

# UNIVERSIDAD POLITÉCNICA ESTATAL DEL CARCHI



## FACULTAD DE INDUSTRIAS AGROPECUARIAS Y CIENCIAS AMBIENTALES

### CARRERA DE ALIMENTOS

**Tema: “Identificación de *Aspergillus flavus* y cuantificación de aflatoxina B1 en la harina de trigo expandida en la ciudad de Tulcán”**

Trabajo de Integración Curricular previo a la obtención del  
título de Ingeniera en Alimentos

AUTORES: Lugo Ponce Adriana Gabriela  
Paspuel Cayambe Anderson Dario  
TUTOR: Ing. Anchundia Lucas Miguel Ángel, Msc.

Tulcán, 2024.

## CERTIFICADO DEL TUTOR

Certifico que los estudiantes Lugo Ponce Adriana Gabriela y Paspuel Cayambe Anderson Dario con el número de cédula 0450004742 y 0402058143 respectivamente han desarrollado el Trabajo de Integración Curricular: "Identificación de *Aspergillus flavus* y cuantificación de aflatoxina B1 en la harina de trigo expendida en la ciudad de Tulcán"

Este trabajo se sujeta a las normas y metodología dispuesta en el Reglamento de la Unidad de Integración Curricular, Titulación e Incorporación de la UPEC, por lo tanto, autorizo la presentación de la sustentación para la calificación respectiva

---

Ing. Anchundía Lucas Miguel Ángel, MSc.

**TUTOR**

Tulcán, febrero de 2024

## AUTORÍA DE TRABAJO

El presente Trabajo de Integración Curricular constituye un requisito previo para la obtención del título de Ingenieros en la Carrera de alimentos de la Facultad de Industrias Agropecuarias y Ciencias Ambientales

Nosotros, Lugo Ponce Adriana Gabriela y Paspuel Cayambe Anderson Dario con cédula de identidad número 0450004742 y 0402058143 respectivamente declaramos que la investigación es absolutamente original, auténtica, personal y los resultados y conclusiones a los que hemos llegado son de nuestra absoluta responsabilidad.



---

Lugo Ponce Adriana Gabriela

**AUTORA**



---

Paspuel Cayambe Anderson Dario

**AUTOR**

Tulcán, febrero de 2024

## ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Nosotros Lugo Ponce Adriana Gabriela y Paspuel Cayambe Anderson Dario declaramos ser autor de los criterios emitidos en el Trabajo de Integración Curricular: "Identificación de *Aspergillus flavus* y cuantificación de aflatoxina B1 en la harina de trigo expendida en la ciudad de Tulcán" y se exime expresamente a la Universidad Politécnica Estatal del Carchi y a sus representantes de posibles reclamos o acciones legales.



---

Lugo Ponce Adriana Gabriela

**AUTORA**



---

Paspuel Cayambe Anderson Dario

**AUTOR**

Tulcán, febrero de 2024

## AGRADECIMIENTO

Al finalizar un trabajo tan arduo y lleno de dificultades como el desarrollo de un plan de investigación es inevitable que nos aborde un muy profundo sentimiento de agradecimiento. Sin embargo, el análisis objetivo nos muestra inmediatamente que la magnitud de ese aporte hubiese sido imposible sin la participación de personas e instituciones que han facilitado las cosas para que este trabajo llegue a un feliz término. Por ello, es para nosotros un verdadero placer utilizar este espacio para ser justo y consecuente con ellas, expresándoles nuestros agradecimientos.

Debemos agradecer de manera especial y sincera a nuestro tutor Msc. Miguel Ángel Anchundia Lucas por orientarnos en la elaboración del proyecto. Su apoyo y confianza en el trabajo y su capacidad para guiar nuestras ideas ha sido un aporte invaluable, no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en nuestra formación como investigador. Las ideas propias, siempre enmarcadas en su orientación y rigurosidad, han sido la clave del buen trabajo que hemos realizado juntos, el cual no se puede concebir sin su siempre oportuna participación. Le agradecemos también el habernos facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante todo el desarrollo de esta tesis.

Queremos expresar también nuestros sinceros agradecimientos a mi amada familia y compañeros quienes han sido un apoyo incondicional en esta tesis.

## DEDICATORIA

Doy infinitas gracias a Dios por el camino recorrido; a mi familia por su cariño y su ejemplo; a mi tutor por compartir generosamente sus conocimientos.

Al personal directivo y administrativo de la Institución por brindarme todas las facilidades para realizar las investigaciones pertinentes a lo largo de este año de formación académica; y a mis compañeros de estudio, por brindarme su amistad y apoyo moral.

Adriana Lugo

Doy gracias a Dios y a mi familia por estar en los momentos más difíciles de esta larga prueba, la realización de mi tesis, por darme el apoyo suficiente y les dedico a ellos por estar siempre junto a mí, con su apoyo incondicional y siempre brindando sus ánimos a mi persona para no rendirme y culminar este reto tan difícil para convertirme en un gran profesional.

Anderson Paspuel

## ÍNDICE

<b>RESUMEN.....</b>	16
<b>ABSTRACT .....</b>	17
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	18
<b>RESUMEN.....</b>	16
<b>ABSTRACT .....</b>	17
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	18
<b>I. EL PROBLEMA.....</b>	20
<b>1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	20
<b>1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....</b>	22
<b>1.3. JUSTIFICACIÓN .....</b>	22
<b>1.4. OBJETIVOS Y PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN .....</b>	23
1.4.1. Objetivo General .....	23
1.4.2. Objetivos Específicos .....	23
1.4.3. Preguntas de Investigación.....	23
<b>II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.....</b>	24
<b>2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN.....</b>	24
2.1.1. Caracterización morfológica y determinación del potencial de producción de aflatoxinas de <i>Aspergillus flavus</i> aislado de maíz y suelo en Kenia.....	24
2.1.2. Aislamiento e identificación de <i>Aspergillus flavus</i> a partir de muestras de alimentos para aves de corral utilizando un enfoque molecular tradicional combinado y la expresión de CYP64A1 a nivel de ARNm. ....	24
2.1.3. Aislamiento de micoflora y caracterización molecular de especies de <i>Aspergillus</i> y <i>Fusarium</i> en cereales tunecinos. ....	25

2.1.4. Diversidad Morfológica y Molecular de <i>Aspergillus</i> de Grano de Maíz Utilizado como Alimento para Ganado. ....	26
<b>2.2. MARCO TEÓRICO</b> .....	26
2.2.1. Historia de la harina de trigo .....	26
2.2.2. La harina .....	27
2.2.3. Tipos de Harina .....	27
2.2.4. Las variedades de trigo más importantes .....	28
2.2.5. Características físicas y químicas de la harina .....	29
2.2.6. Diagrama de flujo de la obtención de la harina de Trigo .....	29
2.2.7. Producción mundial de la harina de trigo .....	31
2.2.8. Producción y costos de producción de trigo en el mercado ecuatoriano .....	32
2.2.9. La vida útil de la harina .....	33
2.2.10. Métodos de almacenamiento .....	33
2.2.11. Inocuidad alimentaria .....	34
2.2.12. Sistemas oficiales de inocuidad .....	34
2.2.13. Análisis de riesgos en inocuidad de alimentos .....	35
2.2.14. Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs) .....	36
2.2.15. Agentes etiológicos y otros microorganismos.....	36
2.2.16. Bacterias indicadoras .....	36
2.2.17. Hongos .....	37
2.2.18. <i>Aspergillus flavus</i> .....	37
2.2.19. Características Microbiológicas de <i>Aspergillus</i> .....	37
2.2.20. Morfología de <i>Aspergillus flavus</i> .....	38
2.2.21. Patogenia.....	39
2.2.22. ¿Qué son las micotoxinas? .....	39
2.2.23. ¿Qué es la aflatoxina? .....	39



2.2.24. Características de las aflatoxinas.....	41
2.2.25. Efectos cancerígenos de las aflatoxinas.....	42
2.2.26. Calidad de los alimentos .....	42
2.2.27. Calidad nutritiva .....	42
2.2.28. Calidad de conservación .....	42
2.2.29. Alimentos no perecederos .....	43
2.2.30. Alimentos semiperecederos.....	43
2.2.31. Alimentos perecederos.....	43
2.2.32. Calidad sensorial.....	43
2.2.33. Calidad higiénica o sanitaria.....	43
2.2.34. Siembra en superficies .....	43
2.2.35. Agar papa dextrosa.....	43
2.2.36. Diluciones .....	44
2.2.37. Técnicas de aislamiento y recuento.....	44
2.2.38. ¿Qué es la PCR? .....	44
2.2.39. Técnica de RFLP (enzima de restricción) .....	47
2.2.40. Electroforesis en gel.....	48
2.2.41. Árbol filogenético .....	48
2.2.42. Método de Elisa .....	49
<b>III. METODOLOGÍA .....</b>	<b>52</b>
<b>3.1. ENFOQUE METODOLÓGICO .....</b>	<b>52</b>
3.1.1. Enfoque .....	52
3.1.2. Tipo de Investigación .....	52
<b>3.2. HIPÓTESIS .....</b>	<b>52</b>
<b>3.3. DEFINICIÓN Y OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES.....</b>	<b>53</b>
3.3.1. Definición de variables .....	53

3.3.2. Operacionalización de variables .....	54
<b>3.4. MÉTODOS UTILIZADOS .....</b>	<b>55</b>
3.4.1. Métodos para la cuantificación de <i>Aspergillus flavus</i> y aflatoxina B1 .....	55
3.4.2. Materiales .....	64
3.4.3. Cultivo monospórico .....	65
3.4.4. Identificación de especies de <i>Aspergillus flavus</i> mediante el análisis molecular PCR .....	65
3.4.5. Amplificación para PCR .....	66
3.4.6. Método de Elisa .....	66
<b>3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>66</b>
3.5.1. Población y muestra .....	66
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>69</b>
<b>4.1. RESULTADOS .....</b>	<b>69</b>
<b>V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>120</b>
<b>5.1. CONCLUSIONES .....</b>	<b>120</b>
<b>5.2. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>121</b>
<b>5.3. MANUAL .....</b>	<b>122</b>
5.3.1. Mantenimiento de las Instalaciones y Equipos .....	124
5.3.2. Recepción de Materias Primas .....	125
5.3.3. Almacenamiento de Materias Primas y producto terminado .....	128
5.3.4. Aseguramiento y control de calidad de la harina de trigo .....	131
5.3.5. Buenas prácticas de manufactura .....	132
5.3.6. Enfermedades Transmitidas por Alimentos .....	134
5.3.7. Contaminación de Harina de Trigo y Fuentes de Contaminación .....	137
5.3.8. Higiene del personal .....	139
5.3.9. Control de plagas .....	140
5.3.10. Control de productos químicos .....	141

5.3.11. Control de residuos.....	143
<b>VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>146</b>
<b>VII. ANEXOS.....</b>	<b>152</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Porcentajes de los principales componentes de la harina de trigo .....	29
Tabla 2. Micotoxinas más comunes, productos afectados y efectos sobre la salud..	41
Tabla 3. Cuadro de Operacionalización de variables del respectivo estudio .....	54
Tabla 4. Número de envases o sacos a muestrear .....	55
Tabla 5. Esquema del contenido de los tubos para el análisis de ADN .....	61
Tabla 6. Condiciones de almacenamiento de harinas de trigo .....	68
Tabla 7. Porcentaje de incumplimiento de las 20 condiciones evaluados a los 40 lugares expendedores de harina de trigo de la ciudad de Tulcán para el desarrollo del análisis microbiológico. ....	70
Tabla 8. Recuento en placas de hongos totales provenientes de harinas de trigo en UFC/g.....	71
Tabla 9. Características macroscópicas y producción de aflatoxinas de colonias presuntivas de <i>Aspergillus flavus</i> de los aislados provenientes a la muestra 1 A1 y muestra 1 A2 en harina de trigo cultivado en medio MEA, CYA, YES y CREA a 25°C por 7 días.....	72
Tabla 10. Características macroscópicas y producción de aflatoxinas de colonias presuntivas de <i>Aspergillus flavus</i> los aislados provenientes a la muestra 1 A3 y muestra 5 A4 en harina de trigo cultivado en MEA, CYA, YES y CREA a 25°C por 7 días. ....	73
Tabla 11. Características macroscópicas y producción de aflatoxinas de colonias presuntivas de <i>Aspergillus flavus</i> aislados provenientes a la muestra 5 A5 y muestra 5 A6 en harina de trigo cultivado en medio MEA, CYA, YES y CREA a 25°C por 7 días.	74

Tabla 12. Características macroscópicas y producción de aflatoxinas de colonias presuntivas de <i>Aspergillus flavus</i> aislados provenientes a la muestra 5 A7 y muestra 5 A8 en harina de trigo cultivado en medio MEA, CYA, YES y CREA a 25°C por 7 días.	75
Tabla 13. Características macroscópicas y producción de aflatoxinas de colonias presuntivas de <i>Aspergillus flavus</i> aislados provenientes a la muestra 7 A9 y muestra 13 A10 en harina de trigo cultivado en medio MEA, CYA, YES y CREA a 25°C por 7 días. .....	76
Tabla 14. Características macroscópicas y producción de aflatoxinas de colonias presuntivas de <i>Aspergillus flavus</i> aislados provenientes a la muestra 13 A11 y muestra 13 A12 en harina de trigo cultivado en medio MEA, CYA, YES y CREA a 25°C por 7 días. .....	77
Tabla 15. Características macroscópicas y producción de aflatoxinas de colonias presuntivas de <i>Aspergillus flavus</i> aislados provenientes a la muestra 13 A13 y muestra 13 A14 en harina de trigo cultivado en medio MEA, CYA, YES y CREA a 25°C por 7 días .....	78
Tabla 16. Características macroscópicas y producción de aflatoxinas de colonias presuntivas de <i>Aspergillus flavus</i> aislados provenientes a la muestra 13 A15 y muestra 13 A16 en harina de trigo cultivado en medio MEA, CYA, YES y CREA a 25°C por 7 días. .....	79
Tabla 17. Características macroscópicas y producción de aflatoxinas de colonias presuntivas de <i>Aspergillus flavus</i> aislados proveniente a la muestra 14 A17 y muestra 14 A18 en harina de trigo cultivado en medio MEA, CYA, YES y CREA a 25°C por 7 días. .....	80
Tabla 18. Características macroscópicas y producción de aflatoxinas de colonias presuntivas de <i>Aspergillus flavus</i> aislados proveniente a la muestra 14 A19 y muestra 14 A20 en harina de trigo cultivado en medio MEA, CYA, YES y CREA a 25°C por 7 días.6 .....	81
Tabla 19. Características microscópicas de los aislados presuntivos M1A1 a M14A20 de <i>Aspergillus flavus</i> proveniente.....	83
Tabla 20. Resultados del análisis y cuantificación de aflatoxinas en 10 aislados presuntivos de <i>Aspergillus flavus</i> de harina de trigo por duplicado para ver si la	

ausencia o presencia de estas micotoxinas mediante el equipo de electrofotómetro por el método de Elisa .....	117
Tabla 21. Muestras de harina donde se realizaron la cuantificación de aflatoxinas para ver si hay presencia o ausencia de estas micotoxinas mediante electroforesis por el método de Elisa .....	118

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de flujo para el proceso de harina de trigo.....	30
Figura 2. Los precios del trigo aumentan drásticamente .....	32
Figura 3. Precios del trigo de 2021 en Ecuador .....	33
Figura 4. Características de las principales especies implicadas en patología humana .....	38
Figura 5. Estructura molecular de aflatoxina B1 .....	40
Figura 6. Anatomía de un árbol filogenético.....	49
Figura 7. Procedimiento a seguir en las diluciones sucesivas.....	56
Figura 8. Siembra por aislamiento o recuento.....	57
Figura 9. Mapa Político Cantón Tulcán .....	67
Figura 10. Características macroscópicas de aislados presuntivos de <i>A. flavus</i> .....	86
Figura 11. Determinación de aflatoxinas de <i>A. flavus</i> presuntivos en agar coco .....	87
Figura 12. Características macroscópicas de aislados presuntivos de <i>A. flavus</i> .....	88
Figura 13. Determinación de aflatoxinas de <i>A. flavus</i> presuntivos en agar coco .....	89
Figura 14. Características macroscópicas de aislados presuntivos de <i>A. flavus</i> .....	90
Figura 15. Determinación de aflatoxinas de <i>A. flavus</i> presuntivos en agar coco .....	91
Figura 16. Determinación de aflatoxinas de <i>A. flavus</i> presuntivos en agar coco .....	91
Figura 17. Características macroscópicas de aislados presuntivos de <i>A. flavus</i> .....	92

Figura 18. Características macroscópicas y microscópicas de aislados presuntivos de A. flavus.....	93
Figura 19. Características macroscópicas y microscópicas de aislados presuntivos de A. flavus.....	94
Figura 20. Características macroscópicas y microscópicas de aislados presuntivos de A. flavus.....	95
Figura 21. Características macroscópicas y microscópicas de aislados presuntivos de A. flavus.....	96
Figura 22. Características macroscópicas y microscópicas de aislados presuntivos de A. flavus.....	97
Figura 23. Características macroscópicas y microscópicas de aislados presuntivos de A. flavus.....	98
Figura 24. Características macroscópicas y microscópicas de aislados presuntivos de A. flavus.....	99
Figura 25. Características macroscópicas y microscópicas de aislados presuntivos de A. flavus.....	100
Figura 26. Características macroscópicas y microscópicas de aislados presuntivos de A. flavus.....	101
Figura 27. Características macroscópicas y microscópicas de aislados presuntivos de A. flavus.....	102
Figura 28. Características macroscópicas y microscópicas de aislados presuntivos de A. flavus.....	103
Figura 29. Características macroscópicas y microscópicas de aislados presuntivos de A. flavus.....	104
Figura 30. Características macroscópicas y microscópicas de aislados presuntivos de A. flavus.....	105
Figura 31. Características macroscópicas y microscópicas de aislados presuntivos de A. flavus.....	106
Figura 32. Características macroscópicas y microscópicas de aislados presuntivos de A. flavus.....	107

Figura 33. Características macroscópicas y microscópicas de aislados presuntivos de A. flavus .....	108
Figura 34. Características macroscópicas y microscópicas de aislados presuntivos de A. flavus .....	109
Figura 35. Características macroscópicas y microscópicas de aislados presuntivos de A. flavus .....	110
Figura 36. Características macroscópicas y microscópicas de aislados presuntivos de A. flavus .....	111
Figura 37. Características macroscópicas y microscópicas de aislados presuntivos de A. flavus .....	112
Figura 38. Electroforesis de las muestras presuntivas de A. flavus .....	113
Figura 39. Electroforesis de las muestras presuntivas de A. flavus .....	113
Figura 40. Electroforesis de las muestras presuntivas de A. flavus .....	114
Figura 41. El Árbol filogenético indica que los 20 aislados presuntivos de A. flavus alinean con el género Aspergillus flavus y A. oryzae con un 56% de compatibilidad. ....	115

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Acta de la sustentación de Predefensa del TIC.....	152
Anexo 2. Certificado del abstract por parte de idiomas.....	153
Anexo 3. Norma NTE INEN 159- 10:90 Control microbiológico.....	154
Anexo 4. Fotografías de respaldo al estudio.....	163

## RESUMEN

Con el objetivo de identificar *Aspergillus flavus* y cuantificar el contenido de aflatoxina B1 en la harina de trigo expandida en la ciudad de Tulcán se cultivaron 20 aislados obtenidos de la harina de trigo en agar extracto de malta (MEA), agar autolisado de levadura Czapek (CYA), agar sacarosa con extracto de levadura (YES) y agar creatina sacarosa (CREA). Los aislados se identificaron mediante características morfológicas y moleculares para identificar *Aspergillus flavus*. La identificación molecular fue realizada utilizando primers para la región ITS1/ITS4. El árbol filogenético mostro una alineación del 56% con especies de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus oryzae*. Mediante la técnica de siembra en coco agar se determinó la producción de aflatoxinas mostrando la presencia o ausencia mediante el cambio de color a rosado y rojo intenso, a través de la técnica de ELISA competitiva directa se cuantifico los niveles de aflatoxinas en los aislados presuntivos de *Aspergillus flavus*. El presente estudio demostró la inocuidad de las harinas de trigo expandidas en la ciudad de Tulcán, siendo aptas para el consumo humano debido a que no contienen aflatoxinas por encima de los límites permitidos.

**Palabras Claves:** harina de trigo, *Aspergillus flavus*, caracterización morfológica, árbol filogenético, aflatoxinas.



## ABSTRACT

In order to identify *Aspergillus flavus* and quantify the content of aflatoxin B1 in wheat flour marketed in the city of Tulcán, farming of 20 isolates obtained from wheat flour were carried out in different farming media, such as malt extract agar (MEA), Czapek yeast autolysate agar (CYA), sucrose agar with yeast extract (YES) and creatine sucrose agar (CREA). The identification of the isolates was carried out by observing specific morphological and molecular characteristics for *Aspergillus flavus*. Molecular analysis was performed using primers designed for the ITS1/ITS4 region. The resulting phylogenetic tree revealed a 56% alignment with *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae* species. By means of the planting technique in coco agar, the production of aflatoxins was determined, manifesting the presence or absence through a change of color to intense pink and red tones. In addition, the quantification of aflatoxin levels in presumptive isolates of *Aspergillus flavus* was carried out using the direct competitive ELISA technique. The results obtained in this study demonstrate the safety of the wheat flours marketed in the city of Tulcán, confirming their suitability for human consumption as they do not present levels of aflatoxins above the permitted limits.

**Key words:** wheat flour, *Aspergillus flavus*, morphological characterization, phylogenetic tree, aflatoxins.

## INTRODUCCIÓN

La primera planta que se cultivó en el mundo con la aparición de la agricultura es el trigo, hace más de 10000 años. Los nutrientes constituidos en estos alimentos aportan cantidades adecuadas de carbohidratos, proteínas, ácidos grasos esenciales, fibra, vitaminas del complejo B y E y minerales (Brugos, 2019, p. 8).

La harina de trigo es obtenida a partir de la molturación del grano de trigo maduro, entero, sano. Este es un ingrediente indispensable para la dieta diaria. Los alimentos ricos en almidón son especialmente susceptibles de contaminación por *Aspergillus* que llegan a producir aflatoxinas a lo largo de las fases de la cadena alimentaria que son postcosecha, procesamiento, transporte y almacenamiento (Sifre & Peraire, 2019).

*Aspergillus flavus* es una especie fúngica que puede producir una serie de micotoxinas como la aflatoxina B1, siendo la más importante en los alimentos. Los hongos aflatoxinogénicos pueden deteriorar varios productos alimenticios.

La producción de micotoxinas en los productos depende tanto de las condiciones ambientales como de las especies toxigénicas presentes. Las temperaturas para que proliferen *Aspergillus flavus* en la parte de almacenamiento va entre los 20-25°C, de pH entre 4 y 8 y una humedad relativa entre 80-90% (Rangel, Valdivia, & Luna, 2020).

La identificación de estos microorganismos son indicadores importantes de la calidad en la harina, y también permite predecir el riesgo potencial que podría causar al consumidor grandes daños en la salud tales como aspergilosis pulmonar y micosis; las buenas prácticas de manejo en el proceso y la detección temprana de estas sustancias son la clave para prevenir y reducir especies micotoxigénicas en los alimentos.

Un método importante para la identificación de *Aspergillus flavus* es la prueba de reacción en cadena de la polimerasa, ADN (PCR) que se basa en la detección inmediata, altamente indispensable y específica de especies micotoxigénicas en cultivos puros, utilizando el material genético del microorganismo juntamente con el primer ITS para la identificación molecular. Para identificar con precisión las especies de *Aspergillus* a nivel de especie, se aplica la identificación tanto morfológica como

molecular. Las características morfológicas pueden no ser suficientes ya que las características microscópicas y macroscópicas de algunas especies son similares por ello es necesario su identificación molecular (Zulkifli & Zakaria, 2017, p. 26).

## I. EL PROBLEMA

### 1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Según la Organización Mundial de la Salud "se estima que cada año enferman en el mundo unos 600 millones de personas casi 1 de cada 10 habitantes por ingerir alimentos contaminados y que 420 000 mueren por esta misma causa" (Organización Mundial de la Salud, 2020, p. 18).

De acuerdo a la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), establece que el 25% de los alimentos en el mundo están infestados con micotoxinas, que al ser ingeridos afectan a los órganos como el hígado, riñones, cerebro, músculos y el sistema nervioso provocando los siguientes síntomas: náuseas y vómitos hasta la falta de coordinación de los movimientos (ataxia) y muerte (Severo, 2021).

Los hongos del género *Aspergillus* crecen a una temperatura óptima de 25-37°C y una humedad relativa de 70 y 90%, la contaminación se da antes y después de la cosecha. En las harinas de trigo, crece una variedad de hongos, el más común es *Aspergillus flavus*, la materia prima en bodegas de abastecimiento de alimentos se encuentra en costales, por el espacio y su almacenamiento. Pudiendo crecer los hongos del género *Aspergillus* y *Penicillium*, quienes son los responsables de producir micotoxinas como aflatoxinas B1, G1 y Ocratoxina A.

Estos hongos causan el deterioro de muchos alimentos. Las sustancias que producen la invasión fúngica suelen ser muy tóxicos, tanto para el hombre como para los animales. El hongo *Aspergillus flavus* crece a una temperatura óptima de 36 °C con una actividad de agua del 0,95. La producción de aflatoxinas se da a una temperatura de 33°C, a una actividad de 0,99, aunque pueda ser formada aún a 15°C con una actividad del agua de 0,95 (Carrillo, 2018).

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios tóxicos de los hongos *A. flavus* y *A. parasiticus*. Al contaminar diferentes cultivos, entre ellos el trigo, por estos hongos y sus aflatoxinas provocan cambios en sus características nutricionales y sanitarias del producto.

El consumo de alimentos contaminados por este hongo produce una enfermedad llamada aspergilosis, una infección que ataca al aparato respiratorio. Algunas personas que padecen de asma o fibrosis quística tienen una reacción alérgica a este microorganismo. Los signos y síntomas son: fiebre, tos que puede expulsar sangre o tapones de moco, y empeoramiento del asma. Además de los pulmones puede invadir otras áreas del cuerpo como los senos paranasales. En el caso de las aflatoxinas pueden afectar a cualquier órgano y sistema, especialmente al hígado y riñón. Son causa de cáncer hepático y se relacionan con otros tipos de cáncer (Martínez et al., 2021).

El procesamiento de los alimentos es una cadena que debe estar bien salvaguardada porque la falla en uno de los pasos puede dañar el producto final. En el caso de las harinas de trigo en la fase de almacenamiento existe más contaminación y el producto es más propenso a deteriorarse debido a tres factores: temperatura, humedad y el contenido de oxígeno. En la temperatura y humedad ocurren diferentes anomalías como el retraso bioquímico (respiración) del producto que conlleva a la degradación, como también al desarrollo directo de microorganismo (mohos, levaduras). Si las harinas están en medios ricos de oxígeno habrá un alto nivel de propagación de M/O convirtiéndose en un alimento perjudicial para el consumidor.

La harina de trigo al ser expendida en bodegas o locales comerciales tienden a sufrir contaminación cruzada indirecta, esto se produce a través de un factor intermedio el cual es la mano del manipulador que toca el alimento crudo y se da por la higiene del hombre. Otros medios pueden ser las superficies donde se encuentran los productos y los utensilios (Higiene Alimentaria, 2019).

Es relevante adoptar estrategias correctivas que incidan en todas las fases del proceso de producción. Las estrategias deberían ser efectivas y flexibles para aplicarse de acuerdo con los problemas y los recursos de cada país. La inocuidad no depende del uso de tecnologías sofisticadas ni de grandes inversiones en equipos y en capacitación de operarios (Hernández, 2018, p.34).

## 1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Las condiciones inadecuadas de almacenamiento en locales expendedores de harina de trigo pueden provocar el crecimiento de hongos *Aspergillus flavus* que conlleva al desarrollo de Aflatoxina B1, afectando la inocuidad del alimento?

## 1.3. JUSTIFICACIÓN

Las harinas han sido utilizadas tradicionalmente por diferentes pueblos y culturas, el alto consumo se debe a que poseen un elevado contenido alimenticio tanto en proteínas como en minerales y carbohidratos, también se puede destacar por ser versátiles y fáciles de experimentar su transformación agroindustrial (Cárdenas, 2018).

Por otro lado, en Europa la harina tiene total importancia en la base alimenticia ya que a partir de la harina se hace el pan "(...) pilar de la alimentación en la cultura europea" (Sifre et al., 2019, p.8). Las harinas poseen antioxidantes naturales, vitamina E, fosfolípidos, magnesio, vitamina F, ácidos grasos esenciales, ácido linoleico u omega 3, alto porcentaje en proteínas e hidratos de carbono.

La harina de trigo es el ingrediente mayoritario en la elaboración de un alimento tan indispensable en la dieta diaria de las personas como es el pan, el cual insustituible en cualquier dieta equilibrada, además se emplea en diferentes procesos como repostería, galletas entre otras.

El cultivo de harina de trigo en Ecuador es de suma importancia en la alimentación de los ecuatorianos, de este cereal se elaboraban diferentes alimentos como pan, galletas, fideos, pastelería, etcétera. Hay muchas formas del uso de la harina: como espesante y aditivo nutricional en sopas, salsas, estofados y en la preparación de bebidas fermentadas como la chicha (Sáenz, 2021).

En Ecuador el consumo per cápita es mayor al 30 kg/año, sin embargo, llega a abastecer a la población con un 2% del trigo local, mientras es importado el 98%. Es de gran importancia ya que es un ingrediente que permite elaborar diferentes productos de la canasta básica y de manera especial en el sector panadero (Yanez, 2020).

El alto consumo de las harinas requiere y motiva una evaluación microbiológica, debido a que se debe garantizar inocuidad alimentaria. A partir de un análisis de determinación de hongos (*Aspergillus flavus*) y micotoxinas (aflatoxina B1) se puede verificar el estado de las harinas, si son o no peligrosas para la salud.

Al mantener un adecuado almacenamiento, control de temperatura y humedad se evita el crecimiento de hongos micotoxigénicos y por ende la presencia de aflatoxinas, de tal manera la harina es apta para el consumo humano.

Por lo mencionado anteriormente se plantea identificar *Aspergillus flavus* y cuantificar el contenido de aflatoxinas B1 en harinas.

#### **1.4. OBJETIVOS Y PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN**

##### 1.4.1. Objetivo General

Identificar *Aspergillus flavus* y cuantificar aflatoxina B1 en la harina de trigo expandida en la ciudad de Tulcán.

##### 1.4.2. Objetivos Específicos

- Aislar e identificar a *Aspergillus flavus* y cuantificar los aislados productores de aflatoxina B1.
- Cuantificar el contenido de *Aspergillus flavus* y de aflatoxina B1 en las harinas de trigo expandida en la ciudad de Tulcán.
- Proponer un manual de Buenas Prácticas de Manejo de Harinas a los expendedores de harina de trigo.

##### 1.4.3. Preguntas de Investigación

¿Cómo diferenciar el género *Aspergillus flavus* de las otras especies de *Aspergillus*?

De la cantidad de muestras tomadas para el análisis microbiológico, ¿Cuál es el porcentaje que dieron positivas para *Aspergillus flavus*?

¿Cómo llevar un buen manejo en el almacenamiento de las harinas?

## II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

### 2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

2.1.1. Caracterización morfológica y determinación del potencial de producción de aflatoxinas de *Aspergillus flavus* aislado de maíz y suelo en Kenia.

Thathana, Murage, King, & Pillay (2017) hacen referencia a *Aspergillus flavus* en muestras de suelo y maíz para identificar su aflatoxina. Quinientos catorce aislamientos recolectados de maíz y suelo en Kenia se cultivaron en Czapeck Dox Agar, Malt Extract Agar, Sabouraud, Agar dextrosa, Agar papa dextrosa y Agar rosa-bengala cloranfenicol. Se realizó por medio de la macro-morfología y micromorfología y se hizo usando cultivos en portaobjetos. La determinación de aflatoxina se lo hizo por fluorescencia UV por medio de agar coco, agar sacarosa y agar de levadura. En 43 muestras se presentaron presuntos aislamientos de *A. flavus*, se identificó aflatoxina en el 23% de los aislamientos por cromatografía de capa líquida (TLC). Las aflatoxinas identificadas fueron: B1, B2, G1. El que tenía más incidencia fue del hongo *A. flavus* con un 63% y producción de aflatoxinas 28% en Distrito de Makueni que fue el valor más alto y en distrito de Bungoma se registró 11% de aislamiento positivos de los cuales 2% fueron productores de aflatoxina. El estudio se lo realizó para saber la importancia de este hongo y lo que puede provocar en alimentos perjudicando a la salud humana en el momento de ingerirlos.

2.1.2. Aislamiento e identificación de *Aspergillus flavus* a partir de muestras de alimentos para aves de corral utilizando un enfoque molecular tradicional combinado y la expresión de CYP64A1 a nivel de ARNm.

Hussain, Hassan, Durairaj, & Yun (2021) mencionan que el objetivo del estudio fue aislar e identificar *Aspergillus flavus* a partir de muestras de alimentos para aves. Métodos tradicionales y moleculares. 8 de 23 muestras (34,78%) fueron positivas para *A. flavus*. Estos métodos incluyen la comparación de la región ITS1-5.8S-ITS2. Además, la capacidad de los aislados para expresar aflatoxina. El gen de la sintasa (CYP64A1) también se analizó en un medio líquido sintético. Basado en características culturales, carácter único. Los genes ITS 1 y 2 y la expresión de CYP64A1 a nivel de ARNm de *A.*



*flavus* se identificaron con precisión en muestras de alimentos. El aislado de *A. flavus* sería un posible candidato para futuras investigaciones y aplicaciones.

### 2.1.3. Aislamiento de micoflora y caracterización molecular de especies de *Aspergillus* y *Fusarium* en cereales tunecinos.

Jedid, Soldevilla, & Lahouar (2018) mencionan que, el trigo, la cebada y el maíz son los principales cereales consumidos en Túnez. El objetivo fue determinar la flora fúngica de estas especies de granos, especialmente las especies micotóxicas de *Aspergillus* y *Fusarium*. Se recolectaron y procesaron muestras de cosecha reciente y almacenadas (31 y 34 muestras respectivamente) de cada tipo de trigo en el país de Túnez para el aislamiento e identificación de hongos. La identificación de géneros fúngicos se basa en características morfológicas. Las especies de *Aspergillus* y *Fusarium* se identificaron mediante análisis de PCR específicos de especie mediante secuenciación de ADN. *Alternaria* (70,83%), *Eurotium* (62,50%), *Aspergillus* (54,17%) y *Penicillium* (41,67%) fueron los hongos más frecuentes aislados de trigo. *Penicillium* (75%), *Aspergillus* (70%), *Eurotium* (65%) y *Alternaria* (65%) fueron los géneros más frecuentes aislados de cebada. En maíz dominaron los géneros *Aspergillus* (76,19%), *Eurotium* (42,86%) y *Penicillium* (38,09%). Se encontraron *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Alternaria* en muestras de granos almacenados y recientemente cosechados. Las frecuencias de infección por *Aspergillus*, *Fusarium* y *Alternaria* fueron más altas en las muestras recolectadas recientemente, y las especies de *Penicillium* fueron más frecuentes en las muestras almacenadas. Todas las muestras de cereal fueron examinadas por la técnica Plantación Directa, granos de cereal por muestra fueron desinfectados superficialmente en solución de cloro activo al 2% durante un minuto a temperatura ambiente. La siembra se llevó a cabo en placas de Petri (90 mm de diámetro, 10 granos/placa) que contenían medio papa dextrosa agar (PDA) (CONDA, Pronadisa, Madrid, España) y las placas se incubaron a 25 °C durante siete días. Los aislamientos obtenidos se subcultivaron en PDA y se utilizaron las claves de identificación de Pitt y Hocking (2009) para determinar sus géneros y su sección en el caso de *Aspergillus*, especies. Se realizaron cultivos monospóricos a colonias de *Aspergillus* y *Fusarium* con el fin de obtener cepas puras para su posterior identificación por métodos basados en ADN.

#### 2.1.4. Diversidad Morfológica y Molecular de *Aspergillus* de Grano de Maíz Utilizado como Alimento para Ganado.

Zulkifli & Zakaria (2017) indican que, es importante analizar los granos de maíz que se los utiliza como alimento para animales ya que pueden estar contaminados por hongos como *Aspergillus*. *Aspergillus* en los granos de maíz puede indicar la producción de micotoxinas. Se utilizó identificación morfológica y molecular para identificar *Aspergillus* aislado de granos de maíz utilizados como alimento. Se identificaron tentativamente morfológicamente seis especies, a saber, *Aspergillus niger* (grupos I y II), *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus clavatus* y *Aspergillus terreus*. Los aislamientos de *A. niger* se dividieron en dos grupos según las diferencias menores en la apariencia de sus colonias. La identificación molecular utilizando espaciador interno transcrito y secuencias de  $\beta$ -tubulina confirmaron la identificación morfológica, con la excepción de los aislados del grupo II de *A. niger*, que se identificaron molecularmente como *Aspergillus tubingensis*. EL árbol filogenético neighbor joining mostró que los aislados de la misma especie se agrupan en el mismo clado. Este estudio mostró que diferentes especies de *Aspergillus* predominan en el maíz utilizado como alimento para animales. La identificación adecuada de las especies de *Aspergillus* también es necesaria para el tratamiento adecuado de los granos de maíz infectados. La presencia de especies tóxicas conocidas como *A. niger*, *A. flavus* y *A. fumigatus* indica un riesgo potencial de contaminación de los granos de maíz con micotoxinas.

## 2.2. MARCO TEÓRICO

### 2.2.1. Historia de la harina de trigo

La harina de trigo es uno de los productos más consumidos en el mundo "Es el producto que el ser humano ha desarrollado de la molienda del grano de trigo, cereal que el hombre empezó a cultivar hace 10.000 años en Oriente Medio"

La harina es la base del pan desde las antiguas civilizaciones hasta la actualidad, se origina desde la región asiática comprendida entre los ríos Tigris y Éufrates en la zona de Mesopotamia.

Hace más de doce mil años se evidencia que sucedieron las primeras formas de recolección del trigo. Las evidencias arqueológicas del cultivo del trigo vienen de Siria, Jordania, Turquía e Irak. Sin duda alguna, desde la perspectiva histórica,

antropológica y nutricional los cereales constituyen la fuente de nutrientes más importantes de la humanidad. Están asociados al origen de la civilización y cultura de todos los pueblos. Según Sifre (2019):

El hombre pudo pasar de nómada a sedentario cuando aprendió a cultivar los cereales y obtener de ellos una parte importante de su sustento. Cada cultura, cada civilización, cada zona geográfica del planeta, consume un tipo de cereales específicos creando toda una cultura gastronómica en torno a ellos (p. 2).

En cada continente varía el uso de cada tipo de harina, aunque en la mayoría se consume todo tipo de harinas se puede decir que hay uno que predomina, en Europa el trigo, en América el maíz, en Asia el arroz, en África el sorgo y el maíz.

El autor indica que “Es muy probable que la molienda del trigo para producir harina se hiciera primitivamente, por medio de majaderos y de morteros, o machacándolo entre dos piedras planas posteriormente se utilizó los molinos de sangre (movidos por animales)” (Sifre et al., 2019, p.3). El trigo produjo más alimento al ser cultivado por iniciativa de los seres humanos, pues de otra manera este no habría podido tener éxito en estado salvaje.

## 2.2.2. La harina

La harina en textura es un polvo medianamente fino producto de la molienda de un cereal o leguminosa seca. Aunque hay una diversidad de harinas, la más usual es la harina de trigo, que se ha vuelto habitual en la elaboración del pan, también se hace harina de centeno, de cebada, de avena, de maíz o de arroz. Claramente existen también otros tipos de harinas obtenidas de otros alimentos como leguminosas (garbanzos, soja), castaña, mandioca, entre otros (Galeano, 2022).

## 2.2.3. Tipos de Harina

### 2.2.3.1. Harina de trigo

Es la harina más utilizada, es la que se utiliza para elaborar masas, dulces, saladas, pero también para rebozar carnes y pescados o para hacer pan. Además, tiene una variedad integral, es más oscura, se obtiene por el proceso de molienda y es la más deseable o saludable, una desventaja es que su vida útil es menor, lo que es recomendable utilizarla al instante.

### 2.2.3.2. Harina de maíz

Otro tipo popular de harina es la harina de trigo. Con ayuda de estos se suelen preparar tortillas, empanadas o empanadas, galletas, pasteles y hasta panes (¿se puede vivir una vida gala sin comer mil o pan ancho?). También es costumbre inscribir algunos viveros o condimentos.

Entre las características de la harina de trigo destaca su contenido en almidón y su carácter libre de gluten, lo que se asocia a personas celíacas. En definitiva, una comida con muchos beneficios para tus recetas (López, 2018).

### 2.2.4. Las variedades de trigo más importantes

#### 2.2.4.1. Escanda

La escanda es descendiente directa del trigo silvestre y es una de las variedades más antiguas de trigo cultivado. En el siglo XX, la cosecha se desperdiciaba debido a su bajo rendimiento en comparación con otros tipos de trigo.

Ahora hay una tendencia escrita por su precio y sabor, es rico en nutrientes y antioxidantes. Por ejemplo, la espelta contiene el doble de luteína y un 42 % más de zinc que el trigo integral.

#### 2.2.4.2. Trigo Farro o "Emmer".

El trigo faraón se originó en Egipto y fue el primer trigo cultivado por el hombre hace más de 12.000 años. El trigo perdió su importancia en la era moderna en Europa, pero el interés revivió en el siglo XX, y hoy puedes encontrar productos a base de farro (cereal de trigo antiguo) como pan, pasta y cerveza artesanal.

Una de las características del trigo farro es que la planta no requiere pesticidas y es muy susceptible a las prácticas orgánicas (Bruno, 2018).

#### 2.2.4.3. Trigo Harinero

El trigo harinero o trigo blando es el trigo blando más famoso y representa el 95% del trigo cultivado en el mundo que se utiliza para hacer pan y pasta.

Este maíz es el resultado de sucesivos cruces realizados por agricultores y en las últimas décadas en laboratorios de biología molecular (sin utilizar técnicas transgénicas). En la década de 1960, estas técnicas dieron como resultado un maíz más corto y más resistente al cultivo con fertilizantes (Navarro, 2021).

#### 2.2.4.4. Trigo horasan

El trigo Khorasan es el resultado de un cruce natural entre el trigo duro y el trigo silvestre. Es uno de los granos cultivados más antiguos y se origina en Khorasan (una región histórica en los actuales Irán y Afganistán).

Por su resistencia a las plagas, este trigo es muy adecuado para la agricultura ecológica y la producción de pasta. En las tiendas, este cereal se encuentra bajo la marca Kamut, que está patentada en Estados Unidos (Navarro, 2021).

#### 2.2.5. Características físicas y químicas de la harina

La harina de trigo es el ingrediente principal en la elaboración del pan, y su composición es: almidón (70-75%), agua (14%) y proteínas (10-12%), así como polisacáridos no amiláceos (2-3%), y lípido (2%).

**Tabla 1.** Porcentajes de los principales componentes de la harina de trigo

Componentes	Porcentaje (%)
Almidón	70 – 75
Agua	14
Proteínas	10 – 12
Lípidos	2
Polisacáridos no amiláceos	2 – 3

**Fuente:** (Ruiz, 2019)

##### 2.2.5.1. Propiedades físicas

- Densidad: oscila entre 500 g/litro y 800 g/litro. Es más ligero que el agua con una densidad de 1 kg/L.

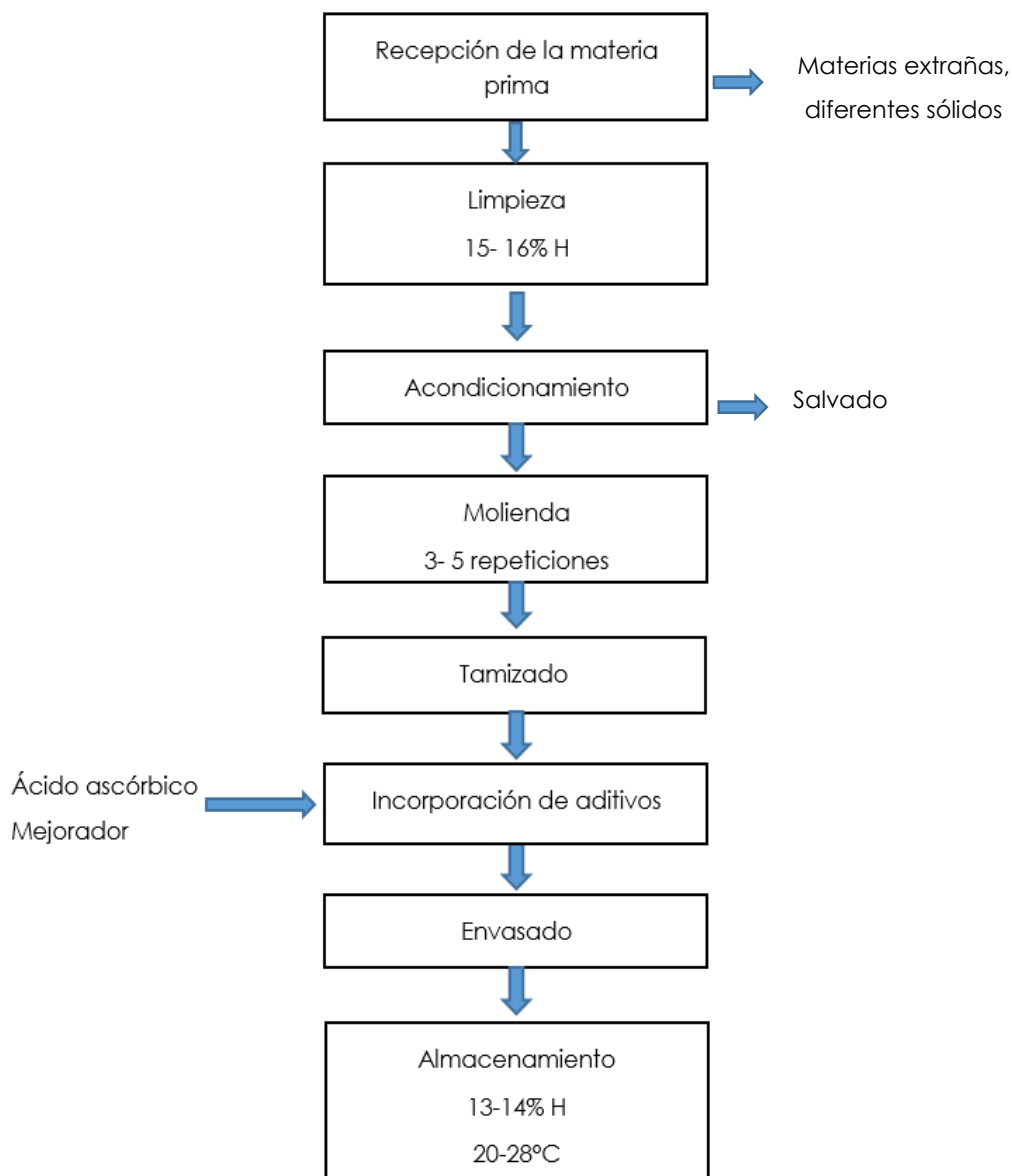
- Factores físicos de la harina: se utilizan dos factores para medir la resistividad y la elasticidad de la harina: el factor W y el factor P/L. Estos dos factores dependen de la composición de las dos proteínas que componen el gluten.

a) Factor P/L: Este factor se determina empíricamente usando una herramienta especial llamada alveógrafo y mide qué tan resistente y quebradiza es la harina.

