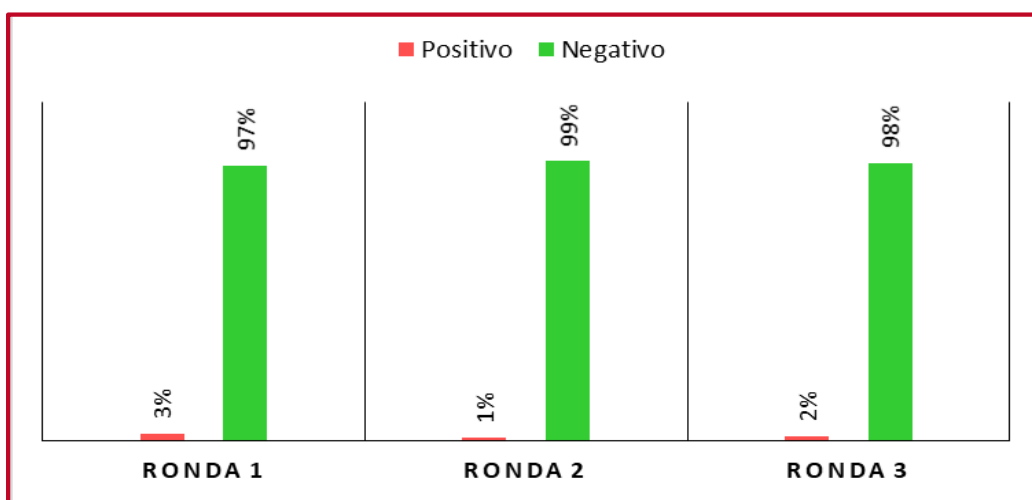
Resultados obtenidos en la ronda 3 para la prueba de detección de ANT1.

	Alausí	Chambo	Chunchi	Colta	Cumandá	Guamote	Guano	Pallatanga	Penipe	Riobamba	Total
Negativo	15	14	5	16	2	36	33	4	9	56	190
Positivo	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	3

En la figura 21 se observa el porcentaje de resultados obtenidos durante la prueba de detección de ANT1, durante cada ronda de muestreo.

Figura 21

Porcentaje de resultados obtenidos de la prueba de ANT1 en leche cruda de la provincia de Chimborazo.



Para el análisis de resultados se empleó la distribución de Bernoulli. En la tabla 16 se observan los resultados obtenidos luego de las tres rondas de muestreo. En la figura 22 se observa la representación gráfica de función de masa, con una probabilidad de éxito “ $p= 0.02$ ”.

Esto indica que la leche de la provincia de Chimborazo la presencia de antibióticos de la familia ANT1 es escasa, casi nula. Indicando que la mayoría de productores no está haciendo el uso de estos antibióticos en el tratamiento de sus animales o están respetando los periodos de retiro.

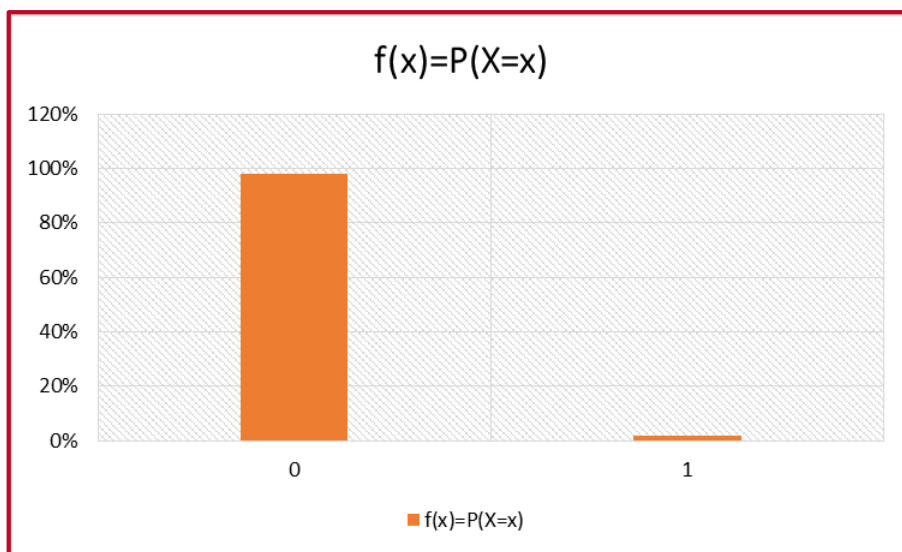
Tabla 16

Resultados obtenidos en la provincia de Chimborazo para la prueba de detección de ANT1.

	Alausí	Chambo	Chunchi	Colta	Cumandá	Guamote	Guano	Pallatanga	Penipe	Riobamba	Total
Negativo	43	42	15	48	6	109	99	12	27	168	569
Positivo	2	3	0	0	0	2	0	0	0	3	10

Figura 22

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



Nota. La distribución de Bernoulli nos indica que existe un 98% de probabilidad que el resultado obtenido de la prueba de detección de ANT1 sea “0” y un 2% de probabilidad que sea “1”.

Antibióticos aminoglucósidos

Al realizar las pruebas de detección de ANT2 no se detectó la presencia de antibióticos aminoglucósidos en ninguna de las 579 muestras evaluadas. En la figura 23 se observa una tira reactiva del kit 3 Aminosensor.

Figura 23

Tira reactiva del kit 3 Aminosensor.



Nota. Esta tira reactiva indica que la muestra analizada no tiene residuos de Neomicina, Dihydro-o-estreptomicina y gentamicina.

Neutralizantes alcalinos

Se utilizó el método de rojo-fenol para determinar la presencia de neutralizante alcalinos en muestras de leche cruda. Los resultados revelaron que siete muestras tenían neutralizantes alcalinos añadidos y 572 muestras resultaron negativas. En la Figura 24 se observan tubos de ensayo donde se distingue la diferencia del color entre un resultado positivo y un resultado negativo.

Figura 24

Análisis para determinar la presencia de neutralizantes alcalinos en leche cruda.



Nota. Tubos de ensayo con muestras de leche analizadas con el método de rojo-fenol: (A) Resultado positivo y (B) Resultado negativo.

En las tablas 17, 18 y 19 se observan los resultados obtenidos en los diez cantones de la provincia durante cada una de las rondas. En la figura 25 se observa el porcentaje de resultados obtenidos.

Tabla 17

Resultados obtenidos en la ronda 1 para la prueba de detección de neutralizantes alcalinos.

	Alausí	Chambo	Chunchi	Colta	Cumandá	Guamote	Guano	Pallatanga	Penipe	Riobamba	Total
Negativo	15	15	5	16	2	37	33	4	9	56	192
Positivo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1

Tabla 18

Resultados obtenidos en la ronda 2 para la prueba de detección de neutralizantes alcalinos.

