

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**



**PRESENCIA DE LA AFLATOXINA M1 EN LECHE
HUMANA DE MADRES GUATEMALTECAS**

Catherin Angelamaría Fuentes Orozco

Katterine Azucena Sagastume Morales

Carla Reneé Guerra Martínez

QUÍMICAS BIÓLOGAS

Guatemala, octubre de 2018

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**



**PRESENCIA DE LA AFLATOXINA M1 EN LECHE
HUMANA DE MADRES GUATEMALTECAS**

Seminario de Investigación

Presentado por

Catherin Angelamaría Fuentes Orozco

Katterine Azucena Sagastume Morales

Carla Reneé Guerra Martínez

Para optar al título de
QUÍMICAS BIÓLOGAS

Guatemala, octubre de 2018

JUNTA DIRECTIVA

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda	Decano
Licda. Elsa Julieta Salazar Meléndez de Ariza, M.A.	Secretaria
MSc. Miriam Carolina Guzmán Quilo	Vocal I
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
Br. Andreina Delia Irene López Hernández	Vocal IV
Br. Carol Andrea Betancourt Herrera	Vocal V

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Por darnos la sabiduría, inteligencia y capacidad para alcanzar nuestras metas, por ponernos en el lugar y en el tiempo correcto y proporcionarnos la fortaleza necesaria para seguir adelante.

A NUESTROS PADRES

Por ser los pilares que nos inyectan cada día el querer ser mejor, por enseñarnos a trabajar para alcanzar nuestros sueños y por su incansable lucha para convertirnos en profesionales.

A NUESTROS HERMANOS

Por su amor y apoyo incondicional, por creer en nosotras y compartir los buenos y malos momentos de la vida.

A NUESTRA FAMILIA

Por apoyar nuestros objetivos y llevarnos siempre por el camino de la unidad, entendimiento y humildad, brindándonos su cariño en todo momento.

A NUESTROS AMIGOS

Por ser la familia que encontramos durante esta etapa, gracias por compartir experiencias que formarán parte importante de nuestra vida.

A NUESTRA CASA DE ESTUDIO

La Universidad de San Carlos de Guatemala, la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia y la Escuela de Química Biológica por brindarnos los conocimientos para nuestro crecimiento profesional y personal.

A NUESTROS ASESORES Y REVISORA

Por la orientación y el apoyo brindado durante el transcurso de este estudio compartiendo constantemente sus conocimientos.

A LAS INSTITUCIONES QUE NOS APOYARON

A los miembros de los Bancos de leche humana de los Hospitales de Antigua Guatemala, Totonicapán y San Marcos por el apoyo en el proceso de muestreo y al Laboratorio de Inmunología-Autoinmunidad del Hospital Roosevelt, por permitir el uso de las instalaciones para el procesamiento y análisis de las muestras.

ÍNDICE

I. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN	1
II. RESUMEN.....	2
III. ANTECEDENTES.....	3
A. Lactancia materna	3
B. Beneficios de la lactancia materna	3
C. Leche humana	4
D. Composición de la leche humana madura.....	5
1. Agua.....	5
2. Proteínas	5
3. Carbohidratos.....	6
4. Lípidos	7
5. Micronutrientes.....	8
E. Contaminantes de la leche humana	12
1. Generalidades	12
2. Contaminantes	14
F. Antecedentes de aflatoxinas en Guatemala.....	27
G. Normativa para aflatoxinas en leche humana	29
1. Food and Drug Administration (FDA).....	29
2. Unión Europea (UE).....	29
3. Codex Alimentarius.....	30
4. Comisión Guatemalteca de Normas (COGUANOR).....	30
H. Métodos de Detección de Micotoxinas	30
1. Radioinmunoensayos (RIA).....	31
2. Inmunoensayos Competitivos de Enzimas Ligadas (ELISA)	31
3. Ensayos cualitativos rápidos.....	32
4. Columnas de inmunoafinidad.....	32
IV. JUSTIFICACIÓN.....	34
V. OBJETIVOS	35
VI. HIPÓTESIS.....	36
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	37