- Un valor bajo hace que la harina sea muy extensible, poco resistente y fácil de trabajar.

- Si el valor es alto, la elasticidad de la harina es baja y la resistencia es fuerte, por lo que es difícil trabajar con ella.

#### 2.2.6. Diagrama de flujo de la obtención de la harina de Trigo



**Figura 1.** Diagrama de flujo para el proceso de harina de trigo  
**Fuente:** (Becerra & Tuñoque, 2018)

#### 2.2.6.1. Descripción del diagrama de flujo

**Recepción de la materia prima:** el trigo llega en buen estado, sin daños en su estructura.

**Limpieza:** Se retira todas las impurezas, materias extrañas, otros sólidos. El grano se transporta a equipos vibratorios o zarandas. Ayudan a cualquier impureza.

**Acondicionamiento:** Se agrega agua lo cual endurece y hace elástica la capa externa del trigo para eliminar el endospermo, ayudando a la molienda. Se debe

alcanzar una humedad de 15-16 % y con una temperatura menor a 45°C ya que si sobrepasa el gluten presente se puede desnaturalizar.

**Molienda:** Se retira el salvado del germen para realizar la molienda por medio de un molino de rodillo para así obtener al máximo la harina. Este proceso se realiza de 3-5 repeticiones.

**Tamizado:** La harina obtenida pasa por los tamices el mismo que cuenta con varias bandejas superpuestas cubiertas con mallas para diferente granulometría, y se logra separar la harina del salvado.

**Incorporación de aditivos:** Se le coloca ácido ascórbico con el fin de que se pueda mejorar la calidad del producto y enriquecer el contenido nutricional.

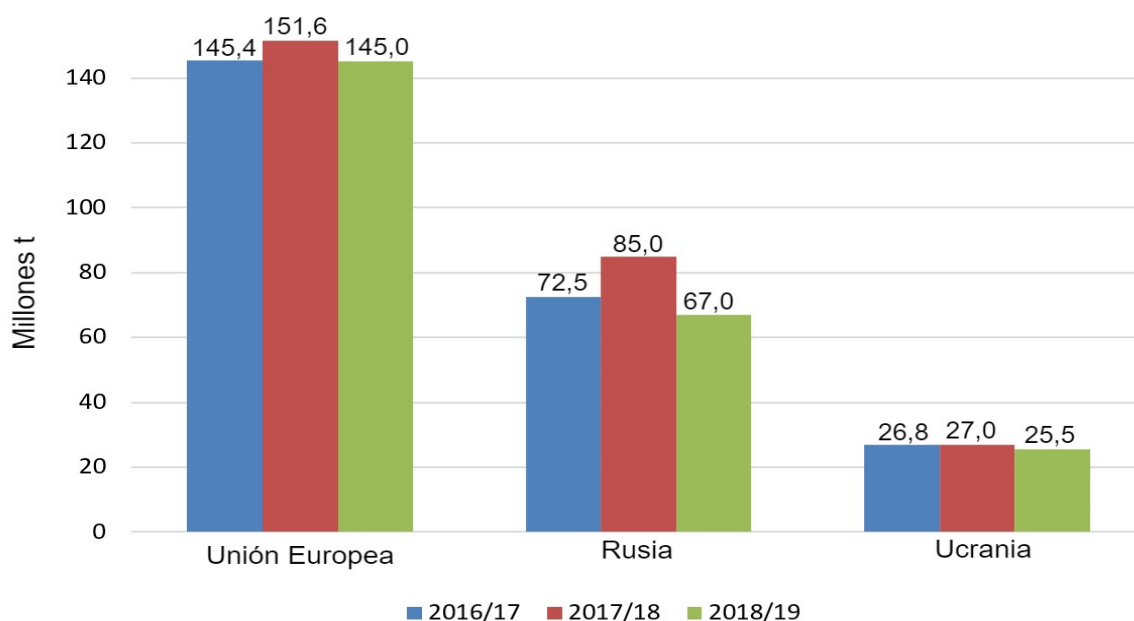
**Envasado:** El producto es almacenado en bolsas de polietileno para lograr conservar la calidad del producto, Ayudan a proteger al producto contra la humedad y evita que puedan contaminar agentes externos.

**Almacenamiento:** la harina tiene que almacenarse para que repose y madure y se lo hace a una temperatura de 20 y 27°C y debe alcanzar una humedad e 13-14 %. Los sacos deben de estar encima de pallets de madera que libra de todo riesgo.

#### 2.2.7. Producción mundial de la harina de trigo

En el mundo el trigo representa el 41% de consumo de todos los cereales. Entre los importadores principales de harina de trigo están: Brasil, Egipto, Irán y México. Los países desarrollados dependen de las exportaciones de países que cultivan bastante esta materia prima y se va incrementando y se espera que las importaciones netas de trigo aumenten de 72 millones de toneladas anuales en 1977- 99 a 160 millones de toneladas en el año 2030 (Holguín & Alvarado, 2018).

Pocos son los países que tienen las condiciones óptimas para el cultivo del trigo. Cuatro países representan el 90% de la producción de trigo, con más de 70% proveniente de Etiopía, junto con, Sudáfrica, Sudán y Kenia expanden la producción 4%, 1.3%, 1.9% y 2.4% anual.



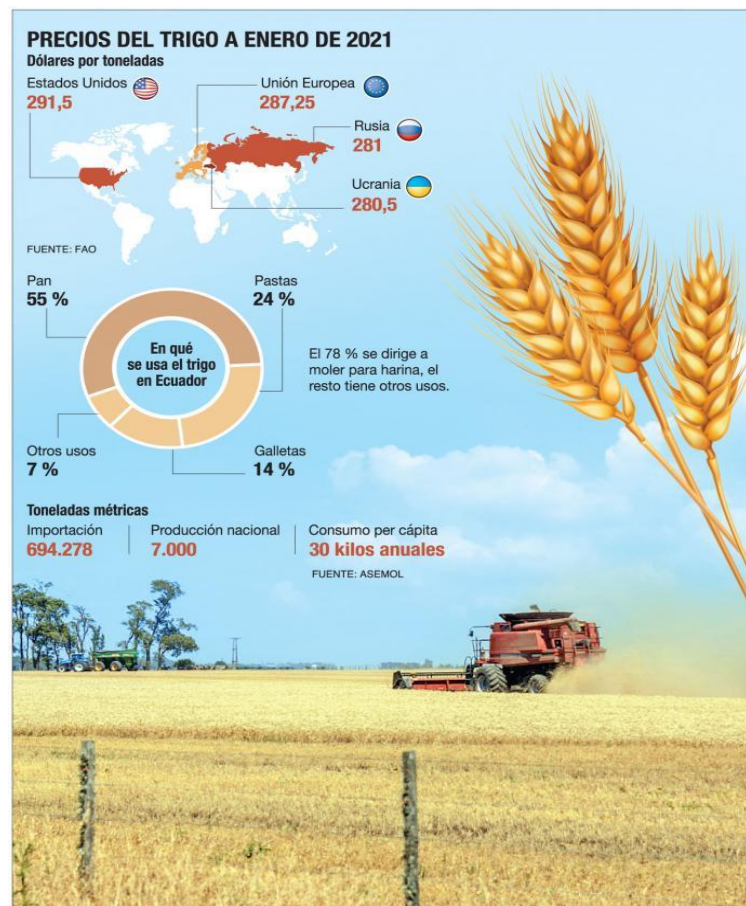
**Figura 2.** Los precios del trigo aumentan drásticamente  
**Fuente:** (Guinjoan, 2018)

Los principales exportadores de trigo son: Argentina, Australia, Canadá, UE, Kazajstán, Rusia, Ucrania, Estados Unidos. La producción mundial de trigo en el año 2015 incrementó ligeramente en 1%, dando una cifra de 734,6 millones de toneladas. Tanto las importaciones como las exportaciones descendieron, lo cual concluyen que aumentó el autoconsumo en los países productores. Gracias a China, Rusia y la Unión Europea aumenta la oferta productiva lo que hace que haya mucha competencia en exportaciones, lo que afecto al precio internacional del cereal se mantenga bajo.

#### 2.2.8. Producción y costos de producción de trigo en el mercado ecuatoriano

Ecuador sale de la lista de los países productores de trigo, solo el 1,13% de la demanda nacional llega de los agricultores nacionales, el resto se importa, principalmente, desde Canadá, Estados Unidos y Argentina. Son 694000 toneladas que se demanda anualmente en Ecuador para diferentes usos en la industria molinera, según informes del Ministerio de Agricultura (Lizarzaburo, 2021).





**Figura 3.** Precios del trigo de 2021 en Ecuador  
**Fuente:** (Lizarzaburo, 2021)

### 2.2.9. La vida útil de la harina

El deterioro de la harina se debe a varios factores como el tipo de harina, la humedad, temperatura y el método de almacenamiento. Las harinas se conservan entre 3 a 8 meses a las temperaturas óptimas.

### 2.2.10. Métodos de almacenamiento

#### 2.2.10.1. Almacenamiento en sacos

Los costales deben estar limpios, ser resistentes, y estar bien cosidos o sellados, se los coloca sobre un pallet que impedirá que toque con el suelo. Se suele cruzar los sacos para proporcionar mayor estabilidad y así facilitando la rotación del costal. No debe de ir más de 8 costales arrumados (CODEX STAN 152, 1985, p. 3).

#### 2.2.10.2. Almacenamiento en silos

Una vez estando el silo vacío se recomienda una limpieza completa para su correcta desinfección al menos una vez al año (CODEX STAN 152, 1985).

#### 2.2.11. Inocuidad alimentaria

La inocuidad es la característica de que un alimento no causa daño al ser ingerido, más allá de si es saludable o no, es decir, se trata de que se encuentre en un estado salubre y de calidad. Está relacionado con la higiene de los alimentos, por tanto, se requiere de medidas higiénicas para tener y mantener alimentos inocuos.

La calidad es negociable y lo que para uno es bueno, para otro tal vez no. Sin embargo, la inocuidad es una característica obligada: si no es inocuo, no puede llamarse alimento. "Puede afirmarse que la inocuidad de los alimentos es tan antigua como el mismo hábito de comer. Siempre ha habido una intención de evitar el dolor y la enfermedad" (Organismo internacional regional de sanidad agropecuaria, 2018, p.6). Cualquier cosa que al comerla cause daño no puede considerarse un alimento.

Sin embargo, el consumidor asume la inocuidad de su alimento porque se deja llevar por las apariencias. Por tanto, los indicadores de la falta de inocuidad de los alimentos son los sabores desagradables, los olores fétidos, las texturas reblandecidas, los exudados y los colores pálidos, en otras palabras la percepción de la descomposición sensorial "Cuando se habla de inocuidad está implícita la idea de hacer prevalecer el aspecto preventivo de las medidas a tomar, de manera que la inocuidad de los alimentos debe verse como parte esencial de los cuidados preventivos de la salud pública" (Organismo internacional regional de sanidad agropecuaria, 2018, p.7).

#### 2.2.12. Sistemas oficiales de inocuidad

Las entidades regulatorias juegan un rol indispensable para salvaguardar la salud humana. Es importante que "los sistemas estatales brinden el apoyo necesario para sostener el comercio y apoyar la infraestructura turística" (Organismo internacional regional de sanidad agropecuaria, 2018, p.7).

La salud depende de las funciones bien ejercidas por las diferentes entidades regulatorias, es decir, de su capacidad para supervisar la producción, actualización y comercio del sector productivo. En ese sentido, se requiere mantener una cobertura suficiente, respecto a calidad como en cantidad, para mantener un control que

resulte efectivo para los medios de producción. Sobre todo, cuando comercian sus productos con mercados formales e internacionales.

La regulación sirve para

- 1) Proteger al consumidor.
- 2) Garantizar que todos los alimentos sean inocuos, sanos y aptos para el consumo humano durante su producción, empaque, almacenamiento, transporte, distribución, proceso, preparación y su consumo. Así también que se cumplan los requisitos de inocuidad y calidad y estén etiquetados de forma objetiva y precisa, de acuerdo con las disposiciones de la ley. (Organismo internacional regional de sanidad agropecuaria, 2018).

#### 2.2.13. Análisis de riesgos en inocuidad de alimentos

Las organizaciones internacionales y los sistemas privados de gestión han puntualizado que los países deben asegurar que las medidas sanitarias y fitosanitarias se basen en evaluaciones adecuadas, tanto de las circunstancias como de los riesgos existentes para la vida y la salud de las personas y los animales, o para la preservación de los vegetales. Esto incluye a las medidas para la inocuidad de los alimentos, por lo que el análisis de riesgos cobra su importancia para el desarrollo de sistemas efectivos. Los lineamientos para el análisis de riesgos en alimentos se encuentran en el Codex Alimentarius.

La identificación del peligro es un paso ya conocido en el ámbito de la inocuidad de los alimentos. De allí en adelante es preciso mencionar que los tres componentes deben aplicarse dentro de un marco general, dedicado a la gestión para la salud humana que pueda estar dentro de los alimentos. Entre la evaluación y la gestión debe existir una separación funcional que garantice que la evaluación se lleve a cabo sobre las bases científicas adecuadas y que evite toda confusión entre el trabajo de los que evalúan y los que gestionan, más allá de todo conflicto de intereses. Pero no debe perderse de vista que el análisis del riesgo cualitativo o cuantitativo es un proceso iterativo. Es decir, que su acción se repite en forma cíclica y, por lo tanto, implica que exista una interacción entre evaluadores y gestores (Organismo internacional regional de sanidad agropecuaria, 2018, p.20).

#### 2.2.14. Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs)

El Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos de América indican que entre 1999 y 2007, durante 8 años el número de muertes producto de los vómitos y la diarrea aumentaron de unos 7,000 a más de 17,000.

La Organización Mundial de la Salud, 2015, indico que un treinta por ciento de todas las muertes por enfermedades de transmisión alimentaria se producen en niños menores de 5 años.

Organismo internacional regional de sanidad agropecuaria (2018) indica que:

Los niños de esa edad representan solo el 9% de la población mundial. Las Enfermedades de Transmisión Alimentaria (ETAs), causadas por 31 agentes (bacterias, virus, priones, parásitos, toxinas y productos químicos), afectan cada año hasta 600 millones de personas de todo el mundo. Dicho de otra forma, casi 1 de cada 10 personas enferman tras consumir alimentos contaminados. De estas personas, 420.000 mueren (el 0.07%), incluidos 125.000 niños menores de 5 años. En los países tropicales en vías de desarrollo, la enfermedad gastrointestinal suele ser la segunda causa de consulta, después de las afecciones respiratorias (p. 27).

#### 2.2.15. Agentes etiológicos y otros microorganismos

Bacterias patógenas. La mayoría de las bacterias son inofensivas. Para efecto de la inocuidad de los alimentos interesan las que causan enfermedad "Estas bacterias se conocen como bacterias patógenas y son las que merecen la mayor parte de la atención de las medidas de control. Ejemplos: *Salmonella ssp.*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7" (Organismo internacional regional de sanidad agropecuaria, 2018).

#### 2.2.16. Bacterias indicadoras

Son aquellas que no necesariamente son patógenas, pero su presencia delata que ha habido contacto con superficies potencialmente contaminantes. Así se encuentran: "coliformes fecales o *Escherichia coli*"

Alguien que manipula alimentos o superficies en contacto con alimentos no se ha lavado las manos después de ir al baño; o que ha habido una contaminación con objetos que provienen del exterior de la planta. Encontrar estos organismos es muy

desalentador, porque con ellos podrían venir huevecillos de parásitos, virus de hepatitis A, norovirus, amibas, giardias y muchos otros.

Estos últimos son difíciles de determinar y los métodos son muy costosos. Por eso se opta por detectar indicadores. Los indicadores más importantes son el grupo de las bacterias coliformes. Son bacterias Gram-negativas que se determinan para demostrar contacto fecal con el alimento o sus superficies de contacto (Organismo internacional regional de sanidad agropecuaria, 2018).

#### 2.2.17. Hongos

Los hongos son microorganismos del reino *Fungi* que se alimentan de plantas y animales. Nadie sabe cuántas especies de hongos hay, pero las estimaciones oscilan entre 10 000 y 300 000 o más. La mayoría de los organismos son filamentosos y la producción de esporas suele ser característica del reino fúngico. Estas esporas pueden ser transportadas por el aire, el agua o los insectos.

Los hongos están formados por muchas células y, a veces, se pueden ver a simple vista. Bajo el microscopio, estos hongos parecen hongos alargados. En muchos hongos consiste el cuerpo:

- Se parecen a raíces de forma de hilos que colonizan al alimento donde viven.
- El tallo crece elevándose por encima del alimento
- Esporas que se forman al final del tallo.

#### 2.2.18. *Aspergillus flavus*

*Aspergillus flavus* es un hongo hialino, saprófito y filamentosos que pertenece al filo *Ascomycota*. Está formado por hifas hialinas sobresalientes y puede reproducirse sexualmente (formando ascosporas en asco) y asexualmente (formando conidios).

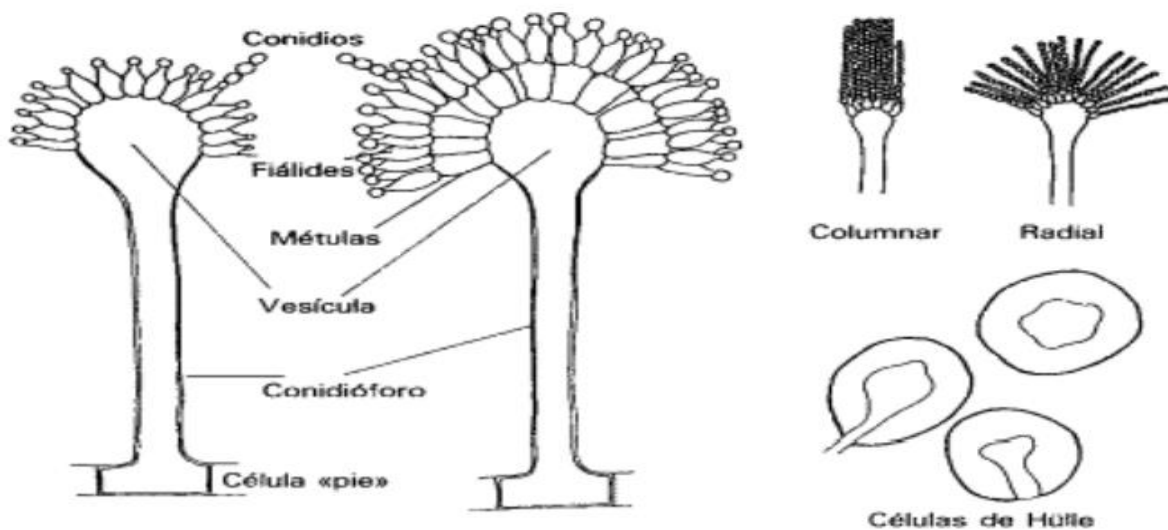
Hay alrededor de 180 especies de *Aspergillus*, pero solo unas 40 causan infecciones en humanos y animales. *Aspergillus fumigatus* es la causa más común de infección por *Aspergillus* en humanos. Otras especies comunes son *A. Flavi*, *A. Terius* y *A. niger* y menos comunes *A. nidulans* y *A. versicolor* (Alcalá, Muñoz, & Bouza, 2020).

#### 2.2.19. Características Microbiológicas de *Aspergillus*

Alcalá, Muñoz, & Bouza, (2020) mencionan que se conocen alrededor de 900 especies de *Aspergillus*, Rapper y Fennell las clasificaron en 18 grupos, de los cuales

solo 12 están relacionados con enfermedades humanas: *Aspergillus fumigatus* (85%), *A. flavus* (5-10%), *A. niger* (2-3%), *A. terreus* (2-3%), *A. nidulans*, *A. glaucus*, *A. clavatus*, *A. cervinus*, *A. candidus*, *A. flavipes* y *A. ustus*. Esta clasificación se basa en:

Características morfológicas de los hongos: tamaño y forma de las cabezas conidiales, morfología de los conidióforos, falídes y métulas, así como en presencia de células de Hulle y esclerocios. La siguiente figura muestra la estructura morfológica del género *Aspergillus*:



**Figura 4.** Características de las principales especies implicadas en patología humana  
**Fuente:** (Alcana, Muñoz, Bouza, 2020)

#### 2.2.20. Morfología de *Aspergillus flavus*

- El hongo *Aspergillus flavus* presenta una morfología compleja, esta se basa en la formación de esclerocios. El Grupo I contiene cepas L con un diámetro de esclerocio superior a 400  $\mu\text{m}$  y el Grupo II contiene cepas S con un diámetro de esclerocio inferior a 400  $\mu\text{m}$ .
- También tienen formas de reproducción sexual y asexual.
- La reproducción asexual produce conidiosporas y esclerocios, mientras que la reproducción sexual produce esclerocios.
- *Aspergillus flavus* produce esporas asexuales conocidas como conidios.
- Las conidiosporas se producen a partir de fiálidas en los conidióforos.
- Las conidiosporas son visibles a simple vista y tienen un micelio denso de 3 a 6  $\mu\text{m}$  de tamaño.
- Los conidióforos surgen de los filamentos septales.
- Los conidióforos son incoloros y de textura rugosa.

- Las fialidas que surgen de los conidióforos son de una o dos hileras.
- Un tabique parece un tabique que forma ramas filamentosas de micelio.
- Tienen hifas hialinas ramificadas en cada tabique.
- Las hifas son muy pequeñas e invisibles a simple vista.
- *Aspergillus flavus* también se reproduce produciendo ascosporas que se encuentran en los esclerocios.
- La reproducción sexual tiene lugar entre dos especies compatibles de diferentes formas vegetativas nacidas al mismo tiempo. (Mokobi, 2021)

#### 2.2.21. Patogenia

*Aspergillus* es un ejemplo de lo que se denomina "patógeno oportunista", es decir, uno que a menudo afecta los fuertes mecanismos de defensa de las personas. Los factores de patogenicidad de este hongo incluyen:

- Los conidios son pequeños y se inhalan fácilmente, lo que puede causar infecciones pulmonares y de los senos paranasales.
- Es capaz de crecer a 37°C, por lo que es apta para afectar a la población.
- Puede adherirse a la superficie de las células epiteliales y eventualmente a las células endoteliales, y tiene una fuerte propensión a penetrar las venas.
- Genera gran cantidad de productos tóxicos extracelulares (elastasa, toxina de restricción, fumigantina, etc.) en células de mamíferos (Alcalá, Muñoz, & Bouza, 2020).

#### 2.2.22. ¿Qué son las micotoxinas?

Las micotoxinas son sustancias tóxicas producidas por ciertos hongos que se encuentran principalmente en cultivos alimentarios y nueces, pero también en apio, jugo de uva, manzanas y otras frutas y verduras. Hay muchos, y los investigadores siguen descubriendo nuevos hongos. La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) estima que el 25% de los cultivos del mundo están afectados por micotoxinas. La más famosa de las micotoxinas es la aflatoxina (Murillo & Esker, 2021).

#### 2.2.23. ¿Qué es la aflatoxina?

Las aflatoxinas son toxinas cancerígenas producidas por ciertos hongos en alimentos y alimentos para animales, especialmente cultivos de maíz y maní. Son probablemente las mejores y más populares micotoxinas del mundo. Las aflatoxinas

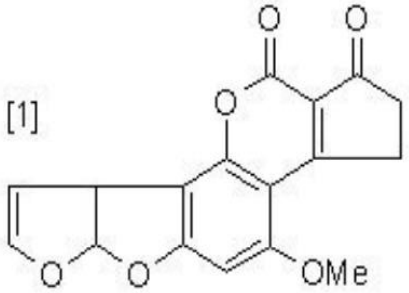
están asociadas con una amplia gama de enfermedades, incluida la intoxicación por aflatoxinas en el ganado, las mascotas y los seres humanos en todo el mundo. Muchos países regulan y controlan la presencia de aflatoxinas en las raciones de alimentos para humanos y animales para limitar la exposición a las aflatoxinas. La prevención de aflatoxinas es uno de los temas más difíciles en la actualidad.

Bajo el término genérico de aflatoxina se conoce un grupo de unos 20 metabolitos diferentes de origen fúngico producidos por ciertas especies del género *Aspergillus* (*A. flavi*, *A. parasitici* y *A. nonii*) con distinta toxicidad y presencia en los alimentos. Aunque 6 son más habituales en los alimentos: B1, B2, G1, G2, M1 y M2 (Seguridad alimentaria, 2021).

*Aspergillus* prospera en el calor y la humedad y se puede encontrar en una variedad de alimentos como maní, nueces, maíz, arroz, higos y otros alimentos secos, especias y aceites vegetales crudos debido a la contaminación antes y después de la cosecha. y granos de cacao.

Las aflatoxinas son genotoxinas y cancerígenas, por lo que se debe minimizar la exposición a través de los alimentos. Las aflatoxinas son resistentes al procesamiento normal de alimentos, por lo que esta es la mejor solución para prevenir el crecimiento de moho.

Las aflatoxinas B: Este grupo incluye las aflatoxinas B1 y B2. La aflatoxina B1 es la de mayor prevalencia en los alimentos y la más tóxica para los seres humanos.

AFLATOXINA	FÓRMULA		P.MOLECULAR (g/mol)
B <sub>1</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	 <p>[1]</p>	312,3

**Figura 5.** Estructura molecular de aflatoxina B1  
**Fuente:** Seguridad alimentaria (2021)



**Tabla 2.** Micotoxinas más comunes, productos afectados y efectos sobre la salud.

Micotoxina	Productos	Especies fúngicas	Efectos de Ingestión
Aflatoxina B1, B2, G1, G2	Maíz, cacahuete y otros productos	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i>	Aflatoxina B1 es identificada como un potente carcinogénico humano de acuerdo al IARC. Riesgo de toxicosis en humanos. Efectos adversos en varios animales especialmente pollos.
Deoxinivalenol, Nivalenol (Vomitoxina)	Trigo, maíz y cebada	<i>Fusarium gramineum</i> , <i>Fusarium crookwellense</i> , <i>Fusarium culmorum</i>	Toxicosis humana en India, China, Japón y Corea. Tóxico para animales especialmente cerdos.
Zearalenona	Maíz, Trigo	<i>Fusarium gramineum</i> , <i>Fusarium crookwellense</i> , <i>Fusarium culmorum</i>	Identificada por la IARC como posible carcinógeno. Afecta el sistema reproductor en animales de laboratorio y cerdos.
Ocratoxina A	Cebada, trigo y muchos otros productos	<i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Penicillium verrucosum</i>	Sospechoso por la IARC como carcinógeno humano. Tóxico para cerdos y aves de corral.
Fumonisina B1	Maíz	<i>Fusarium moniliforme</i> entre otras especies menos severas	Leucoencefalomalacia equina (por sus siglas en inglés, ELEM), fatal enfermedad de caballos.

Fuente: (IARC, 2019)

#### 2.2.24. Características de las aflatoxinas

Salazar, Ulloa, & Rojas, (2019), mencionarán que las aflatoxinas son metabolitos secundarios que no son necesarios para el crecimiento de los hongos, pero son productos finales de las vías de neutralización del poder tóxico de ciertos cuerpos por su combinación con otras sustancias (destoxificación), puede producirse, in vitro o in vivo por la acción de ciertos órganos (hígado).

Químicamente, las aflatoxinas son estables en los alimentos y son difíciles de eliminar una vez que se producen, tienden a resistir procesos normales de cocción. Pertenece a la familia de las difuranocumarinas, un grupo de metabolitos heterocíclicos estrechamente relacionados, que se dividen en dos grupos principales según sus estructuras químicas. Deboro-Coumaro ciclopentanona serie 1 (AFB1, AFB2, AFB2A, AFM1, AFM2, AFM2A y Aflatoxicol) y Deboro-Coumaro lactona serie 2 (AFG1, AFG2, AFG2A, AFGMAF3, AFGMAF1,

Sin embargo, los más importantes son B1, B2, G1 y G2, caracterizados por su color fluorescente bajo luz ultravioleta (B: "azul", azul; G: "verde", verde). La aflatoxina B1 se sintetiza a través de la vía de los policétidos. Las reacciones involucradas incluyen

condensación, oxidación, reducción, alquilación y halogenación para formar una molécula compuesta por un anillo de cumarina unido a un resto de dihidrofurano y un resto de ciclopentanona.

#### 2.2.25. Efectos cancerígenos de las aflatoxinas

- Estos son un tipo de cáncer resultante de la exposición a largo plazo a la aflatoxina B1. B1 es un carcinógeno hepático potencial, que causa tumores principalmente en el hígado, pero también en los riñones, los pulmones y el colon en humanos y animales.
- El carcinoma hepatocelular (HCC), un cáncer primario de hígado, está asociado con el consumo de aflatoxina B1.
- Las personas con alto riesgo de desarrollar carcinoma hepatocelular (CHC) asociado a aflatoxinas tienen hepatitis B y C crónicas e interactúan sinérgicamente con la aflatoxina B1 para aumentar la incidencia de CHC (Mokobi, 2021).

#### 2.2.26. Calidad de los alimentos

La calidad de un alimento se define como el conjunto de características que lo hacen agradable, apto y seguro para el consumidor. La calidad debe reunir varios aspectos, como la calidad de nutritiva, lo que permite conservarlos, así como la higiene (Calle, 2018, p.16).

#### 2.2.27. Calidad nutritiva

El fin primordial del consumo de alimentos es nutrir a los seres vivos, es decir, aportar al organismo los nutrientes necesarios para desarrollarse y mantener sus funciones vitales. La calidad nutritiva se refiere a la composición química de un alimento, a su contenido de nutrientes: proteínas, lípidos, hidratos de carbono, vitaminas, minerales y el valor biológico de los mismos (Calle, 2018, p. 16).

#### 2.2.28. Calidad de conservación

Esta se refiere a la aptitud de un alimento para la conservación. De acuerdo con este criterio un alimento es mejor cuanto más tiempo se mantiene con sus cualidades originales y menos condiciones de almacenamiento necesitan. La estabilidad está estrechamente relacionada con la composición del alimento y para esto la cantidad de agua es determinante (Calle, 2018, p. 16).

#### 2.2.29. Alimentos no perecederos

No se deterioran a no ser que sean tratados inadecuadamente. Pueden ser almacenados durante largos periodos de tiempo, un año o más debido a su bajo contenido de humedad.

#### 2.2.30. Alimentos semiperecederos

Si se cuidan y se almacenan adecuadamente estos permanecerán sin deteriorarse por algún tiempo, de semanas hasta meses (Calle, 2018, p.16).

#### 2.2.31. Alimentos perecederos

Se descomponen rápidamente a menos que se les aplique algún método de conservación, ya que su contenido de humedad es muy alto.

#### 2.2.32. Calidad sensorial

Es captada por los sentidos y hace que un alimento sea apetecible o rechazado por el consumidor, es el primer factor de selección de un alimento. Comprende las características organolépticas, es decir, olor, color, sabor, textura, entre otras (Rivadeneira, 2019)

#### 2.2.33. Calidad higiénica o sanitaria

Es el primer aspecto que debe cumplir un alimento para el consumo. Para lograrla es indispensable la ausencia de toda sustancia nociva, ya sea de origen biológico, físico o químico que puede causar algún trastorno al consumidor a corto o largo plazo (Canu, 2019).

#### 2.2.34. Siembra en superficies

Se añade en una caja Petri el medio de cultivo realizado, se deja gelatinizar y se coloca en la superficie el inocuo. Utilizando una espátula de Drigalsky se extiende y adhiere el inocuo hasta la absorción por el medio de cultivo. Este método se lo recomienda para microorganismos aerobios estrictos (Reynoso, Magnoli, & Barros, 2022).

#### 2.2.35. Agar papa dextrosa

Es un medio de cultivo gelatinoso, no selectivo. En este medio pueden crecer bacterias y hongos, pero su uso es especialmente para el aislamiento de hongos filamentosos y levaduras. Por sus siglas en inglés es conocido como medio PDA.

La característica más importante de es agar es el uso, solo para tipo de hongos fitopatógenos que causan daños a los vegetales. El medio papa dextrosa es muy fácil de preparar en cualquier laboratorio y como su nombre lo indica contienen infusión de papa, dextrosa para el crecimiento de los microorganismos y agar-agar. Según lo que se desea obtener o trabajar se le agrega sustancias inhibitoras al aislamiento (Gil, 2023).

#### 2.2.36. Diluciones

Es un método cuyo objetivo es disminuir el soluto por unidad de volumen de disolución. Se logra trabajando con una cantidad específica de diluyente y soluto para crear una mezcla homogénea entre dos o más sustancias (Arana, Orruño, & Barcina, 2020).

##### 2.2.36.1. Qué es el factor de dilución

Es el número de veces o repeticiones que se debe diluir una solución para obtener una de más baja concentración. Nos permite saber que tan diluido se encuentra la última solución con respecto a la primera.

##### 2.2.36.2. Técnica de recuento por dilución

Esta técnica consiste en inocular 1 ml de solución que se coge de la muestra madre y se pasa al primer tubo o frasco tipo antibiótico, luego con la ayuda de una pipeta se coge 1 ml del primer tubo que se inoculó y así consecutivamente hasta tener el factor de dilución que se desea obtener (Morales, 2022).

#### 2.2.37. Técnicas de aislamiento y recuento

Se refiere a colonias mixtas que se encuentran en las cajas Petri con el respectivo cultivo o agar y se realiza esta técnica para la separación de colonias de un solo género. Para separar a un microorganismo de un solo género se transfiere a un agar específico denominado cultivo puro por poseer un solo tipo de M/O (Sánchez, 2018).

#### 2.2.38. ¿Qué es la PCR?

Se da una reacción de la cadena de polimerasa con la ayuda de un sistema enzimático in vitro que amplifica por millones de veces una secuencia específica de ADN. La enzima ADN polimerasa cumple con el trabajo de sintetizar naturalmente el ADN en las células. En la prueba si utilizamos como sustrato el ADN genómico, entonces hablamos de una PCR. Los elementos más importantes para que se lleve a

cabo la prueba son: el templado o molde (ADN o ADNc), la enzima, los oligonucleótidos o primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina guanina), el ion magnesio (Mg<sup>+</sup>), una solución amortiguadora o buffer y H<sub>2</sub>O. Todos estos elementos trabajan en tres fases principales que se compone esta prueba: desnaturalización, hibridación y extensión. Los equipos donde se desarrolla la reacción son llamados termocicladores, donde se puede operar de manera homogénea y en el que la temperatura y el tiempo no alteren a cada uno de los ciclos. Al final de la prueba para comprobar si se amplificó la secuencia blanco de interés, los productos de la PCR o amplicones son transportados a geles de agarosa para refutar si la reacción fue exitosa (Rabelo & Piñeres, 2022).

#### 2.2.38.1. Tipos de PCR

La PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) es una técnica utilizada en biología molecular para amplificar secuencias de ADN. Hay varios tipos de PCR que se han desarrollado para aplicaciones específicas. Algunos de los tipos de PCR más comunes incluyen:

- PCR convencional: requiere sólo de una DNA polimerasa, magnesio, nucleótidos, cebadores, una plantilla de DNA amplificable y un termociclador. El mecanismo de la PCR es tan simple como su propósito: 1) El DNA bicatenario (dsDNA) se desnaturaliza (se separa en hebras individuales) por calor. 2) Los cebadores se unen a las secuencias coincidentes en el DNA monocatenario. 3) La DNA polimerasa extiende los cebadores (en la dirección 5' – 3'), lo que da como resultado dos copias de la molécula de DNA bicatenario original doble cadena. Estos tres pasos comprenden el ciclo de amplificación en la PCR. El investigador debe optimizar cada paso del ciclo según la plantilla de DNA y los cebadores utilizados. Este ciclo de amplificación suele repetirse entre 20 y 40 veces y se puede analizar el producto amplificado. La PCR se utiliza ampliamente para amplificar el DNA para su uso posterior en otros experimentos. Esta técnica se puede utilizar en pruebas genéticas o para la detección de DNA patógeno.
- PCR anidada: una variación de la PCR tradicional que implica dos rondas de amplificación, cada una con un par diferente de cebadores, para aumentar la sensibilidad y especificidad del ensayo. Primero, la reacción se realiza utilizando cebadores externos para amplificar una región de ADN más larga

que contiene el fragmento objetivo. Este producto de amplificación se utiliza luego como plantilla para otra PCR utilizando cebadores internos para amplificar regiones específicas.

- PCR in situ: Las hebras individuales de ARN o ADN, llamadas sondas, marcan y permiten la unión a secuencias complementarias de ARN o ADN que se encuentran en muestras de tejido o cromosomas. La sonda está marcada con un marcador químico o radiactivo para que se pueda visualizar su unión.
- PCR múltiple: El objetivo es amplificar diferentes secuencias específicas simultáneamente en un solo tubo, lo que necesariamente implica que la mezcla de reactivos y procedimientos utilizados sea suficiente para detectar cada objetivo sin retrasar la detección de otros objetivos. Se debe tener en cuenta:
  - ✓ Escoger o diseñar oligonucleótidos que no interaccionen entre sí, es decir, que no forman oligómeros.
  - ✓ Que tengan temperaturas de anillamiento similares.
  - ✓ Que cada pareja amplifique una única secuencia diana.
  - ✓ Que generen amplicones de tamaño suficientemente diferente como para poder ser separados y diferenciados tras la amplificación.
  - ✓ En cuanto a la calidad y cantidad de ADN molde, por supuesto debemos intentar partir de la menor concentración posible y con ausencia de sustancias inhibitoras que puedan interferir en la reacción. Para ello, los protocolos de purificación variarán en función del tipo de muestra clínica de partida
- RT-PCR: dos procesos: transcripción inversa del ácido ribonucleico (ARN) para sintetizar ADN complementario (ADNc), seguida de la correspondiente PCR. De esta forma se pueden amplificar los genes expresados durante el estudio.
- PCR en tiempo real o cuantitativa: El principio de esta tecnología se basa en la PCR de punto final, pero la forma en que se detectan y analizan los productos amplificados es diferente. El término tiempo real significa que la detección del producto amplificado ocurre durante cada ciclo de la reacción. Por sí solo, el término "cuantitativo" significa que se puede cuantificar la cantidad de ADN en una muestra. Los productos de amplificación se controlaron a medida que avanzaba la reacción. El sistema de PCR de fluorescencia cuantitativa en tiempo real proporciona alta sensibilidad, especificidad y eficiencia. Los compuestos químicos de la PCR en tiempo real

son los mismos que la de la PCR de punto final, excepto que la enzima, el dNTP's, Mg +, el buffer y el sistema indicador fluorescente para la detección del producto amplificado generalmente se venden juntos en una solución conocida como "Master Mix", el agua se suministra por separado y además es libre de nucleasas. Los cebadores deben diseñarse especialmente para garantizar una alta especificidad y generar amplicones de entre 100 y 150 pb de tamaño; si estos valores son mayores, la eficiencia de la reacción disminuirá significativamente.

- PCR de células vivas: como paso preliminar para la amplificación de fragmentos de ADN diana, la muestra se neutraliza con material genético "libre" en suspensión o material genético de células dañadas o muertas. Con este primer paso, los resultados del PRC muestran que nuestra muestra contiene solo células viables (Tamay, Ibarra , & Velasquillo, 2019)

#### 2.2.39. Técnica de RFLP (enzima de restricción)

Los fragmentos de restricción de longitud son un tipo de polimorfismo que trabaja con la variación de la secuencia de ADN que se da por las enzimas de restricción. Su principal función es cortar moléculas de ADN de lugares que se desea trabajar. Los RFLPS se emplean en los mapas genéticos como marcadores, para su observación se utiliza electroforesis en gel (Cheriyedath, 2019).

##### 2.2.39.1. ¿Cómo funciona?

El RFLP se ejecuta a través de una serie de pasos que se describen brevemente a continuación:

##### 2.2.39.2. Extracción de ADN

El ADN se extrae de una muestra purificada.

##### 2.2.39.3. Fragmentación del ADN

El ADN purificado se digiere usando endonucleasas de restricción. Los sitios de reconocimiento de estas enzimas tienen generalmente de 4 a 6 pares de bases de largo. Cuanto menor sea la secuencia conocida, mayor será el número de fragmentos generados por el resumen (Cheriyedath, 2019).

Por ejemplo, si hay una secuencia GAGC corta que ocurre repetidamente en una muestra de ADN. La endonucleasa de restricción que reconoce la secuencia GAGC corta el ADN en cada repetición del motivo GAGC.

Si una muestra repite la secuencia GAGC 4 veces y otra muestra la repite 2 veces, las longitudes de los fragmentos generados por la enzima para las dos muestras serán diferentes.

#### 2.2.40. Electroforesis en gel

Los fragmentos de restricción formados durante la fragmentación del ADN se analizan mediante electroforesis en gel.

Los fragmentos tienen carga negativa y se pueden separar fácilmente mediante electroforesis, que separa las moléculas en función de su tamaño y carga. Las muestras de ADN fragmentado se colocan en una cámara que contiene un gel electroforético y dos electrodos (Cheriyedath, 2019).

Cuando se aplica un campo eléctrico, los desechos migran al electrodo positivo. Los fragmentos más pequeños se mueven más rápido a través del gel, dejando atrás a los más grandes, por lo que las muestras de ADN se separan en bandas distintas en el gel.

##### 2.2.41.1. Visualización en las Bandas

El gel se trata con tintes fluorescentes para hacer visibles las bandas de ADN.

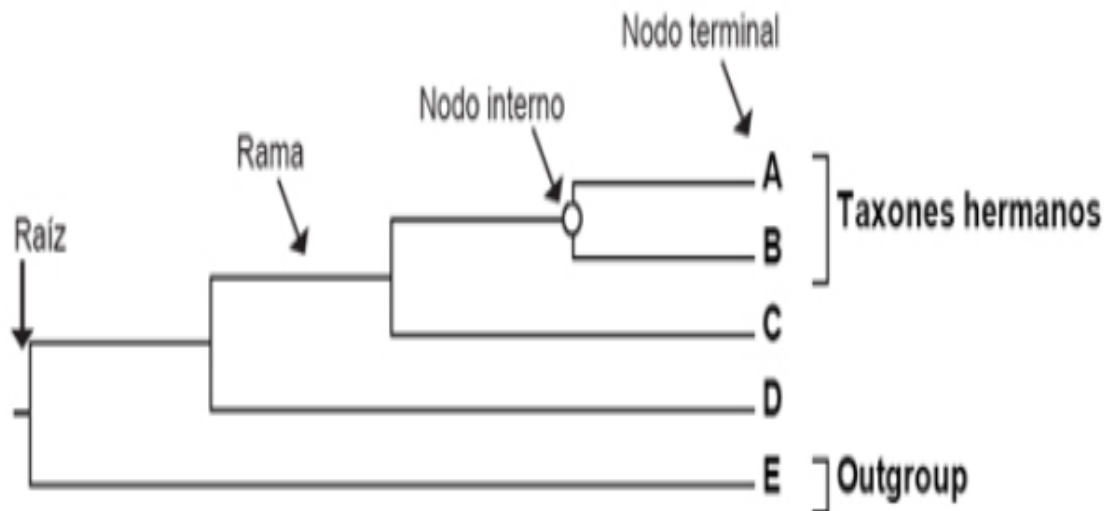
#### 2.2.41. Árbol filogenético

Es un diagrama el cual permite identificar las relaciones entre organismos, está compuesto de varias ramificaciones, estas reflejan como grupos de especies evolucionaron a partir de una serie de ancestros en común, además se muestra que en estos árboles dos especies están más relacionadas si se muestra un ancestro común más reciente y menos relacionadas si tienen un ancestro en común menos reciente. Se basa en información recopilada sobre la especie como características físicas y la secuencia de ADN según sus genes.

En la siguiente gráfica se muestra la anatomía del árbol filogenético. Consiste en puntos finales o nodos donde reside el organismo de interés (pueden pertenecer a la misma especie o de diferentes niveles jerárquicos). Los nodos internos que representan los principales ancestros comunes compartidos por dos o más taxones.



Las ramas que conectan los nodos internos terminan en la raíz, que es el nodo más interno compartido por todos los taxones. Cuando dos taxones comparten un ancestro en común con otras especies, se denominan taxones hermanos. El “outgroup” es el taxon más lejano emparentado al taxón de interés, sirve para enraizar el árbol, es decir, donde se encuentra la primera ramificación (Revilla, 2021).



**Figura 6.** Anatomía de un árbol filogenético  
**Fuente:** (Revilla, 2021)

#### 2.2.42. Método de Elisa

El ensayo de ELISA requiere de tres elementos esenciales los cuales son: el antígeno a detectar, un anticuerpo específico para ese antígeno conjugado y un sistema que permite estimar la cantidad de antígeno presente en la muestra de acuerdo a la reacción enzimática que se genere.

##### 2.2.42.1. Tipos de Elisa

###### 2.2.42.1.1. Elisa indirecto

En este ensayo se utilizan dos anticuerpos, primario y secundario, el ultimo siempre será conjugado a una enzima. El procedimiento para realizar el método es el siguiente: primero se inmoviliza el antígeno sobre una placa; se coloca un anticuerpo primario sin marcar que se va a unir al antígeno que se quiere encontrar; después se coloca de nuevo un anticuerpo secundario junto con una enzima que se fusionarán al anticuerpo primario, por último, se añade el sustrato que al tener contacto con la enzima proporcionará una señal que se observará y permitirá la detección y cuantificación del antígeno de interés (BioTech, 2019).

#### 2.2.42.1.2. Elisa directo

La Elisa directo es el método más simple y rápido de todos, donde el anticuerpo primario trabaja conjunto con una enzima para unirse directamente al antígeno de interés permitiendo la detección y así poder obtener la cuantificación. El proceso es el siguiente: el antígeno se inmoviliza en una placa; para luego colocar un anticuerpo primario trabajando con una enzima que detectará el antígeno de interés y por último el sustrato que al reaccionar con la enzima se verá una señal visible que permitirá la detección y cuantificación del antígeno del interés (BioTech, 2019).

#### 2.2.42.1.3. Elisa tipo sándwich

El antígeno se queda inmovilizado entre dos anticuerpos, uno de captura y otro de detección, también conocidos como pares de anticuerpos, que interactúan a dos epítomos distintos de un mismo antígeno. A continuación, el procedimiento, El anticuerpo de captura se inmoviliza sobre la placa. Luego se coloca la muestra que contiene el antígeno de interés que se une al anticuerpo de captura. Después se coloca un anticuerpo secundario marcado con una enzima que trabajarán con el anticuerpo de detección y se añade el sustrato que al reaccionar con la enzima proporcionará una señal visible que permitirá la detección (BioTech, 2019).

#### 2.2.42.1.4. Elisa competitivo

Esta técnica más difícil de la técnica Elisa, conocida como Elisa de inhibición debido al uso de un antígeno de referencia que competirá con el antígeno de la muestra para unirse al anticuerpo primario. El proceso es el siguiente. El antígeno de referencia se inmoviliza sobre la placa, el exceso de anticuerpo primario sin marcar se incubó con la muestra que está el antígeno de interés, dando lugar de complejos antígeno-anticuerpo. Por consiguiente, se coloca la mezcla antígeno anticuerpo a la placa, donde los antígenos de referencia y muestra competirán para unirse, se lava la placa, ya terminando se añade un anticuerpo secundario marcado con una enzima que se unirá al anticuerpo primario anclado al antígeno de referencia; se añade el sustrato que al reaccionar con la enzima proporcionará una señal visible que será inversamente proporcional a la cantidad de antígeno de interés (BioTech, 2019).