	Alausí	Chambo	Chunchi	Colta	Cumandá	Guamote	Guano	Pallatanga	Penipe	Riobamba	Total
Negativo	15	15	5	16	2	37	31	4	9	57	191
Positivo	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2

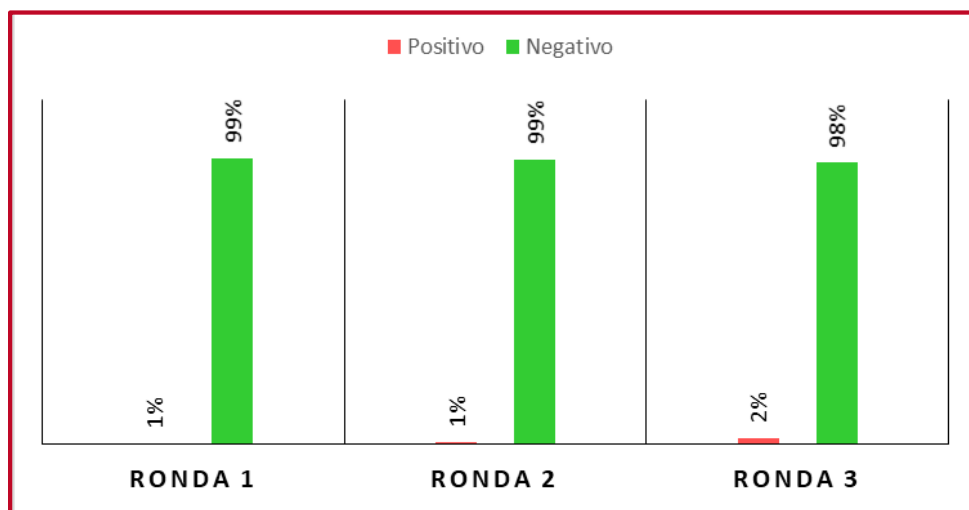
Tabla 19

Resultados obtenidos en la ronda 3 para la prueba de detección de neutralizantes alcalinos.

	Alausí	Chambo	Chunchi	Colta	Cumandá	Guamote	Guano	Pallatanga	Penipe	Riobamba	Total
Negativo	15	15	5	15	2	35	33	4	9	56	189
Positivo	0	0	0	1	0	2	0	0	0	1	4

Figura 25

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



En la tabla 20 se observa un resumen de los resultados obtenidos. Al analizarlos mediante la distribución de Bernoulli como se observa en la figura 26 tenemos la gráfica de función de masa, con una probabilidad de éxito “ $p= 0.01$ ”.

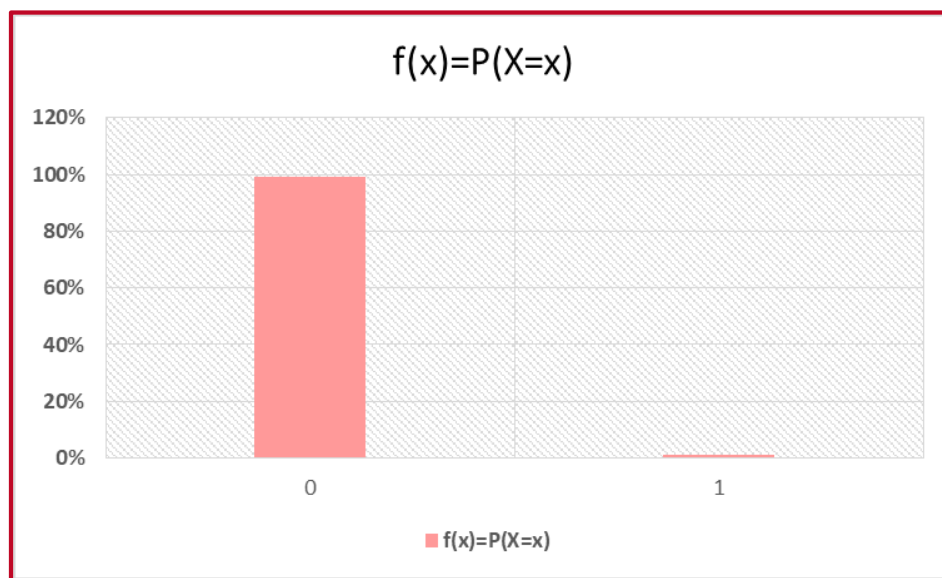
Tabla 20

Resultados obtenidos en la provincia de Chimborazo para la prueba de detección de neutralizantes alcalinos.

	Alausí	Chambo	Chunchi	Colta	Cumandá	Guamote	Guano	Pallatanga	Penipe	Riobamba	Total
Negativo	45	45	15	47	6	109	97	12	27	169	572
Positivo	0	0	0	1	0	2	2	0	0	2	7

Figura 26

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



Nota. La distribución de Bernoulli nos indica que existe un 99% de probabilidad que el resultado obtenido de la prueba de neutralizantes alcalinos sea "0" y un 1% de probabilidad que sea "1".

Células somáticas

El conteo de células somáticas presentes en las 579 muestras de leche cruda se realizó con el método de citometría de flujo. En la tabla 21 se observan los promedios de células somáticas calculados en cada cantón de la provincia durante las tres rondas de muestreo. En la figura 27 se observa el porcentaje de muestras analizadas que cumplen con este parámetro en cada ronda de muestreo y en la figura 28 se observa observar la representación gráfica de los promedios calculados con los resultados obtenidos en toda la provincia, en cada ronda.

Tabla 21

Promedio de conteo de células somáticas/cm³ presentes en leche cruda en cada cantón de la provincia de Chimborazo.

	Alausí	Chambo	Chunchi	Colta	Cumandá	Guamote	Guano	Pallatanga	Penipe	Riobamba
Ronda1	525867	472067	549400	563125	683000	492486	558606	340750	528778	590175
Ronda2	629533	498267	513200	530500	720500	691649	770758	508500	629333	578614
Ronda3	579267	686533	475800	598188	614500	988270	679485	687250	616222	691719