A. Universo de trabajo	37
B. Muestra.....	37
C. Cálculo de muestra	37
D. Diseño de Muestreo.....	38
E. Recursos	38
1. Investigadores	38
2. Asesores.....	38
3. Colaboradores	38
4. Institucionales	38
F. Físicos.....	38
1. Materiales	38
2. Equipo.....	39
3. Material de laboratorio	39
4. Reactivos	39
G. Procedimiento.....	40
1. Toma de muestra	40
2. Análisis y procesamiento de muestras.....	42
H. Diseño estadístico.....	45
1. Tipo de estudio	45
2. Análisis y procesamiento de datos.....	45
3. Procesamiento de datos	46
I. Aspectos éticos	46
VIII. RESULTADOS	47
IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	52
X. CONCLUSIONES	58
XI. RECOMENDACIONES	59
XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
XIII. ANEXOS	70

I. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN

Este estudio forma parte de una serie de investigaciones que se han realizado en la Escuela de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, dirigidas a la caracterización de la leche humana en la población guatemalteca. Los estudios previos han evaluado factores inmunológicos, como las concentraciones de inmunoglobulina A (Linares, 2013), o relacionados al área de control de calidad, de buenas prácticas de manufactura en los bancos de leche humana (Guzmán, Sempe, y Guzmán 2016). En este estudio se determinó la presencia de aflatoxina M1 (AFM1), que es uno de los contaminantes presentes en la leche.

Guatemala es un país que se distingue por su variabilidad climática, lo que propicia a que se reproduzcan diversas especies de hongos, en los diferentes granos básicos cultivados en el campo, que son consumidos por la población guatemalteca. Los hongos producen toxinas que dañan la salud de quienes las consumen, ya que son sustancias que pueden llegar a producir, hepatotoxicidad. Las de mayor impacto son las aflatoxinas B1 y B2, que pueden ser transformadas por el metabolismo de los animales que las ingieren en aflatoxinas M1 y M2, las cuales aparecen en la leche (tanto animal como humana), la orina y las heces. Los niños son más susceptibles a estas toxinas debido a que su metabolismo aún no se ha desarrollado completamente.

Diversos estudios realizados en Latinoamérica han demostrado que a través de la leche humana se pueden transmitir toxinas como la AFM1 al niño lactante. En Colombia se determinó los niveles de AFM1 en leche humana obteniendo que el 90% de las muestras analizadas fueron positivas para AFM1 (Sánchez, 2014). En Ecuador se realizó la evaluación de la prevalencia de AFM1 en leche humana y su relación con la fuente dietaria de aflatoxinas, obteniendo resultados positivos para AFM1 en un 11.5% y de una relación significativa entre el consumo de quesillo tierno y la contaminación de la leche humana ($p < 0.001$) (Ballesteros, 2014). Tomando en consideración la amplia variación reportada en diversos países de Latinoamérica, se consideró necesario realizar en Guatemala este tipo de estudio, donde se conoció la situación actual de AFM1 en las regiones mencionadas anteriormente del país.

II. RESUMEN

La leche humana fomenta el desarrollo sensorial y cognitivo, y protege al niño de enfermedades crónicas e infecciosas, sin embargo es susceptible a contaminación biológica y química. Dentro de los contaminantes de mayor riesgo se encuentran las aflatoxinas, que son metabolitos secundarios producidos mayormente por los hongos *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*, los cuales contaminan los alimentos con aflatoxina B1 y G1, que al ser consumidos por las madres son metabolizados por el hígado en Aflatoxina M1 (AFM1), la cual es excretada en diferentes vías, entre ellas, la leche materna (Fundación vasca para la seguridad alimentaria, 2005).

El objetivo principal de este estudio fue determinar la presencia de AFM1 en leche humana de mujeres guatemaltecas. Las muestras se recolectaron en los Bancos de leche humana (BLH) de San Marcos, Antigua Guatemala y Totonicapán. Se seleccionaron por conveniencia a 120 madres y se recolectó información sobre su consumo de alimentos a través del cuestionario de frecuencia, para reportar la influencia de estos en la presencia o ausencia de AFM1 en las muestras, las cuales fueron obtenidas de acuerdo a la técnica que se utilizaba en cada banco de leche.

La detección de la AFM1 se realizó con un ELISA (VERATOX®), siguiendo el protocolo indicado por el fabricante con un límite de detección mayor de 4.3 ng/L. Los datos se analizaron con estadística descriptiva utilizando los programas Epi Info™ 7 y STATA. Se encontró 33 leches positivas para AFM1 con una incidencia del 27.5% y niveles que van desde 4.3 hasta 32.2 ng/L. De las cuales solamente dos muestras sobrepasaron el límite permitido por Unión Europea (UE) (25 ng/L). La mayor cantidad de muestras positivas fueron recolectadas en el Banco de leche de Antigua Guatemala.