Según Herrera & Llontop (2020) indica que:

Para Aflatoxina B1 el Kit AgraQuant® se basa en un ensayo inmunoabsorbente unido a enzimas competitiva directa (ELISA). Se extrae aflatoxina B1 de muestras

trituras con metanol al 70%. Al extraer la muestra y la aflatoxina unida a la enzima se mezclan y se colocan a los micropocillos recubiertos con anticuerpos. La aflatoxina B1 libre compite con la aflatoxina B1 en muestras y estándares de control conjugado con anticuerpos y enzimas fijados a los micropocillos (conjugado incluido en el kit). Después del paso de lavado, agregue el sustrato enzimático que permite el desarrollo de un color azul. La intensidad del color se inversamente proporcional a la concentración de aflatoxina B1 en una muestra. Luego se agrega una solución de parada para cambiar el color de azul a amarillo. Se utilizan micropocillos los cuales se miden ópticamente un lector de micropocillos con un filtro de absorción de 450 nm y filtro diferencial de 630 nm. La densidad óptica de los controles da lugar a la Curva Standard y comparar densidades de muestra para calcular la concentración exacta de aflatoxina B1 utilizando la curva estándar (pp. 60-63).

### III. METODOLOGÍA

#### 3.1. ENFOQUE METODOLÓGICO

##### 3.1.1. Enfoque

El siguiente trabajo de investigación tendrá un enfoque cualitativo y cuantitativo, será de gran aporte para determinar si la harina de trigo que se expende en la ciudad de Tulcán presenta contaminación de hongos, principalmente de *Aspergillus flavus* que produce aflatoxina B1, sustancia tóxica presente en varios productos y para ello se cuantificará el contenido del hongo y el de aflatoxina B1, basándose en una prueba de PCR y método de Elisa.

##### 3.1.2. Tipo de Investigación

**Investigación experimental:** Se aplicará la respectiva investigación realizando el análisis microbiológico en el laboratorio de la Universidad Politécnica Estatal Carchi.

#### 3.2. HIPÓTESIS

**Ho:** La harina de trigo que se expende en la ciudad de Tulcán no contiene hongos (*Aspergillus flavus*) y su micotoxina (Aflatoxina B1), debido a las buenas condiciones de almacenamiento en los locales expendedores siendo inocuas para su consumo.

**Ha:** La harina de trigo que se expende en la ciudad de Tulcán contiene hongos (*Aspergillus flavus*) y su micotoxina (Aflatoxina B1), debido a las inadecuadas condiciones de almacenamiento en los locales expendedores no siendo inocuas para su consumo.

### **3.3. DEFINICIÓN Y OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES**

#### 3.3.1. Definición de variables

Variable Independiente

- Condiciones adecuadas de almacenamiento de la harina de trigo expendida en la ciudad de Tulcán.

Variable dependiente

- Inocuidad de la harina de trigo expendida en la ciudad de Tulcán

### 3.3.2. Operacionalización de variables

**Tabla 3.** Cuadro de Operacionalización de variables del respectivo estudio

Variable	Dimensión	Indicadores	Técnica	Instrumento
<b>Variable Independiente</b> Condiciones adecuadas de almacenamiento de la harina de trigo expendida en la ciudad de Tulcán	Factores que afectan al almacenamiento	% de cumplimiento de condiciones adecuadas de almacenamiento e higiene	Ficha de condiciones para un buen almacenamiento de harinas de trigo	(Guía de Almacenamiento seco refinado y congelado, 2018)
<b>Variable Dependiente</b> Inocuidad de la harina de trigo	Aislamiento de <i>Aspergillus flavus</i> , Identificación de <i>Aspergillus flavus</i> , cuantificación de aislados productores de micotoxinas.	<i>Aspergillus flavus</i>	Técnica de recuento en placa por siembra en profundidad, características macro-microscópicas y PCR	NTE INEN 1529-10
	Cuantificación de micotoxinas	Aflatoxina B1	Método Elisa	(Guerrero & Parreño, 2018)

### 3.4. MÉTODOS UTILIZADOS

Para la realización del siguiente trabajo experimental se tomó como población a los lugares expendedoras de harina de trigo ubicados en la parte norte, centro y sur de la ciudad de Tulcán, el número de la población es de 40 establecimientos que comprenden las siguientes calles: calle Sucre, Calderón, Atahualpa, Tarqui y la avenida Coral. Sitios donde se obtuvo como número de muestras 20 locales expendedores de harina de trigo siendo estos los locales que menos cumplen con las condiciones de almacenamiento.

La norma INEN 617 (1981) establece que para el muestro de harina envasada en sacos la muestra significativa debe ser de 500g hasta 10 sacos y de 1kg para más de 10 sacos por cada saco se debe tomar una muestra elemental y el número de a muestrear está especificado en la tabla 4.

**Tabla 4.** Número de envases o sacos a muestrear

Tamaño del lote (N)	Número de envases a muestrear (n)
1 – 3	Todos
4 - 9	3
10 – 25	4
26 - 50	5
Más de 50	n=N

**Fuente:** (INEN 617, 1981)

Las muestras de cada local se realizaron por triplicado en los laboratorios de análisis de alimentos y microbiológicos de la Universidad Politécnica Estatal Del Carchi.

#### 3.4.1. Métodos para la cuantificación de *Aspergillus flavus* y aflatoxina B1

##### 3.4.1.1. Siembra en Superficie

###### 3.4.1.1.1. Preparación de Agar (Dextrosa y Papa, PDA)

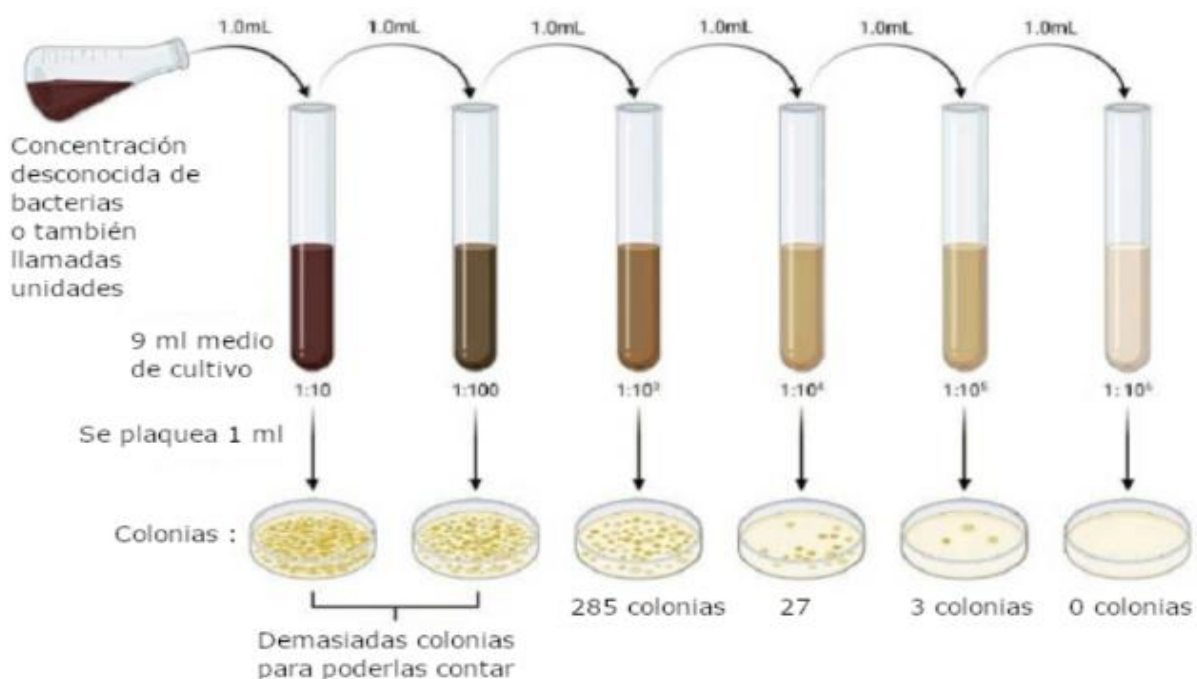
Primero se debe rehidratar 39 g del medio PDA en un litro de agua destilada. Dejar reposar de 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para disolverlo por completo. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 lb de presión) durante 15 minutos. Enfriar aproximadamente a 45°C.

###### 3.4.1.1.2. Diluciones

###### Procedimiento

Al tener la muestra de 1,5 lb se pesa 10 g para añadir a una funda ziploc, luego se añade 90 ml de agua peptona y se lleva a stomacher para homogenizar la dilución

(muestra madre equivalente  $10^{-1}$ ). Se procede a realizar diluciones seriada para ejecutar el conteo de unidades formadoras de colonias. Primero se debe tomar con la micro pipeta 1000  $\mu$ l de la muestra madre y transferir al primer tubo que contiene 9ml de solución salina estéril esta da lugar a la dilución  $10^{-2}$ , luego se homogeniza la suspensión con vortex durante 15 segundos, tomar nuevamente una punta y transferir 1000  $\mu$ l al siguiente tubo de dilución que sería la dilución  $10^{-3}$  repetir el paso anterior hasta obtener la dilución  $10^{-6}$ . Marcar las cajas Petri de agar PDA de recuento por triplicado para cada muestra con la dilución correspondiente.



**Figura 7.** Procedimiento a seguir en las diluciones sucesivas  
**Fuente:** (Sanz, 2018)

### 3.4.1.1.3. Siembra en superficie para aislamiento o recuento

La siembra en superficie se realiza vertiendo sobre una placa Petri 20 ml de agar PDA (agar Papa Dextrosa) que ha sido previamente marcada con el factor de dilución correspondiente. Con un asa de siembra de drigalsky se procede a homogenizar la muestra sobre la superficie del medio en diferentes direcciones. Se incuban las cajas Petri de 3 a 5 días hasta observar crecimiento a una temperatura de 25 °C, al finalizar el tiempo de incubación se realiza un conteo de colonias, y se identifica al hongo *Aspergillus flavus* de un color verde-amarillento con una textura pulverulenta con surcos radiales, rugosas o granulosas. Cada colonia representa a una unidad formadora de colonia mixta (Sanz, 2018).



Se realiza el siguiente cálculo para obtener Unidades Formadoras de Colonias por gramo (UFC/g) de acuerdo a la norma NTE INEN 1529-10 (2013)

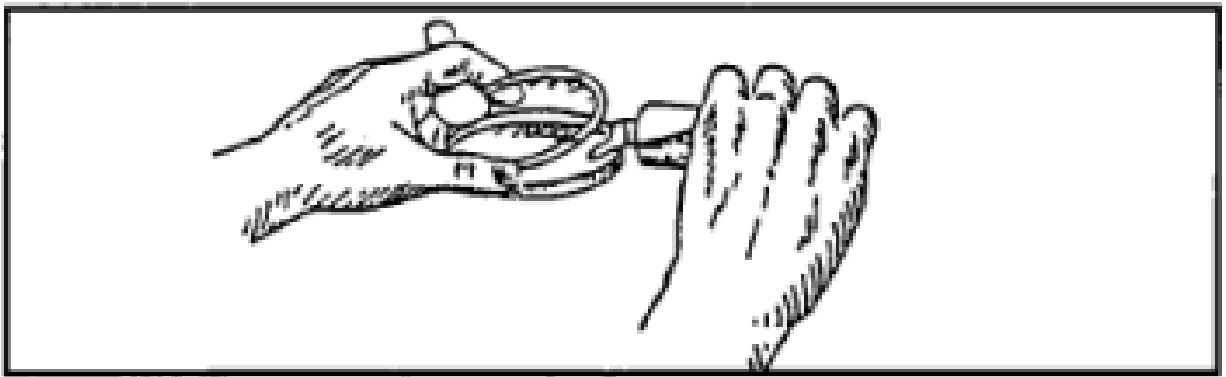
$$\text{UFC/g} = \frac{\text{número de colonias contadas} \times \text{factor decimal de dilución (FDD)}}{\text{volumen de siembra}}$$

a) Factor dilución (FD)

Título de la dilución inicial x Título diluciones sucesivas

b) Factor decimal de dilución (FDD) = 1/FD

Seleccionar las placas que estén en el rango entre 10 y 150 colonias, en el caso de mohos.



**Figura 8.** Siembra por aislamiento o recuento  
**Fuente:** (Sanz, 2018)

#### 3.4.1.2. Cultivo monospórico

Para poder realizar el cultivo monospórico se debe aislar el hongo presuntivo de *Aspergillus flavus* (colonias de color verde-amarillento con bordes blancos), en la dilución correspondiente. Con la ayuda del mechero y de un asa estéril se aísla el hongo colocándolo inmediatamente en una nueva caja Petri con agar PDA, con la finalidad de tener un solo hongo (*Aspergillus flavus*), se lleva a incubar a 25 °C durante tres días para luego proceder con el cultivo monospórico.

1. Preparar Tween 20 al 0,1%.

- Hacer una solución pura en un balón aforado colocando 1 ml de solución Tween 20 y aforando con agua destilada. Se tiene una primera solución concentrada.
- Se coge 10 ml de la solución concentrada y se añade a otro balón aforándolo con agua destilada.

- Se coloca la solución al 0,1% en matraces y se lleva a autoclavar (121°C a 15 min).
2. Hacer una suspensión de esporas, en un tubo de ensayo con 10 ml de la solución tween al 0,1 % añadir una cantidad pequeña del hongo (placas aisladas) y llevar al vortex durante 15 segundo para separar las esporas.
  3. Con la ayuda de una micropipeta cargar la suspensión específica en una cámara de Neubauer y hacer el conteo del número de esporas bajo el microscopio de visión plana.
  4. Una vez obtenido el número de esporas, se hace una segunda suspensión con ayuda de un programa matemático, donde se calcula la cantidad en ml o ul que se debe colocar de la primera suspensión para añadir a la segunda, que contiene 10 ml de la solución Tween 20 al 0,1%, agitar en vortex.
  5. Cultivar en 4 puntos específicos la concentración requerida en una placa con medio PDA.
  6. Incubar a 25°C y observar el siguiente día el crecimiento de hifas en el microscopio.
  7. Aislar las hifas con un asa de siembra estéril y ubicarlas en otra placa con PDA (por lo menos cuatro placas) con el fin de que la colonia que se quiera separar sea pura.

#### 3.4.1.3. Características microscópicas y macroscópicas

Para poder describir el hongo a través de una observación microscópica de la estructura, es necesario hacer una tinción o coloración, siguiendo el procedimiento a continuación:

1. Cultivar el hongo en una caja utilizando el medio de cultivo MEA, con la ayuda de un bisturí y una aza se coloca un pedazo del agar encima de un portaobjetos, debajo se encuentra un pedazo de gasa para luego añadir agua destilada, el hongo en sus días de incubación debe tener humedad para que crezca en las mejores condiciones, por último, con ayuda de una aza se siembra el hongo en el centro en forma de zic zac y en los bordes, se coge de los microtubos donde se estaba conservando y cubrimos con un cubreobjetos.
2. Esperar el crecimiento durante 5 días.
3. Se coge el cubreobjetos de la placa donde se cultivó el hongo y se lleva a un portaobjetos en el cual se le añade dos gotas de azul de metileno y se observa

en el microscopio con los lentes objetivos de 40x y 100x. Con el microscopio se puede tomar fotos a la estructura morfológica del hongo.

4. Si las estructuras son muy pequeñas, utilizar aceite de inmersión para observar en el lente de 100x.
5. Medir el diámetro y la longitud del hongo que se está estudiando.

Este método permite examinar mediante un microscopio la estructura del hongo *A. flavus*, como sus conidióforos, vesículas, métulas, fiálides y conidios (Matomé, Murage, & King, 2021).

Para las características macroscópicas se va a determinar el crecimiento de colonias, el color, la textura de las colonias los bordes y la presencia de exudados y esclerocios, se examina en diferentes medios como son: MEA (agar extracto de malta), CYA (agar autolisado de levadura Czapek), YES (agar sacarosa con extracto de levadura) y CREA (agar creatina sacarosa) que permite identificar si el hongo produce ácido a 25 °C durante 7. Se debe medir los diámetros de colonias macroscópicas en milímetros desde el reverso.

Los aislados de monosporas se sembraron en agar de coco estéril y se incubaron en la oscuridad (30°C, 5-7 días). Luego, se agregó hidróxido de amonio al 25% (200 µl; J.T. Baker, México) a la tapa de las cajas de Petri y se observó la distribución e intensidad del color. La presencia de color rosado a rojo intenso se consideró un indicador de formación de AF.

#### 3.4.1.4. Identificación de especies de *Aspergillus flavus* mediante el análisis molecular PCR

Según MP mpbio (2020) detalla que:

- Para la extracción del ADN se usa el Microkit de ADN FastDNA® SPIN kit. Se recolecta el micelio fresco de cada aislado
- a través de filtración con gasas a partir del cultivo puro PDA y se seca con papel filtro.
- El micelio filtrado, pesado se tritura (manualmente con mortero más perlas de acero).
- Se pesa entre 100-200 mg de micelio fresco de cada muestra y se coloca en un tubo Lisina Matrix A, o 200 µl de células suspendidas en agua o solución

salina isotónica; se añade 1000 µl de la sustancia CLS-Y y se lleva al vortex por 5 min.

- Luego se lleva a la centrifuga a una revolución de 13000 rpm por 5 a 10 minutos para sedimentar los desechos.
- Se toma 800 µl del sobrenadante y se pasa a los tubos eppendorf de 2 ml colocando también 800 µl de Brindig Martix en los mismos. Invertir para mezclar.
- Llevar los tubos a la agitadora a 200 rpm durante 5 min.
- Tomar 800 µl de la muestra y pasar a tubos con columna, llevar a centrifugar a 13000rpm por 3 min. Botar el sobrenadante.
- Se toma lo que sobra de los tubos eppendorf y se vuelve a pasar a los tubos de columna, se lleva nuevamente a la centrifugadora por 13000 rpm durante 3 min. Dejar los tubos de columna limpios para agregar 500 µl de SEWS-M y llevar a centrifugar por 5 min a una revolución 13000 rpm, verificar que baje todo el sobrenadante para botarlos.
- Tomar la columna y pasar a un nuevo tubo. Se agrega 100 µl de DES y se lleva a baño María a 55 °C por 7 min.
- Sacar y llevar a centrifugar a 13000 rpm por 2 min para llevar el ADN diluido al tubo colector limpio.
- Una vez centrifugado se bota la columna de los tubos obteniendo el ADN. Ahora está listo para aplicaciones posteriores. Almacenar a -20°C durante periodos prolongados o a 4°C durante un máximo de una semana.
- Para cuantificar el ADN en el equipo de electroforesis, se calibra previamente utilizando 2 µl de DES. Para el análisis del ADN se utiliza 2 µl de cada muestra.
- Los valores obtenidos de la calidad de ADN a partir de sus absorbancias por espectrofotometría en NanoDrop se observa en medida de concentración en ng µl<sup>-1</sup> en relación a las absorbancias A260 nm, A280 nm, 260/280 nm y 260/230 nm.
- Preparación de las muestras
  - 1) Se realizan diluciones del ADN obtenido.

Ejemplo M1A1: datos obtenidos por espectrofotómetro de microvolúmenes NanoDrop es 93,251 µg/ml – 1,5 µl

$$C_i V_i = C_f V_f$$

$C_i$  = concentración inicial: 93,251 µg/ml

$V_i$  = volumen inicial

$C_f$  = concentración final: 10 µl

$V_f$  = volumen final: 50 µl

$$V_i = \frac{10 \mu\text{l} \times 50 \mu\text{l}}{93,251 \mu\text{g/ml}} = 9,93 \mu\text{l}$$

Para obtener una concentración de 100µl, en un tubo eppendorf se agrega 9,93µl de ADN concentrado y 90,07 µl de agua libre de nucleasas.

2) Preparación de micro tubos para llevar al Termociclador

**Tabla 5.** Esquema del contenido de los tubos para el análisis de ADN

Cebadores ITS1- ITS4					
N muestras	Praimer 1 ITS1	Praimer 2 ITS4	MasterMix	ADN	Agua libre de nucleasas
20	2,5 µl	2,5 µl	25 µl	3 µl	17 µl
Cebadores Bt2a - Bt2b					
N muestras	Praimer 1 Bt2a	Praimer 2 Bt2b	MasterMix	ADN	Agua libre de nucleasas
20	2,5 µl	2,5 µl	25 µl	3 µl	17 µl

$$\text{Praimer 1} = 2,5 \mu\text{l} \times 22 = 55 \mu\text{l}$$

$$\text{Praimer 2} = 2,5 \mu\text{l} \times 22 = 55 \mu\text{l}$$

$$\text{MasterMix} = 25 \mu\text{l} \times 22 = \mu\text{l}$$

$$\text{ADN} = 3 \mu\text{l}$$

$$\text{Agua} = 17 \mu\text{l}$$

Volumen final de 50 µl

Se prepara un tubo Eppendorf con 55 µl del praimer ITS1 y ITS4, 550 µl de MasterMix y 374 µl de agua libre de nucleasas; de igual forma se toma otro tubo eppendorf para los cebadores Bt2a - Bt2b. Posteriormente se toma 21 tubos para PCR, en cada tubo se coloca 47 µl de la preparación y 3 µl de ADN en los 20 micro tubos, debido a que el primer tubo va a ser el control. La amplificación del ADN se realizó en el equipo de amplificación termociclador MultiGene™.

#### 3.4.1.5. Espaciador transcrito interno (ITS)

La identificación molecular se realizó siguiendo la metodología de Palacio (2018), donde se utilizó la región ITS usando los cebadores ITS1/ITS4 los cuales tienen la siguiente secuencia (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') y (5'-TCCTCCGCTTATTGATATG-3') respectivamente.

Para la reacción de amplificación se usará 25 ng de ADN fúngico, 5 µL de Buffer 10x, 5 µL de MgCl (25 mM), 1 µL de cada cebador (20mM), 4 µL de dNTP (2,5 mM) y 0,3 µL de Taq polimerasa Thermo Scientific® (5 U/µL) en un volumen final de 50 µL

#### 3.4.1.6. Electroforesis en gel de agarosa

Después del proceso de amplificación por PCR, los amplicones se analizaron mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1%. Para preparar el gel se agrega 5000 µl de TBE 10X Buffer molecular Biology Grade en una probeta de 50ml y completa con agua destilada hasta los 50ml. Colocar la solución en un matraz de 100ml, posteriormente pesar 0,75g de agarosa y añadir a la solución. Llevar la mezcla a una estufa, remover bien y mantener en la estufa hasta que el líquido comience a hervir. Por último, se deja enfriar para adicionar 4 µl de SafeView. Se usa el equipo de electroforesis para la amplificación de ADN a las siguientes condiciones: 40 minutos, voltaje de 90 y corriente de 400. Se toma fotografías del gel, después de analizar los productos de PCR, se envían para secuenciación comercial (Rangel, Valdivia, & Luna, 2020)

#### 3.4.1.7. Análisis de secuencias

Se analizaron secuencias de dos regiones. Las secuencias se alinearon y compararon con las secuencias de la base de datos utilizando el programa Homology and Local Alignment Search Tool (BLAST). Las secuencias se procesaron con el programa Geneious Prime en el que la secuencia de consenso para cada secuencia de PCR se hizo a partir del mismo aislado fúngico y molécula. Todas las secuencias de conjuntos de cebadores individuales se analizaron y compararon con BLASTn para la homología (Alvarado, 2021)

#### 3.4.1.8. Análisis filogenético

Se usó neighbor joining para desarrollar árboles filogenéticos de secuencias de consenso usando el método estadístico de máxima verosimilitud de todas las secuencias alineadas con MUSCLE usando el programa MEGA X, usando parámetros

de los modelos Tamura-Nei, Kimura-2, Tamura-3 parámetros (dependiendo del mejor modelo analizado por MEGA X), y un método de arranque (un método estadístico que genera una gran cantidad de pseudo-réplicas de alineación inicial) con 1000 repeticiones para probar la probabilidad máxima de todas las ramas (clados) producidas.

De acuerdo a Lozano, Morales, & Martínez (2021) indican que, las especies del género *Aspergillus* presentan una gran diversidad y variabilidad en la naturaleza. Su clasificación y/o identificación tradicional está basada principalmente en las características morfológicas. Los estudios comparativos de secuencias de nucleótidos de genes de DNA ribosomal (rDNA) pueden ser utilizados para análisis de relaciones filogenéticas y/o identificación de especie o subespecie de hongos. Se utilizaron análisis de restricción de regiones de rDNA, incluyendo las regiones ITS1-5. 8-ITS2, con fin de elucidar relaciones filogenéticas para identificación de especies de algunas especies de *Aspergillus*.

3.4.1.9. Método de inmunoensayo enzimático competitivo directo (ELISA) para el análisis cuantitativo de aflatoxina B1 (Veratox For Aflatoxin)

Procedimiento para prueba cuantitativa para aflatoxinas ELISA.

Antes del proceso de extracción, la muestra debe molerse y mezclarse completamente. Almacene las muestras entre 2 °C y 8 °C (35 °F a 46 °F) hasta el análisis.

1. Para cada muestra a analizar, prepare alcohol metílico al 70% mezclando 7 partes de metanol grado ACS y 3 partes de agua desionizada o destilada.

2. Mezclar 25 g de la muestra molida con 125 ml de metanol al 70 % en una batidora de alta velocidad durante 2 minutos. Método alternativo: Añadir 5 g de muestra molida a 25 ml de metanol al 70 % y agitar vigorosamente durante 3 minutos.

4. Vierta al menos 5-15 ml en un filtro Whatman #1 (o jeringa de filtración Neogen), filtre el extracto y recoja el filtrado como muestra.

5. Para cada muestra que se va a analizar, retire un pocillo mezclado marcado en rojo más cuatro pocillos de control marcados en rojo y colóquelos en el portapocillos.

6. Tomar igual número de pocillos recubiertos con anticuerpos. Guarde Inmediatamente los pocillos no utilizados. Para proteger los anticuerpos, enrolle los

bordes del sobre y s ello con cinta adhesiva. Marque un extremo de la tira con un "1" y coloque la tira en el portaocillos con el extremo marcado a la izquierda.

7. Mezcle cada reactivo moviendo suavemente el recipiente con un movimiento circular antes de usarlo.

8. Agregue 100 ml de conjugado de la botella con etiqueta azul a cada pocillo de mezcla marcado con rojo.

9. Usando una punta nueva, transfiera 100 mL de control y muestra a los pocillos de mezcla marcados con rojo.

10. Usando una pipeta de 12 canales, mezcle los pocillos pipeteando el líquido hacia arriba y hacia abajo tres veces. Transfiera 100 ml a los pocillos de anticuerpos. Mezcle moviendo el soporte de microplacas hacia adelante y hacia atrás sobre una superficie plana durante 10 a 20 segundos para evitar salpicaduras de reactivos en los pocillos. Incubar durante 2 minutos a temperatura ambiente, 18–30  C (64–86  F). Deseche el recipiente de mezcla marcado en rojo.

11. lene y vacíe cada pozo de anticuerpo con agua desionizada o destilada, repita este paso 5 veces. Luego de vuelta a los pozos sobre una toalla de papel y golp elos hasta verter toda el agua restante.

12. Pipetee la cantidad requerida de sustrato en la cubeta de reactivo con etiqueta verde y use una punta nueva para pipetear 100 ml de sustrato en el pocillo y colóquelo sobre una superficie plana. Mezcle moviéndose hacia adelante y hacia atrás de 10-20 segundos. Incubar durante 3 minutos, desechar cualquier sustrato restante y enjuagar la celda de reactivo con agua.

13. Pipetear la solución detenedora roja (del frasco de etiqueta roja, el mismo volumen preparado para el sustrato) en la cubeta de reactivos de etiqueta roja. Usando la misma punta de pipeta utilizada para dispensar el sustrato, agregue 100 mL de reactivo de tapón rojo a cada pocillo y mezcle moviéndolo hacia adelante y hacia atrás sobre una superficie plana. Descarte las puntas (Coello, 2019).

### 3.4.2. Materiales

#### 3.4.2.1. Diluciones

- Erlenmeyer
- Agar PDA (papa dextrosa) comprar 3



- Micro pipeta de 1 ml
- Tubos de ensayo
- Vortex
- Asa de siembra
- Placas Petri
- Agar ASD (agar Sabouraud dextrosado)
- Incubadora

#### 3.4.3. Cultivo monospórico

- Extracto de levadura al 0,2%
- Solución de Tween
- Agua destilada
- Autoclave
- Eppendorf
- Cámara de Neubauer
- Microscopio de visión plana
- Espátula de Drigalski
- Bisturí estéril

#### 3.4.4. Identificación de especies de *Aspergillus flavus* mediante el análisis molecular PCR

- FastDNA® SPIN kit
- Papel filtro
- Tubo de Eppendorf de 2 ml 1 caja
- Vórtex
- lisis TES
- Proteinasa K
- Cloroformo
- Alcohol isoamílico
- Centrifugadora
- Acetato de amonio
- Isopropanol
- Etanol
- Cámara de flujo laminar.
- Equipo NanoDrop (Thermo Scientific™)

- Espectrofotometro

#### 3.4.5. Amplificación para PCR

- Cebadores ITS- B-tubulina buscar las secuencias
- GoTaq® Master Mix (2X) 3 de 50 preparaciones
- Agua grado biología molecular 1/2 litro
- Termociclador MultiGene™.

#### 3.4.6. Método de Elisa

- Veratox For Aflatoxin
- Metanol grado analítico ACS
- Agua destilada
- micropocillos
- Filtro Whatman N°1
- Pipeta de 8 canales
- Anticuerpos
- Tampón de ensayo
- Tuallas absorbentes
- Columnas de inmuno absorción
- Puntas de 100 µl , 10 µl y 1000 una funda cada una

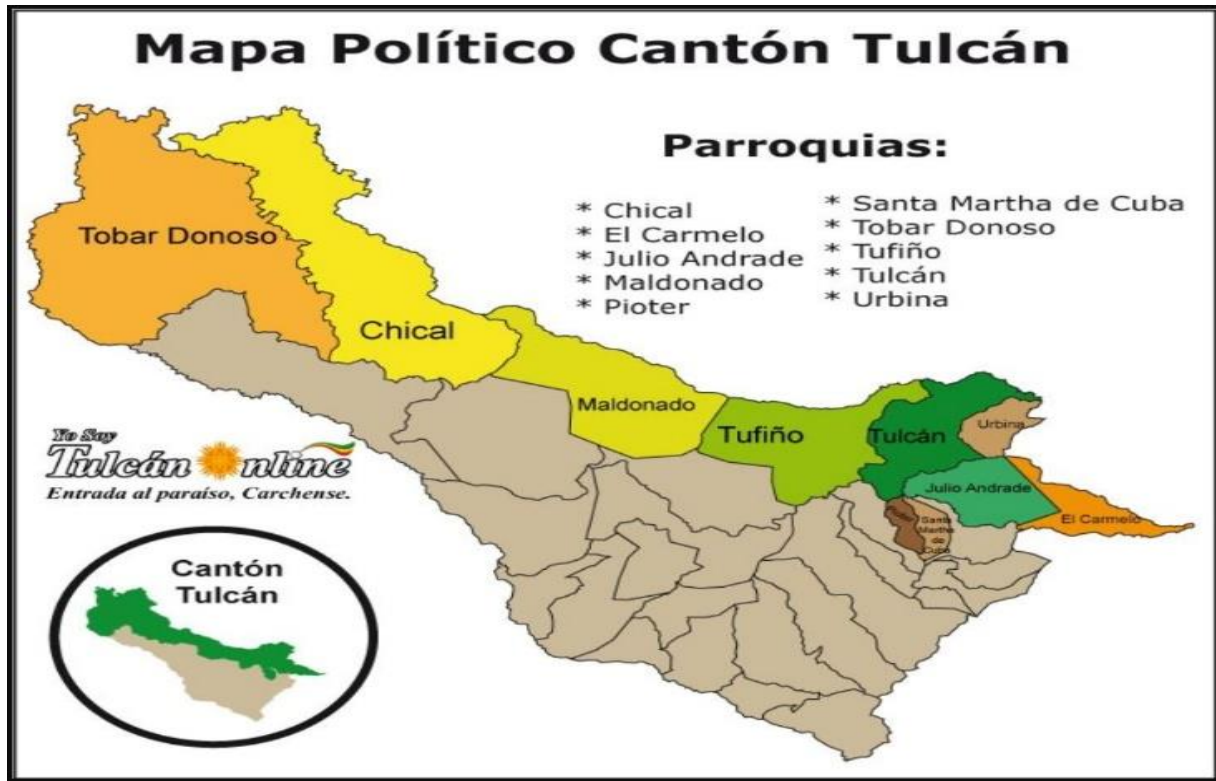
### **3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

#### 3.5.1. Población y muestra

El cantón Tulcán cuenta con una extensión territorial de 1817, 82 km, representando el 0,71 % del área total del Ecuador equivalente a 256369,6 km<sup>2</sup>; y el 48,48% del área total de la provincia del Carchi correspondiente 3749, 7 km<sup>2</sup>.

El Cantón Tulcán se integra de la cabecera cantonal con sus dos parroquias urbanas Tulcán y González Suárez; y, nueve parroquias rurales: El Carmelo, Julio Andrade, Maldonado, Pioter, Tobar Donoso, Tufiño, Urbina, El Chical y Santa Martha de Cuba.

La recolección de las muestras se llevará a cabo en la zona urbana de la ciudad de Tulcán, correspondientes a las parroquias Tulcán y González Suárez, sectores donde se encuentran los locales expendedores de harinas de trigo.



**Figura 9.** Mapa Político Cantón Tulcán  
**Fuente:** Varas (2008)

#### 3.5.1.1. Población

La población está constituida por 40 establecimientos expendedores de harina de trigo en la ciudad de Tulcán ubicadas en las parroquias Tulcán (norte) y González Suárez (sur). Esta información se recolectó gracias a las autoridades municipales de la ciudad.

#### 3.5.1.2. Selección de la muestra

##### 3.5.1.2.1. Muestreo Discrecional

Dentro del campo de estudio se utiliza el método de muestreo discrecional.

En el muestreo discrecional, la muestra fue seleccionada a criterio del investigador en base a las condiciones más idóneas para la realización del estudio (Querembás, 2022). Así, a partir de los datos recolectados en la etapa de diagnóstico preliminar, es posible observar y determinar las condiciones que se dan en los establecimientos de venta de harina de trigo en la ciudad de Tulcán, sabiendo que uno de ellos tendrá

errores e inconsistencias y en las condiciones higiénicas, así como en la observación de las adecuadas prácticas de higiene y manipulación de los alimentos durante el almacenamiento y conservación, esto se debe al desconocimiento del personal de servicio; se podrá escoger los locales a estudiar que contengan el mayor porcentaje de incumplimiento de las 11 condiciones planteadas y así de cada lugar sacar una muestra significativa para el respectivo análisis microbiológico.

### 3.5.1.2.2. Selección de la muestra de acuerdo a condiciones de almacenamiento

A continuación, en la tabla 6 se da a conocer las condiciones de un buen almacenamiento según la guía de almacenamiento seco, refrigerado y congelado realizada por el Proceso Bienestar Estudiantil de la Universidad Industrial de Santander.

**Tabla 6.** Condiciones de almacenamiento de harinas de trigo

	<b>Condiciones</b>
<b>Instalaciones del área</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Mantener la bodega de almacenamiento limpia, seca y ordenada.</li> <li>-Poner mallas en las ventanas para impedir el acceso de roedores e insectos.</li> <li>- Colocar la harina sobre pales, nunca directamente sobre el piso, ya que absorbe humedad. Si la harina se humedece se forman grumos (pelotas) que facilitan la formación de hongos (moho).</li> <li>- Colocar los sacos de harina a 1mt. de distancia de las paredes para facilitar la limpieza diaria y el control de plagas.</li> <li>- Cereales empacados en sacos como (arroz, harinas), azúcar, leguminosas, deben apilarse en forma cruz sobre la plataforma, esto para que permita la circulación de aire por debajo.</li> <li>- Ubicar no más de ocho sacos por arrume.</li> </ul>
<b>Personal manipulador</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Los manipuladores de alimentos no se lavan adecuadamente las manos cuando manejan dinero o cambian de actividad.</li> </ul>
<b>Utensilios y materiales</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Los empaques no deben estar húmedos, mohosos o rotos.</li> <li>- No se deben usar productos de limpieza o desinfección cuyos aromas puedan contaminar la harina. Se recomienda cloro para esta labor.</li> <li>- Colocar los recipientes para basura fuera de la bodega donde está la harina y taparlos.</li> <li>- Que el utensilio para el pesaje de harina solo sea de uso del mismo.</li> </ul>

**Fuente:** (Guía de Almacenamiento seco refinado y congelado, 2018)

## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.1. RESULTADOS**

La Tabla 7 muestra el porcentaje de incumplimiento de las 11 condiciones de almacenamiento de la harina de trigo, el cumplimiento se marca con una C y el incumplimiento con una I, el porcentaje se basa en el 100% de incumplimiento.

Una vez realizado el análisis se encontró que 20 de los 40 lugares expendedores de harina de trigo presentaron más altos porcentajes de incumplimiento.

**Tabla 7.** Porcentaje de incumplimiento de las 20 condiciones evaluados a los 40 lugares expendedores de harina de trigo de la ciudad de Tulcán para el desarrollo del análisis microbiológico.

Condiciones	Lugares que expenden harina de trigo en la ciudad de Tulcán																																									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40		
Mantener la bodega de almacenamiento limpia, seca y ordenada.	I	C	C	C	C	I	I	I	I	C	C	C	I	I	C	I	C	I	C	I	C	C	I	I	C	C	I	C	C	I	I	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
Poner mallas en las ventanas para impedir el acceso de roedores e insectos.	I	C	C	I	C	C	I	I	I	I	C	I	I	I	I	C	C	I	C	I	C	I	C	I	I	C	C	I	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	I	C	I
Colocar la harina sobre pales, nunca directamente sobre el piso, ya que absorbe humedad. Si la harina se humedece se forman grumos (pelotas) que facilitan la formación de hongos (moho).	I	C	C	C	C	C	I	C	I	C	C	I	I	I	C	C	C	I	C	I	I	C	C	I	C	I	C	C	C	C	C	C	C	C	C	I	C	C	C	C	I	C
Colocar los sacos de harina a 1mt. de distancia de las paredes para facilitar la limpieza diaria y el control de plagas.	I	I	C	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	C	I	I	I	I	I	I	C	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
Cereales empacados en sacos como (arroz, harinas), azúcar, leguminosas, deben apilarse en forma cruz sobre la plataforma, esto para que permita la circulación de aire por debajo.	C	C	C	I	I	C	C	C	C	C	C	I	I	C	I	C	I	I	C	I	C	C	C	I	I	C	C	I	C	C	I	I	C	C	C	C	I	I	C	C	C	C
Ubicar no más de ocho sacos por arume.	I	C	C	I	I	C	I	I	I	C	C	I	I	I	C	C	I	I	I	I	C	C	C	I	C	I	C	I	C	I	C	I	C	C	C	C	C	I	I	C	C	C
Los manipuladores de alimentos no se lavan adecuadamente las manos cuando manejan dinero o cambian de actividad.	I	I	C	I	I	C	I	C	I	C	I	I	I	I	C	I	I	I	C	I	C	C	C	I	I	I	I	I	C	C	C	I	C	C	C	C	I	I	C	C	C	
Los empaques no deben estar húmedos, mohosos o rotos.	C	C	C	C	I	C	C	C	C	C	C	C	I	C	C	C	C	C	I	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	I	C	C	C	I	I	C	C	I	
No se deben usar productos de limpieza o desinfección cuyos aromas puedan contaminar la harina. Se recomienda claro para esta labor.	C	C	C	I	I	C	C	C	C	I	C	I	C	C	C	C	I	C	C	C	C	C	I	C	I	C	C	I	I	C	C	I	I	C	C	I	I	C	C	I	I	C
Colocar los recipientes para basura fuera de la bodega donde está la harina y taparlos.	I	I	I	C	I	C	I	C	I	I	C	C	C	I	I	C	I	I	C	I	C	C	C	I	C	C	C	C	C	I	C	I	C	C	C	C	I	I	C	C	I	
Que el utensilio para el pesaje de harina solo sea de uso del mismo.	C	C	I	I	I	C	C	I	C	I	I	C	I	C	I	C	I	I	C	C	I	I	C	I	C	C	C	C	C	I	C	C	I	C	I	C	I	I	I	I	I	I
	64	27	18	64	73	18	64	45	64	45	27	73	82	64	45	27	55	82	18	82	27	27	19	82	45	36	27	55	27	36	27	73	18	36	18	73	27	36	27	45		

Las condiciones de almacenamiento que se evaluaron permitieron verificar la presencia de microorganismos en las harinas de trigo teniendo así 20 establecimientos con mayor porcentaje de incumplimiento de condiciones de almacenamiento. Esto conlleva a el planteo de un manual de buenas practicas de manejo de harinas.

En la tabla 8 se observa el recuento, el número de colonias presuntivas de *Aspergillus flavus* y los niveles máximos de aceptación de mohos en las 20 muestra de harina de trigo, se hizo el recuento de mohos en agar PDA, a los 5 días de la incubación se seleccionan las placas entre 10 y 150 colonias para calcular las unidades formadoras de colonias; el límite máximo de mohos en UFC/g es de 500. Se observa una aceptación del rango permitido por lo que es adecuada su consumo.

**Tabla 8.** Recuento en placas de hongos totales provenientes de harinas de trigo en UFC/g

N de muestras	Recuento de mohos totales (UFC/g)	N de colonias presuntivas (UFC/g)	Aceptación
M1	3,0 x 10 <sup>2</sup>	3	Aceptado
M2	3,6 x 10 <sup>2</sup>	0	Aceptado
M3	4,3 x 10 <sup>2</sup>	0	Aceptado
M4	2,6 x 10 <sup>2</sup>	0	Aceptado
M5	1,5 x 10 <sup>2</sup>	5	Aceptado
M6	2,6 x 10 <sup>2</sup>	0	Aceptado
M7	4,0 x 10 <sup>2</sup>	1	Aceptado
M8	3,3 x 10 <sup>2</sup>	0	Aceptado
M9	3,0 x 10 <sup>2</sup>	0	Aceptado
M10	2,0 x 10 <sup>2</sup>	0	Aceptado
M11	2,6 x 10 <sup>2</sup>	0	Aceptado
M12	3,6 x 10 <sup>2</sup>	0	Aceptado
M13	3,3 x 10 <sup>2</sup>	7	Aceptado
M14	2,3 x 10 <sup>2</sup>	4	Aceptado
M15	2,0 x 10 <sup>2</sup>	0	Aceptado
M16	4,6 x 10 <sup>2</sup>	0	Aceptado
M17	4,3 x 10 <sup>2</sup>	0	Aceptado
M18	1,5 x 10 <sup>2</sup>	0	Aceptado
M19	3,0 x 10 <sup>2</sup>	0	Aceptado
M20	2,6 x 10 <sup>2</sup>	0	Aceptado

En las tablas 9 a 18 se detallan las características macroscópicas de los veinte aislados presuntivos de *A. flavus* cultivados en cuatro agares distintos MEA, CYA, YES y CREA a 25°C por 7 días permitiendo observar rasgos distintivos como el color de la superficie, tamaño de la colonia, margen, color reverso, elevación, crecimiento, producción de aflatoxinas, esclerocios, textura y exudados; características macroscópicas que permiten identificar de mejor manera microorganismos de interés.

**Tabla 9.** Características macroscópicas y producción de aflatoxinas de colonias presuntivas de *Aspergillus flavus* de los aislados provenientes a la muestra 1 A1 y muestra 1 A2 en harina de trigo cultivado en medio MEA, CYA, YES y CREA a 25°C por 7 días.

Agar	MEA	CYA	YES	CREA
<b>Muestra</b>	<b>M1 A1</b>			
<b>Color de la superficie</b>	Bordes blancos, colonia verde amarillenta con un centro oliva	Color verde amarillento, micelio blanco	Bordes crema, colonia verdosa amarillenta con un centro verde oscuro	Producción de ácido en el agar. Colonia amarilla fosforescente, centro oliva.
<b>Tamaño de la colonia</b>	3,83 ± 4,16	5 ± 4,5	4,83 ± 6	3,06 ± 4,7
<b>Margen</b>	Filamentoso	Filamentoso	Filamentoso	Filamentoso
<b>Color reverso</b>	Naranja claro	Blanca	Verde amarillento	Verdoso fosforescente
<b>Elevación</b>	Umbunada	Umbunada	Umbunada	Plana
<b>Crecimiento</b>	Medio	Medio	Medio	Medio
<b>Producción de aflatoxina</b>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<b>Esclerocios</b>	—	—	—	—
<b>Textura</b>	Algodonosa	Algodonosa	Granulosa	Lisa con picos verdosos escasos
<b>Exudados</b>	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia
<b>Muestra</b>	<b>M1 A2</b>			
<b>Color de la superficie</b>	Bordes blancos, colonia verde oliva, centro blanco	Bordes crema, colonia verde amarillenta, cabeza verde oscura.	Bordes crema, colonia verdosa amarillenta con un centro verde oscuro	De color amarillo por la presencia de ácido
<b>Tamaño de la colonia</b>	4,1 ± 6,5	4,33 ± 4,86	4,2 ± 6,8	4,23 ± 4,6
<b>Margen</b>	Filamentoso	Filamentoso	Filamentoso	Filamentoso
<b>Color reverso</b>	Naranja	Marrón	Marrón	Amarillo fosforescente
<b>Elevación</b>	Umbunada	Umbunada	Umbunada	Plana
<b>Crecimiento</b>	Medio	Medio	Medio	Medio
<b>Producción de aflatoxina</b>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<b>Esclerocios</b>	—	—	—	—
<b>Textura</b>	Algodonosa	Algodonosa	Granulosa	Colonias planas
<b>Exudados</b>	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia



**Tabla 10.** Características macroscópicas y producción de aflatoxinas de colonias presuntivas de *Aspergillus flavus* los aislados provenientes a la muestra 1 A3 y muestra 5 A4 en harina de trigo cultivado en MEA, CYA, YES y CREA a 25°C por 7 días.

Agar	MEA	CYA	YES	CREA
<b>Muestra</b>	<b>M1 A3</b>			
<b>Color de la superficie</b>	Bordes blancos, colonia verde amarillenta con centro oliva	Color verde amarillento, micelio blanco	Bordes crema, colonia verdosa amarillenta con un centro verde oscuro	Producción de ácido en el agar. Colonia amarilla fosforescente con un centro oliva.
<b>Tamaño de la colonia</b>	3,4 ± 4,26	5,3 ± 4,9	4,13 ± 6,2	3,33 ± 4,75
<b>Margen</b>	Filamentoso	Filamentoso	Filamentoso	Filamentoso
<b>Color reverso</b>	Naranja claro	Blanca	Verde amarillento	Verdoso fosforescente
<b>Elevación</b>	Umbunada	Umbunada	Umbunada	Plana
<b>Crecimiento</b>	Medio	Medio	Medio	Medio
<b>Producción de aflatoxina</b>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<b>Esclerocios</b>	—	—	—	—
<b>Textura</b>	Algodonosa	Algodonosa	Granulosa	Flocoso
<b>Exudados</b>	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia
<b>Muestra</b>	<b>M5 A4</b>			
<b>Color de la superficie</b>	Bordes blancos, colonia verde oliva	Bordes crema, colonia verde amarillenta con una cabeza verde oscura.	Bordes crema, colonia verdosa amarillenta con un centro verde oscuro	De color amarillo por la presencia de ácido
<b>Tamaño de la colonia</b>	4,03 ± 5,46	4,1 ± 6	3,96 ± 6,66	3,13 ± 2,9
<b>Margen</b>	Filamentoso	Filamentoso	Filamentoso	Filamentoso
<b>Color reverso</b>	Naranja	Marrón	Marrón	Amarillo fosforescente
<b>Elevación</b>	Umbunada	Umbunada	Umbunada	Plana
<b>Crecimiento</b>	Medio	Medio	Medio	Medio
<b>Producción de aflatoxina</b>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<b>Esclerocios</b>	—	—	—	—
<b>Textura</b>	Algodonosa	Algodonosa	Granulosa	Flocoso
<b>Exudados</b>	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia

**Tabla 11.** Características macroscópicas y producción de aflatoxinas de colonias presuntivas de *Aspergillus flavus* aislados provenientes a la muestra 5 A5 y muestra5 A6 en harina de trigo cultivado en medio MEA, CYA, YES y CREA a 25°C por 7 días.