Figura 27

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

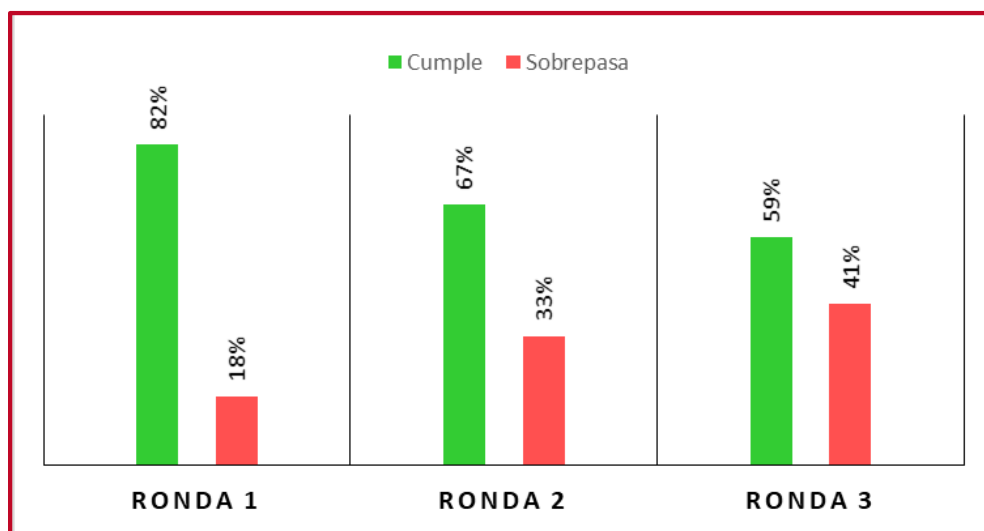
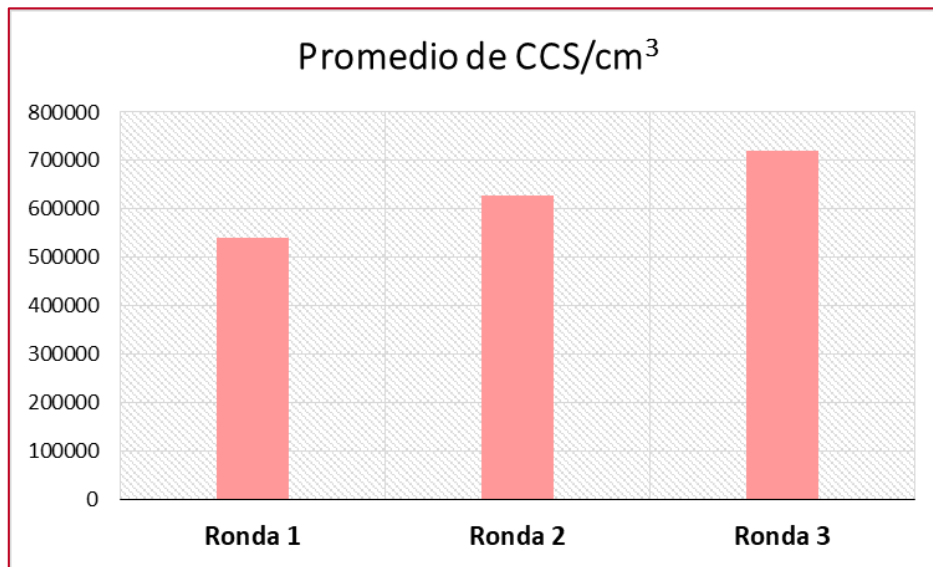


Figura 28

Gráfico de barras del promedio de células somáticas/cm³ presentes en leche cruda de la provincia de Chimborazo.



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

En el apéndice 6 se observa el cálculo de los intervalos de confianza y se obtuvo que en promedio el conteo de células somáticas (CCS) en la primera ronda estuvo entre 482 mil y 601 mil CCS/cm³, ($1-\alpha=0.95$); en la segunda ronda estuvo entre 568 mil y 687 mil CCS/cm³, ($1-\alpha=0.95$); y en la tercera ronda entre 618 mil y 821 mil CCS/cm³, ($1-\alpha=0.95$).

Bacterias totales

El conteo de bacterias totales se realizó con citometría de flujo y se obtuvo el resultado en conteo de bacterias individuales (IBC) pero aplicando la ecuación 2 se transformaron los resultados a UFC, en la tabla 22 tenemos el promedio de UFC/cm³ de leche cruda de cada cantón de la provincia durante las tres rondas de muestreo. En la figura 29 se observa el porcentaje de muestras analizadas

que cumplen con este parámetro en cada ronda de muestreo y en la figura 30 se observa el promedio calculado con los resultados obtenidos en toda la provincia.

Tabla 22

Promedio de bacterias totales presentes en muestras de leche cruda (UFC/cm³) en cada cantón de la provincia de Chimborazo.

	Alausí	Chambo	Chunchi	Colta	Cumandá	Guamote	Guano	Pallatanga	Penipe	Riobamba
Ronda1	4185819	9008275	7913412	2624194	959818	4810714	4933821	6824398	2704702	4960417
Ronda2	3318957	6262230	4111619	3414590	775649	3041075	5251954	2765004	7065997	4957480
Ronda3	2417021	1679958	336432	3102806	7799254	2937580	5273518	1297172	1501842	9550787

Figura 29

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

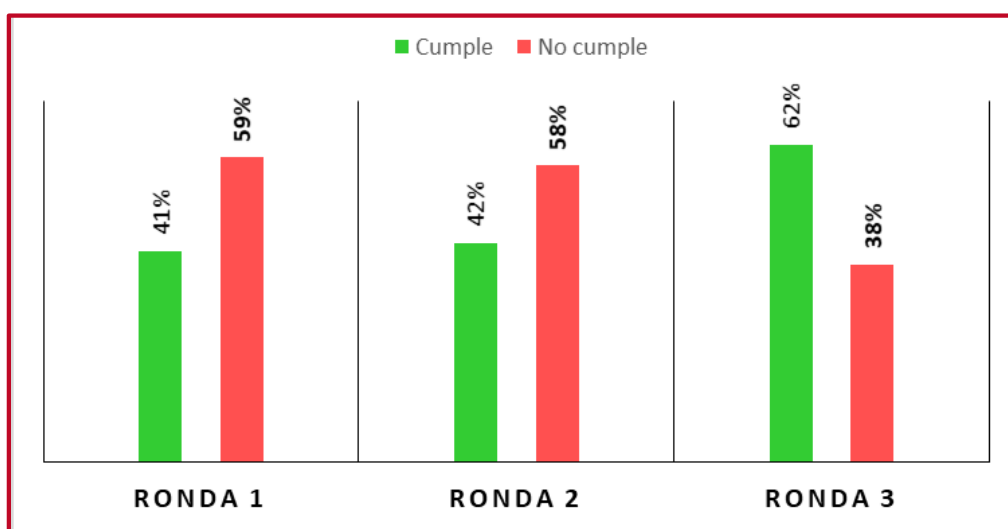
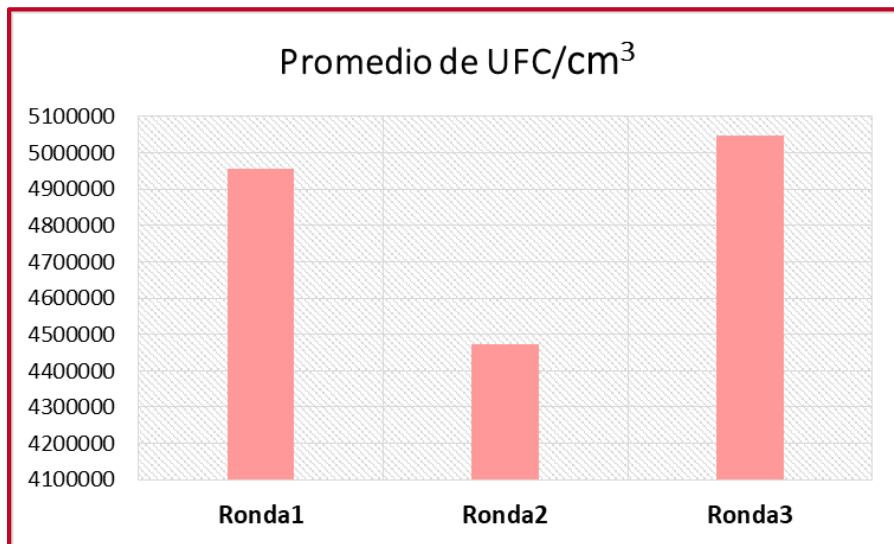