Palabras clave: aflatoxina M1, leche humana.

III. ANTECEDENTES

A. Lactancia materna

La Organización Mundial de la Salud (OMS) (2016) define la lactancia materna como la alimentación con ningún otro alimento o bebida, excepto la leche humana, durante los primeros 6 meses de vida; sin embargo, se permite que el lactante reciba jarabes o gotas de vitaminas, minerales y medicinas. También recomienda que posterior a los 6 meses de vida, los lactantes deban empezar a recibir alimentación complementaria, pero sin abandonar la lactancia materna hasta los 2 años o más.

En 1981 la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF) hacen énfasis en el en el Código Internacional de Comercialización de Sucedáneos de la Leche Materna, en la importancia de mantener la práctica de la lactancia natural como medio para mejorar la salud y la nutrición de lactantes y niños de corta edad.

B. Beneficios de la lactancia materna

La leche humana fomenta el desarrollo sensorial y cognitivo, y protege al niño de enfermedades crónicas e infecciosas, principalmente gastrointestinales, como lo demuestran los estudios de Huffman & Combest (1990), en los que infantes que no son amamantados tienen 25 veces más riesgo de morir por diarrea, frente a los que son alimentados exclusivamente con leche humana; las enfermedades diarreicas se presentan con una frecuencia mayor entre los niños que reciben alimentación artificial, incluso en condiciones de higiene adecuada. Otras infecciones agudas como otitis media, la meningitis por *Haemophilus influenzae*) y las infecciones del tracto urinario, resultan ser menos comunes y graves entre los niños alimentados por lactancia materna exclusiva durante al menos 4 meses (Kramer, 2001; Duncan, 1993; Silfverdal, Bodin & Olcén, 1999; Marild, 2004).

A largo plazo, los niños alimentados de manera artificial presentan un mayor riesgo de padecer enfermedades con base inmunológica, especialmente asma, diabetes tipo 1; enfermedad celíaca y colitis ulcerativa (Klement, Cohen, Boxman, Joseph & Reif, 2004; Sadauskaite, 2004; Akobeng, 2006).

La lactancia materna también representa beneficios para la madre, a corto y a largo plazo, Chua y colaboradores demostraron en 1994 que puede reducir el riesgo de hemorragia postparto, debido

a que se incrementan los niveles de oxitocina, lo que aumenta la actividad uterina. También existen pruebas crecientes acerca del menor riesgo de cáncer de mama y de ovario entre las madres que amamantan (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2002; Rosenblatt & Thomas, 1993).

C. Leche humana

La leche humana ofrece al niño el alimento ideal y completo durante los primeros 6 meses de vida y sigue siendo la fuente óptima de lácteos durante los primeros dos años, al ser complementada con otros alimentos (Belén, Veranes, Castillo, Rizo y Cádiz, 2009). Cada leche tiene características propias que la diferencian significativamente de otras leches de mamíferos y la hacen adecuada a la cría de la especie. Del punto de vista nutricional, la infancia es un período muy vulnerable, ya que es el único período en que un solo alimento es la única fuente de nutrición, y justamente durante una etapa de maduración y desarrollo de órganos (Micheo, 1996).

La leche humana es un fluido vivo que se adapta a los requerimientos nutricionales e inmunológicos del niño a medida que éste crece y se desarrolla. Se distinguen: la leche de pretérmino, el calostro, la leche de transición y la leche madura (Micheo, 1996).

El calostro se produce durante los primeros 3 a 4 días después del parto. Es un líquido amarillento y espeso de alta densidad y poco volumen. En los 3 primeros días postparto el volumen producido es de 2 a 20 mL por mamada, siendo esto suficiente para satisfacer las necesidades del recién nacido. La producción de leche durante el primer día no supera los 100 mL, pero aumenta significativamente entre las 36 y 48 horas postparto, nivelándose a volúmenes de 500-750 mL/24 horas a los 5 días postparto (Quiroz y Quiroz, 2014).