Agar	MEA	CYA	YES	CREA
<b>Muestra</b>	<b>M5 A5</b>			
<b>Color de la superficie</b>	Bordes blancos, colonia verde amarillenta con un centro oliva	Color verde amarillento, micelio blanco	Bordes crema, colonia verdosa amarillenta con un centro verde oscuro	Producción de ácido en el agar. Colonia amarilla fosforescente con un centro oliva.
<b>Tamaño de la colonia</b>	4,3 ± 5,3	4,7 ± 4,2	4,5 ± 6,7	4,44 ± 6,7
<b>Margen</b>	Filamentoso	Filamentoso	Filamentoso	Filamentoso
<b>Color reverso</b>	Naranja claro	Blanca	Verde amarillento	Verdoso fosforescente
<b>Elevación</b>	Umbunada	Umbunada	Umbunada	Plana
<b>Crecimiento</b>	Medio	Medio	Medio	Medio
<b>Producción de aflatoxina</b>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<b>Esclerocios</b>	—	—	—	—
<b>Textura</b>	Algodonosa	Algodonosa	Granulosa	Flocoso
<b>Exudados</b>	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia
<b>Muestra</b>	<b>M5 A6</b>			
<b>Color de la superficie</b>	Bordes blancos, colonia verde claro	Amarillo verdoso brillante con una base crema	Bordes crema, colonia verdosa amarillenta con un centro color crema	De color amarillo por la presencia de ácido y con un centro verde
<b>Tamaño de la colonia</b>	5,66 ± 3,9	6,6 ± 4,03	7,16 ± 4	3,7 ± 2,9
<b>Margen</b>	Filamentoso	Filamentoso	Filamentoso	Filamentoso
<b>Color reverso</b>	Marrón	Crema	Crema	Amarillo fosforescente
<b>Elevación</b>	Umbunada	Umbunada	Umbunada	Plana
<b>Crecimiento</b>	Medio	Medio	Medio	Medio
<b>Producción de aflatoxina</b>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<b>Esclerocios</b>	—	—	—	—
<b>Textura</b>	Algodonosa	Algodonosa	Granulosa	Flocoso
<b>Exudados</b>	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia

**Tabla 12.** Características macroscópicas y producción de aflatoxinas de colonias presuntivas de *Aspergillus flavus* aislados provenientes a la muestra 5 A7 y muestra 5 A8 en harina de trigo cultivado en medio MEA, CYA, YES y CREA a 25°C por 7 días.

Agar	MEA	CYA	YES	CREA
<b>Muestra</b>			<b>M5 A7</b>	
<b>Color de la superficie</b>	Crema y blanco en los bordes, verde oscuro en el centro.	Color verde amarillento, micelio blanco	Colonia verdosa con base crema	Producción de ácido en el agar. Colonia amarilla fosforescente con un centro oliva.
<b>Tamaño de la colonia</b>	5,63 ± 4	6,73 ± 3,97	7,17 ± 4	3,03 ± 2,37
<b>Margen</b>	Filamentoso	Filamentoso	Filamentoso	Filamentoso
<b>Color reverso</b>	Marrón	Crema	Crema	Verdoso fosforescente
<b>Elevación</b>	Umbilicada	Umbilicada	Umbilicada	Plana
<b>Crecimiento</b>	Medio	Medio	Medio	Medio
<b>Producción de aflatoxina</b>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<b>Esclerocios</b>	—	—	—	—
<b>Textura</b>	Algodonosa	Algodonosa	Granulosa	Flocoso
<b>Exudados</b>	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia
<b>Muestra</b>			<b>M5 A8</b>	
<b>Color de la superficie</b>	Borde blanco cremoso, cuerpo amarillo verdoso, centro verde oscuro.	Bordes crema, colonia verde amarillenta con una cabeza verde oscura.	Bordes crema, colonia verdosa amarillenta con un centro verde oscuro	De color amarillo por la presencia de ácido
<b>Tamaño de la colonia</b>	5,5 ± 4,07	7,3 ± 4,27	7,4 ± 4,33	3,27 ± 2,63
<b>Margen</b>	Filamentoso	Filamentoso	Filamentoso	Filamentoso
<b>Color reverso</b>	Marrón	Marrón	Marrón	Amarillo fosforescente
<b>Elevación</b>	Umbunada	Umbunada	Umbunada	Plana
<b>Crecimiento</b>	Medio	Medio	Medio	Medio
<b>Producción de aflatoxina</b>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<b>Esclerocios</b>	—	—	—	—
<b>Textura</b>	Algodonosa	Algodonosa	Granulosa	Flocoso
<b>Exudados</b>	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia

**Tabla 13.** Características macroscópicas y producción de aflatoxinas de colonias presuntivas de *Aspergillus flavus* aislados provenientes a la muestra 7 A9 y muestra 13 A10 en harina de trigo cultivado en medio MEA, CYA, YES y CREA a 25°C por 7 días.

Agar	MEA	CYA	YES	CREA
<b>Muestra</b>	<b>M7 A9</b>			
<b>Color de la superficie</b>	Bordes blancos cremosos, cuerpo verdoso. centro un verde oliva.	Colonia marrón con un centro oliva.	Colonia verdosa con base crema	Producción de ácido en el agar. Colonia amarilla fosforescente con un centro oliva.
<b>Tamaño de la colonia</b>	5,83 ± 3,43	6,67 ± 3,87	7,3 ± 4,06	2,77 ± 3,33
<b>Margen</b>	Filamentoso	Filamentoso	Filamentoso	Filamentoso
<b>Color reverso</b>	Naranja	Marrón	Marrón	Verdoso fosforescente
<b>Elevación</b>	Umbunada	Umbunada	Umbunada	Plana
<b>Crecimiento</b>	Medio	Medio	Medio	Medio
<b>Producción de aflatoxina</b>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<b>Esclerocios</b>	—	—	—	—
<b>Textura</b>	Algodonosa	Algodonosa	Granulosa	Flocoso
<b>Exudados</b>	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia
<b>Muestra</b>	<b>M13 A10</b>			
<b>Color de la superficie</b>	Borde blanco cremoso, cuerpo amarillo verdoso centro verde oscuro.	Colonia crem con un centro verde oscuro.	Colonia verdosa con un centro oliva.	Colonia fosforescente amarillo apagado con un centro oliva.
<b>Tamaño de la colonia</b>	5,5 ± 4,03	6,73 ± 4,03	7,3 ± 4,17	3,4 ± 2,8
<b>Margen</b>	Filamentoso	Filamentoso	Filamentoso	Filamentoso
<b>Color reverso</b>	Marrón	Marrón	Marrón	Amarillo fosforescente
<b>Elevación</b>	Algodonosa	Algodonosa	Umbunada	Plana
<b>Crecimiento</b>	Medio	Medio	Medio	Medio
<b>Producción de aflatoxina</b>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<b>Esclerocios</b>	—	—	—	—
<b>Textura</b>	Algodonosa	Algodonosa	Granulosa	Flocoso
<b>Exudados</b>	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia

**Tabla 14.** Características macroscópicas y producción de aflatoxinas de colonias presuntivas de *Aspergillus flavus* aislados provenientes a la muestra 13 A11 y muestra 13 A12 en harina de trigo cultivado en medio MEA, CYA, YES y CREA a 25°C por 7 días.

Agar	MEA	CYA	YES	CREA
<b>Muestra</b>			<b>M13 A11</b>	
<b>Color de la superficie</b>	Bordes blancos, colonia verde amarillenta con un centro oliva.	Colonia marrón con un centro oliva.	Colonia verdosa con base crema	Producción de ácido en el agar. Colonia amarilla fosforescente con un centro oliva.
<b>Tamaño de la colonia</b>	5,71 ± 4,09	6,67 ± 4,78	7,8 ± 4,5	2,22 ± 3,01
<b>Margen</b>	Filamentoso	Filamentoso	Filamentoso	Filamentoso
<b>Color reverso</b>	Naranja	Marrón	Marrón	Verdoso fosforescente
<b>Elevación</b>	Umbunada	Umbunada	Umbunada	Plana
<b>Crecimiento</b>	Medio	Medio	Medio	Medio
<b>Producción de aflatoxina</b>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<b>Esclerocios</b>	—	—	—	—
<b>Textura</b>	Algodonosa	Algodonosa	Granulosa	Flocoso
<b>Exudados</b>	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia
<b>Muestra</b>			<b>M13 A12</b>	
<b>Color de la superficie</b>	Bordes blancos, colonia verde amarillenta con un centro oliva	Bordes blancos, colonia verde claro con una cabeza blanca y un centro verde.	Bordes crema, colonia verdosa amarillenta	Colonia amarilla fosforescente con un centro oliva.
<b>Tamaño de la colonia</b>	4,67 ± 3,83	4,93 ± 4,1	6,83 ± 4,33	2,9 ± 2,7
<b>Margen</b>	Filamentoso	Filamentoso	Filamentoso	Filamentoso
<b>Color reverso</b>	Marrón	Crema	Verde amarillento	Verdoso fosforescente
<b>Elevación</b>	Umbunada	Umbunada	Umbunada	Plana
<b>Crecimiento</b>	Medio	Medio	Medio	Medio
<b>Producción de aflatoxina</b>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<b>Esclerocios</b>	—	—	—	—
<b>Textura</b>	Algodonosa	Algodonosa	Granulosa	Flocoso
<b>Exudados</b>	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia

**Tabla 15.** Características macroscópicas y producción de aflatoxinas de colonias presuntivas de *Aspergillus flavus* aislados provenientes a la muestra 13 A13 y muestra 13 A14 en harina de trigo cultivado en medio MEA, CYA, YES y CREA a 25°C por 7 días

Agar	MEA	CYA	YES	CREA
<b>Muestra</b>	<b>M13 A13</b>			
<b>Color de la superficie</b>	Bordes blancos, colonia verde amarillenta con un centro oliva	Bordes crema, colonia verde amarillenta con una cabeza verde oscura.	Bordes crema, colonia verdosa amarillenta con un centro verde oscuro	Colonia amarilla fosforescente con un centro oliva.
<b>Tamaño de la colonia</b>	4,46 ± 3,93	5,03 ± 3,73	5,53 ± 4	3,13 ± 3,06
<b>Margen</b>	Filamentoso	Filamentoso	Filamentoso	Filamentoso
<b>Color reverso</b>	Naranja	Marrón	Verde amarillento	Verdoso fosforescente
<b>Elevación</b>	Umbunada	Umbunada	Umbunada	Plana
<b>Crecimiento</b>	Medio	Medio	Medio	Medio
<b>Producción de aflatoxina</b>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<b>Esclerocios</b>	—	—	—	—
<b>Textura</b>	Algodonosa	Algodonosa	Granulosa	Flocoso
<b>Exudados</b>	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia
<b>Muestra</b>	<b>M13 A14</b>			
<b>Color de la superficie</b>	Bordes blancos, colonia verde amarillenta con un centro oliva	Bordes crema, colonia verde amarillenta con una cabeza verde oscura.	Bordes crema, colonia verdosa amarillenta con un centro verde oscuro	Colonia verde oliva
<b>Tamaño de la colonia</b>	4,43 ± 3,53	5,3 ± 3,9	5,46 ± 4,2	2,33 ± 2,33
<b>Margen</b>	Filamentoso	Filamentoso	Filamentoso	Filamentoso
<b>Color reverso</b>	Naranja	Marrón	Verde amarillento	Verdoso fosforescente
<b>Elevación</b>	Umbunada	Umbunada	Umbunada	Plana
<b>Crecimiento</b>	Medio	Medio	Medio	Medio
<b>Producción de aflatoxina</b>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<b>Esclerocios</b>	—	—	—	—
<b>Textura</b>	Algodonosa	Algodonosa	Granulosa	Flocoso
<b>Exudados</b>	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia

**Tabla 16.** Características macroscópicas y producción de aflatoxinas de colonias presuntivas de *Aspergillus flavus* aislados provenientes a la muestra 13 A15 y muestra 13 A16 en harina de trigo cultivado en medio MEA, CYA, YES y CREA a 25°C por 7 días.

Agar	MEA	CYA	YES	CREA
<b>Muestra</b>	<b>M13 A15</b>			
<b>Color de la superficie</b>	Bordes crema, colonia verde amarillenta con un centro oliva	Bordes crema, colonia verde amarillenta con una cabeza verde oscura.	Bordes crema, colonia verdosa amarillenta con un centro verde oscuro	Colonia amarillo fosforescente con un centro oliva.
<b>Tamaño de la colonia</b>	5,46 ± 4,06	5,3 ± 4	6,96 ± 4,1	2,7 ± 3,5
<b>Margen</b>	Filamentoso	Filamentoso	Filamentoso	Filamentoso
<b>Color reverso</b>	Naranja	Marrón	Crema	Verdoso fosforescente
<b>Elevación</b>	Umbunada	Umbunada	Umbunada	Plana
<b>Crecimiento</b>	Medio	Medio	Medio	Medio
<b>Producción de aflatoxina</b>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<b>Esclerocios</b>	—	—	—	—
<b>Textura</b>	Algodonosa	Algodonosa	Granulosa	Flocoso
<b>Exudados</b>	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia
<b>Muestra</b>	<b>M13 A16</b>			
<b>Color de la superficie</b>	Borde verde con centro verde-amarillento	Bordes crema, colonia verde amarillenta, centro blanco.	Bordes verdes claro, colonia verdosa amarillenta, centro blanco	Borde amarillo fosforescente, centro blanco.
<b>Tamaño de la colonia</b>	6,63 ± 4,03	6,7 ± 4,1	6,76 ± 4	5,33 ± 3,73
<b>Margen</b>	Redondeado	Redondeado	Lobulado	Filamentoso
<b>Color reverso</b>	Naranja	Verde claro	Marrón	Amarillo fosforescente
<b>Elevación</b>	Umbunado	Plano	Plano	Plano
<b>Crecimiento</b>	Medio	Medio	Medio	Medio
<b>Producción de aflatoxina</b>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<b>Esclerocios</b>	+	+	—	—
<b>Textura</b>	Algodonosa	Algodonosa	Granulosa	Flocoso
<b>Exudados</b>	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia

**Tabla 17.** Características macroscópicas y producción de aflatoxinas de colonias presuntivas de *Aspergillus flavus* aislados proveniente a la muestra 14 A17 y muestra 14 A18 en harina de trigo cultivado en medio MEA, CYA, YES y CREA a 25°C por 7 días.

Agar	MEA	CYA	YES	CREA
<b>Muestra</b>			<b>M14 A17</b>	
<b>Color de la superficie</b>	Borde blanco, colonia verde oliva, centro blanco	Borde blanco, colonia verde amarillenta, centro verde oscuro.	Bordes crema, colonia verdosa, centro verde claro	Colonia amarillo fosforescente, centro blanco.
<b>Tamaño de la colonia</b>	6,53 ± 3,8	5,9 ± 3,83	6,93 ± 4,3	4,16 ± 3,2
<b>Margen</b>	Redondeado	Filamentoso	Filamentoso	Filamentoso
<b>Color reverso</b>	Naranja	Crema	Marrón	Amarillo fosforescente
<b>Elevación</b>	Umbunada	Umbunada	Umbunada	Plana
<b>Crecimiento</b>	Medio	Medio	Medio	Medio
<b>Producción de aflatoxina</b>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<b>Esclerocios</b>	—	—	—	—
<b>Textura</b>	Granulosa	Granulosa	Granulosa	Flocoso
<b>Exudados</b>	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia
<b>Muestra</b>			<b>M14 A18</b>	
<b>Color de la superficie</b>	Borde crema, colonia verde oliva, centro verde	Borde crema, colonia verde claro, centro verde oscuro.	Bordes crema, colonia verde oliva, centro verde claro	Colonia amarillo fosforescente, centro blanco.
<b>Tamaño de la colonia</b>	6,13 ± 3,96	5,83 ± 3,7	6,86 ± 3,96	3,16 ± 2,56
<b>Margen</b>	Redondeado	Filamentoso	Filamentoso	Filamentoso
<b>Color reverso</b>	Naranja	Crema	Marrón	Amarillo fosforescente
<b>Elevación</b>	Umbunada	Umbunada	Umbunada	Plana
<b>Crecimiento</b>	Medio	Medio	Medio	Medio
<b>Producción de aflatoxina</b>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<b>Esclerocios</b>	—	—	—	—
<b>Textura</b>	Algodonosa	Algodonosa	Granulosa	Flocoso
<b>Exudados</b>	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia



**Tabla 18.** Características macroscópicas y producción de aflatoxinas de colonias presuntivas de *Aspergillus flavus* aislados proveniente a la muestra 14 A19 y muestra 14 A20 en harina de trigo cultivado en medio MEA, CYA, YES y CREA a 25°C por 7 días.

Agar	MEA	CYA	YES	CREA
<b>Muestra</b>	<b>M14 A19</b>			
<b>Color de la superficie</b>	Borde crema, colonia verde oliva, centro verde	Borde crema, colonia verde claro, centro verde oscuro.	Bordes crema, colonia verde oliva, centro verde claro	Colonia amarillo fosforescente, centro blanco.
<b>Tamaño de la colonia</b>	5,9 ± 3,83	5,9 ± 3,66	6,7 ± 4,03	3,6 ± 2,86
<b>Margen</b>	Redondeado	Filamentoso	Filamentoso	Filamentoso
<b>Color reverso</b>	Naranja	Crema	Marrón	Amarillo fosforescente
<b>Elevación</b>	Umbunada	Umbunada	Umbunada	Plana
<b>Crecimiento</b>	Medio	Medio	Medio	Medio
<b>Producción de aflatoxina</b>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<b>Esclerocios</b>	—	—	—	—
<b>Textura</b>	Algodonosa	Algodonosa	Granulosa	Flocoso
<b>Exudados</b>	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia
<b>Muestra</b>	<b>M14 A20</b>			
<b>Color de la superficie</b>	Borde crema, colonia verde oliva, centro verde	Borde crema, colonia verde claro, céntrico verde oscuro.	Bordes crema, colonia verde oliva, centro verde claro	Colonia amarillo fosforescente, centro blanco.
<b>Tamaño de la colonia</b>	5,93 ± 3,93	6,16 ± 3,53	6,56 ± 4,03	3,66 ± 2,9
<b>Margen</b>	Redondeado	Filamentoso	Filamentoso	Filamentoso
<b>Color reverso</b>	Naranja	Crema	Marrón	Amarillo fosforescente
<b>Elevación</b>	Umbunada	Umbunada	Umbunada	Plana
<b>Crecimiento</b>	Medio	Medio	Medio	Medio
<b>Producción de aflatoxina</b>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<b>Esclerocios</b>	—	—	—	—
<b>Textura</b>	Algodonosa	Algodonosa	Granulosa	Flocoso
<b>Exudados</b>	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia

En la identificación de las características macroscópicas los aislados de las colonias presuntivas de *Aspergillus flavus* fueron sembradas en diferentes agares: MEA, CYA, YES y CREA a 25 °C por 7 días. Las colonias se observaron de color verde amarillenta, verde oscuro u oliva para los tres primeros tipos de agares, y de color amarillo fosforescente en agar CREA debido a la producción de ácido. Las colonias presentaron un tamaño de 7,17 ±4, los márgenes son filamentosos, con un crecimiento

medio para los 4 casos, presencia de esclerocios en la muestra M13A16. Según Pildain, Cabral, & Vaamonde (2020) informan que la producción de esclerocios es una característica rara de *A. flavus*, siendo una de sus características distintivas, por ende, en la mayoría de muestras no se verificó la presencia de esclerocios. El aislado produjo exudados en tres de los cuatro medios utilizados. Así lo reafirma Vaamonde, Degrossi, Comerio, & Fernandez (2017) quienes describieron a la colonia de *A. flavus* y *A. parasiticus* de color verde-amarillento. Otro aspecto, el color verde de los conidios; en particular las colonias de *A. parasiticus* son de color verde más oscuro a comparación con *A. flavus*. Esta característica se debe al tiempo de incubación y es comprobable en los cultivos en PDA que en MEA. Entre más tiempo pase las colonias de *A. flavus* cambian de color a verde grisáceo. Ambos hongos muestran zonas flocosas debido a la disminución a la capacidad para esporular, ya que el color característico está limitado con las paredes de los conidios. Otra manera de diferenciar el color más eficaz de las esporas de estas especies es por el medio DRBC (agar dicloran rosadebengala-cloramfenicol).

Otros autores, Uguña (2019), describen a la colonia de color blanca con textura aterciopelada en el primer día, al tercer día las esporas cambian de color a un verde claro en medio PDA, después presentan una textura polvorienta con los bordes blanquecinos. En agar Sabouraud el crecimiento de conidios amarillos que al pasar de 5 a 7 días se vuelven verdes; el tamaño de la colonia es de 7 a 7,5 cm en un tiempo de 3 días, el reverso de las colonias pueden ser incoloras, cremosas, cafés oscuras, cafés amarillentas, naranjas, según el tipo de agar y a medida que la colonia está vieja se tornan cafés oscuras, en el centro el hongo tiene una estructura flocosa, señalan también que se genera formación de esclerocios siendo estructuras de resistencia, de textura globosa, el primer día de color blanco y al día 7 se tornan de color negro, algunos se quedan de color blanco confundiendo con el micelio.

Koneman & Allen (2018) mencionan que *A. flavus* y otras especies dentro del género *Aspergillus* tienen un crecimiento rápido que va de 3 a 5 días, los bordes externos son blancos, indicativo de crecimiento nuevo, además afirma que las cepas en una edad temprana presentan texturas algodonosas y al madurar muestran texturas granulosas o polvosas de diferentes colores debido a la maduración de los conidios.

En la tabla 19 y 20 se presentan las características microscópicas de los veinte aislados presuntivos de *Aspergillus flavus* en donde se observó conidios o esporas entre 6  $\mu\text{m}$  a 10,7  $\mu\text{m}$  de largo y 10,3  $\mu\text{m}$  a 13  $\mu\text{m}$  de ancho de forma baciliforme y espiculada,

presencia de fiálides que tienen una medida entre de 6,9  $\mu\text{m}$  a 15,7  $\mu\text{m}$  de largo y 15,7  $\mu\text{m}$  a 21  $\mu\text{m}$  de ancho, conidióforos con una longitud entre 111,7 a 345  $\mu\text{m}$ , tamaño de las vesículas entre 11,5  $\mu\text{m}$  a 24,4  $\mu\text{m}$  de largo y 43,6  $\mu\text{m}$  a 67  $\mu\text{m}$  ancho con estructura globosa y cadena de esporas en columna.

**Tabla 19.** Características microscópicas de los aislados presuntivos M1A1 a M14A20 de *Aspergillus flavus* provenientes de las muestras 1, 5, 7, 13, 14 de la harina de trigo en MEA cultivados a 25°C por 7 días (1)

<b>Muestra</b>	<b>Vesículas</b>	<b>Conidióforo</b>	<b>Métulas</b>	<b>Fiálides</b>	<b>Conidios</b>	<b>Cabeza y vesículas</b>
<b>M1 A1</b>	14,3 $\pm$ 57,1	6,3 $\pm$ 209,8	Ausencia	7,8 $\pm$ 18,9	7,8 $\pm$ 11,3 (Epiculadas)	Cabeza hemisférica
<b>M1 A2</b>	15,8 $\pm$ 43,6	13,3 $\pm$ 111,7	Ausencia	10,8 $\pm$ 19,2	6 $\pm$ 13 (Epiculadas)	Cadenas de esporas en columna
<b>M1 A3</b>	11,5 $\pm$ 36,8	15,7 $\pm$ 224	Ausencia	10,8 $\pm$ 22,4	6,6 $\pm$ 13,5 (Reticulada)	Cabeza y vesícula globosa
<b>M5 A4</b>	23,3 $\pm$ 67,1	12,6 $\pm$ 127,9	Ausencia	6,9 $\pm$ 16,9	7,9 $\pm$ 195 (Epiculadas)	Cabeza hemisférica
<b>M5 A5</b>	16,3 $\pm$ 59,8	24,8 $\pm$ 187,9	Ausencia	10,6 $\pm$ 18,5	6,8 $\pm$ 10,3 (Baciliforme)	Cadena de esporas en columna
<b>M5 A6</b>	22,3 $\pm$ 67,1	7,3 $\pm$ 309,8	Ausencia	8,8 $\pm$ 20,9	6,5 $\pm$ 10,3 (Epiculadas)	Cabeza hemisférica
<b>M5 A7</b>	13,8 $\pm$ 55,6	5,2 $\pm$ 345	Ausencia	10 $\pm$ 15,7	9 $\pm$ 11 (Epiculadas)	Cadenas de esporas en columna
<b>M5 A8</b>	12,6 $\pm$ 46,8	7,3 $\pm$ 287,1	Ausencia	9,5 $\pm$ 20,2	8 $\pm$ 10,9 (Globosa)	Cabeza y vesícula globosa
<b>M7 A9</b>	16,5 $\pm$ 46,8	6,6 $\pm$ 345	Ausencia	10,8 $\pm$ 20,3	8,6 $\pm$ 12,5 (Reticulada)	Cabeza y vesícula globosa
<b>M13 A10</b>	12 $\pm$ 47,8	7,3 $\pm$ 287,1	Ausencia	10,6 $\pm$ 18,5	6,8 $\pm$ 10,3 (Baciliforme)	Cadena de esporas en columna

**Tabla 20.** Características microscópicas de los aislados presuntivos M1A1 a M14A20 de *Aspergillus flavus* provenientes de las muestras 1, 5, 7, 13, 14 de la harina de trigo en MEA cultivados a 25°C por 7 días (2)

Muestra	Vesículas	Conidióforo	Métulas	Fiálides	Conidios	Cabeza y vesículas
<b>M13 A11</b>	20,7 ± 56	13 ± 345	Ausencia	15,5 ± 20,8	10,5 ± 13,6 (Reticulada)	Cadena de esporas en columna
<b>M13 A12</b>	24,4 ± 62,1	7,3 ± 256,9	Ausencia	15,7 ± 21,4	8,9 ± 11,8 (Baciliforme)	Cabeza y vesícula globosa
<b>M13 A13</b>	11,8 ± 44,6	5,8 ± 257	Ausencia	12 ± 15,7	7,6 ± 10,3 (Reticulada)	Cabeza y vesícula globosa
<b>M13 A14</b>	12 ± 56,8	8,7 ± 167,8	Ausencia	11,2 ± 16,2	10,7 ± 13,8 (Reticulada)	Cabeza y vesícula globosa
<b>M13 A15</b>	16 ± 35,7	7 ± 306,9	Ausencia	10,9 ± 17,2	9 ± 11,7 (Reticulada)	Cabeza hemisférica
<b>M13 A16</b>	23,1 ± 64,5	8 ± 274,3	Ausencia	8,9 ± 23,6	8 ± 11,8 (Reticulada)	Cabeza hemisférica
<b>M14 A17</b>	21,1 ± 57,8	4 ± 235,6	Ausencia	14,6 ± 20,2	7,8 ± 12 (verrugosa)	Cabeza hemisférica
<b>M14 A18</b>	16,9 ± 38,1	6,8 ± 222,4	Ausencia	10,5 ± 16,4	6,4 ± 11,9 (Espiculadas)	Cadenas de esporas en columna
<b>M14 A19</b>	21 ± 55,6	6,2 ± 167	Ausencia	13,4 ± 26,6	8,8 ± 12,9 (Espiculadas)	Cabeza hemisférica
<b>M14 A20</b>	17,8 ± 48,9	7,9 ± 101	Ausencia	10,9 ± 21,9	7,3 ± 12,2 (Espiculadas)	Cabeza hemisférica

Para las características microscópicas de aislados presuntivos de *A. flavus*, se sembró en agar MEA y se observó las estructuras con ayuda de azul de metileno y aceite de inmersión si se utilizaba el lente de 100x en un microscopio óptico. Se miró las vesículas que van en un rango de medidas (ancho-largo) de 24,4±67,1 μm, conidióforos (7±456,9 μm), hubo ausencia de métulas, fiálides (10,9±17,2 μm), conidios (10,5±13,6 μm) con forma espiculada y la forma de la cabeza y vesícula: estructura hemisférica, cadenas de esporas en columna, cabeza y vesícula globosa, identificadas en las cepas.

A nivel microscópico Gil (2018) argumenta que las cepas de *A. flavus* presentan conidios piriformes o globosos lisos y al madurar cambian a rugosos, así lo refutan Gómez (2021) y Cifuentes & Espinosa (2019), lo cual indican que los conidios pueden

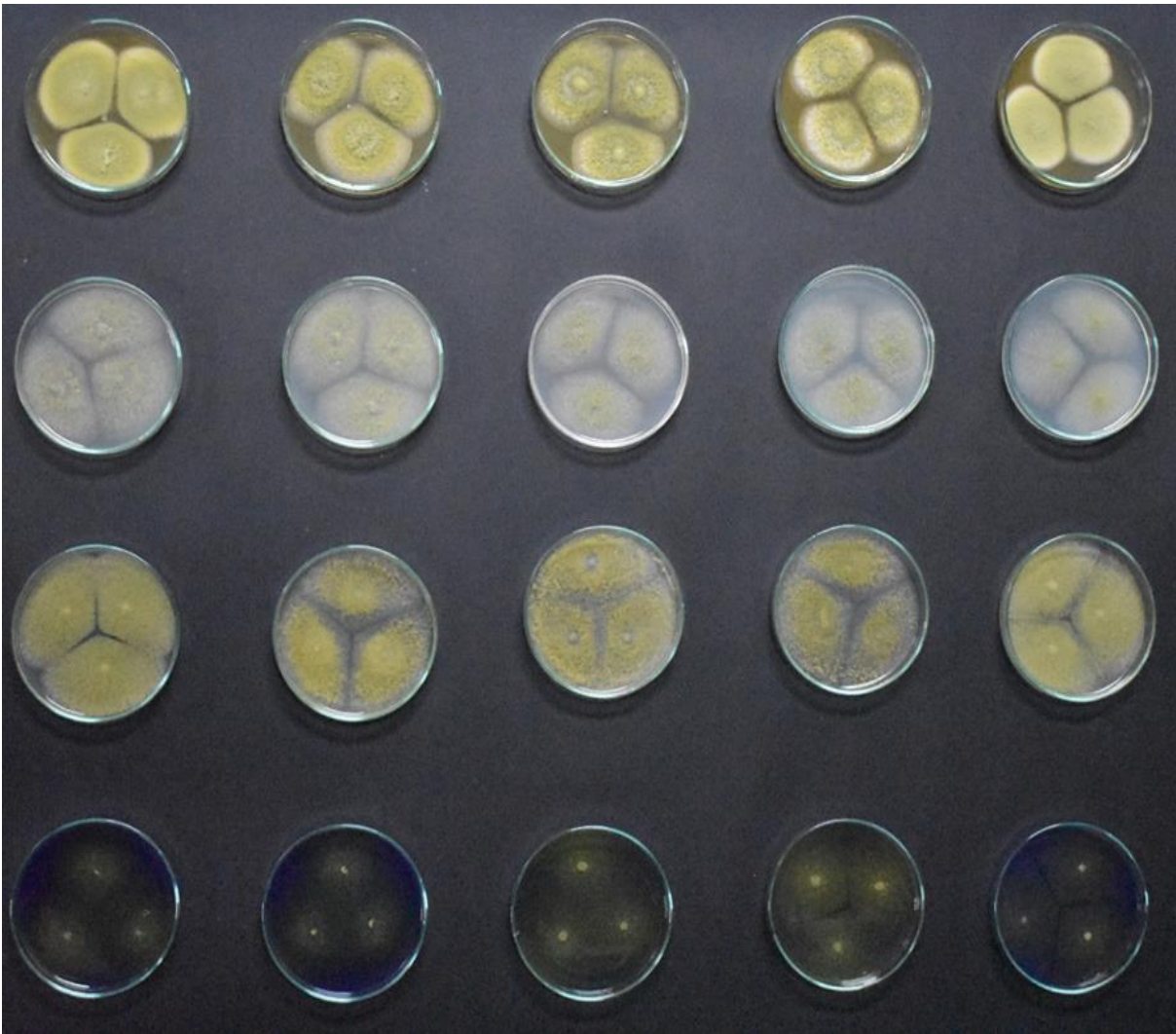
ser subglobosos y suaves.

Con respecto a los conidióforos Koneman & Allen (2022) comentan que son largos con regusidad solo en las cercanías, al unir con la vesícula. Indica Gómez (2014) junto con Abarca (2020) que la forma de la vesícula de *A. flavus* es esférica de la cual Rodríguez (2019) que las fiálides nacen a 360° alrededor de toda la vesícula, Koneman & Allen (2022) y Sandoval (2023) informan que pueden ser biseriadas y uniseriadas, biseriadas si las mótulas se unen a la vesícula por un extremo, en cambio por el otro extremo se hallan las fiálides donde nacen los conidios y uniseriadas si las fiálides se conectan con la vesícula de un extremo- cubriendo las  $\frac{3}{4}$  de la vesícula y del otro nacen los conidios.

En el presente estudio, del análisis filogenético se complemento con la observación morfológica siendo esta una técnica ampliamente usada en diversas investigaciones, ya que, proporciona una buena identificación del género *Aspergillus*, siendo así un método esencial para categorizar aislamientos de acuerdo a grupos, secciones, emitiendo una mejor identificación por otro tipo de métodos.

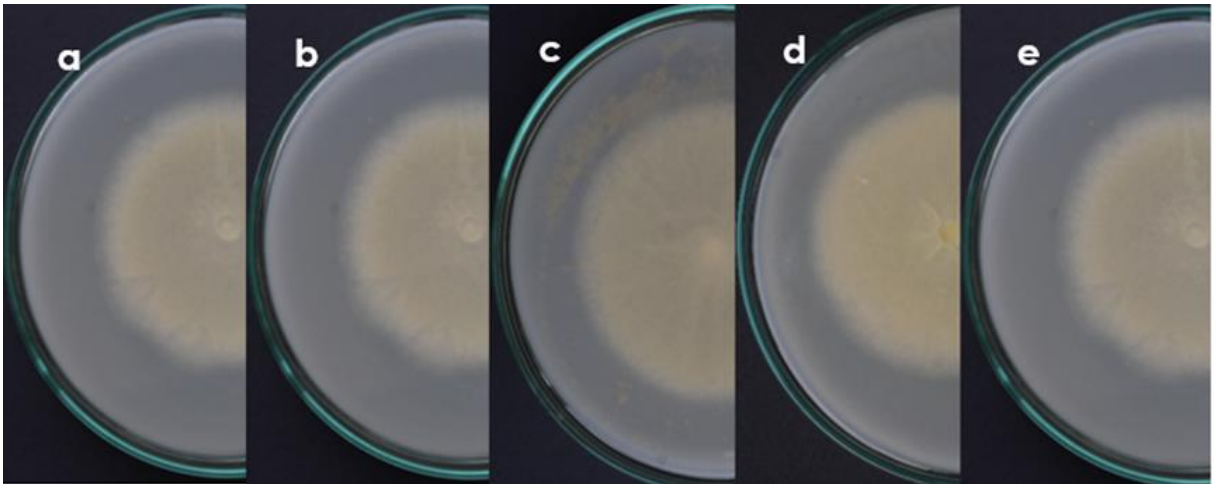
En las figuras 10, 12, 14 y 16 se observa características macroscópicas de los aislados M1, M5, M7, M13 y M14 presuntivos de *Aspergillus flavus* en donde se muestra la textura de las colonias, el color, presencia de esclerocios, cultivados en agar MEA, CYA, YES y CREA de cultivos a 25 °C por 7 días. En agar crea se observa tonalidades amarillas debido a la producción de ácido.

En las figuras 11, 13, 15, 17 se observa el crecimiento de los aislados presuntivos de *Aspergillus flavus* en agar coco para la determinación de aflatoxinas, se muestra presencia de estas micotoxinas cuando el agar coco se tinte de un color rosa claro. En el presente trabajo los aislados presuntivos de *Aspergillus flavus* no mostraron contenido de aflatoxinas.



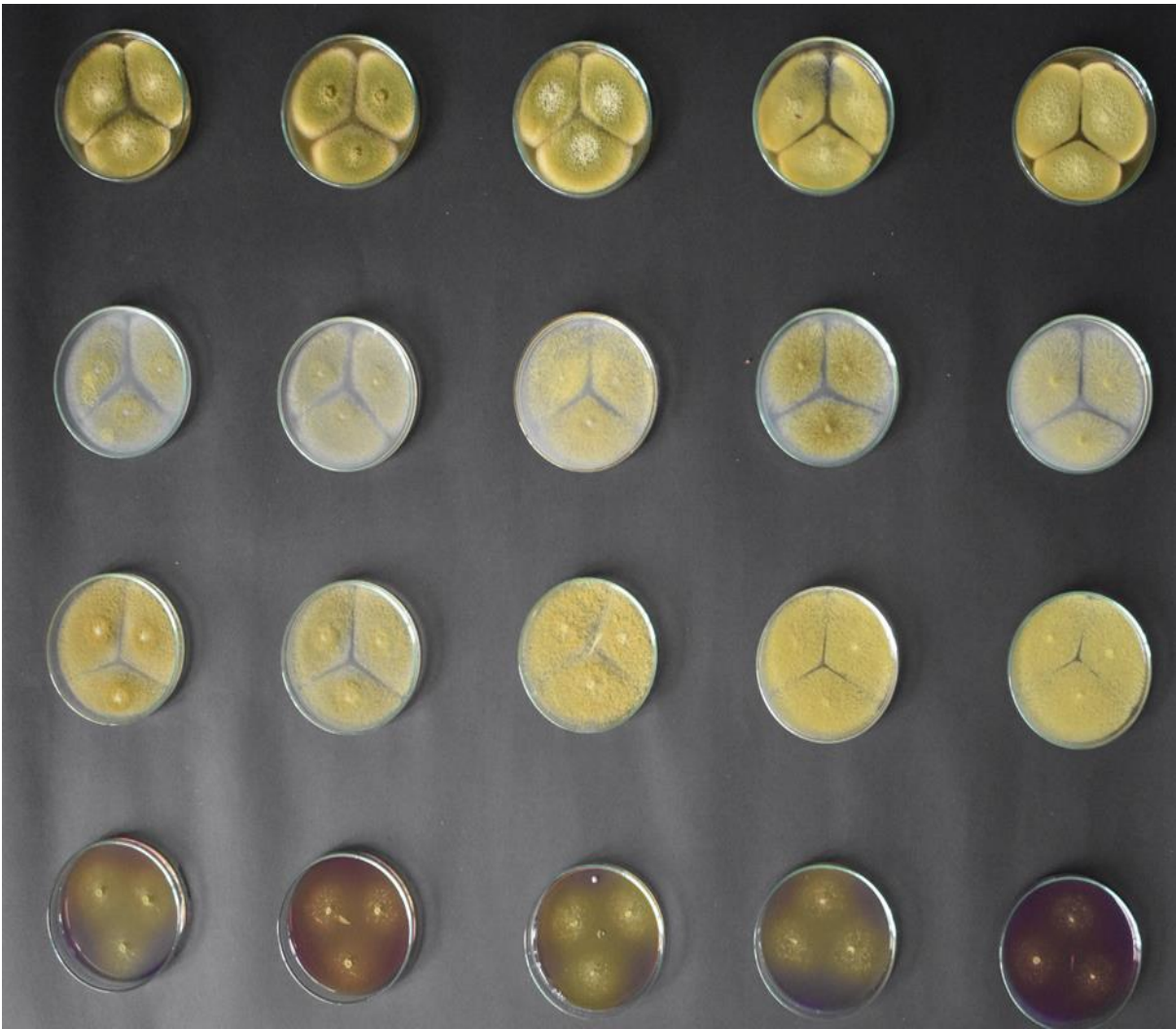
**Figura 10.** Características macroscópicas de aislados presuntivos de *A. flavus*

En la siguiente figura se observa las características macroscópicas de aislados presuntivos cultivados en medio MEA, CYA, YES y CREA a 25 °C por 7 días de *Aspergillus flavus*, correspondiente a las colonias. Columna 1= muestra 1 A1, columna 2= muestra 1 A2, columna 3= muestra 1 A3, columna 4= muestra 5 A4 y columna 5= muestra 5 A5. Fila 1 correspondiente al medio MEA, fila 2 medio CYA, fila 3 medio YES y Fila 4 medio CREA. En CREA presencia de tonalidades amarillas por la producción de ácido.



**Figura 11.** Determinación de aflatoxinas de *A. flavus* presuntivos en agar coco

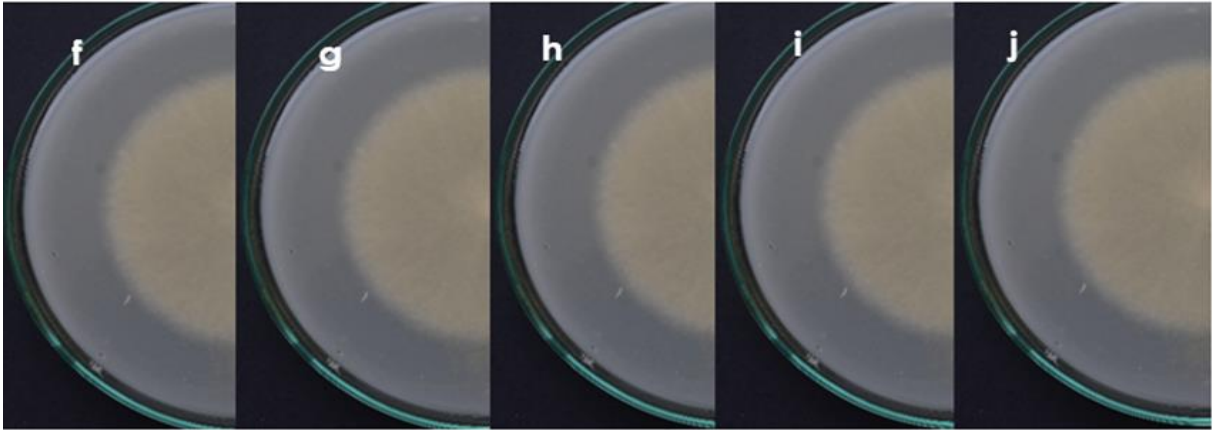
En la siguiente figura se determina la presencia de aflatoxinas en agar coco a 25 °C por 7 días en las colonias M1A1 (a), M1A2 (b), M1A3 (c), M5A4 (d) y M5A5 (e) de aislados presuntivos de *Aspergillus flavus*. Indicadores: (blanco) ausencia, (palo de rosa) presencia. Ausencia de tonalidades rosa en los aislados de las colonias presuntivas de *Aspergillus flavus* por ende no hay presencia de aflatoxinas.



**Figura 12.** Características macroscópicas de aislados presuntivos de *A. flavus*

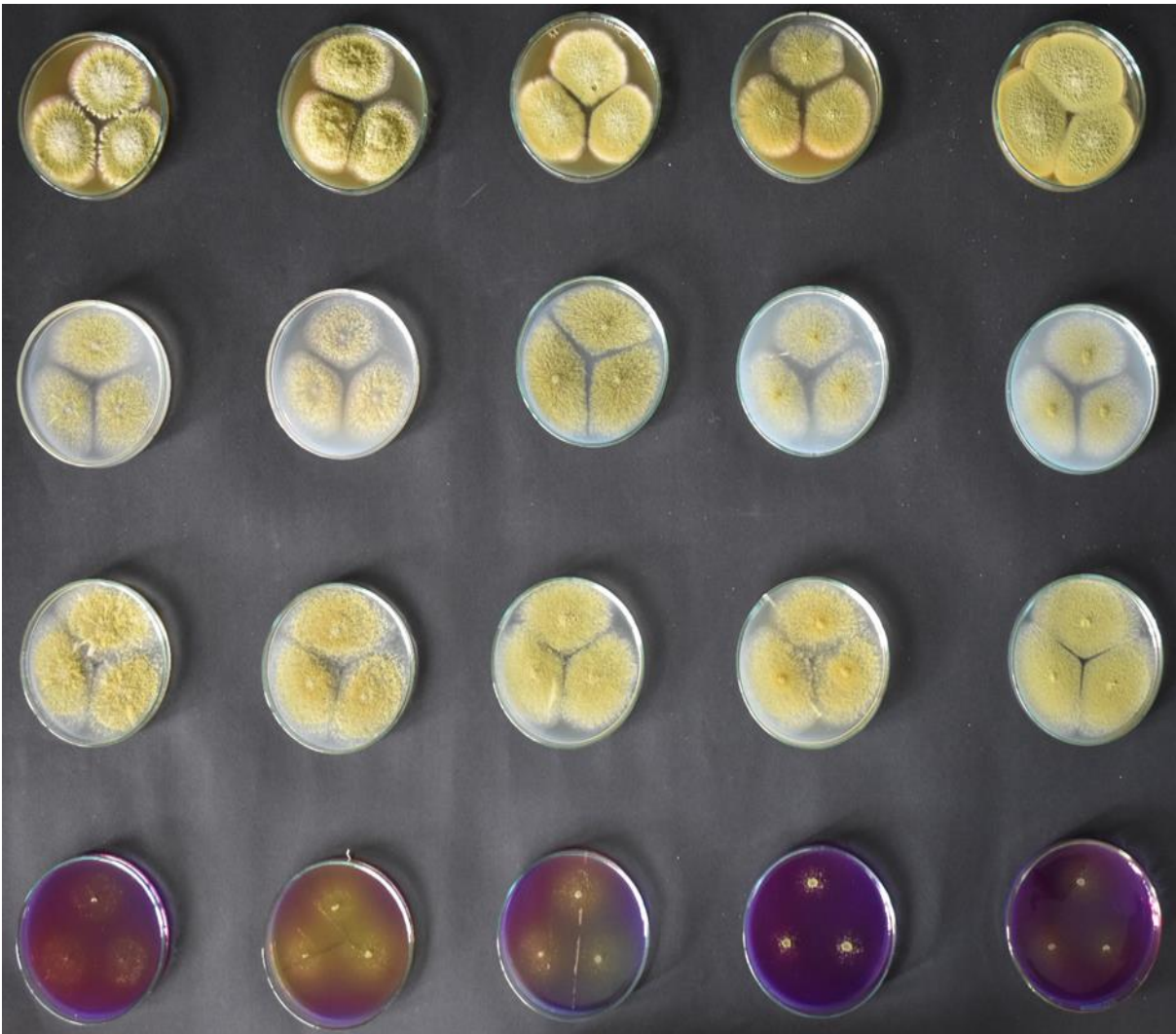
En la siguiente figura se observa las características macroscópicas de aislados presuntivos cultivados en medio MEA, CYA, YES y CREA a 25 °C por 7 días de *Aspergillus flavus*, correspondiente a las colonias. Columna 1= muestra 5 A6, columna 2= muestra 5 A7, columna 3= muestra 5 A8, columna 4= muestra 7 A9 y columna 5= muestra 13 A10. Fila 1 correspondiente al medio MEA, fila 2 medio CYA, fila 3 medio YES y Fila 4 medio CREA. En CREA presencia de tonalidades amarillas por la producción de ácido.