Figura 30

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



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

En el apéndice 7 se observa el cálculo de los intervalos de confianza y se obtuvo que en promedio el conteo de bacterias totales (CBT) en la primera ronda estuvo entre 4.11×10^6 y 5.79×10^6 UFC/cm³, ($1-\alpha=0.95$); en la segunda ronda estuvo entre 3.64×10^6 y 5.30×10^6 UFC/cm³, ($1-\alpha=0.95$); y en la tercera ronda entre 2.78×10^6 y 7.31×10^6 UFC/cm³, ($1-\alpha=0.95$).

Capítulo 4: Discusión

La industria láctea se encuentra en constante crecimiento, con ello aumenta la demanda de leche cruda al ser la principal materia prima de esta industria. A pesar de que en los últimos años se ha incrementado el consumo de leche de otras especies como la cabra, sigue siendo la leche vacuna la principal materia prima para la pasteurización y elaboración de quesos, yogurt, entre otros derivados. En la provincia de Chimborazo procesan diariamente en promedio 245804 L de leche cruda.

Con el crecimiento de la población crece también la demanda de servicios y alimentos. Cuando la oferta es superada por la demanda, hay personas que recurren al fraude alimentario con la finalidad de obtener mayores réditos económicos. La leche es un alimento susceptible a la adulteración (Vega y León et al., 2021). AGROCALIDAD realiza inspecciones a centros de acopio e industrias lácteas con la finalidad de vigilar la calidad e inocuidad de la leche cruda a través de la medición de ciertos parámetros cualitativos y cuantitativos.

El primer parámetro que se evaluó fue la estabilidad proteica. Esta prueba se puede realizar con alcohol al 75 % en volumen o 68 % en peso (NTE INEN 9:2012, 2012). Otra sustancia que se puede emplear para esta prueba es alizarina. Mediante esta prueba cualitativa se obtuvo que el 18 % de las muestras presentan coagulación por lo tanto son positivas, mostrando que existe una elevación en la acidez y disminución de pH debido a la fermentación y aumento de microorganismos (Pinto da Rosa et al., 2020).

Los siguientes parámetros que se midieron durante este trabajo fueron pH y acidez (% de ácido láctico). La normativa ecuatoriana no establece límites permisibles para pH de leche cruda, por ese motivo se tomó como referencia un rango que oscila entre 6.6 y 6.8 (López et al., 2015), en base a lo mencionado tenemos el promedio de pH se encuentra dentro de los parámetros normales, pues se mantiene entre 6.61 y 6.66 (Figura 12). Es importante tener en cuenta que el pH tiende a cambiar con el transcurso del tiempo (Marouf & Elmhal, 2017). Entre los factores que influyen en el pH tenemos la mastitis, además en caso de ser calostro se va a tener una leche con un pH bajo (Helmenstine, 2022).

La acidez está relacionada de forma directa con el pH, son parámetros inversamente proporcionales. Los microorganismos tienen la capacidad de convertir lactosa en ácido láctico, en tanto la acidez aumenta, el valor de pH disminuye (Marouf & Elmhal, 2017). Las proteínas pueden influir en el porcentaje de acidez de forma directamente proporcional (Schmidt et al., 1996). En el estudio los

promedios de ácido láctico de cada ronda son 0.160, 0.157 y 0.156 respectivamente (Figura 14), los límites permisibles según la normativa ecuatoriana está en un rango de 0.13 hasta 0.17. Esta información nos indica que se está cumpliendo con la normativa, sin embargo es importante tomar en cuenta que la finalidad del uso de adulterantes es ocultar cambios que puedan ocurrir en la leche cruda a causa del tiempo, manejo inadecuado y condiciones higiénicas deficientes.

Las aflatoxinas son micotoxinas secretadas como metabolitos secundarios por *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, que forman parte de la flora microscópica de alimentos en condiciones de almacenamiento (Gimeno, 2004). En ninguna muestra analizada se evidenció la presencia de Aflatoxina M1, estos resultados se los puede relacionar con el tipo de alimento que consume el ganado vacuno de la provincia de Chimborazo, su dieta se basa en forraje, alfalfa y leguminosas frescas. Es decir el consumo de alimentos secos y balanceados es mínimo. La Aflatoxina M1 representa un riesgo para la salud pública, por su potencialidad mutagénica, teratogénica y carcinogénica (Gimeno, 2004), siendo los resultados bastante alentadores con respecto a este contaminante que pone en riesgo la inocuidad de la leche cruda y la salud humana.

El contenido de cloruros en le leche cruda está relacionado con su contenido de sales. Es importante vigilar que los niveles de cloruros no excedan los límites permitidos (Metrohm, 2020). Con la aplicación de la prueba rápida colorimétrica y tomando en cuenta el límite permitido por AGROCALIDAD (1000 mg/L Cl⁻ o 0.1%) únicamente se registraron cuatro resultados positivos, con la probabilidad de que una de cada 100 muestras exceda el límite permitido (Figura 18).

Una investigación realizada por Medina et al., (1998) estudió de la relación de la crioscopía y la concentración de cloruros presentes en leche cruda, en base a los límites establecidos (0.07-0.12%) por la Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN), evidenciando un incumplimiento de la norma en la mayor parte de los casos (Medina et al., 1998). En estudio realizado por Canales et al.,

(1996) determinaron la concentración de cloruros utilizando un potenciómetro, es un método de detección de mastitis en vacas lecheras, la concentración de cloruros detectada en vacas enfermas oscila entre 0.14 hasta 0.332%, en vacas sanas desde 0.077 hasta 0.114 % y en leche proveniente de vacas en proceso de transición, la concentración oscila de 0.117 a 0.138 % (Canales et al., 1996).

El uso de peróxidos para disminuir el porcentaje de acidez de la leche es ampliamente conocido y difundido alrededor del mundo, especialmente cuando se carece de un sistema de enfriamiento de la leche. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es un adulterante que se adiciona a la leche para activar la enzima lactoperoxidasa (Martin et al., 2014). A pesar de ser un adulterante común no se detectó la presencia de H_2O_2 en las muestras analizadas; esto probablemente se deba al fácil deterioro del peróxido de hidrógeno en leche, como consecuencia se dificulta la detección de este adulterante (Martin et al., 2014).

Jurado et al., (2017) realizaron un estudio para determinar el tiempo de eliminación de peróxidos en muestras de leche cruda, siendo que a mayor concentración se requiere más tiempo para su eliminación (Jurado et al., 2017). Siendo importante la realización de la prueba a la mayor brevedad posible.

La presencia de antibióticos en alimentos es un problema de salud pública, a pesar de que los niveles presentes sean mínimos al consumirlos de manera periódica pueden provocar alergia, intoxicación, resistencia antimicrobiana, en casos más graves tienen efectos carcinogénicos, mutagénicos y teratogénicos (Nisha, 2008). El método de cromatografía en capa fina es utilizado para la detección presencia de antibióticos en leche, dando como resultado diez positivos para ANT1 y ningún resultado positivo para ANT2. El grupo de los ANT1 está conformado por los antibióticos β -lactámicos, tetraciclinas y sulfamidas, la probabilidad de obtener un resultado positivo para alguna de estas familias que se agrupan en ANT1 es del 2%.

En la provincia del Guayas, Aroca (2016) realiza la detección cualitativa de antibióticos ANT1 en leche cruda, obteniendo un 19.4% de muestras positivas para antibióticos, indicando que en su mayoría estos residuos no están en la leche distribuida en el cantón Naranjal (Aroca, 2016).

La leche materna al igual que la orina son vías para la eliminación de residuos de medicamentos, los antibióticos no son la excepción. Se obtuvieron resultados positivos para la presencia de las tres familias que conforman ANT1, no de manera simultánea (Figura 20). La familia de antibióticos β -lactámicos bloquea la síntesis de la pared celular de las bacterias y es la más utilizada en tratamientos clínicos debido a su amplio espectro y baja toxicidad. En los últimos tiempos su uso se ha visto limitado por el desarrollo de resistencia generado como consecuencia del uso empírico (Suárez & Gudiol, 2009). En ganadería se utiliza para tratar infecciones respiratorias, además se usa en el tratamiento de mastitis (Salas et al., 2013).

Las sulfamidas y las tetraciclinas también son utilizadas en tratamientos veterinarios. Las tetraciclinas en asociación con la estreptomina se usan en el tratamiento de brucelosis; el uso de sulfamidas ha disminuido por la resistencia antimicrobiana, se emplea para tratar infecciones respiratorias como la neumonía (Pérez-Trallero & Iglesias, 2003). No se detectó la presencia de antibióticos aminoglucósidos en las muestras de leche cruda.

La leche que contiene residuos de antibióticos no es apta para el consumo humano ni de otros animales, esta es la razón por la que se debe respetar el periodo de retiro que sugiere el envase de los medicamentos. Salas et al., (2013) concluyen que tres días posteriores a la finalización del tratamiento es posible detectar residuos de antibióticos en leche (Salas et al., 2013). El consumo de leche con residuos de antibióticos crea resistencia tanto en animales y en el ser humano. Los resultados obtenidos (98% y 100% de resultados negativos para ANT1 y ANT2 respectivamente) sugieren que la mayoría de productores de leche están respetando el tiempo de retiro, y el 2% de resultados positivos para ANT1

presentan casos excepcionales en los que la leche secretada por las vacas sometidas a algún tratamiento no fue descartada.

Los neutralizantes alcalinos son añadidos a la leche con el objetivo de reducir la acidez y elevar el pH, una forma de descartar la presencia de estos adulterantes realizar una prueba de neutralizantes. El método empleado por AGROCALIDAD es la prueba de rojo fenol; de las 579 muestras analizadas, en siete se pudo observar una tonalidad más intensa (Figura 24) y se registraron como positivo, mientras que registraron como negativo las muestras analizadas en las que se observó un color salmón.

Una investigación realizada por Aiello et al., (2019) utilizó cromatografía líquida (HPLC) para detectar la presencia de neutralizantes, cuyo fundamento es determinar la cantidad de ácido láctico, este método resulta rápido y preciso (Aiello et al., 2019). El método colorimétrico con ácido rosólico se utiliza por su rapidez y simplicidad (Gondima et al., 2021). La prueba de rojo fenol es cualitativa y la NTE INEN 1500 la señala como un método para la detección de neutralizantes.

Aiello et al., (2019) a través del método de cromatografía líquida evaluaron muestras leche con valores de pH dentro del rango regular de 6.5 a 6.7, con sospecha de estar neutralizada. La determinación de ácido láctico se realizó en leche acidificada con ácido láctico y neutralizada con hidróxido de sodio para simular la adulteración (Aiello et al., 2019).

El conteo de células somáticas en leche cruda es un indicador del estado de salud de las ubres del animal lechero (Hernández & Bedolla, 2008). La NTE INEN 9:2012, (2012) señala que en 1 cm³ de leche cruda pueden existir hasta 7x10⁵ células somáticas, de lo contrario se estaría infringiendo la normativa vigente.

El número de células somáticas presentes en las muestras de leche cruda se determinó mediante citometría de flujo, utilizando el equipo FOSSOMATIC FC. El promedio de CCS/cm³ en la provincia de Chimborazo en cada una de las tres rondas fueron: 541503 CCS/cm³, 627549 CCS/cm³ y

719575 CCS/cm³ respectivamente. En la ronda 1 y 2 los promedios CSS/cm³ no exceden el límite permitido, mientras que en la ronda 3 se observa que excede el límite, lo que significa que hay un mayor número de casos de mastitis que en las dos rondas previas.

El número células somáticas se pueden determinar con otros métodos: conteo microscópico, pruebas de mastitis California, contadores electrónicos, prueba de Wisconsin y contador Infrarrojo (Quevedo, 2018). El equipo FOSSOMATIC FC es un contador electrónico.

Mera, (2013) en un estudio realizado en Machachi, provincia de Pichincha determinó el número de células somáticas presentes en muestras de leche cruda empleando citometría de flujo, donde el 87.04% de los resultados cumplieron con la NTE INEN 9:2012 (Mera, 2013).

La mastitis provoca que el número de células somáticas en leche cruda aumente y como consecuencia un deterioro en la inocuidad de la leche. Es importante trabajar en la prevención de la mastitis y así disminuir el riesgo que conlleva tener hatos afectados con la enfermedad.

Se recomienda poner en práctica buenas prácticas de ordeño: lavado correcto de manos, ubre y pezones antes y después del ordeño, sellado de ubres después del ordeño, lavar y desinfectar heridas, separar animales según la edad y estado de salud, el área de ordeño debe permanecer higiénica (Gutiérrez, 2014).

El conteo de bacterias totales se realizó con el método de citometría de flujo utilizando el equipo BactoScan™ FC+. El CBT promedio para cada una de las tres rondas fueron: 4956380 UFC/cm³, 4474224 UFC/cm³ y 5047652 UFC/cm³ respectivamente.

Mera, (2013) determinó el número de bacterias totales presentes en muestras de leche cruda empleando citometría de flujo, donde el 98.77% de los resultados cumplieron con la NTE INEN 9:2012 (Mera, 2013).