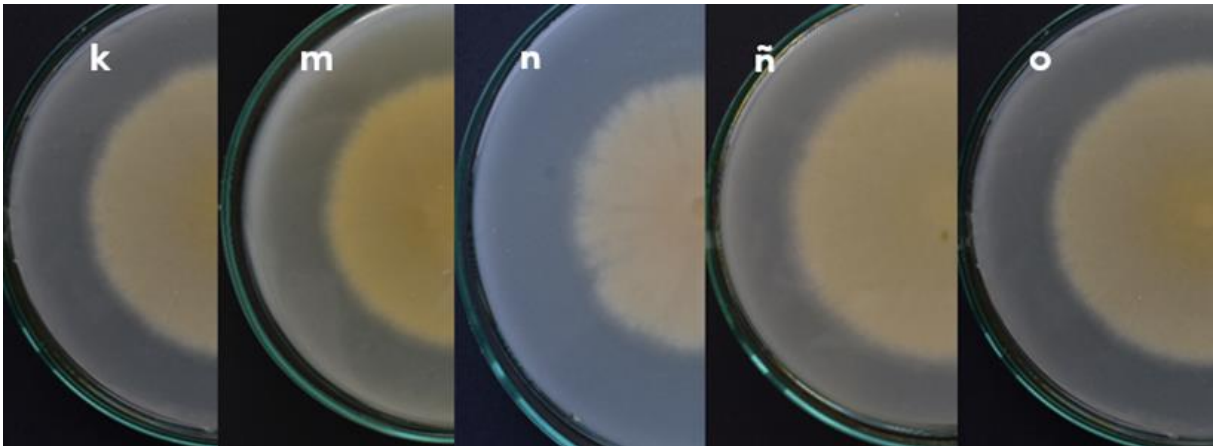
**Figura 13.** Determinación de aflatoxinas de *A. flavus* presuntivos en agar coco

En la siguiente figura se observa la identificación de aflatoxinas en agar coco a 25 °C por 7 días en las colonias M5A6 (f), M5A7 (g), M5A8 (h), M7A9 (i) y M13A10 (j) de aislados presuntivos de *Aspergillus flavus* Indicadores: (blanco) ausencia, (palo de rosa) presencia. Ausencia de tonalidades rosa en los aislados de las colonias presuntivas de *Aspergillus flavus* por ende no hay presencia de aflatoxinas.



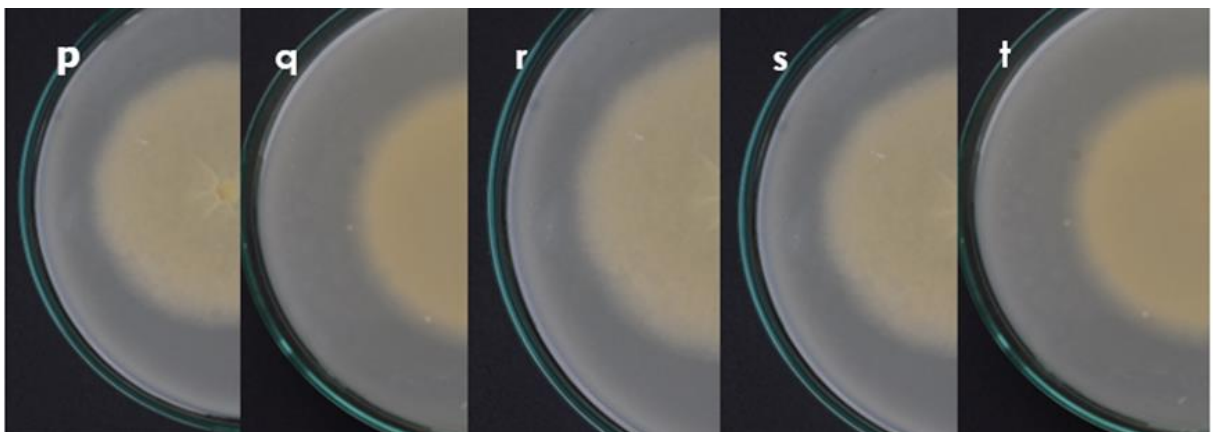
**Figura 14.** Características macroscópicas de aislados presuntivos de *A. flavus*

En la figura se observa las características macroscópicas de aislados presuntivos cultivados en medio MEA, CYA, YES y CREA a 25 °C por 7 días de *Aspergillus flavus*, correspondiente a las colonias. Columna 1= muestra 13 A11, columna 2= muestra 13 A12, columna 3= muestra 13 A13, columna 4= muestra 13 A14 y columna 5= muestra 13 A15. Fila 1 correspondiente al medio MEA, fila 2 medio CYA, fila 3 medio YES y Fila 4 medio CREA. En CREA presencia de tonalidades amarillas por la producción de ácido.



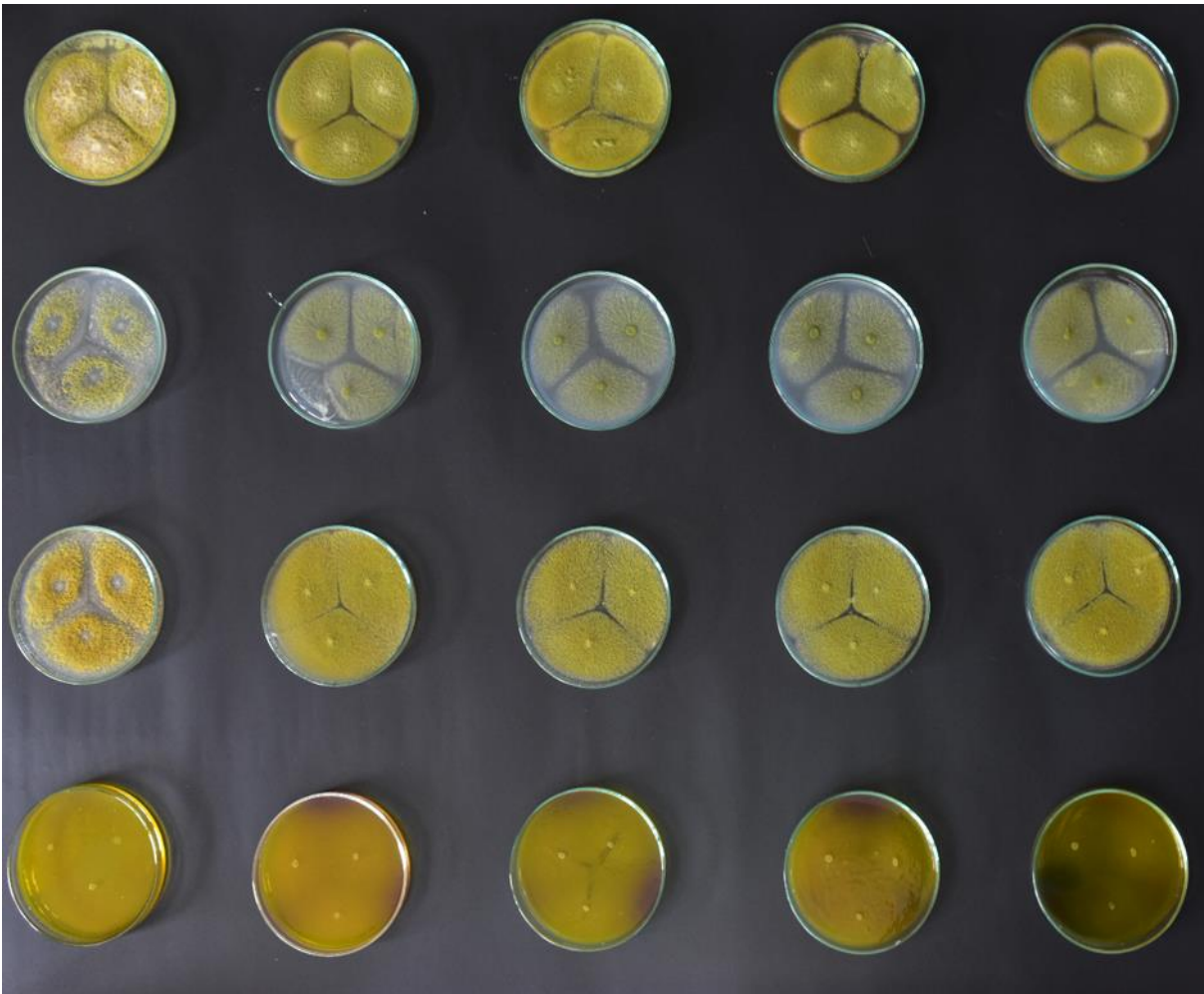
**Figura 15.** Determinación de aflatoxinas de *A. flavus* presuntivos en agar coco

En la siguiente figura se determina aflatoxinas en agar coco a 25 °C por 7 días en las colonias M13A11 (k), M13A12 (m), M13A13 (n), M13A14 (ñ) y M13A15 (o) de aislados presuntivos de *Aspergillus flavus*. Indicadores: (blanco) ausencia, (palo de rosa) presencia. Ausencia de tonalidades rosa en los aislados de las colonias presuntivas de *Aspergillus flavus* por ende no hay presencia de aflatoxinas.



**Figura 16.** Determinación de aflatoxinas de *A. flavus* presuntivos en agar coco

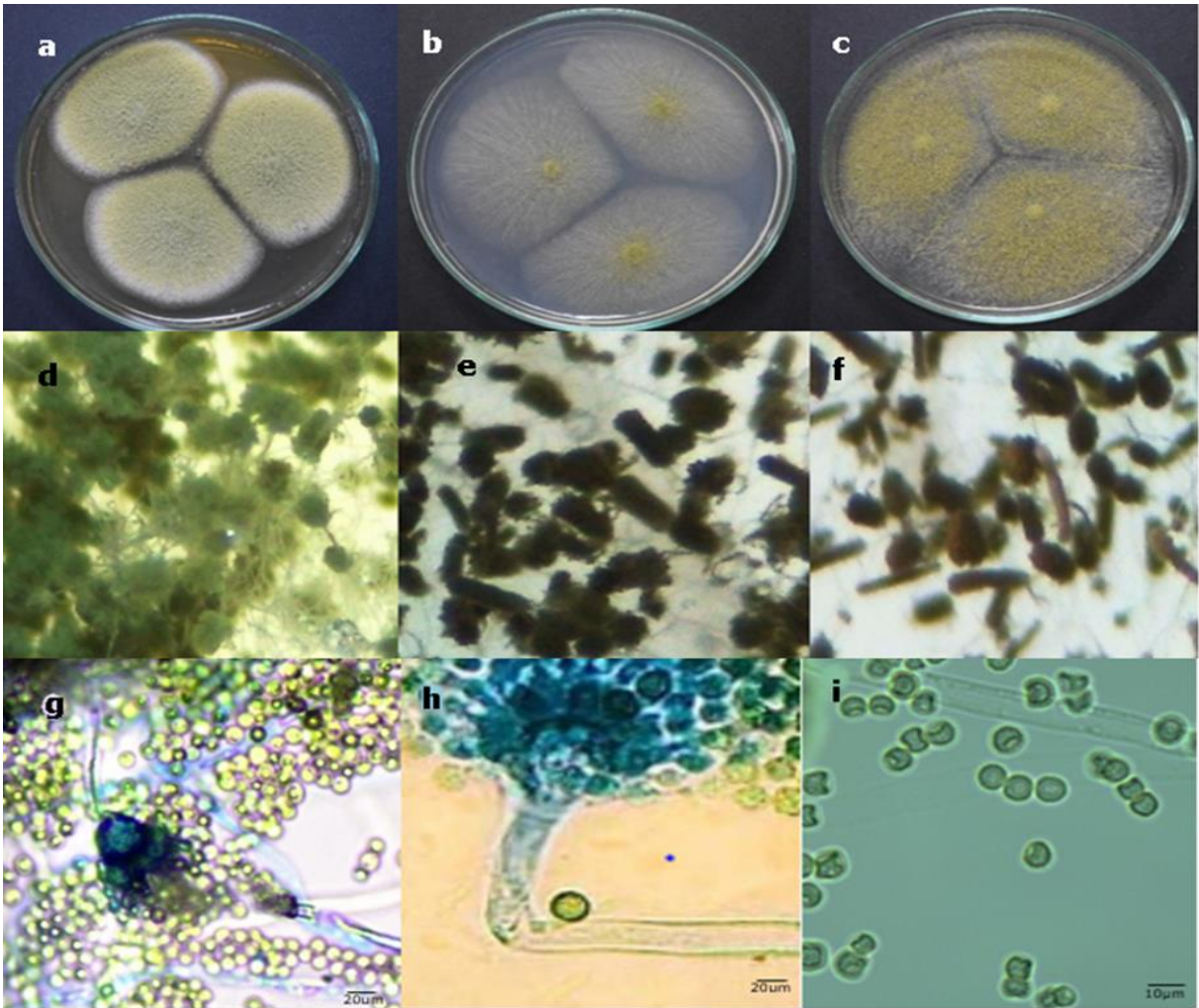
En la siguiente figura se determina las aflatoxinas en agar coco a 25 °C por 7 días en las M13A16 (p), M14A17 (q), M14A18 (r), M14A19 (s) y M14A10 (t) de aislados presuntivos de *Aspergillus flavus*. Indicadores: (blanco) ausencia, (palo de rosa) presencia. Ausencia de tonalidades rosa en los aislados de las colonias presuntivas de *Aspergillus flavus* por ende no hay presencia de aflatoxinas.



**Figura 17.** Características macroscópicas de aislados presuntivos de *A. flavus*

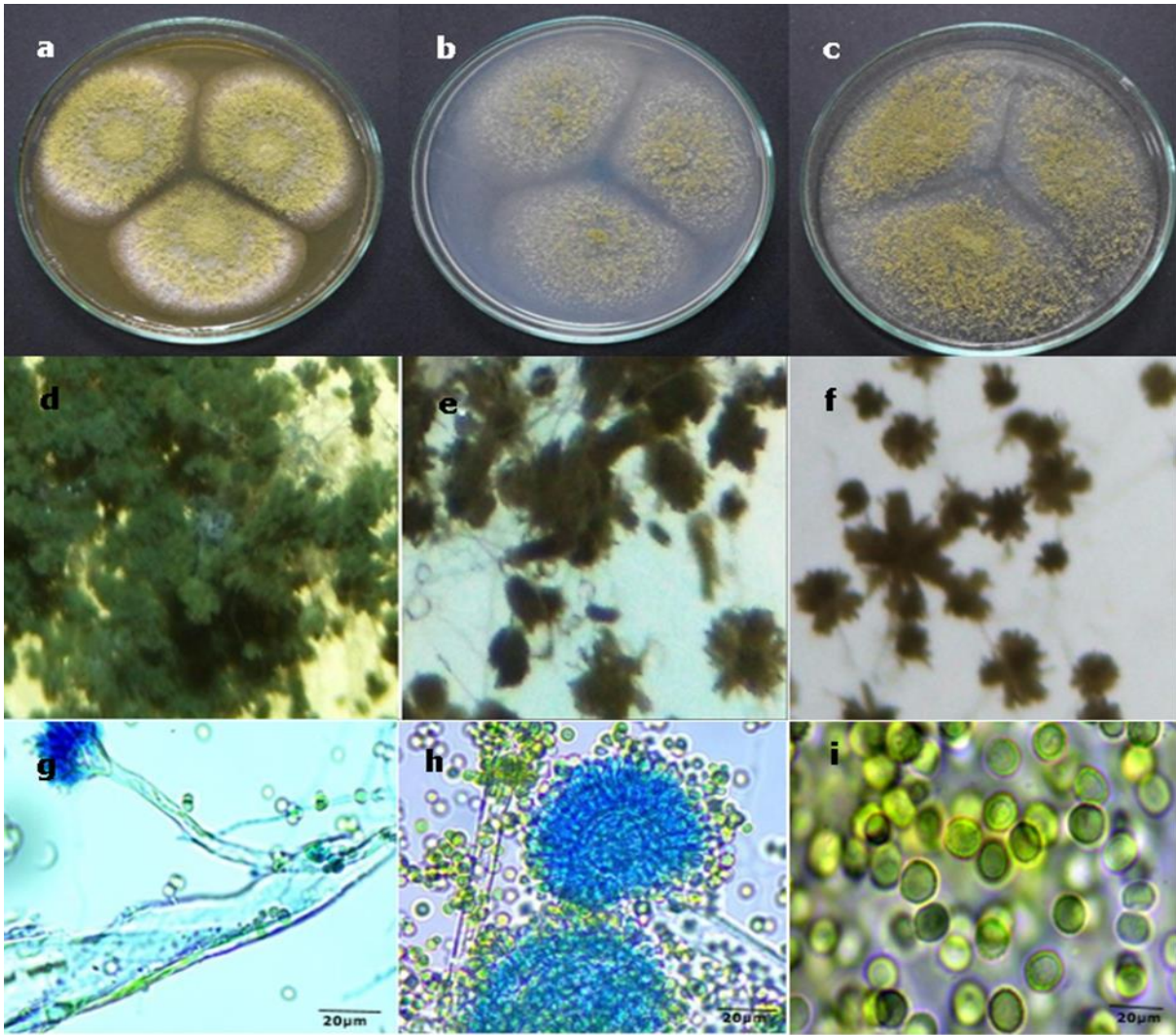
En la siguiente figura se observa las características macroscópicas de aislados presuntivos cultivados en medio MEA, CYA, YES y CREA a 25 °C por 7 días de *Aspergillus flavus*, correspondiente a las colonias. Columna 1= muestra 13 A16, columna 2= muestra 14 A17, columna 3= muestra 14 A18, columna 4= muestra 14 A19 y columna 5= muestra 14 A20. Fila 1 correspondiente al medio MEA, fila 2 medio CYA, fila 3 medio YES y Fila 4 medio CREA. En CREA presencia de tonalidades amarillas por la producción de ácido.

En las figuras 18 a 37 se observa características macroscópicas y microscópicas de los aislados M1, M5, M7, M13 y M14 presuntivos de *Aspergillus flavus*, se muestran estructuras claves para su identificación morfológica vesícula, conidióforo, fialide, conidios, textura; crecimiento a 25 °C por 7 días en agar MEA, CYA y YES, crecimiento de las colonias para la identificación de características microscópicas en agar MEA 25 °C por 7 días.



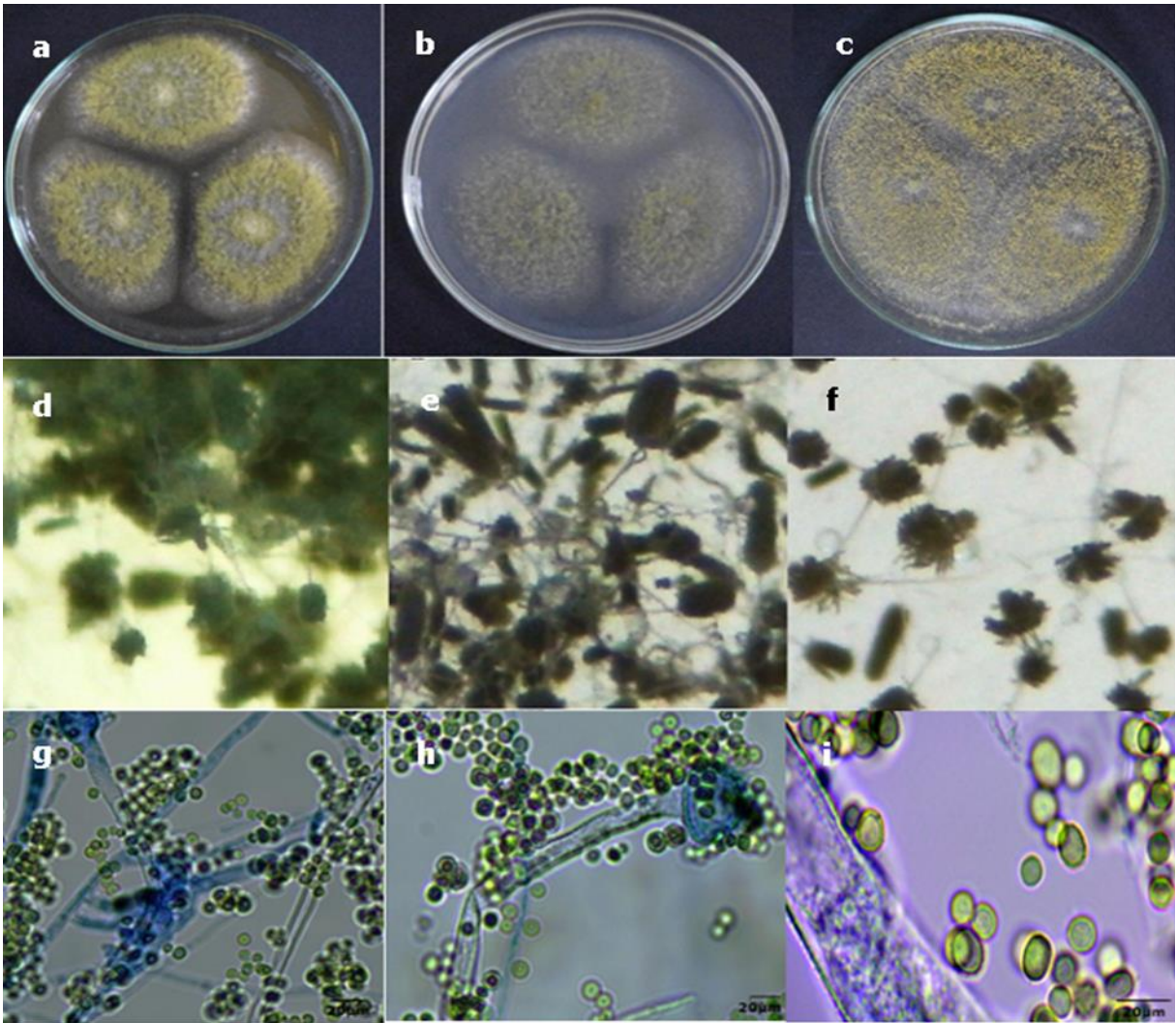
**Figura 18.** Características macroscópicas y microscópicas de aislados presuntivos de *A. flavus*

En la siguiente figura se observa las características de aislados presuntivos de *Aspergillus flavus* de la colonia M1A1 en diferente agar MEA, CYA, YES y CREA a 25 °C por 7 días; (a, b, c) característica macroscópica; (d, e, f) textura de las colonias cultivados en agar MEA, CYA, YES y CREA a 25 °C por 7 días; (g, h, i) características microscópicas cultivados en agar YES a 25 °C por 7 días; (g, h) vesícula, conidióforo, fiálide barra = 20 μm; (i) conidios barra = 20 μm.



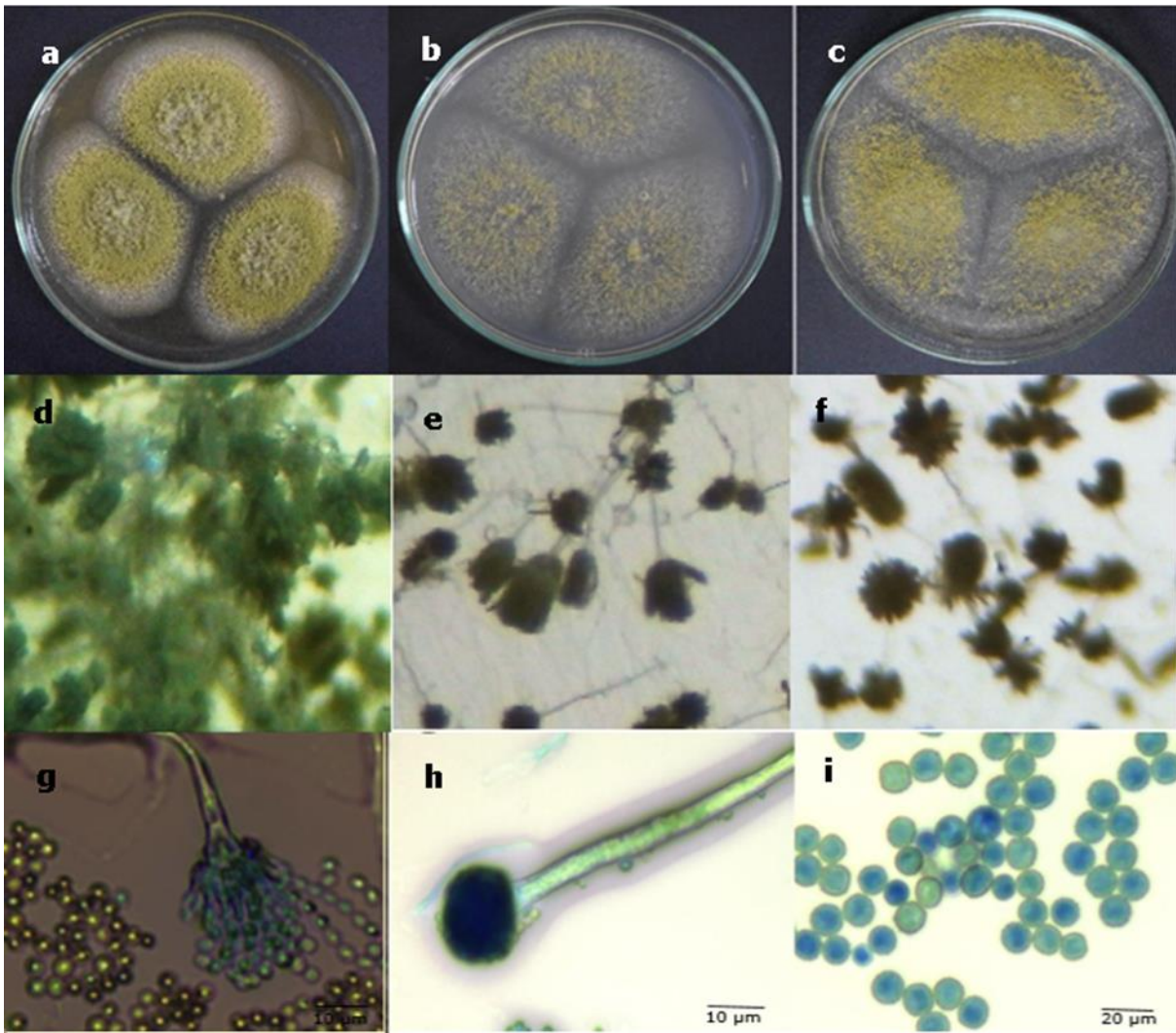
**Figura 19.** Características macroscópicas y microscópicas de aislados presuntivos de *A. flavus*

En la siguiente figura se observa las características de aislados presuntivos de *Aspergillus flavus* de la colonia M1A2 en diferente agar MEA, CYA, YES y CREA a 25 °C por 7 días; (a, b, c) característica macroscópica; (d, e, f) textura de las colonias cultivados en agar MEA, CYA, YES y CREA a 25 °C por 7 días; (g, h, i) características microscópicas cultivados en agar YES a 25 °C por 7 días; (g, h) vesícula, conidióforo, fíalide barra = 20 μm; (i) conidios barra = 20 μm.



**Figura 20.** Características macroscópicas y microscópicas de aislados presuntivos de *A. flavus*

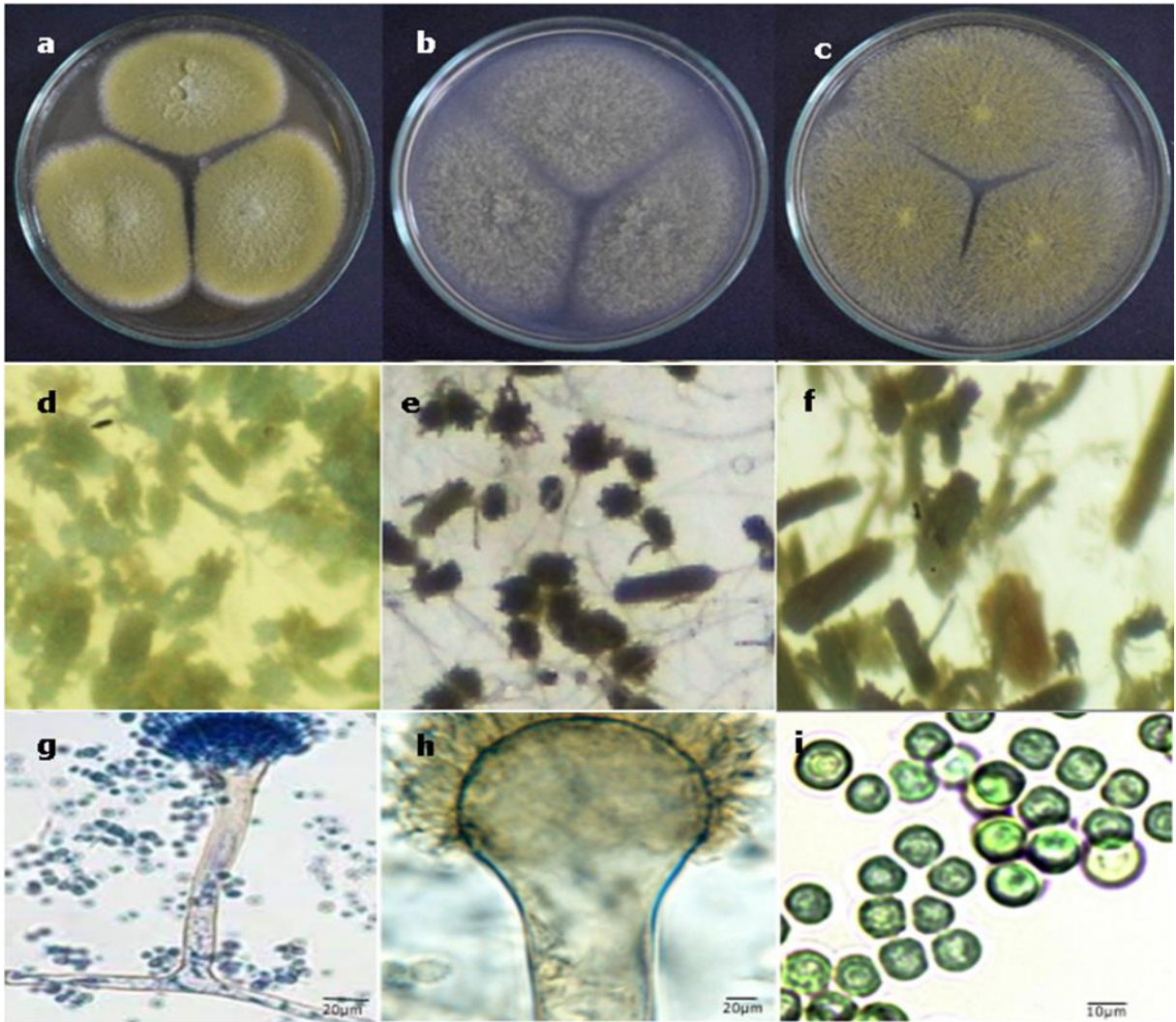
En la siguiente figura se observa las características de aislados presuntivos de *Aspergillus flavus* de la colonia M1A3 en diferente agar MEA, CYA, YES y CREA a 25 °C por 7 días; (a, b, c) características macroscópicas; (d, e, f) textura de las colonias cultivados en agar MEA, CYA, YES y CREA a 25 °C por 7 días; (g, h, i) cultivados en agar YES a 25 °C por 7 días; (g, h) vesícula, conidióforo, fiálide barra = 20 µm; (i) conidios barra = 20 µm.



**Figura 21.** Características macroscópicas y microscópicas de aislados presuntivos de *A. flavus*

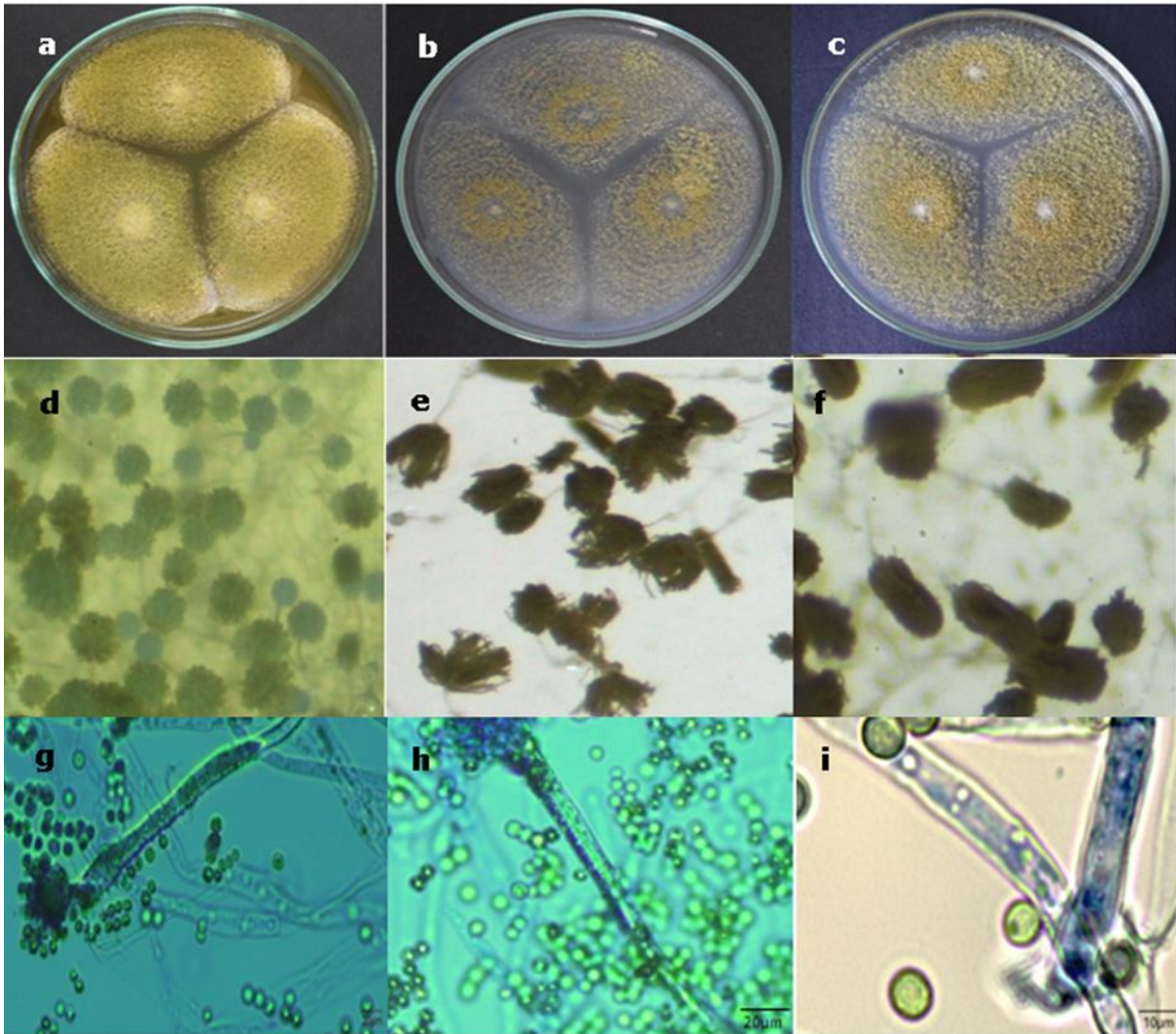
En la siguiente figura se observa las características de aislados presuntivos de *Aspergillus flavus* de la colonia M5A4 en diferente agar MEA, CYA, YES y CREA a 25 °C por 7 días; (a, b, c) características macroscópicas; (d, e, f) textura de las colonias cultivados en agar MEA, CYA, YES y CREA a 25 °C por 7 días; (g, h, i) cultivados en agar YES a 25 °C por 7 días; (g, h) vesícula, conidióforo, fiálide barra = 10 µm; (i) conidios barra = 20 µm.





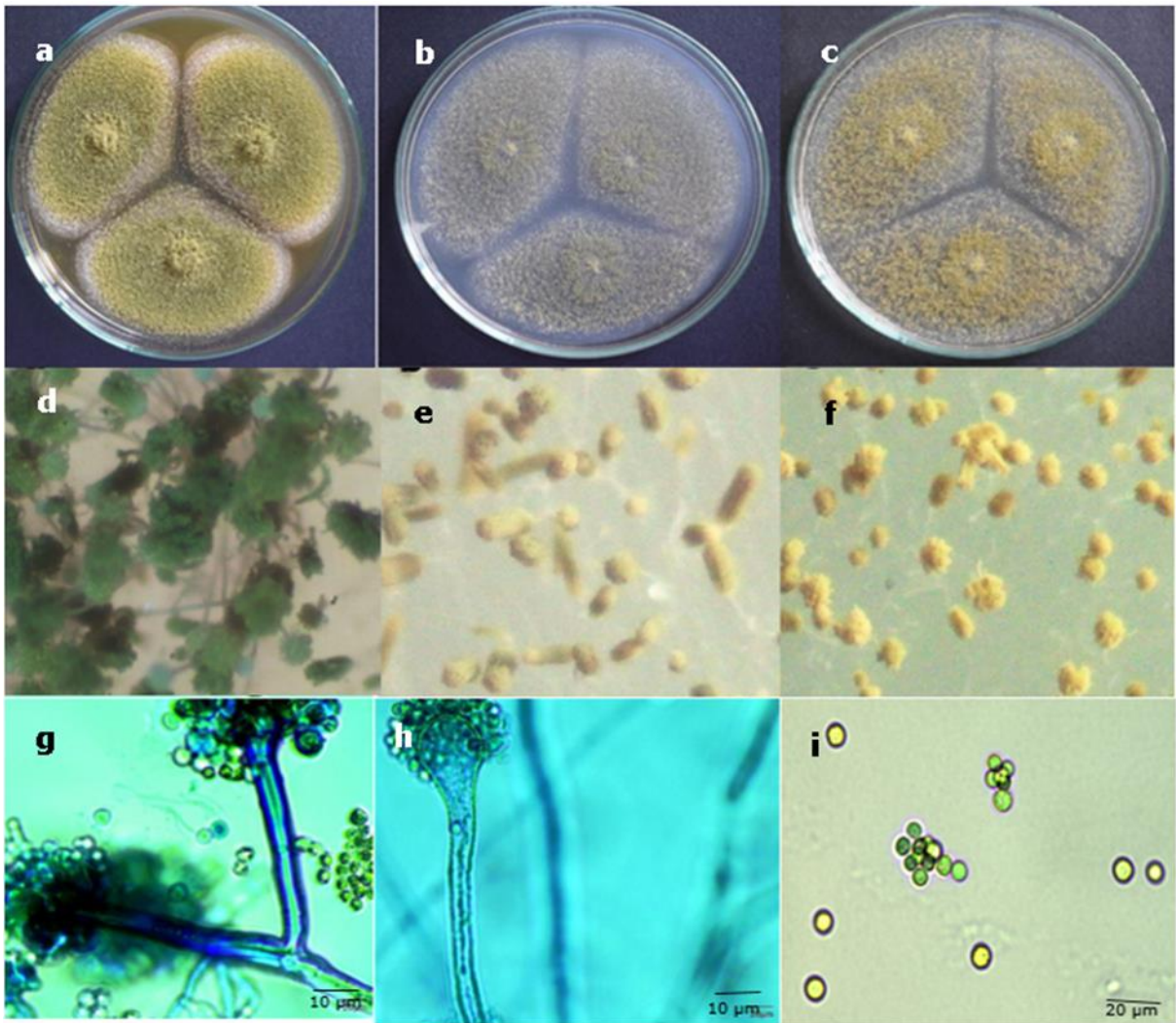
**Figura 22.** Características macroscópicas y microscópicas de aislados presuntivos de *A. flavus*

En la figura 22 se observa las características de aislados presuntivos de *Aspergillus flavus* de la colonia M5A5 en diferente agar MEA, CYA, YES y CREA a 25 °C por 7 días; (a, b, c) características macroscópicas; (d, e, f) textura de las colonias cultivados en agar MEA, CYA, YES y CREA a 25 °C por 7 días; (g, h, i) cultivados en agar YES a 25 °C por 7 días; (g, h) vesícula, conidióforo, fiálide barra = 20 µm; (i) conidios barra = 20 µm.



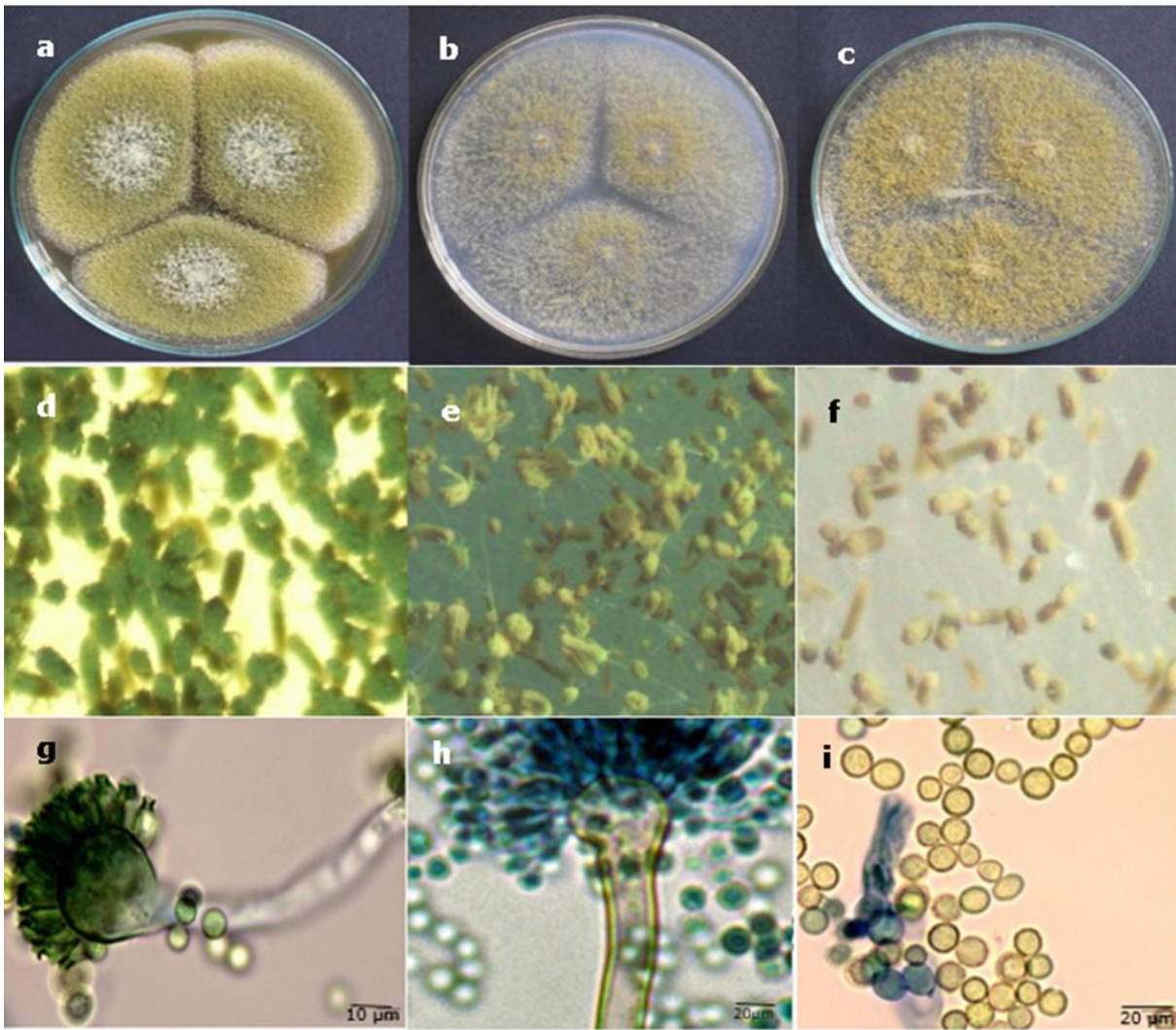
**Figura 23.** Características macroscópicas y microscópicas de aislados presuntivos de *A. flavus*

En la figura 23 se observa las características de aislados presuntivos de *Aspergillus flavus* de la colonia M5A6 en diferente agar MEA, CYA, YES y CREA a 25 °C por 7 días; (a, b, c) características macroscópicas; (d, e, f) textura de las colonias cultivados en agar MEA, CYA, YES y CREA a 25 °C por 7 días; (g, h, i) cultivados en agar YES a 25 °C por 7 días; (g, h) vesícula, conidióforo, fiálide barra = 10 μm; (i) conidios barra = 20 μm.



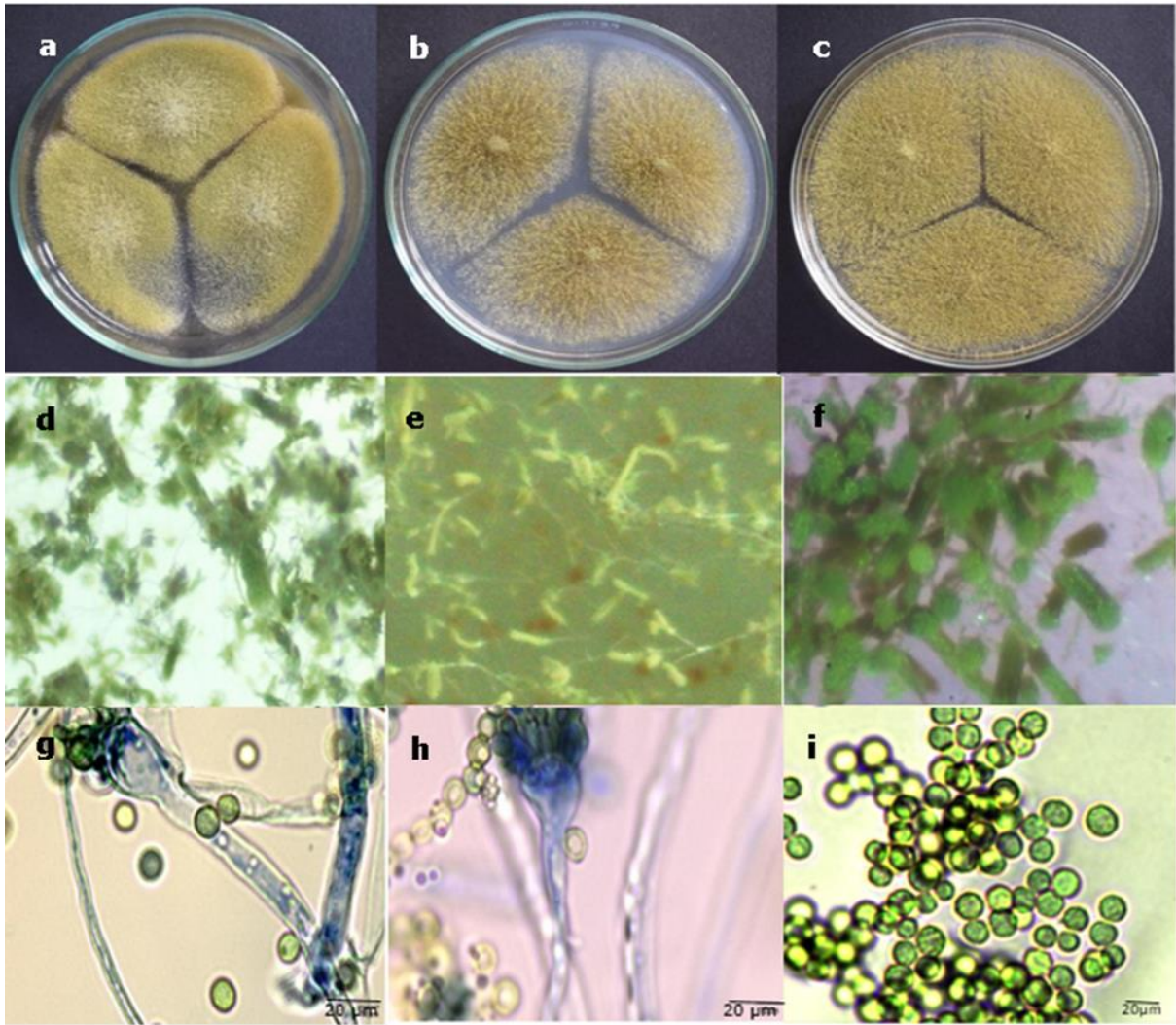
**Figura 24.** Características macroscópicas y microscópicas de aislados presuntivos de *A. flavus*

En la figura 24 se observa las características de aislados presuntivos de *Aspergillus flavus* de la colonia M5A7 en diferente agar MEA, CYA, YES y CREA a 25 °C por 7 días; (a, b, c) características macroscópicas; (d, e, f) textura de las colonias cultivados en agar MEA, CYA, YES y CREA a 25 °C por 7 días; (g, h, i) cultivados en agar YES a 25 °C por 7 días; (g, h) vesícula, conidióforo, fiálide barra = 10 µm; (i) conidios barra = 20 µm.