La siembra en placas Petri es el método tradicional para la determinación de microorganismos aerobios mesófilos totales, los resultados se obtienen en UFC/ (mL o cm³), luego de un periodo de incubación que dura entre 48 y 75 horas (NTE INEN 1 529-5:2006, 2006). Al ser un análisis requerido por industrias lácteas y las agencias de control, se han buscado otras alternativas con el afán de optimizar tiempo. La citometría de flujo es un método rápido y confiable, se determina la población bacteriana a través del Conteo Individual de Bacterias (IBC/mL o cm³) (Contero et al., 2019). Los resultados obtenidos se transformaron de IBC a UFC mediante la ecuación 2.

La NTE INEN 9:2012, (2012) señala que en 1 cm³ de leche cruda puede tener como límite máximo permisible 1.5x10⁶ UFC. Los promedios calculados para cada ronda exceden ampliamente dicho límite. La proliferación bacteriana puede ser consecuencia de diversos factores: ordeño deficiente, carencia de higiene, almacenamiento y transporte inadecuado; esto provoca alteración de la leche, cambios en las características organolépticas y disminución de la vida útil (Revelli et al., 2004).

Los parámetros evaluados en este trabajo, podrían ser aplicados en las estrategias de control internos y externos de centros de acopios e industrias lácteas para mejorar la cadena de producción y así obtener productos de calidad, aptos para el consumo. Además de representar una alternativa para establecer un sistema de pago por calidad, incentivando a la mejora continua de la calidad e inocuidad de la leche cruda (Remón-Díaz et al., 2019).

Capítulo 5: Conclusiones

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 ($\text{valor-}p < 0.0001$) 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 concluye 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.

Capítulo 6: Recomendaciones

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.

Capítulo 7: Bibliografía

Afzal, A., Mahmood, M. S., Hussain, I., & Akhtar, M. (2011). Adulteration and Microbiological Quality of Milk (A Review). *Pakistan Journal of Nutrition*, 10(12), 1195-1202.

<https://doi.org/10.3923/pjn.2011.1195.1202>

Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario (2013). *Laboratorio de Control de Calidad de Leche: Procedimiento PEE/CL/004 "Estabilidad Proteica"* [Archivo PDF].

Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario (2013a). *Laboratorio de Control de Calidad de Leche: Procedimiento PEE/CL/009 "Determinación Aflatoxina M1"* [Archivo PDF].

Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario (2013b). *Laboratorio de Control de Calidad de Leche: Procedimiento PEE/CL/014 "Determinación de Cloruros"* [Archivo PDF].

Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario (2013c). *Laboratorio de Control de Calidad de Leche: PEE/CL/008 "Determinación de Peróxidos"* [Archivo PDF].

Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario (2013d). *Laboratorio de Control de Calidad de Leche: PEE/CL/010 "Determinación de Antibióticos β -lactámicos, Tetraciclinas y Sulfas"* [Archivo PDF].

Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario (2013e). *Laboratorio de Control de Calidad de Leche: PEE/CL/011 "Determinación de Antibióticos Aminoglucósidos"* [Archivo PDF].

Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario (2013f). *Laboratorio de Control de Calidad de Leche: Procedimiento PEE/CL/001 "Determinación del Contaje de Células Somáticas"* [Archivo PDF].

Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario (2013g). *Laboratorio de Control de Calidad de Leche: Procedimiento PEE/CL/003 "Determinación del Contaje de Bacterias Totales"* [Archivo PDF].

Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario (2021). *Laboratorio de Control de Calidad de Leche: Procedimiento PEE/CL/007 "Determinación de la Acidez y pH mediante potenciómetro"* [Archivo PDF].

Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. (6 de mayo de 2016). *ToxFAQs™ - Peróxido de hidrógeno (Hydrogen Peroxide)*.

https://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts174.html

Aguilera-Becerra, Astrid Maribel, & Urbano-Cáceres, Eliana Ximena, & Jaimes-Bernal, Claudia Patricia (2014). Bacterias patógenas en leche cruda: problema de salud pública e inocuidad alimentaria. *Ciencia y Agricultura*, 11(2), 83-93. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=560058659011>

Aiello, A., Pizzolongo, F., Manzo, N., & Romano, R. (2019). A New Method to Distinguish the Milk Adulteration with Neutralizers by Detection of Lactic Acid. *Food Analytical Methods*, 12(11), 2555-2561. <https://doi.org/10.1007/s12161-019-01594-5>

Alais, C. (1985). *Ciencia de la leche: Principios de técnica lechera*. Reverte.

Aroca, N. (2016). *DETECCIÓN CUALITATIVA DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS EN LECHE CRUDA COMERCIALIZADA EN EL CANTÓN NARANJAL, PROVINCIA DEL GUAYAS* [Universidad Técnica de Machala].
http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/7695/1/DE00048_TRABAJO DETITULACION.pdf

- Aya, E. M. A. (2007). Evaluación de la estabilidad proteica en la leche y su relación con la calidad microbiológica en los municipios de Tocancipá, Tabio y Zipaquirá. *Universidad La Salle*, 109. <https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1293&context=zootecnia>
- Azad, T., & Ahmed, S. (2016). Common milk adulteration and their detection techniques. *International Journal of Food Contamination*, 3(1), 22. <https://doi.org/10.1186/s40550-016-0045-3>
- Barbano, D. M., Ma, Y., & Santos, M. V. (2006). Influence of raw milk quality on fluid milk shelf life. *Journal of Dairy Science*, 89 Suppl 1, E15-19. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72360-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72360-8)
- Blowey, R., & Edmondson, P. (1995). *Control de la mastitis en granjas de vacuno de leche*. Editorial Acribia.
- Calderón, A., Arteaga, M. R., Rodríguez, V. C., Arrieta, G. J., Bermudez, D. C., & Villareal, V. P. (2011). EFECTO DE LA MASTITIS SUBCLÍNICA SOBRE EL RENDIMIENTO EN LA FABRICACIÓN DEL QUESO COSTEÑO. *Biosalud*, 10(2), 16-27.
- Calderón-Rangel, A., Rodríguez, V., & Martínez, N. (2013). Determinación de adulterantes en leches crudas acopiadas en procesadoras de quesos en Montería (Córdoba). *Universidad de los Llanos*, 17(2), 202-206. <http://www.scielo.org.co/pdf/rori/v17n2/v17n2a07.pdf>
- Canales, J., Parada, W., & Vigil, A. (1996). *Determinación de concentración de cloruros por potenciometría directa, para la detección de mastitis en vacas lecheras, en el departamento de San Miguel* [Bachelor, Universidad de El Salvador]. <https://ri.ues.edu.sv/id/eprint/18551/>
- Chacón Villalobos, A. (2004). Acidez y peso específico de la leche de cabra de un grupo de capricultores de la Meseta Central costarricense. *Agronomía Mesoamericana*, 15(2), 179-183. <https://doi.org/10.15517/am.v15i2.11898>
- Chacón Villalobos, A. (2006). Comparación de la titulación de la acidez de leche caprina y bovina con hidróxido de sodio y cal común saturada. *Agronomía Mesoamericana*, 17(1), 55-61. <https://doi.org/10.15517/am.v17i1.5066>