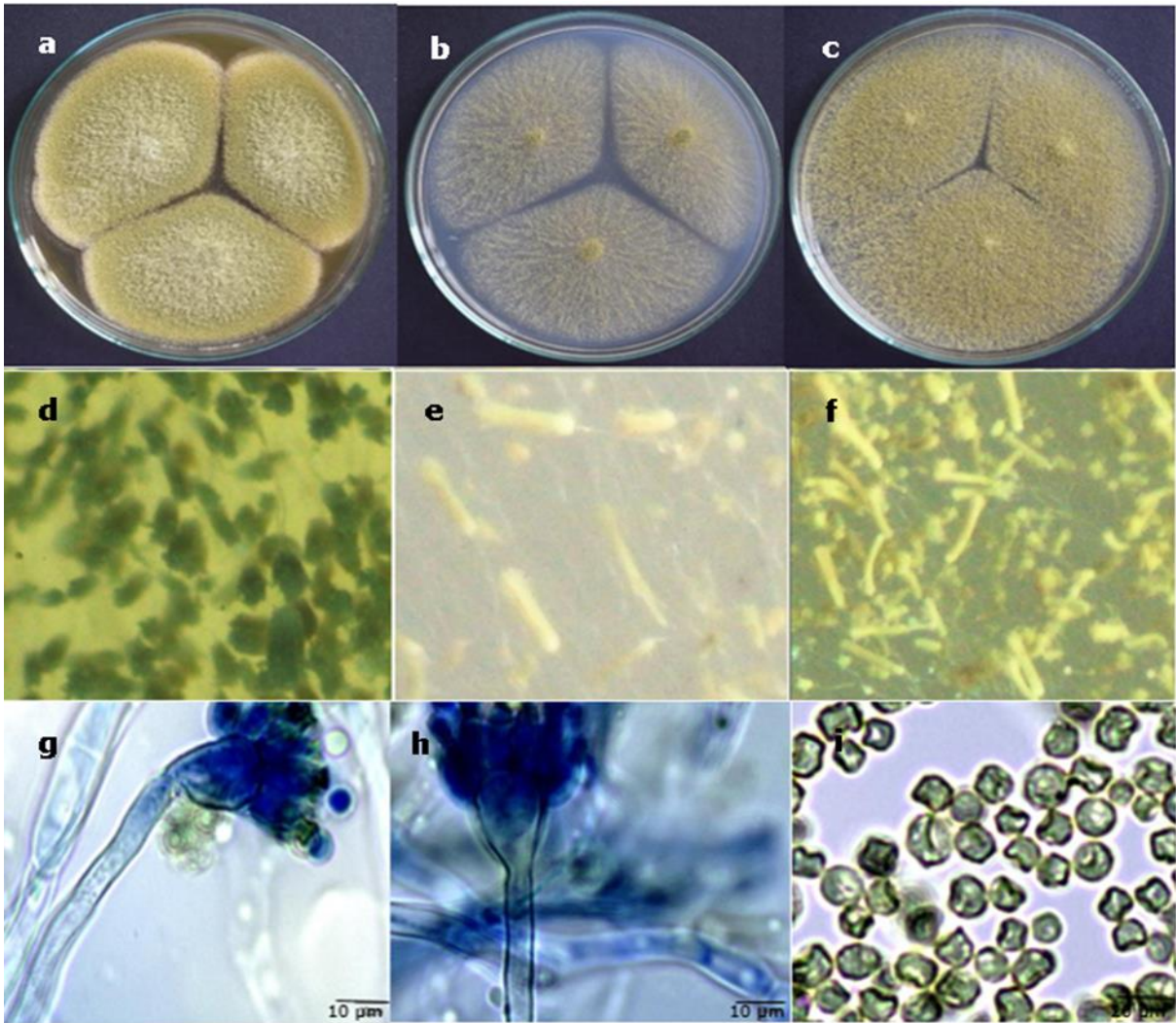
**Figura 25.** Características macroscópicas y microscópicas de aislados presuntivos de *A. flavus*

En la figura 25 se observa las características de aislados presuntivos de *Aspergillus flavus* de la colonia M5A8 en diferente agar MEA, CYA, YES y CREA a 25 °C por 7 días; (a, b, c) características macroscópicas; (d, e, f) textura de las colonias cultivados en agar MEA, CYA, YES y CREA a 25 °C por 7 días; (g, h, i) cultivados en agar YES a 25 °C por 7 días; (g, h) vesícula, conidióforo, fiálide barra = 10 µm; (i) conidios barra = 20 µm.



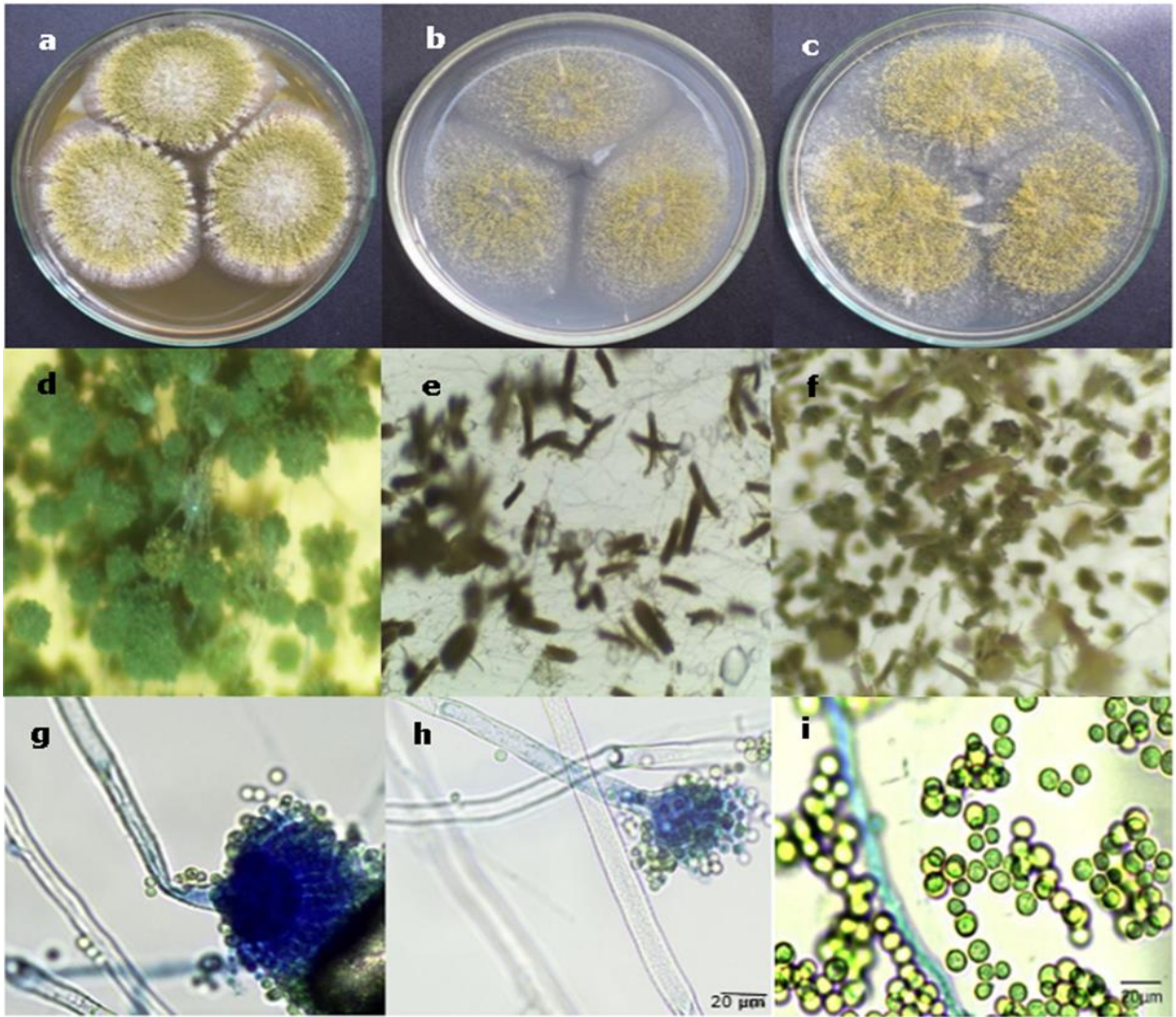
**Figura 26.** Características macroscópicas y microscópicas de aislados presuntivos de *A. flavus*

En la figura 26 se observa las características de aislados presuntivos de *Aspergillus flavus* de la colonia M7A9 en diferente agar MEA, CYA, YES y CREA a 25 °C por 7 días; (a, b, c) características macroscópicas; (d, e, f) textura de las colonias cultivados en agar MEA, CYA, YES y CREA a 25 °C por 7 días; (g, h, i) cultivados en agar YES a 25 °C por 7 días; (g, h) vesícula, conidióforo, fiálide barra = 20 μm; (i) conidios barra = 20 μm.



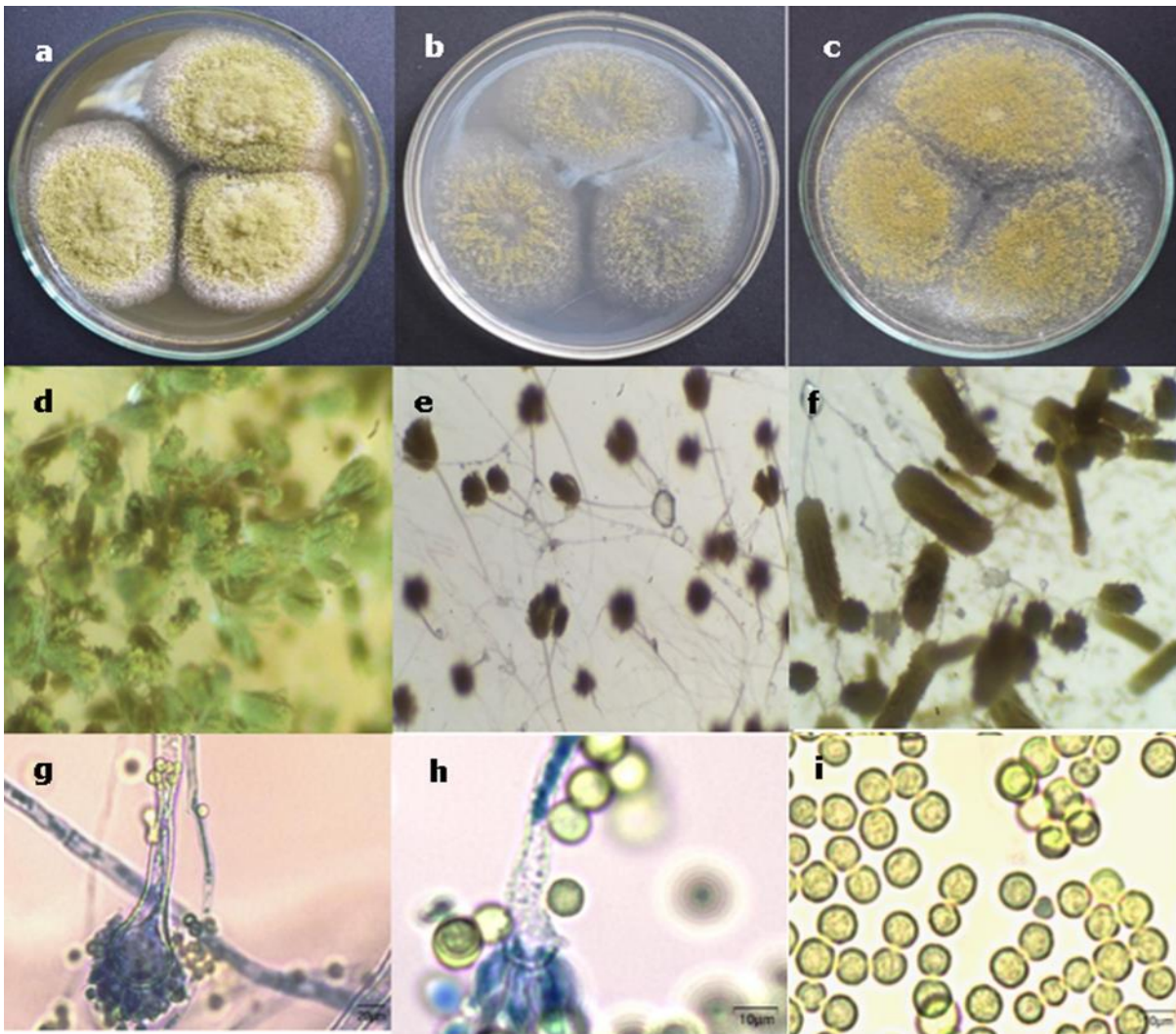
**Figura 27.** Características macroscópicas y microscópicas de aislados presuntivos de *A. flavus*

En la figura 27 se observa las características de aislados presuntivos de *Aspergillus flavus* de la colonia M13A10 en diferente agar MEA, CYA, YES y CREA a 25 °C por 7 días; (a, b, c) características macroscópicas; (d, e, f) textura de las colonias cultivados en agar MEA, CYA, YES y CREA a 25 °C por 7 días; (g, h, i) cultivados en agar YES a 25 °C por 7 días; (g, h) vesícula, conidióforo, fiálide barra = 10 µm; (i) conidios barra = 20 µm.



**Figura 28.** Características macroscópicas y microscópicas de aislados presuntivos de *A. flavus*

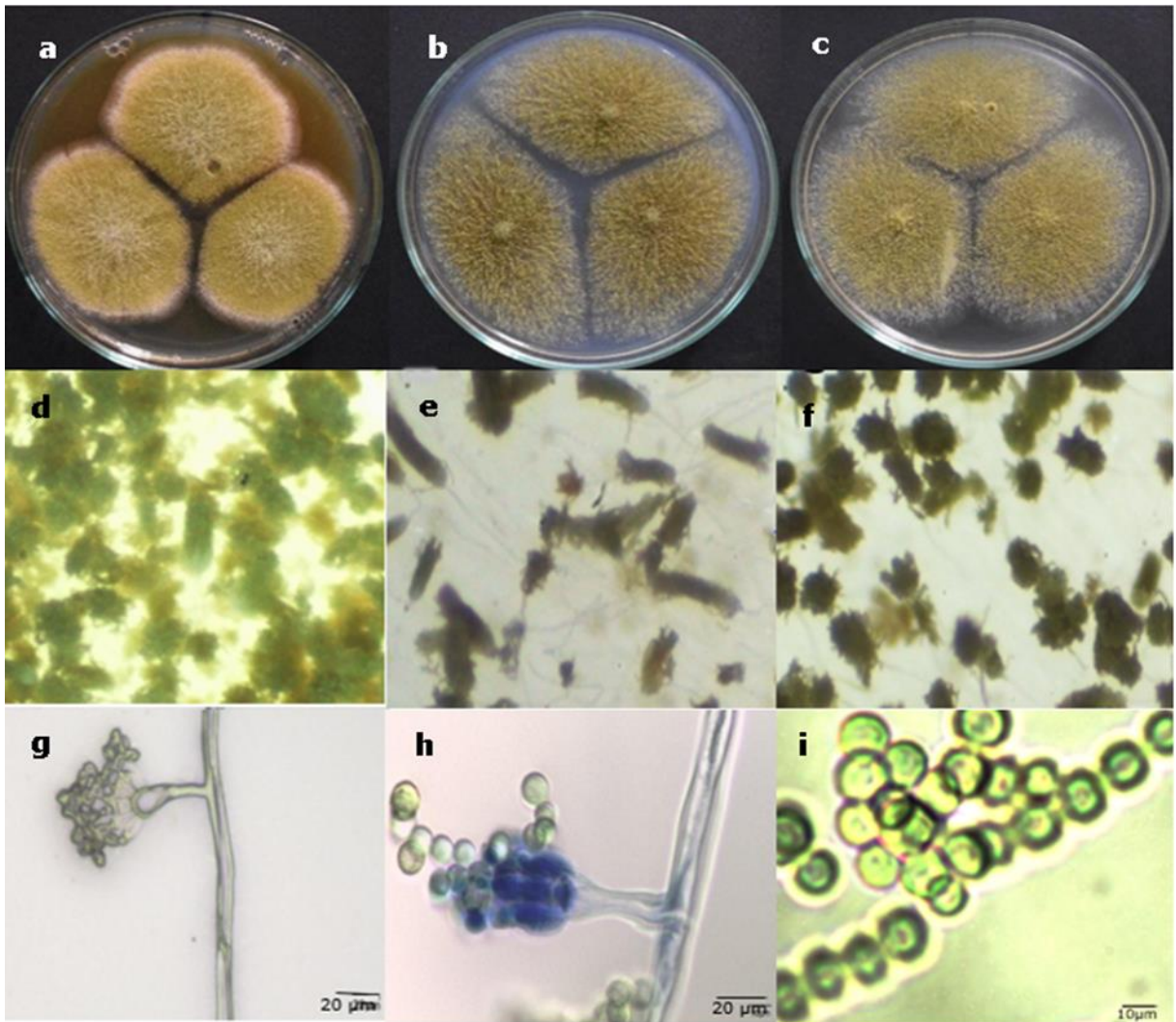
En la figura 28 se observa las características de aislados presuntivos de *Aspergillus flavus* de la colonia M13A11 en diferente agar MEA, CYA, YES y CREA a 25 °C por 7 días; (a, b, c) características macroscópicas; (d, e, f) textura de las colonias cultivados en agar MEA, CYA, YES y CREA a 25 °C por 7 días; (g, h, i) cultivados en agar YES a 25 °C por 7 días; (g, h) vesícula, conidióforo, filide barra = 20 µm; (i) conidios barra = 10 µm.



**Figura 29.** Características macroscópicas y microscópicas de aislados presuntivos de *A. flavus*

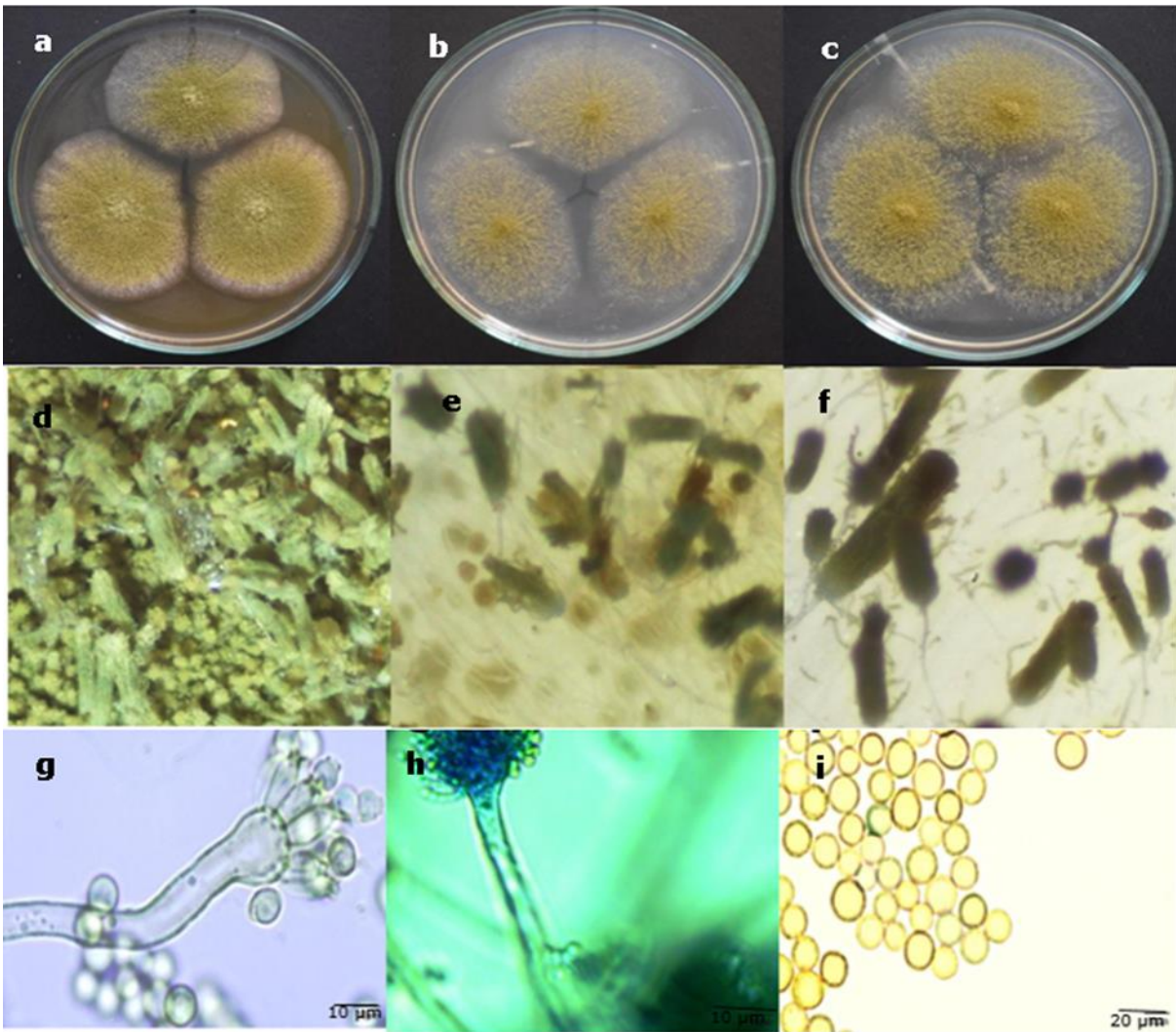
En la figura 29 se observa las características de aislados presuntivos de *Aspergillus flavus* de la colonia M13A12 en diferente agar MEA, CYA, YES y CREA a 25 °C por 7 días; (a, b, c) características macroscópicas; (d, e, f) textura de las colonias cultivados en agar MEA, CYA, YES y CREA a 25 °C por 7 días; (g, h, i) cultivados en agar YES a 25 °C por 7 días; (g, h) vesícula, conidióforo, fiálide barra = 10 μm; (i) conidios barra = 10 μm.





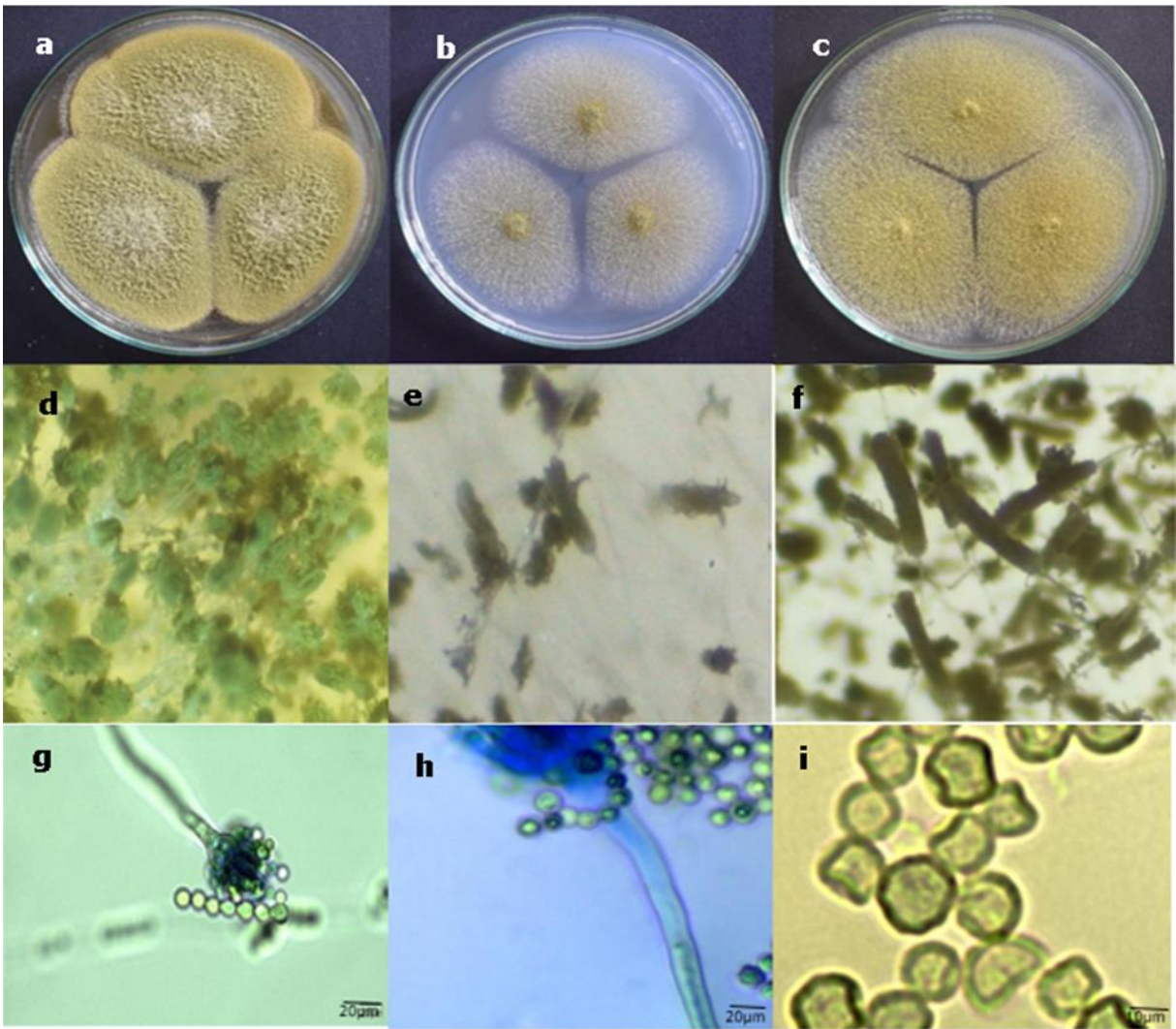
**Figura 30.** Características macroscópicas y microscópicas de aislados presuntivos de *A. flavus*

En la figura 30 se observa las características de aislados presuntivos de *Aspergillus flavus* de la colonia M13A13 en diferente agar MEA, CYA, YES y CREA a 25 °C por 7 días; (a, b, c) características macroscópicas; (d, e, f) textura de las colonias cultivados en agar MEA, CYA, YES y CREA a 25 °C por 7 días; (g, h, i) cultivados en agar YES a 25 °C por 7 días; (g, h) vesícula, conidióforo, fialide barra = 20 µm; (i) conidios barra = 10 µm.



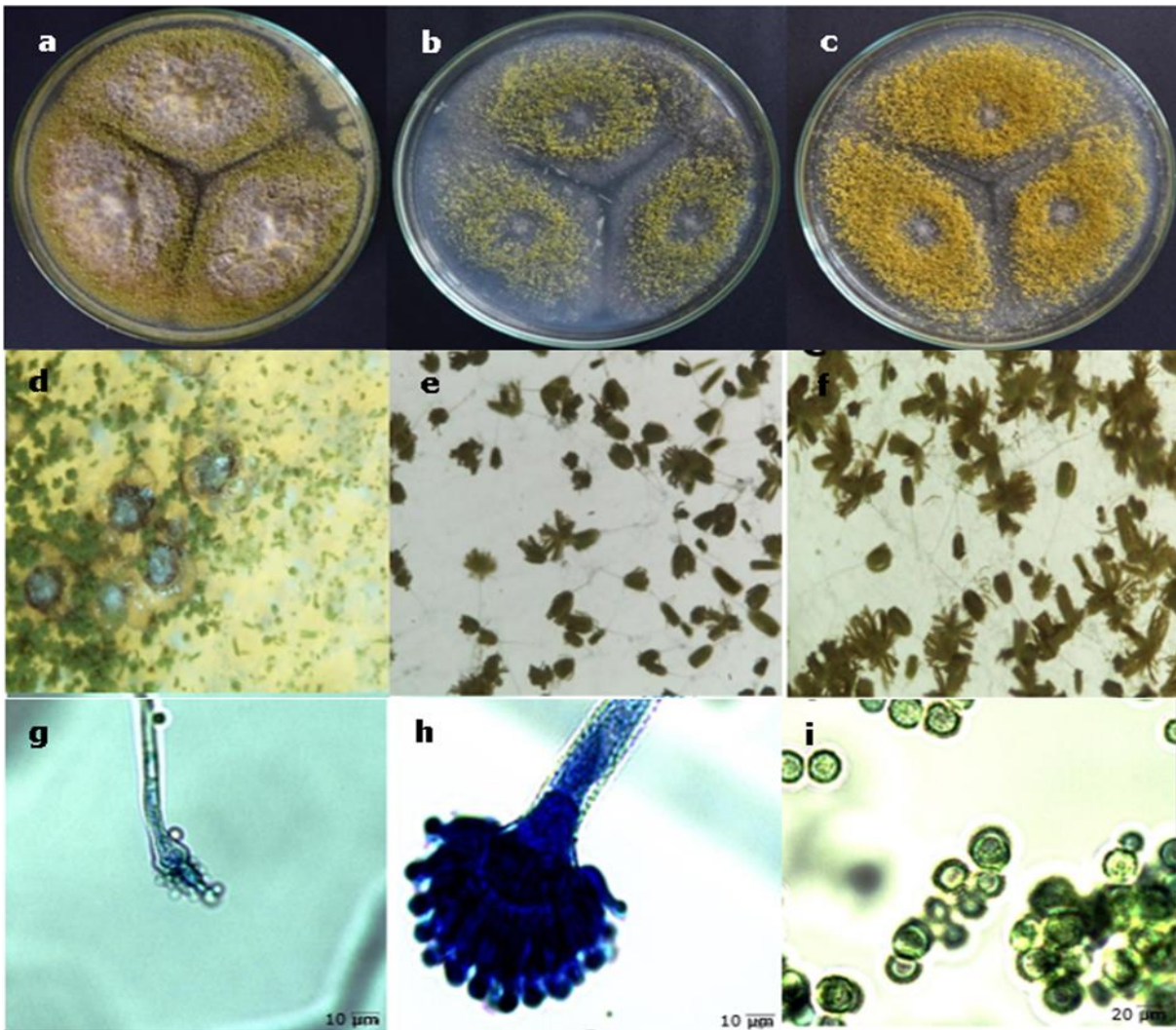
**Figura 31.** Características macroscópicas y microscópicas de aislados presuntivos de *A. flavus*

En la figura 31 se observa las características de aislados presuntivos de *Aspergillus flavus* de la colonia M13A14 en diferente agar MEA, CYA, YES y CREA a 25 °C por 7 días; (a, b, c) características macroscópicas; (d, e, f) textura de las colonias cultivados en agar MEA, CYA, YES y CREA a 25 °C por 7 días; (g, h, i) cultivados en agar YES a 25 °C por 7 días; (g, h) vesícula, conidióforo, fiálide barra = 10 µm; (i) conidios barra = 20 µm.



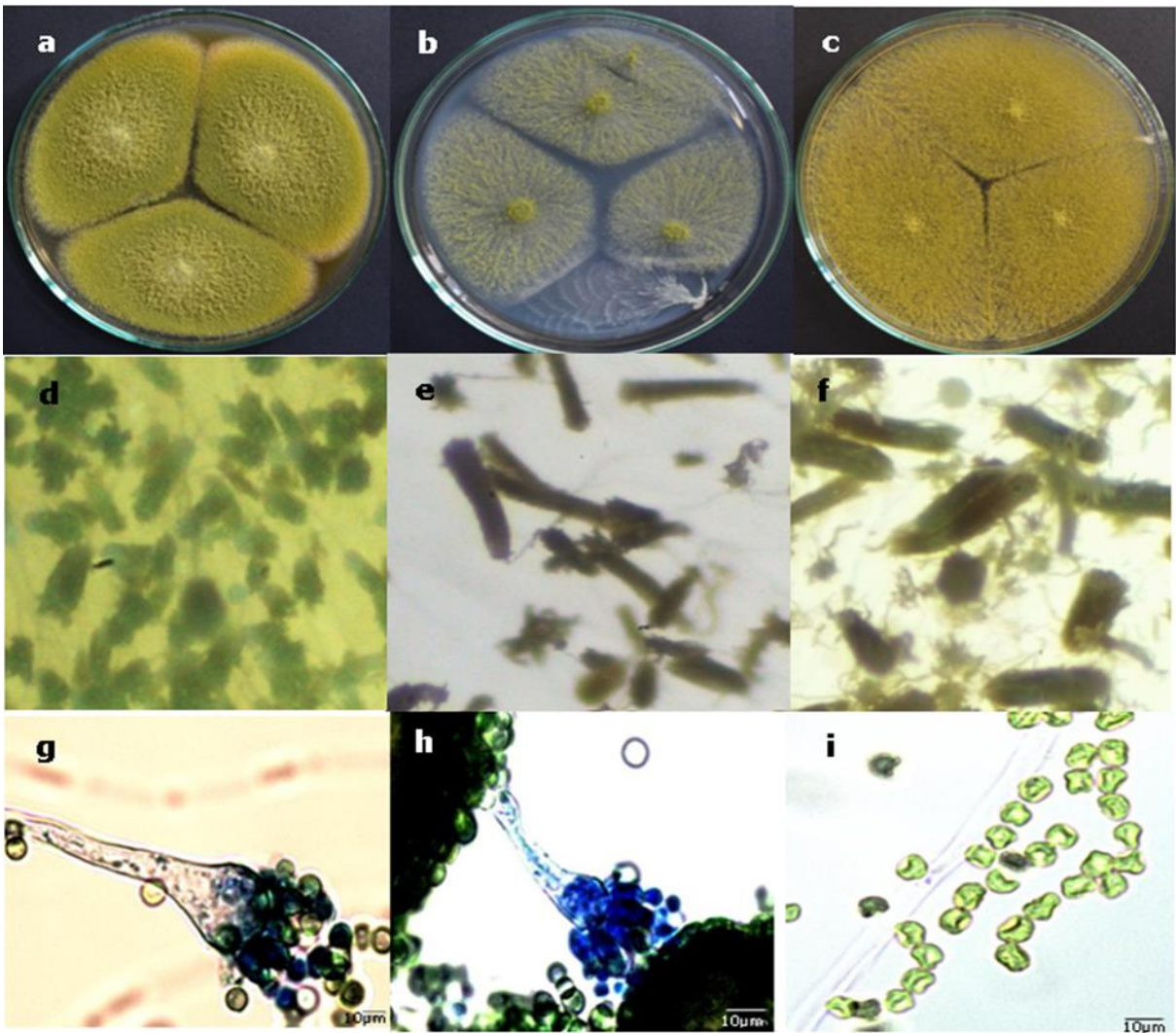
**Figura 32.** Características macroscópicas y microscópicas de aislados presuntivos de *A. flavus*

En la figura 32 se observa las características de aislados presuntivos de *Aspergillus flavus* de la colonia M13A15 en diferente agar MEA, CYA, YES y CREA a 25 °C por 7 días; (a, b, c) características macroscópicas; (d, e, f) textura de las colonias cultivados en agar MEA, CYA, YES y CREA a 25 °C por 7 días; (g, h, i) cultivados en agar YES a 25 °C por 7 días; (g, h) vesícula, conidióforo, fiálide barra = 20 µm; (i) conidios barra = 10 µm.



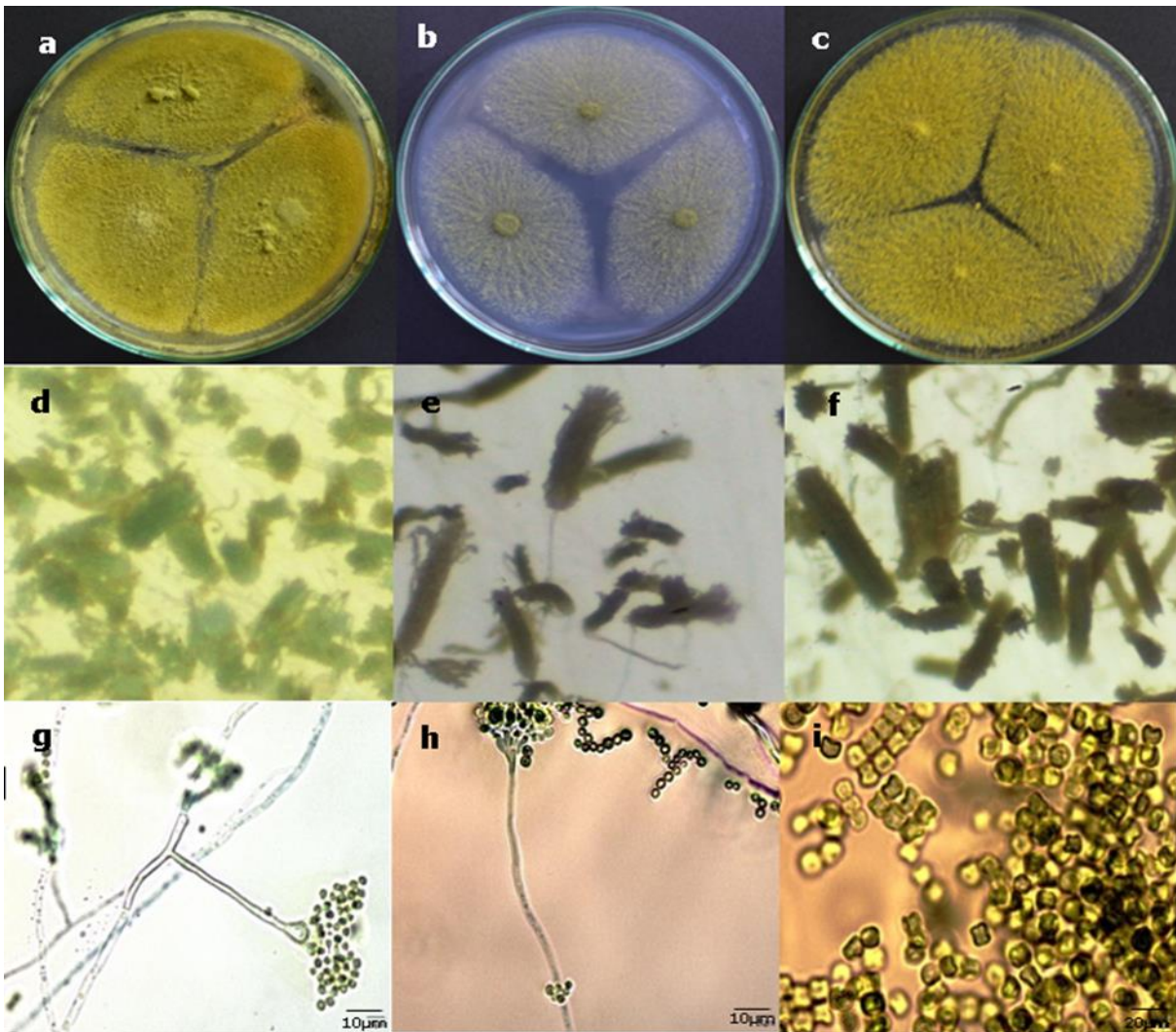
**Figura 33.** Características macroscópicas y microscópicas de aislados presuntivos de *A. flavus*

En la figura 33 se observa las características de aislados presuntivos de *Aspergillus flavus* de la colonia M13A16 en diferente agar MEA, CYA, YES y CREA a 25 °C por 7 días; (a, b, c) características macroscópicas; (d, e, f) textura de las colonias cultivados en agar MEA, CYA, YES y CREA a 25 °C por 7 días; (g, h, i) cultivados en agar YES a 25 °C por 7 días; (g, h) vesícula, conidióforo, fiálide barra = 10 µm; (i) conidios barra = 20 µm.



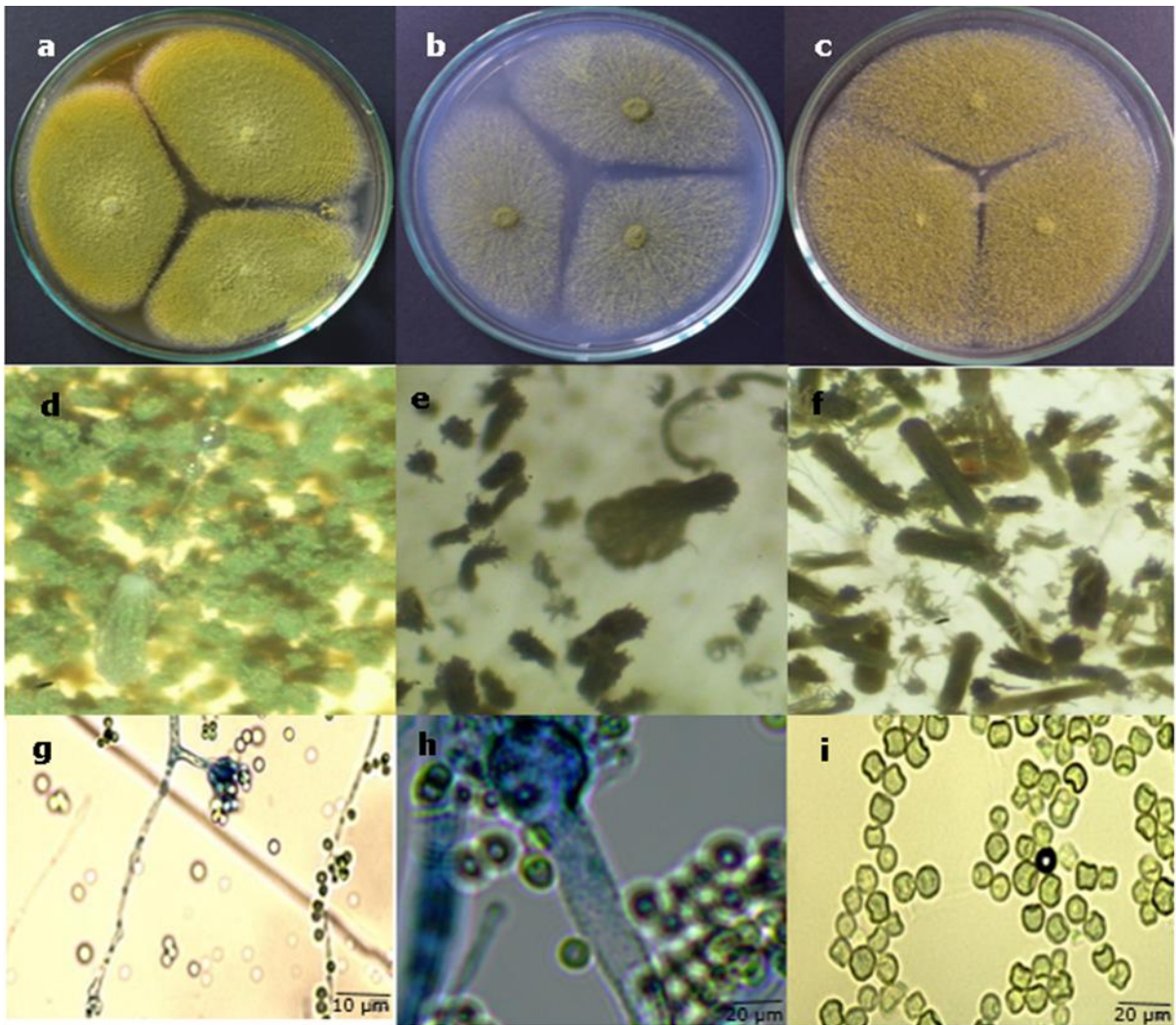
**Figura 34.** Características macroscópicas y microscópicas de aislados presuntivos de *A. flavus*

En la figura 34 se observa las características de aislados presuntivos de *Aspergillus flavus* de la colonia M14A17 en diferente agar MEA, CYA, YES y CREA a 25 °C por 7 días; (a, b, c) características macroscópicas; (d, e, f) textura de las colonias cultivados en agar MEA, CYA, YES y CREA a 25 °C por 7 días; (g, h, i) cultivados en agar YES a 25 °C por 7 días; (g, h) vesícula, conidióforo, fiálide barra = 10 μm; (i) conidios barra = 10 μm.



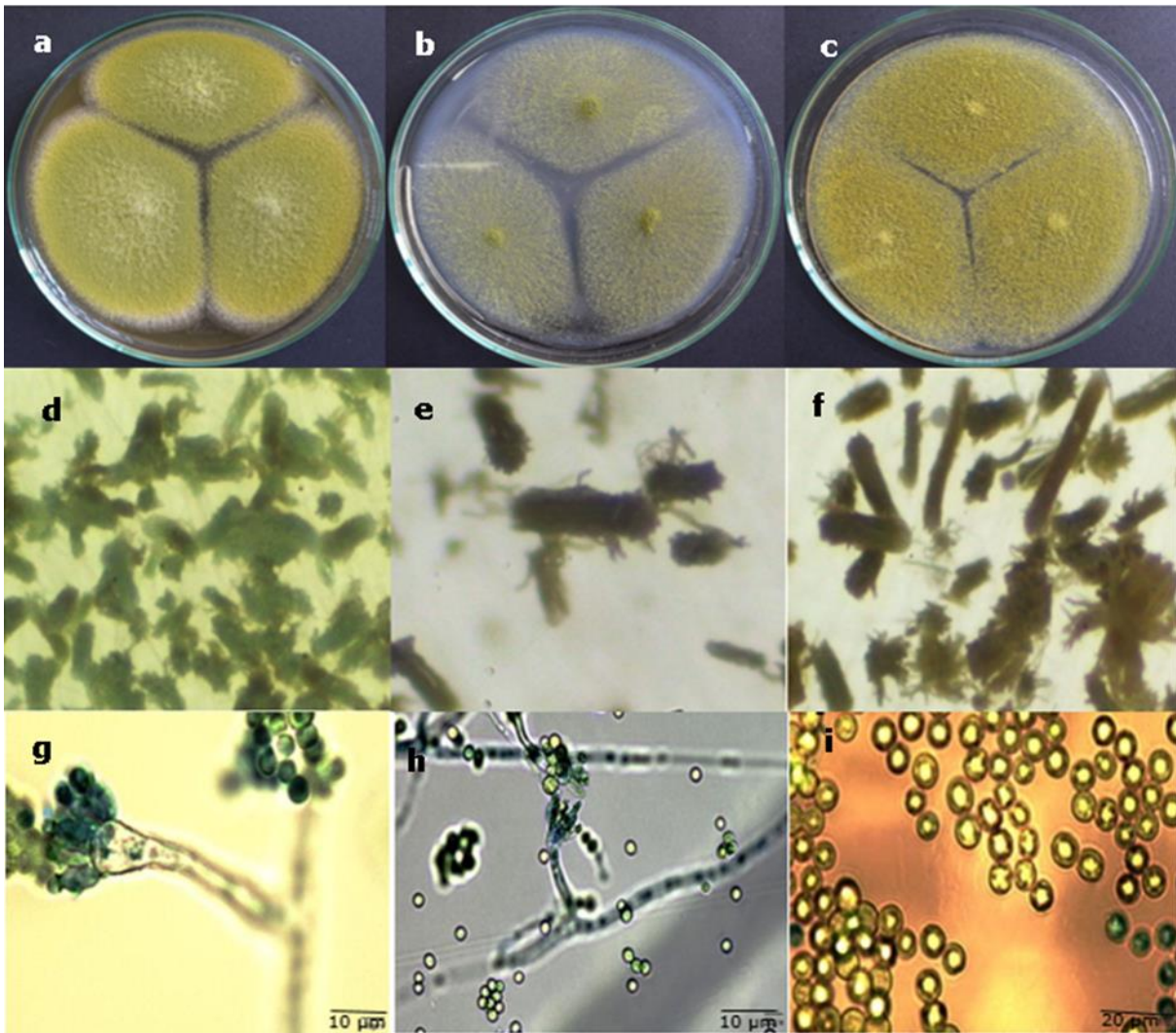
**Figura 35.** Características macroscópicas y microscópicas de aislados presuntivos de *A. flavus*

En la figura 35 se observa las características de aislados presuntivos de *Aspergillus flavus* de la colonia M14A18 en diferente agar MEA, CYA, YES y CREA a 25 °C por 7 días; (a, b, c) características macroscópicas; (d, e, f) textura de las colonias cultivados en agar MEA, CYA, YES y CREA a 25 °C por 7 días; (g, h, i) cultivados en agar YES a 25 °C por 7 días; (g, h) vesícula, conidióforo, fiálide barra = 10 µm; (i) conidios barra = 20 µm.



**Figura 36.** Características macroscópicas y microscópicas de aislados presuntivos de *A. flavus*

En la figura 36 se observa las características de aislados presuntivos de *Aspergillus flavus* de la colonia M14A19 en diferente agar MEA, CYA, YES y CREA a 25 °C por 7 días; (a, b, c) características macroscópicas; (d, e, f) textura de las colonias cultivados en agar MEA, CYA, YES y CREA a 25 °C por 7 días; (g, h, i) cultivados en agar YES a 25 °C por 7 días; (g, h) vesícula, conidióforo, fialide barra = 10 µm; (i) conidios barra = 20 µm.

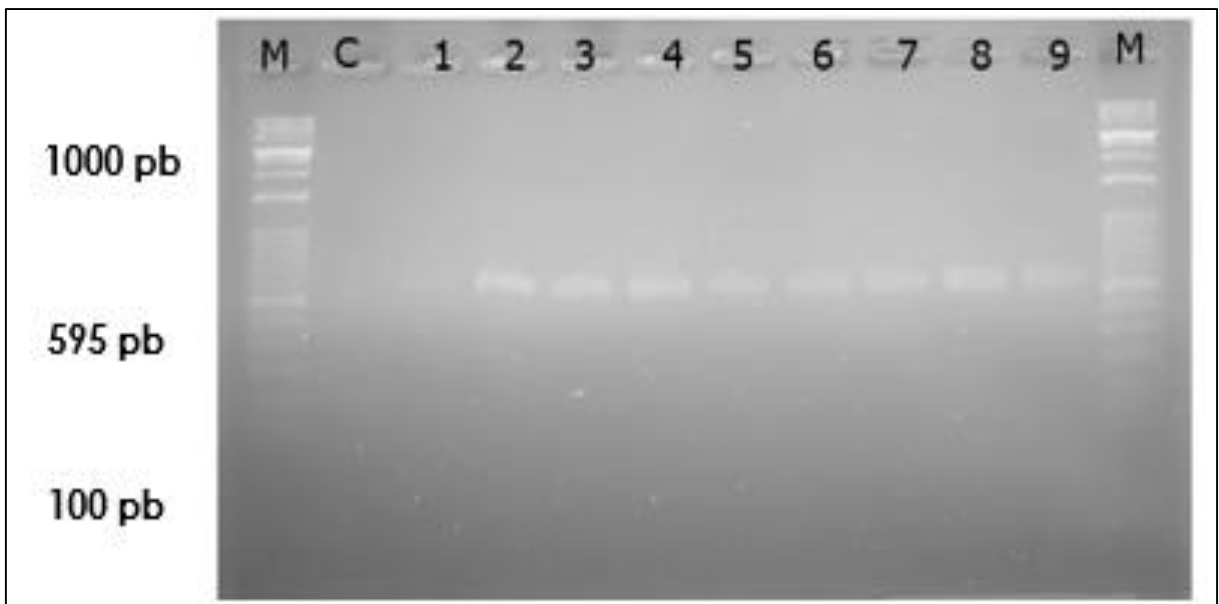


**Figura 37.** Características macroscópicas y microscópicas de aislados presuntivos de *A. flavus*

En la figura 37 se observa las características de aislados presuntivos de *Aspergillus flavus* de la colonia M14A120 en diferente agar MEA, CYA, YES y CREA a 25 °C por 7 días; (a, b, c) características macroscópicas; (d, e, f) textura de las colonias cultivados en agar MEA, CYA, YES y CREA a 25 °C por 7 días; (g, h, i) cultivados en agar YES a 25 °C por 7 días; (g, h) vesícula, conidióforo, fiálide barra = 10 µm; (i) conidios barra = 20 µm.

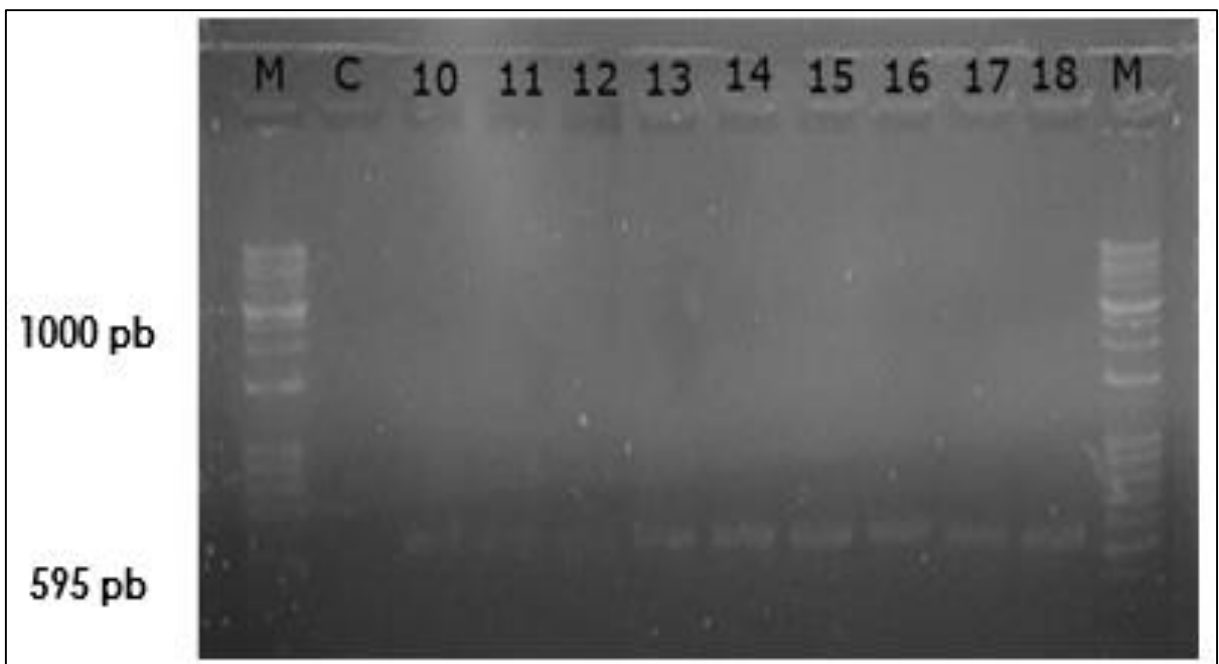
En la figura 38 a 40 se observa el gel de electroforesis de los 20 aislados presuntivos de *Aspergillus flavus*, los cuales fueron identificados mediante el primer ITS1/ITS4, se observa que el tamaño del amplicón de 595pb





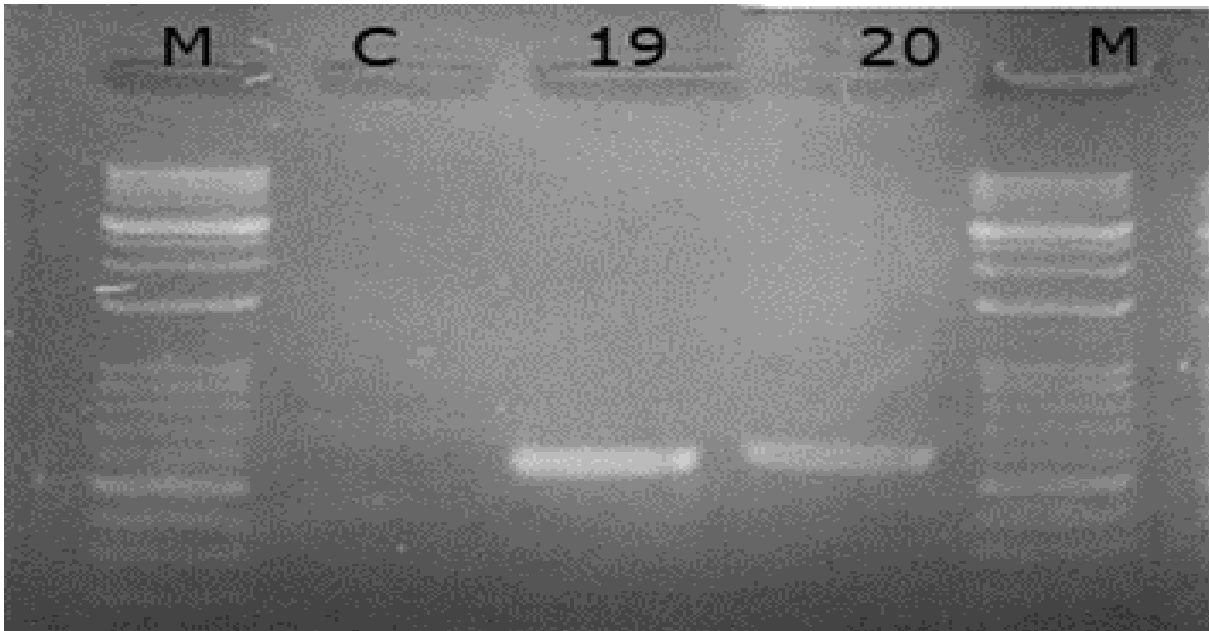
**Figura 38.** Electroforesis de las muestras presuntivas de *A. flavus*

En la figura 38 se observa el gel de electroforesis de la amplificación de la región ITS1-ITS4 de las colonias presuntivas 1 - 9 correspondientes a las muestras M1, M5 y M7 de *Aspergillus flavus* con banda de 595 pb. C: control, M: marcador.



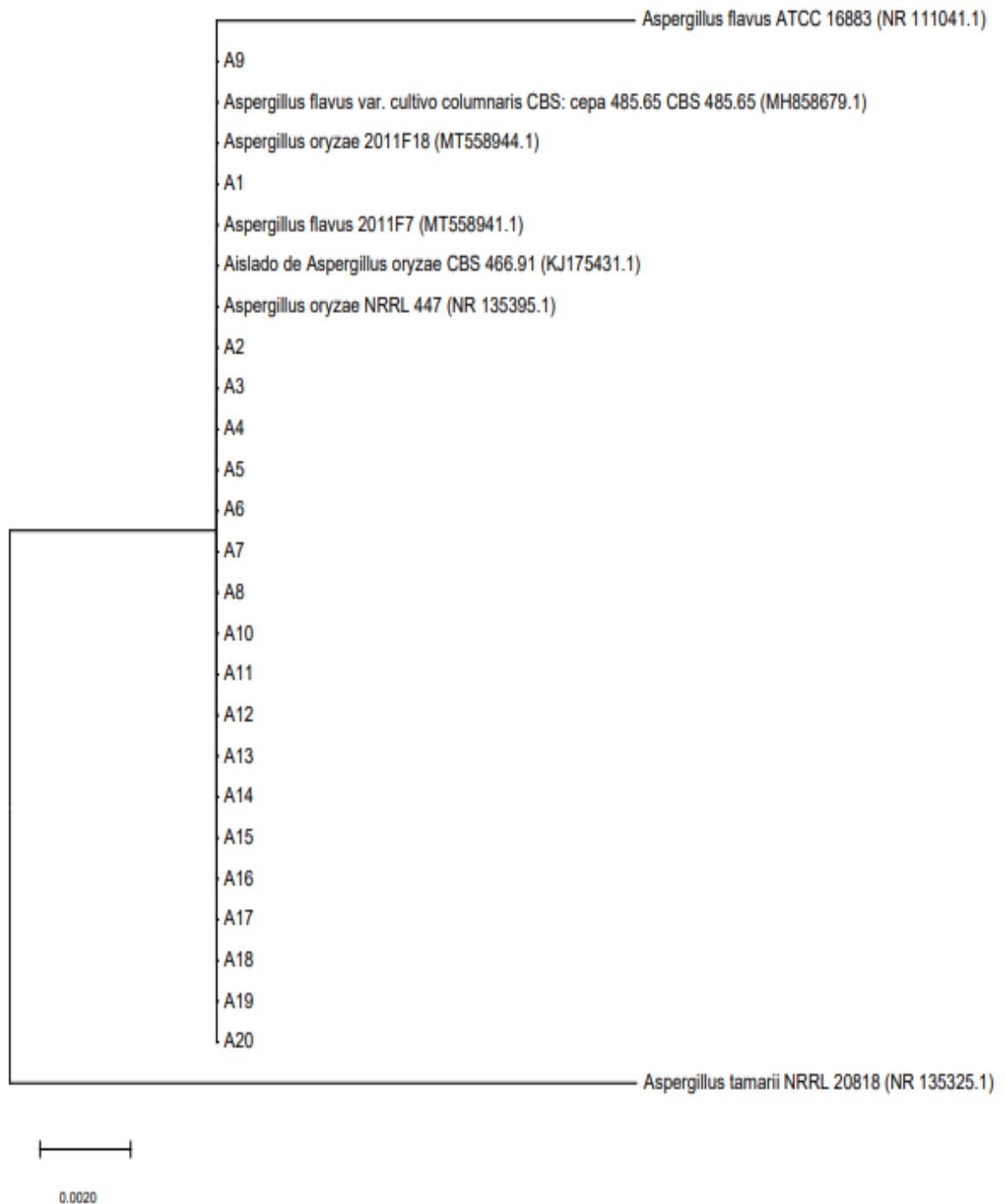
**Figura 39.** Electroforesis de las muestras presuntivas de *A. flavus*

En la figura 39 se observa el Gel de electroforesis de la Amplificación de la región ITS1-ITS4 de las colonias presuntivas 10-18 correspondientes a las muestras M13 y M14 de *Aspergillus flavus* con banda de 595 pb. C: control, M: marcador.



**Figura 40.** Electroforesis de las muestras presuntivas de *A. flavus*

En la figura 40 se observa Gel de electroforesis de la Amplificación de la región ITS1-ITS4 de las colonias presuntivas 19 - 20 correspondientes a la muestra M14 de *Aspergillus flavus* con banda de 595 pb. C: control, M: marcador.



**Figura 41.** El Árbol filogenético indica que los 20 aislados presuntivos de *A. flavus* alinean con el género *Aspergillus flavus* y *A. oryzae* con un 56% de compatibilidad.

En la figura 41 se observa el árbol filogenético realizado en Mega11 Software con secuenciaciones concatenadas de ITS1 - ITS4 de para 20 aislados presuntivos de *Aspergillus flavus* en harina de trigo.

Se extrae el ADN mediante una prueba molecular PCR, los 20 aislados presuntivos de *A. flavus* fueron identificados mediante primers específicos: ITS1 - ITS4 dando como resultado la amplificación, un peso molecular de 595 pb. Lo confirma Legna (2017) en su estudio "Caracterización Fisiológica y molecular de mohos aflatoxigénicos" que para identificar algunas cepas del género *Aspergillus* utilizó amplicones: ITS1 e ITS2 (cepas 1 a 10) y obtuvo un peso molecular de 500 pb. Afirma también que uno de los primeros pasos para una correcta identificación molecular es la obtención de cultivos monospóricos, colonias provenientes de una única especie.

Arrúa et al., (2019) informa que las pruebas moleculares son mucho más rápidas. Por otro lado Geiser (2020) indica que para ensayar una prueba PCR es obligado a definir los genes a estudiar. En hongos hay regiones del ADN que pueden usarse para identificar, solo con el nivel taxonómico que se quiera llegar. A nivel de reino pueden utilizarse exones de genes conservados; a nivel familia, genes mitocondriales; a nivel de especie, espaciadores transcritos internos del ADN ribosomal; y a nivel de poblaciones, técnicas RAPD o microsatélites.

En las muestras de harina de trigo analizadas mediante la técnica de PCR se logró identificar a nivel de especie aislados presuntivos de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus oryzae*, su presencia implica una contaminación ya que producen micotoxinas, las cuales son perjudiciales para el organismo del consumidor.

Es indispensable la realización del análisis microbiológico en la harina de trigo, por que nos permite identificar los diversos tipos de hongos y sus micotoxinas, debido a que es una de las materias primas para la elaboración de diversos productos de panificación.

Es bueno o no, esto nos permite conocer que las harinas de trigo que se expenden en la ciudad de Tulcan presentan una contaminación de hongos *Aspergillus flavus* y *Aspergillus oryzae*, para lo cual se recomienda mantener un buen manejo de almacenamiento.

En las tablas 13 y 14 se muestran los resultados del análisis de aflatoxinas por el método de Elisa, en donde se puede observar que el valor de las muestras analizadas estuvo por debajo de los 5ppb.

**Tabla 21.** Resultados del análisis y cuantificación de aflatoxinas en 10 aislados presuntivos de *Aspergillus flavus* de harina de trigo por duplicado para ver si la ausencia o presencia de estas micotoxinas mediante el equipo de electrofotómetro por el método de Elisa

<b>Muestra</b>	<b>Densidades ópticas</b>	<b>Ppb</b>	<b>Nivel máximo permitido con norma (20 ppb)</b>
1	0,701	Menor a 5	Cumple
2	0,909	Menor a 5	Cumple
3	0,702	Menor a 5	Cumple
4	0,952	Menor a 5	Cumple
5	1,003	Menor a 5	Cumple
6	0,840	Menor a 5	Cumple
7	0,933	Menor a 5	Cumple
8	1,012	Menor a 5	Cumple
9	2,415	Menor a 5	Cumple
10	2,321	Menor a 5	Cumple
1	1,327	Menor a 5	Cumple
2	2,338	Menor a 5	Cumple
3	1,705	Menor a 5	Cumple
4	2,744	Menor a 5	Cumple
5	3,501	Menor a 5	Cumple
6	2,798	Menor a 5	Cumple
7	2,666	Menor a 5	Cumple
8	2,459	Menor a 5	Cumple
9	3,022	Menor a 5	Cumple
10	2,257	Menor a 5	Cumple

**Tabla 22.** Muestras de harina donde se realizaron la cuantificación de aflatoxinas para ver si hay presencia o ausencia de estas micotoxinas mediante electroforesis por el método de Elisa

Muestra	Densidades ópticas	Ppb	Nivel máximo permitido con norma (20 ppb)
11	1,726	Menor a 5	Cumple
12	2,697	Menor a 5	Cumple
13	1,959	Menor a 5	Cumple
14	1,664	Menor a 5	Cumple
15	1,776	Menor a 5	Cumple
16	0,572	Menor a 5	Cumple
17	1,636	Menor a 5	Cumple
18	1,468	Menor a 5	Cumple
19	1,219	Menor a 5	Cumple
20	1,481	Menor a 5	Cumple
11	1,619	Menor a 5	Cumple
12	1,863	Menor a 5	Cumple
13	1,453	Menor a 5	Cumple
14	1,629	Menor a 5	Cumple
15	1,507	Menor a 5	Cumple
16	1,296	Menor a 5	Cumple
17	1,055	Menor a 5	Cumple
18	1,117	Menor a 5	Cumple
19	0,938	Menor a 5	Cumple
20	0,917	Menor a 5	Cumple

Se identificó la producción de aflatoxinas en los 20 aislados presuntivos de *A. flavus* sembrados en agar coco, ninguna dio positiva, ya que, al añadir amoníaco, no se observó tonalidades rosas al reverso de la placa, siendo este color el indicativo para esta prueba. Según Corry et al., (2017) describe al agar AFPA como un medio selectivo para hongos productores de micotoxinas en alimentos *A. flavus* y *A. parasiticus*. La característica principal que ayuda a reconocer colonias de *A. flavus* en 48 horas a 30°C es por el color.

El análisis de aflatoxinas se cuantificó mediante el método de Elisa competitiva directa, dando como resultado de las 20 colonias, niveles bajos de aflatoxinas. Los niveles fueron menores a 5 ppb según el manual, de igual manera lo argumenta Mejía, Alvarado, & Vásquez (2018) que confirma que en 15 muestras de harina de trigo los niveles de aflatoxina fueron 0 ppb, para ambos estudios estos valores no superan el nivel máximo permitido para alimentos de consumo humano de 20 ppb por la norma americana Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA). Son varios los problemas que generan que estos alimentos se contaminen y produzcan estas sustancias toxigénicas, según el autor para que haya presencia de aflatoxinas la más común de tipo B1 originada por el género *Aspergillus*, viene dado desde las condiciones del medio ambiente (tropicales) en el campo y en la fertilización del suelo, como también después de la post cosecha durante el almacenamiento

(temperatura adecuada 20°C) u otros contaminantes físicos y biológicos como maquinaria, insectos y microorganismos.

Se realizó el análisis de aflatoxinas debido a que hay diferentes hongos que pueden producir aflatoxinas además de *Aspergillus flavus*, sin embargo los valores encontrados dieron por debajo de 5ppb, este valor indica que los derivados de estas harinas como productos horneados son inocuos, encontrándose bajo los niveles reportados por la norma Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA).

Los análisis obtenidos en las muestras de harina recolectadas en la ciudad de Tulcán muestran baja incidencia de contaminación por *Aspergillus flavus* debido a esto no hay producción de aflatoxinas en las muestras de harinas por ende el consumo de este alimento es inocuo y no va a causar daño a la población de la ciudad.

## V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1. CONCLUSIONES

- En este estudio los medios de cultivo y características macroscópicas y microscópicas ayudó a la identificación de aislados presuntivos del género *Aspergillus*. El uso de la PCR permitió una identificación molecular de estos aislados, la combinación de identificación morfológica y secuenciación de ITS ayuda a identificar de manera confiable aislados de *Aspergillus* a nivel de especie, de tal manera que en el árbol filogenético mostró una parentalidad del 56% de las muestras con *A. flavus* y *A. oryzae*. La cuantificación de aislados presuntivos productores de aflatoxinas se identificó mediante siembra en coco agar, mostrando que los aislados no producen aflatoxinas. La identificación de estos hongos nos ayuda a descartar si existe contaminación.
- Se determinó y cuantificó la concentración de la AFB1 en la harina de trigo expendida en la ciudad de Tulcán por medio de la técnica ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA) competitivo directo. Se halló que todas las muestras analizadas presentaron una contaminación menor que 5 ppb con AFB1.
- Los niveles de aflatoxinas en las muestras de harina de trigo no son relevantes ni perjudiciales para el consumidor, siendo inocuo el alimento y útil para diferentes procesos industriales.
- Se desarrolló un manual que permite un buen manejo y control de almacenamiento de las harinas de trigo en el cual se detalla: el adecuado mantenimiento de instalaciones y equipos, recepción de materias primas, fuentes de contaminación, enfermedades transmitidas por alimentos, higiene de personal, control de plagas, entre otras especificaciones. Siendo de ayuda para mantener un adecuado control de agentes patógenos que perjudican la salud del consumidor.



## **5.2. RECOMENDACIONES**

- Completar la identificación de hongos a través de otras técnicas como Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP).
- Trabajar con capacitaciones al personal acerca de las buenas prácticas de manufactura a través de charlas con sus respectivos temas con el objetivo de exponer la importancia de la aplicación de estas prácticas dentro de la actividad diaria.
- El control de micotoxinas debe ser un programa "Control integrado" que está dentro de las medidas preventivas en las etapas de producción de los alimentos, esta medida debe ser ejecutada obligatoriamente en las siguientes etapas: cultivo de las materias primas, periodo de cosecha, almacenamiento, como transporte y distribución.

### 5.3. MANUAL



## Índice

5.3.1. Mantenimiento de las Instalaciones y Equipos .....	122
5.3.2. Recepción de Materias Primas.....	123
5.3.3. Almacenamiento de Materias Primas y producto terminado .....	126
5.3.4. Aseguramiento y control de calidad de la harina de trigo.....	129
5.3.5. Buenas prácticas de manufactura.....	130
5.3.6. Enfermedades Transmitidas por Alimentos.....	132
5.3.7. Contaminación de Harina de Trigo y Fuentes de Contaminación.....	135
5.3.8. Higiene del personal.....	137
5.3.9. Control de plagas.....	138
5.3.10. Control de productos químicos.....	139
5.3.11. Control de residuos.....	141

### **5.3.1. Mantenimiento de las Instalaciones y Equipos**

El mantenimiento de las instalaciones y equipos para una fábrica expendio de la harina de trigo es fundamental para garantizar la seguridad de los trabajadores, la calidad del producto y la eficiencia de la producción.

Los siguientes son los principales aspectos a tomar en cuenta para el mantenimiento de las instalaciones y equipos de una fábrica expendio de la harina de trigo:

- **Planificación:** Es importante contar con un plan de mantenimiento preventivo que incluya las tareas y plazos a realizar. Este plan debe ser elaborado por un profesional calificado que tenga en cuenta las características específicas de la fábrica y sus equipos.
- **Equipo de trabajo:** El equipo de mantenimiento debe estar capacitado y contar con las herramientas y equipos necesarios para realizar las tareas de manera segura y eficiente.
- **Documentación:** Es importante documentar todas las tareas de mantenimiento realizadas, incluyendo los materiales utilizados, los tiempos de ejecución y los resultados obtenidos. Esta documentación permitirá realizar un seguimiento del estado de los equipos y tomar las medidas correctivas necesarias.

Los siguientes son algunos consejos para el mantenimiento de las instalaciones y equipos de una fábrica expendio de la harina de trigo:

- **Realizar inspecciones periódicas:** Es importante realizar inspecciones periódicas de las instalaciones y equipos para detectar cualquier anomalía o daño que pueda provocar un accidente o un mal funcionamiento.
- **Realizar mantenimiento preventivo:** El mantenimiento preventivo es la mejor forma de evitar averías y prolongar la vida útil de los equipos.
- **Realizar mantenimiento correctivo:** El mantenimiento correctivo debe realizarse de forma inmediata para evitar que el daño se agrave.

Manual de mantenimiento:

El manual de mantenimiento es un documento que contiene toda la información necesaria para el mantenimiento de las instalaciones y equipos de una fábrica expendio de la harina de trigo. Este documento debe incluir los siguientes elementos:

- Introducción: Descripción general del manual y sus objetivos.
- Planificación: Descripción del plan de mantenimiento preventivo.
- Procedimientos: Descripción de las tareas de mantenimiento preventivo y correctivo.
- Inspecciones: Descripción de los procedimientos para realizar inspecciones periódicas.
- Herramientas y equipos: Descripción de las herramientas y equipos necesarios para realizar el mantenimiento.
- Documentación: Descripción de los procedimientos para documentar las tareas de mantenimiento.

El manual de mantenimiento debe ser elaborado por un profesional calificado y debe estar disponible para todos los trabajadores involucrados en el mantenimiento de las instalaciones y equipos.

El mantenimiento de las instalaciones y equipos para una fábrica expendio de la harina de trigo es una tarea fundamental para garantizar la seguridad, la calidad y la eficiencia de la producción.

### **5.3.2. Recepción de Materias Primas**

El objetivo de este manual es establecer los procedimientos para la recepción de materias primas en una fábrica de expendio de harinas de trigo. Estos procedimientos están diseñados para garantizar la calidad, la seguridad y la eficiencia de la recepción de materias primas.

#### Alcance

Este manual aplica a todas las materias primas que ingresan a una fábrica de expendio de harinas de trigo.

#### Responsabilidades

El responsable de la recepción de materias primas es el jefe de producción. El personal de recepción es responsable de seguir los procedimientos establecidos en este manual.

#### Procedimientos

##### 1. Inspección de la documentación

El personal de recepción debe inspeccionar la documentación que acompaña a la materia prima, como la factura, el certificado de calidad y el certificado de origen. La documentación debe verificarse para asegurarse de que la materia prima cumple con los requisitos especificados.

## 2. Inspección visual

El personal de recepción debe inspeccionar visualmente la materia prima para detectar cualquier anomalía o daño. La inspección visual debe realizarse de acuerdo con los procedimientos establecidos por el fabricante de la materia prima.

## 3. Muestreo

El personal de recepción debe tomar una muestra de la materia prima para realizar análisis de laboratorio. Los análisis de laboratorio deben realizarse para verificar la calidad de la materia prima.

## 4. Almacenamiento

La materia prima que cumple con los requisitos especificados debe almacenarse en un área adecuada. El almacenamiento debe realizarse de acuerdo con las instrucciones del fabricante de la materia prima.

## 5. Registros

El personal de recepción debe registrar todas las actividades de recepción de materias primas. Los registros deben incluir la información siguiente:

- Fecha de recepción
- Proveedor
- Tipo de materia prima
- Cantidad recibida
- Resultados de los análisis de laboratorio

Siguiendo los procedimientos establecidos en este manual, se puede garantizar la calidad, la seguridad y la eficiencia de la recepción de materias primas en una fábrica de expendio de harinas de trigo.

Inspección de la documentación

La inspección de la documentación es la primera etapa de la recepción de materias primas. El personal de recepción debe inspeccionar la siguiente documentación:

- Factura: La factura debe incluir la información siguiente:
  - Número de factura
  - Fecha de la factura
  - Proveedor
  - Tipo de materia prima
  - Cantidad recibida
- Certificado de calidad: El certificado de calidad debe indicar que la materia prima cumple con los requisitos especificados.
- Certificado de origen: El certificado de origen debe indicar el origen de la materia prima.

#### Inspección visual

La inspección visual es la segunda etapa de la recepción de materias primas. El personal de recepción debe inspeccionar la materia prima para detectar cualquier anomalía o daño. La inspección visual debe realizarse de acuerdo con los procedimientos establecidos por el fabricante de la materia prima.

#### Muestreo

El muestreo es la tercera etapa de la recepción de materias primas. El personal de recepción debe tomar una muestra de la materia prima para realizar análisis de laboratorio. Los análisis de laboratorio deben realizarse para verificar la calidad de la materia prima.

#### Almacenamiento

El almacenamiento es la cuarta etapa de la recepción de materias primas. La materia prima que cumple con los requisitos especificados debe almacenarse en un área adecuada. El almacenamiento debe realizarse de acuerdo con las instrucciones del fabricante de la materia prima.

#### Registros

El personal de recepción debe registrar todas las actividades de recepción de materias primas. Los registros deben incluir la información siguiente:

- Fecha de recepción
- Proveedor
- Tipo de materia prima
- Cantidad recibida
- Resultados de los análisis de laboratorio

Siguiendo los procedimientos establecidos en este manual, se puede garantizar la calidad, la seguridad y la eficiencia de la recepción de materias primas en una fábrica de expendio de harinas de trigo.

### **5.3.3. Almacenamiento de Materias Primas y producto terminado**

El objetivo de este manual es establecer los procedimientos para el almacenamiento de materias primas y producto terminado en una fábrica de expendio de harina de trigo. Estos procedimientos están diseñados para garantizar la calidad, la seguridad y la eficiencia del almacenamiento.

#### Alcance

Este manual aplica a todas las materias primas y producto terminado que se almacenan en una fábrica de expendio de harina de trigo.

#### Responsabilidades

El responsable del almacenamiento es el jefe de producción. El personal de almacenamiento es responsable de seguir los procedimientos establecidos en este manual.

#### Procedimientos

##### 1. Almacenamiento de materias primas

Las materias primas deben almacenarse en un área adecuada que cumpla con los siguientes requisitos:

- Limpieza: El área de almacenamiento debe estar limpia y libre de contaminantes.



- Temperatura y humedad: La temperatura y la humedad del área de almacenamiento deben ser adecuadas para el tipo de materia prima.
- Protección: El área de almacenamiento debe estar protegida de la luz solar, la lluvia y otros factores ambientales.

## 2. Almacenamiento de producto terminado

El producto terminado debe almacenarse en un área adecuada que cumpla con los siguientes requisitos:

- Limpieza: El área de almacenamiento debe estar limpia y libre de contaminantes.
- Temperatura y humedad: La temperatura y la humedad del área de almacenamiento deben ser adecuadas para el tipo de producto terminado.
- Protección: El área de almacenamiento debe estar protegida de la luz solar, la lluvia y otros factores ambientales.

## 3. Rotación de inventario

Las materias primas y el producto terminado deben rotarse de manera adecuada para evitar la pérdida de calidad. La rotación de inventario debe realizarse de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

## 4. Registros

El personal de almacenamiento debe registrar todas las actividades de almacenamiento. Los registros deben incluir la información siguiente:

- Fecha
- Tipo de material
- Cantidad
- Área de almacenamiento

Siguiendo los procedimientos establecidos en este manual, se puede garantizar la calidad, la seguridad y la eficiencia del almacenamiento de materias primas y producto terminado en una fábrica de expendio de harina de trigo.

Almacenamiento de materias primas

El almacenamiento de materias primas es una etapa importante en el proceso de producción de harina de trigo. Las materias primas deben almacenarse en un área adecuada que cumpla con los requisitos de limpieza, temperatura y humedad, y protección.

**Limpieza:** El área de almacenamiento debe estar limpia y libre de contaminantes. Esto ayudará a evitar la contaminación de las materias primas.

**Temperatura y humedad:** La temperatura y la humedad del área de almacenamiento deben ser adecuadas para el tipo de materia prima. Por ejemplo, el trigo debe almacenarse en un área fresca y seca.

**Protección:** El área de almacenamiento debe estar protegida de la luz solar, la lluvia y otros factores ambientales. Esto ayudará a mantener la calidad de las materias primas.

#### Almacenamiento de producto terminado

El almacenamiento de producto terminado es otra etapa importante en el proceso de producción de harina de trigo. El producto terminado debe almacenarse en un área adecuada que cumpla con los requisitos de limpieza, temperatura y humedad, y protección.

**Limpieza:** El área de almacenamiento debe estar limpia y libre de contaminantes. Esto ayudará a evitar la contaminación del producto terminado.

**Temperatura y humedad:** La temperatura y la humedad del área de almacenamiento deben ser adecuadas para el tipo de producto terminado. Por ejemplo, la harina de trigo debe almacenarse en un área fresca y seca.

**Protección:** El área de almacenamiento debe estar protegida de la luz solar, la lluvia y otros factores ambientales. Esto ayudará a mantener la calidad del producto terminado.

#### Rotación de inventario

La rotación de inventario es un proceso importante para evitar la pérdida de calidad de las materias primas y el producto terminado. Las materias primas y el producto terminado deben rotarse de manera adecuada para que los productos más antiguos se utilicen primero.

#### Registros

El personal de almacenamiento debe registrar todas las actividades de almacenamiento. Los registros ayudarán a mantener un seguimiento del inventario y a garantizar que las materias primas y el producto terminado se almacenen adecuadamente.

Siguiendo los procedimientos establecidos en este manual, se puede garantizar la calidad, la seguridad y la eficiencia del almacenamiento de materias primas y producto terminado en una fábrica de expendio de harina de trigo.

#### **5.3.4. Aseguramiento y control de calidad de la harina de trigo**

El aseguramiento y control de calidad (AC/CC) es un proceso continuo que se utiliza para garantizar que los productos y servicios cumplan con los requisitos establecidos. En el contexto del expendio de harina de trigo, el AC/CC es importante para garantizar que la harina sea segura, saludable y de alta calidad.

Objetivos del AC/CC en el expendio de harina de trigo:

- Garantizar la seguridad de los alimentos: El AC/CC debe ayudar a prevenir la contaminación de los alimentos por bacterias, virus, parásitos, metales pesados y otros contaminantes.
- Garantizar la salud de los consumidores: El AC/CC debe ayudar a proteger la salud de los consumidores al garantizar que la harina sea segura y saludable.
- Garantizar la calidad de la harina: El AC/CC debe ayudar a garantizar que la harina cumpla con los requisitos de calidad establecidos, como el contenido de gluten, el contenido de humedad y el contenido de nutrientes.

Componentes del AC/CC en el expendio de harina de trigo:

El AC/CC en el expendio de harina de trigo se compone de los siguientes componentes:

- Planificación: El primer paso es desarrollar un plan de AC/CC que establezca los objetivos, los procesos y los recursos necesarios.
- Implementación: El plan de AC/CC debe implementarse de manera efectiva.
- Monitoreo: El AC/CC debe monitorearse de manera regular para identificar y abordar cualquier problema.

- Acción correctiva: Si se identifica un problema, se deben tomar medidas correctivas para resolverlo.

Medidas específicas de AC/CC en el expendio de harina de trigo:

Las plantas de expendio de harina de trigo pueden implementar una serie de medidas específicas de AC/CC para garantizar la seguridad, la salud y la calidad de la harina. Estas medidas incluyen:

- Control de la calidad del agua: El agua utilizada en el proceso de producción de harina debe estar limpia y segura para el consumo humano.
- Control de la calidad del trigo: El trigo utilizado para producir harina debe estar libre de contaminantes, como pesticidas, metales pesados y hongos.
- Control de la calidad de la producción: El proceso de producción de harina debe estar diseñado para minimizar la contaminación de los alimentos.
- Control de la calidad de los productos terminados: La harina debe probarse para garantizar que cumpla con los requisitos de calidad establecidos.

Beneficios del AC/CC en el expendio de harina de trigo:

La implementación de un programa eficaz de AC/CC en el expendio de harina de trigo puede proporcionar una serie de beneficios, incluyendo:

- Protección de la salud de los consumidores: El AC/CC ayuda a prevenir la contaminación de los alimentos y proteger la salud de los consumidores.
- Mejora de la calidad de los productos: El AC/CC ayuda a garantizar que la harina cumpla con los requisitos de calidad establecidos.
- Reducción de los costos: El AC/CC puede ayudar a reducir los costos al prevenir los retiros del mercado y las demandas de responsabilidad.

El aseguramiento y control de calidad (AC/CC) es un componente esencial de la seguridad alimentaria. En el contexto del expendio de harina de trigo, el AC/CC ayuda a garantizar que la harina sea segura, saludable y de alta calidad.

### **5.3.5. Buenas prácticas de manufactura**

Las buenas prácticas de manufactura (BPM) son un conjunto de principios y procedimientos que se utilizan para garantizar la seguridad, la calidad y la inocuidad

de los alimentos. En el contexto del expendio de harinas de trigo, las BPM ayudan a prevenir la contaminación de los alimentos y proteger la salud de los consumidores.

Objetivos de las BPM en el expendio de harinas de trigo:

Los objetivos de las BPM en el expendio de harinas de trigo son:

Garantizar la seguridad de los alimentos: Las BPM deben ayudar a prevenir la contaminación de los alimentos por bacterias, virus, parásitos, metales pesados y otros contaminantes.

Garantizar la salud de los consumidores: Las BPM deben ayudar a proteger la salud de los consumidores al garantizar que la harina sea segura y saludable.

Garantizar la calidad de la harina: Las BPM deben ayudar a garantizar que la harina cumpla con los requisitos de calidad establecidos.

Principios de las BPM en el expendio de harinas de trigo:

Las BPM se basan en los siguientes principios:

Higiene: Las instalaciones, los equipos y el personal deben mantenerse limpios y libres de contaminación.

Control de los peligros: Los peligros potenciales para la seguridad de los alimentos deben identificarse y controlarse.

Trazabilidad: Las empresas deben poder rastrear los alimentos desde el origen hasta el consumidor.

Registro y documentación: Las empresas deben mantener registros y documentación adecuados para demostrar el cumplimiento de las BPM.

Medidas específicas de las BPM en el expendio de harinas de trigo:

Las plantas de expendio de harinas de trigo pueden implementar una serie de medidas específicas de las BPM para garantizar la seguridad, la salud y la calidad de la harina. Estas medidas incluyen:

Limpieza y desinfección: Las instalaciones, los equipos y el personal deben limpiarse y desinfectarse de manera regular para eliminar los contaminantes.

Control de plagas: Las plagas deben controlarse para evitar que contaminen los alimentos.

Control de los productos químicos: Los productos químicos utilizados en el proceso de producción de harina deben manejarse y almacenarse de manera segura para evitar la contaminación de los alimentos.

Control de los proveedores: Los proveedores de trigo y otros ingredientes deben ser seleccionados cuidadosamente y deben cumplir con los estándares de seguridad alimentaria.

Control de los procesos: El proceso de producción de harina debe ser diseñado para minimizar la contaminación de los alimentos.

Control de los productos terminados: La harina debe probarse para garantizar que cumpla con los requisitos de calidad establecidos.

Beneficios de las BPM en el expendio de harinas de trigo:

La implementación de un programa eficaz de las BPM en el expendio de harinas de trigo puede proporcionar una serie de beneficios, incluyendo:

Protección de la salud de los consumidores: Las BPM ayudan a prevenir la contaminación de los alimentos y proteger la salud de los consumidores.

Mejora de la calidad de los productos: Las BPM ayudan a garantizar que la harina cumpla con los requisitos de calidad establecidos.

Reducción de los costos: Las BPM pueden ayudar a reducir los costos al prevenir los retiros del mercado y las demandas de responsabilidad.

Las buenas prácticas de manufactura (BPM) son un componente esencial de la seguridad alimentaria. En el contexto del expendio de harinas de trigo, las BPM ayudan a garantizar que la harina sea segura, saludable y de alta calidad.

Requisitos legales de las BPM en el expendio de harinas de trigo:

En muchos países, las BPM están reguladas por la ley. Las empresas que expiden harinas de trigo deben cumplir con los requisitos legales de las BPM para garantizar la seguridad de los alimentos.

### **5.3.6. Enfermedades Transmitidas por Alimentos**

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son causadas por la ingestión de alimentos contaminados con bacterias, virus, parásitos u hongos. Estas enfermedades pueden causar una amplia gama de síntomas, que incluyen náuseas, vómitos,

diarrea, fiebre y dolor abdominal. En casos graves, las ETA pueden provocar hospitalización o incluso la muerte.

La harina de trigo es un producto que se puede contaminar fácilmente con bacterias, virus y hongos. Esto se debe a que la harina es un producto seco y polvoriento que puede actuar como un vehículo para los contaminantes.

Las siguientes son algunas de las ETA que pueden ser transmitidas por harina de trigo:

- Salmonelosis: La salmonelosis es una infección causada por la bacteria *Salmonella*. Los síntomas de la salmonelosis incluyen náuseas, vómitos, diarrea y fiebre.
- E. coli: La E. coli es una bacteria que puede causar una variedad de enfermedades, incluyendo la diarrea, la fiebre y el dolor abdominal.
- Listeria: La listeria es una bacteria que puede causar una infección grave en el sistema nervioso central.
- Aflatoxinas: Las aflatoxinas son toxinas producidas por ciertos hongos. Las aflatoxinas pueden causar cáncer de hígado.

Para ayudar a prevenir la contaminación de la harina de trigo, las fábricas de expendio de harina de trigo deben seguir las buenas prácticas de manufactura (BPM). Las BPM incluyen medidas para controlar la calidad de las materias primas, los procesos de producción y las instalaciones.

Las siguientes son algunas recomendaciones para ayudar a prevenir la contaminación de la harina de trigo:

- Utilizar materias primas de alta calidad. El trigo debe ser analizado para verificar que cumpla con los requisitos de calidad establecidos.
- Almacenar la harina en condiciones adecuadas. La harina debe almacenarse en un lugar fresco y seco para evitar la contaminación.
- Mantener las instalaciones limpias y desinfectadas. Las instalaciones de producción deben limpiarse y desinfectarse de manera regular.
- Capacitar al personal en las BPM. El personal debe estar capacitado en las medidas para prevenir la contaminación de alimentos.

Al seguir estas recomendaciones, las fábricas de expendio de harina de trigo pueden ayudar a garantizar que la harina de trigo sea segura para el consumo humano.

#### Síntomas de las ETA

Los síntomas de las ETA pueden variar según el tipo de bacteria, virus o hongo que cause la infección. Los síntomas más comunes incluyen:

- Náuseas
- Vómitos
- Diarrea
- Fiebre
- Dolor abdominal

#### Tratamiento de las ETA

En la mayoría de los casos, las ETA se pueden tratar en casa con reposo, líquidos y medicamentos para aliviar los síntomas. Sin embargo, en algunos casos, las ETA pueden requerir hospitalización.

#### Prevención de las ETA

Las ETA se pueden prevenir tomando las siguientes medidas:

- Lavar las manos con agua y jabón antes de preparar alimentos y después de usar el baño.
- Cocinar los alimentos a una temperatura adecuada.
- Refrigerar los alimentos a una temperatura adecuada.
- Evitar comer alimentos crudos o poco cocidos.
- Evitar consumir alimentos que hayan estado expuestos a temperaturas ambientales elevadas.

#### Consejos para la compra y almacenamiento de harina de trigo

- Compre harina de trigo de una fuente confiable.
- Almacene la harina de trigo en un lugar fresco y seco.
- Use harina de trigo dentro de la fecha de caducidad.

#### Consejos para la preparación de alimentos con harina de trigo



- Lave las manos con agua y jabón antes de preparar alimentos.
- Use utensilios y superficies de cocina limpios.
- Cocine los alimentos a una temperatura adecuada.
- Refrigerera los alimentos sobrantes.

### **5.3.7. Contaminación de Harina de Trigo y Fuentes de Contaminación**

La contaminación de la harina de trigo es un problema que puede causar enfermedades transmitidas por los alimentos. Las fuentes de contaminación de la harina de trigo pueden ser biológicas, químicas o físicas.

#### Contaminación biológica

La contaminación biológica de la harina de trigo puede ser causada por bacterias, virus, parásitos o mohos. Estas bacterias, virus, parásitos y mohos pueden causar una variedad de enfermedades transmitidas por los alimentos, como la salmonelosis, la intoxicación alimentaria por E. coli, la hepatitis A, la giardiasis y la intoxicación alimentaria por aflatoxinas.

Las principales fuentes de contaminación biológica de la harina de trigo son:

**El trigo:** El trigo puede estar contaminado con bacterias, virus, parásitos o mohos antes de ser procesado.

**El agua:** El agua utilizada en el proceso de producción de harina puede estar contaminada con bacterias, virus, parásitos o mohos.

**El personal:** El personal puede contaminar la harina con bacterias, virus o parásitos si no tiene las manos limpias o si está enfermo.

**Las plagas:** Las plagas, como los insectos, los roedores y las aves, pueden contaminar la harina con bacterias, virus o parásitos.

#### Contaminación química

La contaminación química de la harina de trigo puede ser causada por pesticidas, fertilizantes, productos químicos de limpieza o metales pesados. Estos pesticidas, fertilizantes, productos químicos de limpieza o metales pesados pueden causar una variedad de problemas de salud, como cáncer, daño al sistema nervioso o problemas de desarrollo.

Las principales fuentes de contaminación química de la harina de trigo son:

El trigo: El trigo puede estar contaminado con pesticidas, fertilizantes o metales pesados antes de ser procesado.

Los productos químicos de limpieza: Los productos químicos de limpieza utilizados en el proceso de producción de harina pueden contaminar la harina si no se usan o almacenan de manera segura.

#### Contaminación física

La contaminación física de la harina de trigo puede ser causada por fragmentos de vidrio, plástico, metal u otros objetos extraños. Estos objetos extraños pueden causar lesiones en la boca, la garganta o el estómago.

Las principales fuentes de contaminación física de la harina de trigo son:

El trigo: El trigo puede estar contaminado con fragmentos de vidrio, plástico, metal u otros objetos extraños antes de ser procesado.