- Chen, X., Chu, B., Xi, H., Xu, J., Lai, L., Peng, H., Deng, D., & Huang, G. (2018). Determination of chlorine ions in raw milk by pulsed amperometric detection in a flow injection system. *Journal of Dairy Science*, *101*(11), 9647-9658. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14395>
- Chye, F. Y., Abdullah, A., & Ayob, M. K. (2004). Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. *Food Microbiology*, *21*(5), 535-541. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2003.11.007>
- Contero, R., Aquino, E. L., Simbaña, P. E., Gallardo, C., Bueno, R., Contero, R., Aquino, E. L., Simbaña, P. E., Gallardo, C., & Bueno, R. (2019). ESTUDIO EN EL ECUADOR DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN PARA EL CONTEO TOTAL DE BACTERIAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO DE LECHE CRUDA BOVINA. *LA GRANJA. Revista de Ciencias de la Vida*, *29*(1), 97-104. <https://doi.org/10.17163/lgr.n29.2019.08>
- Cravero, C. F., Juncos, N. S., & Olmedo, R. H. (2020). Aflatoxina M1 en quesos y su importancia en la actualidad. *Nexo Agropecuario*, *8*(1), 37-42. <https://revistas.unc.edu.ar/index.php/nexoagro/article/view/28797>
- Das, S., Sivaramakrishna, M., Biswas, K., & Goswami, B. (2011). Performance study of a 'constant phase angle based' impedance sensor to detect milk adulteration. *Sensors and Actuators A: Physical*, *167*(2), 273-278. <https://doi.org/10.1016/j.sna.2011.02.041>
- Das, S., Sivaramakrishna, M., Biswas, K., & Goswami, B. (2015). A low cost instrumentation system to analyze different types of milk adulteration. *ISA Transactions*, *56*, 268-275. <https://doi.org/10.1016/j.isatra.2014.11.021>
- Diaz, D., & Pena, G. (2019). *Uso de Antibióticos en la Ganadería Lechera*. Dairexnet. <https://dairy-cattle.extension.org/uso-de-antibioticos-en-la-ganaderia-lechera/>
- Donnelly, C. W. (2004). Growth and Survival of Microbial Pathogens in Cheese. En *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (Vol. 1, pp. 541-559). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1874-558X\(04\)80081-2](https://doi.org/10.1016/S1874-558X(04)80081-2)

- El Universo. (2021, octubre 16). *La leche, el producto estrella de una cadena de producción con una alta demanda de calidad*. El Universo. <https://www.eluniverso.com/noticias/ecuador/produccion-de-leche-nota/>
- FAO, & WHO. (2018). *LÍMITES MÁXIMOS DE RESIDUOS (LMR) Y RECOMENDACIONES SOBRE LA GESTIÓN DE RIESGOS (RGR) PARA RESIDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINARIOS EN LOS ALIMENTOS*. <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/es/?Ink=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXM%2B2%252FMRL2s.pdf>
- Gimeno, A. (2004). *Aflatoxina M1 en la Leche. Riesgos para la Salud Pública, Prevención y Control*. https://www.adiveter.com/ftp_public/articulo1790.pdf
- Gondima, C., Palhares, M., Santos, P., Sousa, R., Junqueira, R., & Souza, S. (2021). DETECTION OF ACID NEUTRALIZERS IN FRAUDULENT MILK: FULL VALIDATION OF A CLASSICAL QUALITATIVE METHOD. *Química Nova*. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170703>
- González, G., Molina, B., & Coca, R. (2010). CALIDAD DE LA LECHE CRUDA. *Primer Foro sobre Ganadería Lechera de la Zona Alta de Veracruz*, 10. https://www.uv.mx/apps/agronomia/foro_lechero/Bienvenida_files/CALIDADDELALECHECRUDA.pdf
- Gutiérrez, N. (2014). *RECOMENDACIONES PARA PREVENIR LA MASTITIS EN LAS VACAS LECHERAS*. Agricultura y Desarrollo Rural. <https://sader.jalisco.gob.mx/fomento-ganaderoagricola-e-inocuidad/544#:~:text=B%C3%A1sicamente%20la%20prevenci%C3%B3n%20de%20esta,las%20siguientes%2C%20medidas%20de%20higiene.&text=Evitar%20derrames%20de%20leche%20de,mediante%20cualquier%20h%C3%A9rida%20de%20ubre>.
- Helmenstine, A. M. (2022). *What Is the Acidity or pH of Milk? Conditions That Affect Acidity*. ThoughtCo. <https://www.thoughtco.com/what-is-the-ph-of-milk-603652>

Hernández, J., & Bedolla, J. (2008). Importancia del conteo de células somáticas en la calidad de la leche.

Revista Electrónica de Veterinaria, 9(9), 1-34.

<https://www.redalyc.org/pdf/636/63617329004.pdf>

Ibrahim, A., Awad, S., & Amer, D. (2021). A Rapid Quality Control Method for the Detection of

Adulteration of Milk by Neutralizing Agents. *International Journal of Dairy Science*, 16(3), 108-

115. <https://doi.org/10.3923/ijds.2021.108.115>

Jurado, S., Morales, S., Núñez, L., Torre, D. D. L., Aragón, E., & Puga, B. (2017). DETERMINACIÓN DEL

TIEMPO DE ELIMINACIÓN DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN CINCO CONCENTRACIONES EN

LECHE CRUDA. *ECUADOR ES CALIDAD*, 4(2), Article 2. <https://doi.org/10.36331/revista.v4i2.28>

Li, N., Richoux, R., Boutinaud, M., Martin, P., & Gagnaire, V. (2014). Role of somatic cells on dairy

processes and products: A review. *Dairy Science & Technology*, 94(6), 517-538.

<https://doi.org/10.1007/s13594-014-0176-3>

López, A. L., Barriga, D., Jara, J., & Ruz, J. M. (2015). *Consejería de Agricultura y Pesca, Instituto de*

Investigación y Formación Agraria y Pesquera: Determinaciones Analíticas en Leche.

[https://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/ifapa/servifapa/registro-](https://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/ifapa/servifapa/registro-servifapa/f4c126b0-f732-480d-930e-2bb9b406f553/download#:~:text=El%20pH%20normal%20de%20la,%2C6%20y%206%2C8.)

[servifapa/f4c126b0-f732-480d-930e-](https://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/ifapa/servifapa/registro-servifapa/f4c126b0-f732-480d-930e-2bb9b406f553/download#:~:text=El%20pH%20normal%20de%20la,%2C6%20y%206%2C8.)

[2bb9b406f553/download#:~:text=El%20pH%20normal%20de%20la,%2C6%20y%206%2C8.](https://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/ifapa/servifapa/registro-servifapa/f4c126b0-f732-480d-930e-2bb9b406f553/download#:~:text=El%20pH%20normal%20de%20la,%2C6%20y%206%2C8.)