El equipo: El equipo utilizado en el proceso de producción de harina puede contaminar la harina con fragmentos de vidrio, plástico, metal u otros objetos extraños.

#### Medidas para prevenir la contaminación de la harina de trigo

Las plantas de expendio de harina de trigo pueden tomar una serie de medidas para prevenir la contaminación de la harina de trigo. Estas medidas incluyen:

Implementar un programa de buenas prácticas de manufactura (BPM): Las BPM son un conjunto de principios y procedimientos que se utilizan para garantizar la seguridad, la calidad y la inocuidad de los alimentos.

Controlar la calidad del trigo: El trigo utilizado para producir harina debe estar libre de contaminantes.

Controlar la calidad del agua: El agua utilizada en el proceso de producción de harina debe estar limpia y segura.

Controlar la higiene: Las instalaciones, el equipo y el personal deben mantenerse limpios y libres de contaminación.

Controlar las plagas: Las plagas deben controlarse para evitar que contaminen los alimentos.

Controlar los productos químicos: Los productos químicos utilizados en el proceso de producción de harina deben manejarse y almacenarse de manera segura.

Controlar los proveedores: Los proveedores de trigo y otros ingredientes deben ser seleccionados cuidadosamente y deben cumplir con los estándares de seguridad alimentaria.

Controlar los procesos: El proceso de producción de harina debe ser diseñado para minimizar la contaminación de los alimentos.

Controlar los productos terminados: La harina debe probarse para garantizar que cumpla con los requisitos de calidad establecidos.

Al implementar estas medidas, las plantas de expendio de harina de trigo pueden ayudar a proteger la salud de los consumidores y prevenir enfermedades transmitidas por los alimentos.

#### **5.3.8. Higiene del personal**

La higiene del personal es un factor importante para garantizar la inocuidad de los alimentos. El personal de las plantas de expendio de harina de trigo debe seguir las siguientes prácticas de higiene para ayudar a prevenir la contaminación de los alimentos:

- Lavarse las manos con agua y jabón con frecuencia: El personal debe lavarse las manos con agua y jabón durante al menos 20 segundos antes, durante y después de manipular alimentos.
- Usar guantes: Los guantes deben usarse al manipular alimentos crudos o potencialmente contaminados.
- Usar ropa limpia y protectora: El personal debe usar ropa limpia y protectora, como gorras, delantales y zapatos cerrados, para evitar la contaminación de los alimentos.
- Cubrir cortes y heridas: Los cortes y heridas deben cubrirse con un vendaje impermeable para evitar la contaminación de los alimentos.
- No toser o estornudar sobre los alimentos: El personal debe cubrirse la boca y la nariz al toser o estornudar para evitar la contaminación de los alimentos.

- No comer, beber o fumar en las áreas de producción: El personal no debe comer, beber o fumar en las áreas de producción para evitar la contaminación de los alimentos.

Además de estas prácticas de higiene personal, las plantas de expendio de harina de trigo deben proporcionar al personal los siguientes recursos para ayudarlos a mantener una buena higiene:

- Acceso a agua y jabón: Las plantas de expendio de harina de trigo deben proporcionar al personal acceso a agua y jabón en las áreas de producción.
- Acceso a guantes y ropa limpia: Las plantas de expendio de harina de trigo deben proporcionar al personal acceso a guantes y ropa limpia en las áreas de producción.
- Entrenamiento en higiene: Las plantas de expendio de harina de trigo deben brindar capacitación en higiene al personal.

La higiene del personal es un factor importante para garantizar la inocuidad de los alimentos. Al seguir las prácticas de higiene personal mencionadas anteriormente, el personal de las plantas de expendio de harina de trigo puede ayudar a prevenir la contaminación de los alimentos y proteger la salud de los consumidores.

### **5.3.9. Control de plagas**

El control de plagas es un factor importante para garantizar la inocuidad de los alimentos en las plantas de expendio de harina de trigo. Las plagas, como los insectos, los roedores y las aves, pueden contaminar los alimentos con bacterias, virus y parásitos que pueden causar enfermedades transmitidas por alimentos.

Las plantas de expendio de harina de trigo deben implementar un programa de control de plagas para prevenir la contaminación de los alimentos. Este programa debe incluir las siguientes medidas:

- Inspección regular de las instalaciones: Las instalaciones deben inspeccionarse regularmente para detectar signos de plagas.
- Uso de trampas y cebos: Las trampas y los cebos se pueden usar para atrapar y matar plagas.
- Uso de pesticidas: Los pesticidas solo deben usarse como último recurso y deben aplicarse de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

- Educación del personal: El personal debe estar capacitado en las medidas de control de plagas.

Las siguientes son algunas medidas específicas que se pueden tomar para controlar las plagas en las plantas de expendio de harina de trigo:

- Mantener las instalaciones limpias y ordenadas: Las instalaciones deben mantenerse limpias y ordenadas para dificultar que las plagas encuentren refugio.
- Reparar los agujeros y grietas: Los agujeros y grietas deben repararse para evitar que las plagas entren en las instalaciones.
- Almacenar los alimentos adecuadamente: Los alimentos deben almacenarse en recipientes cerrados para evitar que las plagas los contaminen.
- Evitar la acumulación de basura: La basura debe eliminarse de manera regular para evitar que atraiga plagas.

Al implementar un programa de control de plagas eficaz, las plantas de expendio de harina de trigo pueden ayudar a prevenir la contaminación de los alimentos y proteger la salud de los consumidores.

#### **5.3.10. Control de productos químicos**

El control de productos químicos es un factor importante para garantizar la inocuidad de los alimentos en las plantas de expendio de harina de trigo. Los productos químicos, como los pesticidas, los fertilizantes y los productos de limpieza, pueden contaminar los alimentos si no se usan correctamente.

Las plantas de expendio de harina de trigo deben implementar un programa de control de productos químicos para prevenir la contaminación de los alimentos. Este programa debe incluir las siguientes medidas:

- Identificación de productos químicos: Todos los productos químicos utilizados en la planta deben estar identificados correctamente.
- Almacenamiento seguro de productos químicos: Los productos químicos deben almacenarse de manera segura para evitar que se contaminen los alimentos.

- Uso adecuado de productos químicos: Los productos químicos solo deben usarse según las instrucciones del fabricante.
- Limpieza y desinfección: Las áreas donde se utilizan productos químicos deben limpiarse y desinfectarse de manera regular.
- Educación del personal: El personal debe estar capacitado en el uso seguro de productos químicos.

Las siguientes son algunas medidas específicas que se pueden tomar para controlar los productos químicos en las plantas de expendio de harina de trigo:

- Mantener un registro de los productos químicos utilizados: Las plantas deben mantener un registro de todos los productos químicos utilizados en la planta.
- Etiquetar todos los contenedores de productos químicos: Los contenedores de productos químicos deben estar etiquetados correctamente con el nombre del producto, la fecha de caducidad y las instrucciones de uso.
- Almacenar los productos químicos en áreas seguras: Los productos químicos deben almacenarse en áreas seguras, lejos de los alimentos y las personas.
- Usar productos químicos solo cuando sea necesario: Los productos químicos solo deben usarse cuando sea necesario y deben usarse de manera adecuada.
- Eliminar los productos químicos de manera segura: Los productos químicos vencidos o no utilizados deben eliminarse de manera segura.

Al implementar un programa de control de productos químicos eficaz, las plantas de expendio de harina de trigo pueden ayudar a prevenir la contaminación de los alimentos y proteger la salud de los consumidores.

En particular, las plantas de expendio de harina de trigo deben tener en cuenta los siguientes riesgos relacionados con los productos químicos:

- Contaminación de los alimentos: Los productos químicos pueden contaminar los alimentos si se usan o almacenan incorrectamente.
- Exposición a los trabajadores: Los trabajadores pueden estar expuestos a productos químicos peligrosos si no se toman las precauciones adecuadas.

- Impacto ambiental: Los productos químicos pueden contaminar el medio ambiente si se eliminan incorrectamente.

Para mitigar estos riesgos, las plantas de expendio de harina de trigo deben seguir las medidas de control de productos químicos mencionadas anteriormente y cumplir con las regulaciones locales y nacionales.

#### **5.3.11. Control de residuos**

El control de residuos es un factor importante para garantizar la inocuidad de los alimentos y la sostenibilidad en las plantas de expendio de harina de trigo. Los residuos, como los desechos alimenticios, los residuos de empaque y los desechos industriales, pueden contaminar los alimentos y el medio ambiente.

Las plantas de expendio de harina de trigo deben implementar un programa de control de residuos para prevenir la contaminación y la degradación ambiental. Este programa debe incluir las siguientes medidas:

- Separación de residuos: Los residuos deben separarse en categorías para facilitar su reciclaje y disposición.
- Reciclaje: Los residuos reciclables, como el papel, el cartón y el plástico, deben reciclarse para reducir la cantidad de residuos que se envía a los vertederos.
- Compostaje: Los residuos orgánicos, como los desechos alimenticios y los residuos de jardinería, pueden compostarse para convertirse en abono.
- Disposición segura: Los residuos no reciclables deben eliminarse de manera segura para evitar la contaminación del medio ambiente.

Las siguientes son algunas medidas específicas que se pueden tomar para controlar los residuos en las plantas de expendio de harina de trigo:

- Provisión de contenedores de residuos separados: Las plantas deben proporcionar contenedores de residuos separados para los residuos reciclables, los residuos orgánicos y los residuos no reciclables.
- Educación del personal: El personal debe estar capacitado en las prácticas de control de residuos.

- Implementación de un programa de reciclaje: Las plantas deben implementar un programa de reciclaje para promover el reciclaje de los residuos.
- Implementación de un programa de compostaje: Las plantas pueden implementar un programa de compostaje para convertir los residuos orgánicos en abono.
- Implementación de un programa de disposición segura: Las plantas deben implementar un programa de disposición segura para los residuos no reciclables.

Al implementar un programa de control de residuos eficaz, las plantas de expendio de harina de trigo pueden ayudar a prevenir la contaminación de los alimentos, proteger el medio ambiente y ahorrar dinero.

En particular, las plantas de expendio de harina de trigo deben tener en cuenta los siguientes riesgos relacionados con los residuos:

- Contaminación de los alimentos: Los residuos pueden contaminar los alimentos si no se manejan correctamente.
- Contaminación del medio ambiente: Los residuos pueden contaminar el medio ambiente si se eliminan incorrectamente.
- Impacto económico: La eliminación de residuos puede ser costosa.

Para mitigar estos riesgos, las plantas de expendio de harina de trigo deben seguir las medidas de control de residuos mencionadas anteriormente y cumplir con las regulaciones locales y nacionales.

Algunas buenas prácticas de control de residuos en las plantas de expendio de harina de trigo incluyen:

- Reducir la cantidad de residuos producidos: Esto se puede hacer mediante la implementación de prácticas de producción más eficientes, como la reducción del desperdicio de alimentos y la reutilización de los materiales.
- Reciclar y compostar: Esto ayuda a reducir la cantidad de residuos que se envían a los vertederos.
- Eliminar los residuos de manera segura: Esto se puede hacer mediante la incineración o la eliminación en vertederos seguros.



Al implementar estas prácticas, las plantas de expendio de harina de trigo pueden ayudar a proteger la salud pública, el medio ambiente y la economía.

## VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcalá, L., Muñoz, P., & Bouza, E. (2020). *Aspergillus* y aspergilosis. *Control calidad semic*, 1-5.
- Alfano, G. (2014). Identificación molecular de especies del género *Candida* y *Aspergillus* mediante la aplicación de la PCR/RFLP. Recuperado el 15 de marzo de 2023 de <http://eprints.uanl.mx/4005/1/1080253536.pdf>
- Alvarado, B. (2021). Análisis in silico de los genes implicados en la virulencia de bacterias patógenas oportunistas aisladas de agua para consumo humano. Recuperado el 12 de diciembre de 2023 de <https://repositorioinstitucional.buap.mx/items/1aaffd65-147f-4e5e-848a-316552a2d8f8>
- Arana, I., Orruño, M., & Barcina, I. (2020). Diluciones y concentraciones muestras líquidas y sólidas. *Aspectos prácticos de la microbiología*, 3-10.
- BioTech. (2019). Tipos de ELISA, ¿conoces las diferencias? *Biotech*, 1-3.
- Brugos, E. (2019). Historia del cereal en la alimentación humana. Recuperado el 16 de abril de 2023 de <chrome-extension://efaidnbnmnibpcajpcglclefindmkaj/https://repositorio.unican.es/xmlui/bitstream/10902/16472/1/BrugosAguadoEmilio.pdf>
- Canu, M. (2019). Seguridad alimentaria: importancia de los factores higiénico sanitarios en la cadena de producción, elaboración y distribución de alimentos. Recuperado el 17 de octubre de 2023 de <https://www.prevencionintegral.com/comunidad/blog/hacia-mundo-sostenible/2017/06/14/seguridad-alimentaria-importancia-factores-higienico-sanitarios-en-cadena-produccion-elaboracion>
- Cheriyedath, S. (2019). Técnica de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP). Recuperado el 24 de noviembre de 2023 de

<https://www.news-medical.net/life-sciences/Restriction-Fragment-Length-Polymorphism-%28RFLP%29-Technique.aspx>

Ciencias. (2020). Así son las pruebas PCR. Recuperado el 17 de octubre de 2023 de <https://www.agenciasinc.es/Noticias/Asi-son-las-pruebas-PCR-que-se-utilizan-para-detectar-el-coronavirus>

CODEX STAN 152. (1985). NORMA DEL CODEX PARA LA HARINA DE TRIGO. FAO, 3.

Coello, L. (2019). Obtenido de Análisis cuantitativo de aflatoxinas en muestras de alimento de consumo infantil en la ciudad de Ventanas. Recuperado el 15 de septiembre de 2023 de <https://repositorio.uteq.edu.ec/server/api/core/bitstreams/f60a364c-af9f-4142-8102-2c570fc21710/content>

Gil, M. (2023). Agar papa dextrosa: fundamento, preparación y uso. *Ciencia-Biología*, 1-2.

Guerrero, A., & Parreño, J. (2018). Determinación de micotoxinas por el método de elisa en soya para aves en producción en la provincia de chinch, año 2016. Recuperado el 18 de noviembre de 2023 de <file:///C:/Users/ANDERSON/Downloads/Aflatoxina-%20ocratoxina.pdf>

Guía de Almacenamiento seco refinado y congelado. (2018). *Condiciones de almacenamiento de la harina de trigo*, 5-7.

Guinjoan, I. (2018). Los precios del trigo aumentan drásticamente. Recuperado el 4 de julio de 2023 de [https://www.3tres3.com/articulos/los-precios-del-trigo-aumentan-drasticamente\\_39867/](https://www.3tres3.com/articulos/los-precios-del-trigo-aumentan-drasticamente_39867/)

Herrera , E., & Llontop, F. (2020). "Características bromatológicas y concentración de aflatoxina b1 en granos de theobroma cacao. nueva cajamarca julio 2017 – febrero 2018, 60-63.

Holguín, B., & Alvarado, A. (2018). Comportamiento de la producción de harina de trigo en Ecuador. Recuperado el 26 de junio de 2023 de <https://www.eumed.net/cursecon/ecolat/ec/2017/produccion-harina->

trigo.html#:~:text=El%20pa%C3%ADs%20consume%20774000%20toneladas,toneladas%20(Moreta%2C%202015).

INEN 617. (1981). Harina de origen vegetal muestreo. Recuperado el 30 de marzo de 2023 de <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/617.pdf>

insst. (2010). *Aspergillus flavus*. Recuperado el 24 de junio de 2023 de <https://www.insst.es/agentes-biologicos-basebio/hongos/aspergillus-flavus.#actividades0>

Jedid, I., Soldevilla, C., & Lahouar, A. e. (2018). Aislamiento de micoflora y caracterización molecular de especies de *Aspergillus* y *Fusarium* en cereales tunecinos. *Saudita de Ciencias Biológicas*, 25(5), 1-7.

Lizarzaburo, G. (2021). La demanda encarece el trigo. *expreso*, 2-7.

Lozano, S., Morales, A., & Martínez, I. (2021). Identificación de especies de *Aspergillus* spp mediante el análisis de rDNA. *Instituto Nacional de Investigación Forestales, Agrícolas y Pecuarias*, 1-1.

Matomé, G., Murage, H., & King, A. (2021). Caracterización morfológica y determinación del potencial de producción de aflatoxinas de *Aspergillus flavus* aislado de maíz y suelo en Kenia. *Agriculture*, 7(10), 1-14.

Mokobi, F. (2021). Morfología de *Aspergillus flavus*. Recuperado el 7 de marzo de 2023 de *Aspergillus flavus* descripción general: <https://microbenotes.com/aspergillus-flavus/>

Morales, J. (2022). Técnica de recuento por Dilución. *Laboratorio Microbiología Industrial*, 4-8.

Murillo, A., & Esker, P. (2021). ¿Qué son las micotoxinas? Recuperado el 6 de septiembre de 2023 de <https://extension.psu.edu/que-son-las-micotoxinas>

- Neogen Corporation. (2016). Quantitative Test with Aqueous Extraction. *globalassets*, 1-12.
- NTE INEN 1529-10. (2013). Control microbiológico de los alimentos mohos y levaduras viables recuentos en placa por siembra en profundidad. Recuperado el 8 de marzo de 2023 de [https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte\\_inen\\_1529-10-1.pdf](https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte_inen_1529-10-1.pdf)
- NTE INEN 616. (2015). HARINA DE TRIGO. REQUISITOS. Recuperado el 8 de marzo de 2023 de <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte-inen-616-4.pdf>
- Palacio, A. (2016). Caracterización de las Poblaciones de *Aspergillus* sección *flavi* presentes en trigo y sorgo. *Universa*, 22-25.
- Palacio, A. (2018). Caracterización de las poblaciones de *Aspergillus* sección *flavi* presentes en trigo y sorgo. *Udelar*, 24-26.
- Pildain, M., Cabral, D., & Vaamonde, G. (2005). Población de *Aspergillus flavus* en mani cultivado en diferentes zonas agrologicas. *Revista de Investigación Agropecuarias*, 3-19.
- Probiotek. (2016). Preparación de Agar de Dextrosa y Papa. Recuperado el 18 de marzo de 2023 de Productos y equipos Biotecnológicos: <https://www.probiotek.com/productos/reactivos/medios-de-cultivo-reactivos/agar-de-dextrosa-y-papa/>
- Querembás, M. (2022). Elaboración de un Manual de Buenas Prácticas de Higiene y Manipulación de Alimentos para las picanterías de la parroquia de Julio Andrade cantón Tulcán. Recuperado el 30 de mayo de 2023 de <file:///C:/Users/ANDERSON/Downloads/TESIS-M+%C3%B4NICA%20QUEREMB+%C3%BCS.pdf>
- Quistián, H., & Osorio, H. (2014). Cultivo puro. *La Microbiología*, 1-5.
- Rabelo, R., & Piñeres, I. (2022). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para la identificación de bacterias patógenas en productos

cárnicos. Recuperado el 12 de mayo de 2023 de <https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/wpecbti/article/view/6610/6016>

Rangel, E., Valdivia, A., & Luna, M. (2020). Caracterización de *Aspergillus flavus* y cuantificación de aflatoxinas en pienso y leche cruda de vacas en Aguascalientes, México. Recuperado el 21 de mayo de 2023 de [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-11242020000200435&script=sci\\_arttext](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-11242020000200435&script=sci_arttext)

Revilla, J. (2021). Aportes de la filogenética a la investigación médica. Recuperado el 28 de marzo de 2023 de [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1018-130X2012000200008](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018-130X2012000200008)

Reynoso, M., Magnoli, C., & Barros, G. (2022). Siembra con espátula de Drigalsky. Recuperado el 3 de diciembre de 2023 de [https://espanol.libretexts.org/Biologia/Microbiolog%C3%ADa/Manual\\_de\\_microbiolog%C3%ADa\\_general/04%3A\\_Metodos\\_de\\_siembra\\_y\\_cultivo\\_de\\_microorganismos/4.02%3A\\_Cultivos\\_en\\_medios\\_solidos](https://espanol.libretexts.org/Biologia/Microbiolog%C3%ADa/Manual_de_microbiolog%C3%ADa_general/04%3A_Metodos_de_siembra_y_cultivo_de_microorganismos/4.02%3A_Cultivos_en_medios_solidos)

Ruiz, G. (2019). Proteínas de la harina de trigo: clasificación y propiedades funcionales. *Ciencia y Tecnología*, 13(38), 27-32.

Sánchez, M. (2018). Técnicas de aislamiento. Recuperado el 16 de mayo de 2023 de <https://sites.google.com/a/goumh.umh.es/practicas-de-microbiologia/indice>

Sanz, S. (2018). Método de aislamiento en placa por diluciones sucesivas. Recuperado el 24 de marzo de <file:///C:/Users/Home/Downloads/Dialnet-PracticasDeMicrobiologia-100835.pdf>

Sifre, M., & Peraire, M. (2019). La harina. Recuperado el 7 de diciembre de 2023 de <chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://bibliotecavirtualsenior.es/wp-content/uploads/2019/06/LA-HARINA.pdf>

Tamay, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2019). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Recuperado el 8 de marzo de 2023 de <https://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2013/ir132d.pdf>

- Valverde, K., Ramón, P., Román, F., & Díaz, B. (2023). Detección de micotoxinas (aflatoxinas) en alimentos primarios y procesados para humanos y animales de granja, en Riobamba-Ecuador, *cientific*. 1-3.
- Varas, J. (2008). Importancia del cultivo del trigo en Ecuador. Recuperado el 18 de diciembre de <https://www.eluniverso.com/2008/05/08/0001/22/A6C5AA8ECBCC4A08937DB8A548983F00.html/>
- Zarrin, M., & Erfaninejad, M. (2016). Molecular variation analysis of *Aspergillus flavus* using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of the internal transcribed spacer rDNA region. *Spandidos Publications*, 1628-1632.
- Zulkifli, N., & Zakaria, L. (2017). Diversidad Morfológica y Molecular de *Aspergillus* de Grano de Maíz Utilizado como Alimento para Ganado. *Hayati Revista de Biociencias*, 24(1), 26-34.

## VII. ANEXOS


### Anexo 1. Acta de la sustentación de Predefensa del TI


UNIVERSIDAD POLITÉCNICA ESTATAL DEL CARCHI				
FACULTAD DE INDUSTRIAS AGROPECUARIAS Y CIENCIAS AMBIENTALES				
CARRERA DE ALIMENTOS				
ACTA				
DE LA SUSTENTACIÓN ORAL DE LA PREDEFENSA DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR				
ESTUDIANTE:	Pasquel Cayambe Andenon Darío		CÉDULA DE IDENTIDAD:	040058143
PERIODO ACADÉMICO:	2023		DOCENTE TUTOR:	MSC. Anchundia Lucas, Miguel Angel
PRESIDENTE TRIBUNAL:	MSc. Vanessa Elizabeth Cadena Maña		DOCENTE:	MSc. Marco Róben Burbano Pulles
TEMA DEL TIC:	"Identificación de <i>Aspergillus flavus</i> y cuantificación de aflatoxina B1 en la harina de trigo expandida en la ciudad de Tulcán"			
No.	CATEGORÍA	Evaluación cuantitativa	OBSERVACIONES Y RECOMENDACIONES	
1	PROBLEMA - OBJETIVOS	1.00		
2	FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	1.00		
3	METODOLOGÍA	8.00	Explicar los criterios de selección de muestra	
4	RESULTADOS	1.00		
5	DISCUSIÓN	8.67	Revisar la discusión en torno al contexto del estudio y generalizar la conclusión	
6	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	1.00		
7	DEFENSA, ARGUMENTACIÓN Y VOCABULARIO PROFESIONAL	8.00	Deben planificar bien el tiempo de exposición, deben ser concretos en la defensa.	
8	FORMATO, ORGANIZACIÓN Y CALIDAD DE LA INFORMACIÓN	8.00	Revisar formato APA.	


Obteniendo una nota de: **8,47** Por lo tanto, **APRUEBA** ; debiendo el o los investigadores acatar el siguiente artículo:

Art. 36.- De los estudiantes que aprueban el informe final del TIC con observaciones.- Los estudiantes tendrán el plazo de 10 días para proceder a corregir su informe final del TIC de conformidad a las observaciones y recomendaciones realizadas por los miembros del Tribunal de sustentación de la pre-defensa.

Para constancia del presente, firman en la ciudad de Tulcán el **viernes, 2 de febrero de 2024**

  
 MSc. Vanessa Elizabeth Cadena Maña  
 PRESIDENTE TRIBUNAL

  
 MSc. Marco Róben Burbano Pulles  
 DOCENTE

  
 MSc. Anchundia Lucas, Miguel Angel  
 DOCENTE TUTOR



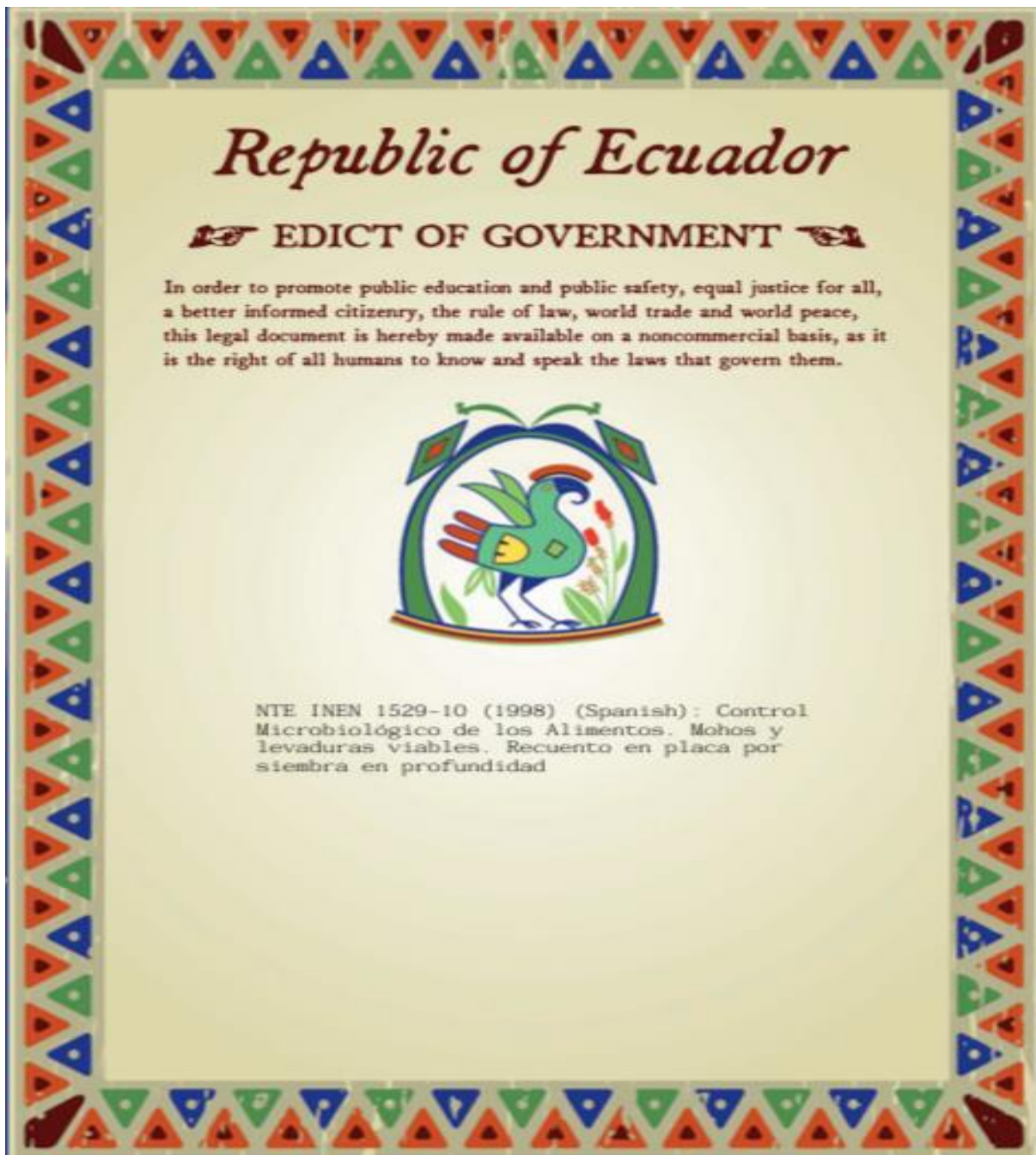
Anexo 2. Certificado del abstract por parte de idiomas



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA ESTATAL DEL CARCHI  
FOREIGN AND NATIVE LANGUAGE CENTER**

<b>ABSTRACT- EVALUATION SHEET</b>				
<b>NAME:</b> Anderson Darío Paspuel Cayambe y Adriana Gabriela Lugo Ponce				
<b>DATE:</b> 5 de febrero de 2024				
<b>"Identificación de <i>Aspergillus flavus</i> y cuantificación de aflatoxina B1 en la harina de trigo expendida en la ciudad de Tulcán "</b>				
<b>MARKS AWARDED</b>		<b>QUANTITATIVE AND QUALITATIVE</b>		
<b>VOCABULARY AND WORD USE</b>	Use new learnt vocabulary and precise words related to the topic:	Use a little new vocabulary and some appropriate words related to the topic:	Use basic vocabulary and simplistic words related to the topic:	Limited vocabulary and inadequate words related to the topic:
	EXCELLENT: 2 <input checked="" type="checkbox"/>	GOOD: 1,5 <input type="checkbox"/>	AVERAGE: 1 <input type="checkbox"/>	LIMITED: 0,5 <input type="checkbox"/>
<b>WRITING COHESION</b>	Clear and logical progression of ideas and supporting paragraphs.	Adequate progression of ideas and supporting paragraphs.	Some progression of ideas and supporting paragraphs.	Inadequate ideas and supporting paragraphs.
	EXCELLENT: 2 <input checked="" type="checkbox"/>	GOOD: 1,5 <input type="checkbox"/>	AVERAGE: 1 <input type="checkbox"/>	LIMITED: 0,5 <input type="checkbox"/>
<b>ARGUMENT</b>	The message has been communicated very well and identify the type of text	The message has been communicated appropriately and identify the type of text	Some of the message has been communicated and the type of text is little confusing	The message hasn't been communicated and the type of text is inadequate
	EXCELLENT: 2 <input checked="" type="checkbox"/>	GOOD: 1,5 <input type="checkbox"/>	AVERAGE: 1 <input type="checkbox"/>	LIMITED: 0,5 <input type="checkbox"/>
<b>CREATIVITY</b>	Outstanding flow of ideas and events.	Good flow of ideas and events.	Average flow of ideas and events.	Poor flow of ideas and events.
	EXCELLENT: 2 <input type="checkbox"/>	GOOD: 1,5 <input checked="" type="checkbox"/>	AVERAGE: 1 <input type="checkbox"/>	LIMITED: 0,5 <input type="checkbox"/>
<b>SCIENTIFIC SUSTAINABILITY</b>	Reasonable, specific and supportable opinion or thesis statement.	Minor errors when supporting the thesis statement.	Some errors when supporting the thesis statement.	Loss of errors when supporting the thesis statement.
	EXCELLENT: 2 <input type="checkbox"/>	GOOD: 1,5 <input checked="" type="checkbox"/>	AVERAGE: 1 <input type="checkbox"/>	LIMITED: 0,5 <input type="checkbox"/>
<b>TOTAL/AVERAGE</b>	9 - 10: EXCELLENT 7 - 8,9: GOOD 5 - 6,9: AVERAGE 3 - 4,9: LIMITED		<b>TOTAL 9</b>	

Anexo 3. Norma NTE INEN 1529-10:90 Control microbiológico





# INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN

Quito - Ecuador

---

**NORMA TÉCNICA ECUATORIANA**

**NTE INEN 1 529-10:98**

---

## **CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS. MOHOS Y LEVADURAS VIABLES. RECUENTOS EN PLACA POR SIEMBRA EN PROFUNDIDAD.**

**Primera Edición**

FOODS MICROBIOLOGICAL CONTROL. MOLDS AND YASTS. PPLATE ACCOUNT BY DEEP SOWING.

First Edition

---

DESCRIPTORES: Productos alimenticios, análisis microbiológico, conteo, mohos y levaduras.  
AL 01.05-308  
CDU: 614.31.579.67:582.28  
CIU: 9320  
ICS: 07.100.30

**Norma Técnica  
Ecuatoriana  
Opcional**

**CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS. MOHOS Y  
LEVADURAS VIABLES. RECuento EN PLACA POR SIEMBRA  
EN PROFUNDIDAD**

**NTE INEN  
1 529-10:98  
1998-01**

### 1. OBJETO

**1.1** Esta norma describe el método para cuantificar el número de unidades propagadoras de mohos y levaduras en un gramo ó centímetro cúbico de muestra.

### 2. ALCANCE

**2.1** Esta norma especifica el método de recuento, en placa, por siembra en profundidad, para el recuento de mohos y levaduras.

### 3. DEFINICIONES

**3.1 Mohos.** Son ciertos hongos multicelulares, filamentosos, cuyo crecimiento en los alimentos se conoce fácilmente por su aspecto aterciopelado o algodonoso. Están constituidos por filamentos ramificados y entrecruzados, llamados "hifas", cuyo conjunto forma el llamado "micelio" que puede ser coloreado o no. Los mohos pueden formar, sobre ciertos alimentos, toxinas, llamadas micotoxinas. Provocan la alteración de productos alimenticios, especialmente los ácidos: yogur, jugos, frutas, etc., o los de presión osmótica elevada: productos deshidratados, jarabes, algunos productos salados, etc.

**3.2 Levaduras.** Son hongos cuya forma de crecimiento habitual y predominante es unicelular. Poseen una morfología muy variable: esférica, ovóidea, piriforme, cilíndrica, triangular o, incluso, alargada, en forma de micelio verdadero o falso. Su tamaño supera al de las bacterias. Al igual que los mohos, causan alteraciones de los productos alimenticios, especialmente los ácidos y presión osmótica elevada.

**3.3 Recuento de mohos y levaduras viables.** Es la determinación del número de colonias típicas de levaduras y mohos que se desarrollan a partir de un gramo o centímetro cúbico de muestra, en un medio adecuado e incubado entre 22°C y 25°C.

### 4. RESUMEN

**4.1** Este método se basa en el cultivo entre 22°C y 25°C de las unidades propagadoras de mohos y levaduras, utilizando la técnica de recuento en placa por siembra en profundidad y un medio que contenga extracto de levadura, glucosa y sales minerales.

### 5. MATERIAL Y MEDIOS DE CULTIVO

**5.1 Materiales.** La vidriería debe resistir esterilizaciones repetidas y todo el material debe estar perfectamente limpio y estéril.

*(Continúa)*

DESCRIPTORES: Productos alimenticios. Análisis microbiológico, contaje, mohos y levaduras

**5.1.1 Placas Petri**

**5.1.2** Pipetas serológicas de boca ancha de 1; 5 y 10 cm<sup>3</sup> graduadas en 1/10 de unidad.

**5.2 Medio de cultivo**

**5.2.1** Agar sal-levadura de Davis o similar. Ver NTE INEN 1 529-1.

**6. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA**

**6.1** Preparar la muestra según su naturaleza, utilizando uno de los procedimientos indicados en la NTE INEN 1 529-2.

**7. PROCEDIMIENTO**

**7.1** Utilizando una sola pipeta estéril, pipetear, por duplicado, alícuotas de 1 cm<sup>3</sup> de cada una de las diluciones decimales en placas Petri adecuadamente identificadas. Iniciar por la dilución de menor concentración.

**7.2** Inmediatamente, verter en cada una de las placas inoculadas, aproximadamente 20 cm<sup>3</sup> de agar sal-levadura de Davis (SLD) fundido y templado a 45 ± 2°C. La adición del medio de cultivo no debe pasar más de 15 minutos, a partir de la preparación de la primera dilución.

**7.3** Delicadamente, mezclar el inóculo de siembra con el medio de cultivo, imprimiendo a la placa movimientos de vaivén, 5 veces en una dirección; hacerla girar cinco veces en sentido de las agujas del reloj. Volver a imprimir movimientos de vaivén en una dirección que forme ángulo recto con la primera y hacerla girar cinco veces en sentido contrario a las agujas de reloj.

**7.4** Utilizar una placa para el control de la carga microbiana del ambiente, la cual no debe exceder de 15 colonias/placa, durante 15 minutos de exposición. Este límite es mantenido mediante prácticas adecuadas de limpieza y desinfección.

**7.5** Como prueba de esterilidad del medio, en una placa sin inóculo verter aproximadamente 20 cm<sup>3</sup> del agar.

**7.6** Dejar las placas en reposo hasta que se solidifique el agar.

**7.7** Invertir las placas e incubarlas entre 22°C y 25°C, por cinco días.

**7.8** Examinarlas a los dos días de incubación y comprobar si se ha formado micelio aéreo. Las primeras colonias que se desarrollan son las de levaduras, que suelen ser redondas, cóncavas, estrelladas. La mayoría de las colonias jóvenes de levaduras son húmedas y algo mucosas, también pueden ser harinosas, blanquecinas y algunas cremosas y rosadas. En ciertos casos, apenas cambian al envejecer, otras veces se desecan y encogen. Las colonias de mohos tienen un aspecto algodonoso característico.

**7.9** Cuando el micelio aéreo de los mohos amenace cubrir la superficie de la placa, dificultando las lecturas posteriores; pasados dos días, realizar recuentos preliminares en cualquier placa que se pueda distinguir las colonias.

*(Continua)*

**7.10** A los cinco días, seleccionar las placas que presenten entre 10 y 150 colonias y contarlas sin el auxilio de lupas. A veces pueden desarrollarse colonias pequeñas, éstas son de bacterias acidófilas y, por tanto, deben excluirse del recuento. Las colonias de levaduras deben ser comprobadas por examen microscópico

**7.11** Contar las colonias de mohos y levaduras en conjunto o separadamente. Si las placas de todas las diluciones contienen más de 150 colonias, contar en las placas inoculadas con la menor cantidad de muestra.

### 7.12 Cálculos

**7.12.1** *Cálculo del número (N) de unidades propagadoras (UP) de mohos y/o levaduras por centímetro cúbico ó gramo de muestra.* Calcular según la siguiente fórmula:

$$N = \frac{\text{número total de colonias contadas o calculadas}}{\text{cantidad total de muestra sembrada}}$$

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0,1m_2)d}$$

Donde:

$\sum C$  = suma de las colonias contadas o calculadas en todas las placas elegidas;

$n_1$  = número de placas contadas de la primera dilución seleccionada;

$n_2$  = número de placas contadas de la segunda dilución seleccionada;

$d$  = dilución de la cual se obtuvieron los primeros recuentos, por ejemplo  $10^{-2}$ ;

$V$  = volumen del inóculo sembrado en cada placa.

Ejemplo:

Volumen sembrado	= 1 cm <sup>3</sup>
Dilución $10^{-2}$	= 83 y 97 colonias
Dilución $10^{-3}$	= 33 y 28 colonias
Número	= $\frac{83 + 97 + 33 + 28}{1(2 + 0,1 \times 2)10^{-2}}$
	= $\frac{241}{0,022}$
	= 10 954 expresado como $1,1 \times 10^4$

**7.12.2 Redondeo.** El valor obtenido redondear a dos cifras significativas de la siguiente manera (NTE INEN 52):

**7.12.2.1** Si el tercer dígito, empezando por la izquierda es menor de cinco, mantener inalterado el segundo dígito y reemplazar por ceros los restantes. Por ejemplo, si el valor calculado fuere 553 000, redondeado a 550 000 y expresar como  $5,5 \times 10^5$ . Si el tercer dígito, empezando por la izquierda es superior a cinco, añadir una unidad al segundo dígito; por ejemplo, si el valor obtenido fue 10 954, redondearlo a 11 000 y expresar  $1,1 \times 10^4$ .

(Continúa)

**7.12.2.2** Si el tercer dígito empezando por la izquierda es cinco y es seguido de, por lo menos, un dígito, añadir una unidad al segundo dígito y reemplazar por ceros a los restantes. Por ejemplo, si el valor obtenido fue 31 554, redondearlo a 32 000 y expresar como  $3,2 \times 10^4$ . Si el tercer dígito es cinco y no es seguido de otro (s) dígito (s) ó lo es únicamente por ceros, añadir una unidad al segundo dígito, si éste es impar; si es par ó cero conservarlo inalterado, ejemplo: 235 redondear a 240 y expresar como  $2,4 \times 10^2$ , 24 500 redondear a 24 000 y expresar como  $2,4 \times 10^4$ .

### **7.12.3 Presentación de resultados**

**7.12.3.1** Presentar el resultado como número, N, de unidades propagadoras UP de mohos y/o levaduras /cm<sup>3</sup> ó g de muestra utilizando solo dos cifras significativas multiplicadas por 10<sup>x</sup> (x es la respectiva potencia de 10). Las cifras significativas corresponden al primero y segundo dígitos (empezando por la izquierda) del número de las colonias calculadas (7.12.1).

**7.12.3.2** Si no hay desarrollo de colonias en las placas de la suspensión 10<sup>-1</sup>, presentar como número estimado (N<sub>E</sub>), de la siguiente forma:

$$N_E \text{ de UP de mohos y/o levaduras/cm}^3 \text{ ó g} = < 1,0 \times 10^1$$

**7.12.3.3** Si no hay desarrollo de colonias en las placas sembradas con 1 cm<sup>3</sup> de muestra no diluida (producto original líquido), expresar el resultado de la siguiente manera:

$$N_E \text{ de UP de mohos y/o levaduras/cm}^3 = < 1,0 \times 10^0$$

**7.12.3.4** Si todas las placas sembradas presentan más de 150 colonias, calcular el resultado a partir de las placas sembradas con la dilución más alta y expresar de la siguiente manera:

$$N_E \text{ de UP de mohos y/o levaduras/cm}^3 \text{ o g} = > \text{ al valor obtenido } \times f$$

f = factor de dilución (valor inverso de la dilución de la muestra).

Indicar entre paréntesis la dilución utilizada. Este resultado sirve como guía para decidir el número de diluciones que se han de realizar en ensayos posteriores y, la decisión de aceptación o rechazo de una partida de alimentos debe basarse solo en valores N.

## **8. PRECISIÓN DEL MÉTODO**

### **8.1 Repetibilidad del recuento de colonias y error personal.**

**8.1.1** Los resultados obtenidos por la misma persona al contar por segunda vez las colonias de una misma placa, no deben variar en más del 5% y del 10% cuando es realizado por otra persona.

**8.1.2** Por razones estadísticas, el intervalo de confianza para este método varía, en el 95% de los casos, desde  $\pm 16\%$  a  $\pm 52\%$ . En la práctica, es posible observar variaciones mayores, especialmente entre resultados obtenidos por diferentes analistas.

(Continúa)

### 9. INFORME DEL ENSAYO

**9.1** En el Informe del ensayo indicar la norma de referencia, la temperatura de incubación, los resultados obtenidos, todas las condiciones operativas no especificadas en esta norma o aquellas consideradas como opcionales y los incidentes que puedan haber influenciado en el resultado. Además, se debe incluir toda la información necesaria para la completa identificación de la muestra

*(Continúa)*



**APÉNDICE Z****Z.1 DOCUMENTOS NORMATIVOS A CONSULTAR**

Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 52:73	<i>Reglas para redondear números.</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1 529-1:94	<i>Control microbiológico de los alimentos.</i>
	<i>Preparación de medios de cultivo</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1 529-2:94	<i>Control microbiológico de los alimentos. Toma y preparación de muestras.</i>

**Z. 2 BASES DE ESTUDIO**

Norma Internacional ISO 7954: 1987 *Microbiology - General guidance for enumeration of yeasts and moulds. Colony count technique at 25 C.* International Organization for Standardization. Switzerland, 1987.

Norma Internacional FIL - IDF 31: 1964. *Count of yeasts and moulds in butter.* International Dairy Federation Belgium - Brussels, 1964.

Mossel, D.A.A., Moreno Garcia, B. *"Microbiología de los alimentos"* 1ra. edición española. Acribia. Zaragoza - España, 1982.

Harrigan, W.F., McCance, M.E. *"Métodos de laboratorio en microbiología de alimentos y productos lácteos"*. Academia. León España, 1979.

Manual Food and Drug Administration Bureau of Foods Division of Microbiology, *"Bacteriológico analítico manual"* Sta. Ed AOAC. Washington, DC, 1978.

Manual Centro Nacional de Alimentación y Nutrición. *"Métodos de examen microbiológico para alimentos y bebidas"*, Normas recomendadas. Manual práctico. Madrid, 1976.

Frazier, WIC. *"Microbiología de los alimentos"*. Acribia. Zaragoza España, 1976.

I.C.M.S.F. *"Microorganismos de los alimentos 1"*. Técnicas del análisis microbiológico. Acribia. Zaragoza España.



**Anexo 4.** Fotografías de respaldo al estudio



**Figura 42.** Lavado de materiales



**Figura 43.** Secado y empacado de materiales



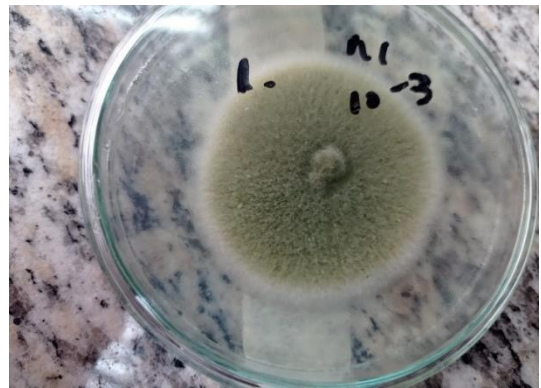
**Figura 44.** Pesado de la muestra (harina de trigo)



**Figura 45.** La muestra llevada al stomacher para que se homogenice



**Figura 46.** Diluciones



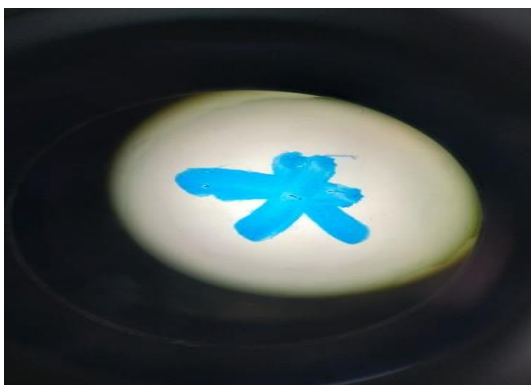
**Figura 47.** Aislamiento (*Aspergillus flavus*)



**Figura 48.** Cultivo monospórico



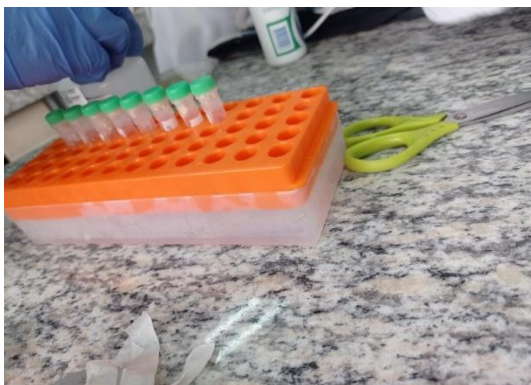
**Figura 49.** Visualización microscópica del cultivo monospórico



**Figura 50.** Visualización de la hifa del hongo



**Figura 51.** Pesado de las muestras para la realización de la PCR



**Figura 52.** Ubicar la muestra en los tubos de martemix y colocar 1000 ul de de la sustancia CLS-Y



**Figura 53.** Llevar a la centrifugadora a 13000 rpm durante 10 min.