Lucey, J. A. (2015). Raw Milk Consumption. *Nutrition Today*, 50(4), 189-193.

<https://doi.org/10.1097/NT.0000000000000108>

Marouf, A., & Elmhal, S. (2017). Monitoring pH During Pasteurization of Raw Cow's Milk using Nd:YAG

Laser. *International Journal of Advanced Research in Physical Science (IJARPS)*, 4, 1-4.

<https://doi.org/10.20431/IJARPS.2017.4.12.2>

- Martin, N. H., Friedlander, A., Mok, A., Kent, D., Wiedmann, M., & Boor, K. J. (2014). Peroxide test strips detect added hydrogen peroxide in raw milk at levels affecting bacterial load. *Journal of Food Protection*, 77(10), 1809-1813. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-074>
- Medina, A. L. M., González, Isbelia G., & Quintero de Letterní, F. Q. de. (1998). Estudio de la relación crioscopía-cloruros de la leche cruda producida en la zona alta del Estado Mérida, Venezuela. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia*, 8(4), Article 4. <https://produccioncientificaluz.org/index.php/cientifica/article/view/14372>
- Mera, P. (2013). *Evaluación de la calidad de leche mediante citometría de flujo, proveniente de bovinos de la Parroquia Machachi, Provincia de Pichincha* [Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE]. <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/7465/1/T-ESPE-047485.pdf>
- Mercado, M., González, V., Rodríguez, D., & Carrascal, A. (2014). Perfil sanitario nacional de leche cruda para consumo humano directo. *Ministerio de Salud y Protección Social*, 10-106. <https://doi.org/minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/SNA/Perfil-sanitario-nacional-leche-cruda.pdf>
- Metrohm. (2020). *Cloruro en leche y leche en polvo*. Metrohm. https://www.metrohm.com/es_ar/applications/application-notes/aa-t-001-100/an-t-133.html
- Murthy, M. R. N., Reid, T. J., Sicignano, A., Tanaka, N., & Rossmann, M. G. (1981). Structure of beef liver catalase. *Journal of Molecular Biology*, 152(2), 465-499. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(81\)90254-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(81)90254-0)
- Negri, L. M. (2005). EL pH Y LA ACIDEZ DE LA LECHE. *Manual de Referencias técnicas para el logro de leche de calidad*, 155-161. <https://www.aprocal.com.ar/wp-content/uploads/pH-y-acidez-en-leche2.pdf>

- Nisha, A. R. (2008). Antibiotic Residues—A Global Health Hazard. *Veterinary World*, 1(12), 375-377.
<https://www.veterinaryworld.org/2008/December/Antibiotic%20Residues%20-%20A%20Global%20Health%20Hazard.pdf>
- NTE INEN 1 529-5:2006. (2006). *Control microbiológico de los alimentos. Determinación de la cantidad de microorganismos aerobios mesófilos. REP.*
<https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/1529-5.pdf>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2013). *Manteniendo los alimentos inocuos y nutritivos* [Archivo PDF]. <https://www.fao.org/3/i3261s/i3261s09.pdf>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2021). *Producción y productos lácteos: Composición de la leche*. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. <https://www.fao.org/dairy-production-products/products/composicion-de-la-leche/es/>
- Pérez-Trallero, E., & Iglesias, L. (2003). Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21(9), 520-529. <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-resumen-tetraciclinas-sulfamidas-metronidazol-13052338#:~:text=Las%20sulfamidas%20son%20antibi%C3%B3ticos%20sint%C3%A9ticos,uso%20actualmente%20es%20muy%20escaso>
- Pinto da Rosa, P., Pio Ávila, B., Damé Veber Angelo, I., Moreira da Silva, P., Garavaglia Chesini, R., Nussy Mota, G., Aristimunho Sedrez, P., Albandes Fernandes, T., Bugoni, M., & Fernando Buttow Roll, V. (2020). FACTORS THAT AFFECT THE THERMAL STABILITY OF BOVINE MILK AND THE USE OF ALCOHOL TEST IN THE MILK INDUSTRY – A REVIEW. *Nucleus Animalium*, 12(2), 15-46.
<https://doi.org/10.3738/21751463.3734>

- Pyz-Łukasik, R., Paszkiewicz, W., Tatara, M. R., Brodzki, P., & Bełkot, Z. (2015). Microbiological quality of milk sold directly from producers to consumers. *Journal of Dairy Science*, 98(7), 4294-4301.
<https://doi.org/10.3168/jds.2014-9187>
- Quevedo, W. (2018). Recuento de células somáticas (RSC), como indicador en la resistencia de la mastitis bovina. *Revista Ciencia, Tecnología e Innovación*, 16(17), 1001-1012.
http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S2225-87872018000100005&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Cotter, P. D. (2013). The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 664-698.
<https://doi.org/10.1111/1574-6976.12030>
- Razquin, P. (2013). *Detección de Aflatoxina M1 en leche*. ZEULAB. <https://www.zeulab.com/centro-de-conocimiento/deteccion-de-aflatoxina-m1-en-leche/>
- Remón-Díaz, D., González-Reyes, D., & Martínez-Vasallo, A. (2019). Evaluación de la calidad higiénico-sanitaria de la leche cruda por métodos de flujo citométrico. *Revista de Salud Animal*, 41(1).
<http://revistas.censa.edu.cu/index.php/RSA/article/view/1006>
- Revelli, G. R., Sbodio, O. A., & Tercero, E. J. (2004). Recuento de bacterias totales en leche cruda de tambos que caracterizan la zona noroeste de Santa Fe y sur de Santiago del Estero. *Revista argentina de microbiología*, 36(3), 145-149.
- Salas, P., Calle, S., Falcón, N., Pinto, C., & Espinoza, J. (2013). Determinación de residuos de antibióticos betalactámicos mediante un ensayo inmunoenzimático en leche de vacas tratadas contra mastitis. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 24(2), 252-255.
- Suárez, C., & Gudíol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(2), 116-129. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.12.001>

te Giffel, M. C., & Wells-Bennik, M. H. J. (2010). Good hygienic practice in milk production and processing. En *Improving the Safety and Quality of Milk* (pp. 179-193). Elsevier.

<https://doi.org/10.1533/9781845699420.2.179>

Vega y León, S., Rey, T., Coronado, M., Ramírez, L., Ortiz, R., Escobar, A., & Vázquez, M. (2021).

Adulteraciones frecuentes en leche y productos lácteos. Hablemos claro de alimentos.

<https://hablemosclaro.org/adulteraciones-frecuentes-en-leche-y-productos-lacteos/>

Wattiaux, M. (2014). Composición de la Leche y Valor Nutricional. *Esenciales Lecheras*, 73-76.

<https://ganaderiasos.com/wp-content/uploads/2017/06/COMPOSICION-DE-LA-LECHE-Y-VALOR-NUTRICIONAL-.pdf>