La leche de transición es la leche que se produce entre el 4° y el 15° día postparto. Entre el 4° y el 6° día se produce un aumento brusco en la producción de leche (bajada de la leche), la que sigue aumentando hasta alcanzar un volumen notable, aproximadamente 600 a 800 mL/día, entre los 8 a 15 días postparto. Se ha constatado que hay una importante variación individual en el tiempo en que las madres alcanzan el volumen estable de su producción de leche. Los cambios de composición y volumen son muy significativos entre mujeres y dentro de una misma mujer, durante los primeros 8 días, para luego estabilizarse (Paz, Zalles y Cruz, 2011).

La leche de transición va variando día a día hasta alcanzar las características de la leche madura. La leche humana madura comienza su producción a partir del día 15 postparto y puede continuar por más de 15 meses. Su volumen promedio es de 750 mL/día, pero puede llegar hasta 1200 mL/día en madres con embarazo múltiple (García, 2011).

D. Composición de la leche humana madura

La leche humana no es solo un conjunto de nutrientes apropiados para el lactante, sino un fluido vivo que tiene más de 200 componentes conocidos que interactúan y tienen más de una función individual. Generalmente incluyen la función nutricional, de protección contra las infecciones y de estímulo del desarrollo cognoscitivo. Los principales componentes de la leche son: agua, proteínas, carbohidratos, grasas, minerales y vitamina, también contiene hormonas y enzimas (Micheo, 1996).

1. Agua

La leche humana contiene un 88% de agua y su osmolaridad es semejante al plasma, permite al niño mantener un perfecto equilibrio electrolítico (Paz et al., 2011).

2. Proteínas

Entre los mamíferos, la leche humana madura posee la concentración más baja de proteína (0.9 g/dL). Sin embargo, es la cantidad adecuada para el crecimiento óptimo del niño. La proteína de la leche humana está compuesta de 30% de caseína y 70% de proteínas del suero. La caseína está formada por micelas complejas de caseinato y fosfato de calcio. Las proteínas del suero son entre otras: alfa-lactoalbúmina (de alto valor biológico para el niño), seroalbúmina, beta-lactoglobulinas, inmunoglobulinas, glicoproteínas, lactoferrina, lisozima, enzimas, moduladores del crecimiento, hormonas y prostaglandinas (García et al., 2016).

Las inmunoglobulinas de la leche humana son diferentes a las del plasma, tanto en calidad como en concentración. La IgA es la principal inmunoglobulina en la leche humana. La IgG es la más importante del plasma y se encuentra en una cantidad 5 veces mayor que la IgA. La proporción de inmunoglobulinas en la leche se modifica progresivamente hasta llegar al nivel que se mantendrá en la leche madura, más o menos a los 14 días postparto (Quiroz y Quiroz, 2014).

El calostro tiene 1.740 mg/dL de IgA contra 43 mg/dL de IgG. La leche madura tiene 100 mg/dL de IgA contra 4 mg/dL de IgG. La IgA protege tanto a la glándula mamaria como a las

mucosas del lactante durante el período en que la secreción de IgA en el niño es insuficiente (Belén et al., 2009).

La lactoferrina tiene acción bacteriostática sobre ciertos gérmenes ferodependientes (*Escherichia coli*), contribuye a la absorción del hierro en el intestino del niño. La lisozima constituye un factor antimicrobiano no específico, tiene efecto bacteriolítico contra Enterobacterias y bacterias Gram positivas. Además, contribuye a la mantención de la microbiota intestinal del lactante y además tiene propiedades anti-inflamatorias (García et al., 2016).

Ocho de los veinte aminoácidos presentes en la leche son esenciales y provienen del plasma de la madre. El epitelio alveolar de la glándula mamaria sintetiza algunos aminoácidos no esenciales. La taurina es un importante aminoácido libre de la leche humana, que el recién nacido no es capaz de sintetizar. Es necesario para conjugar los ácidos biliares y como posible neurotransmisor o neuromodulador del cerebro y la retina (García et al., 2016).

3. Carbohidratos

El principal carbohidrato de la leche es la lactosa, un disacárido compuesto de glucosa y galactosa. La lactosa parece ser un nutriente específico para el primer año de vida, la leche humana tiene un alto contenido de lactosa, 7 g/dL (cerca de 200mM) y es metabolizada por la enzima lactasa que sólo se encuentra en los mamíferos infantes mientras se alimentan con leche humana. De ahí que la mayoría de las personas presentan intolerancia a la lactosa después de la infancia. La alta concentración de lactosa en la leche humana facilita la absorción del calcio y el hierro y promueve la colonización intestinal con el *Lactobacillus bifidus*, microorganismo fermentativo que ayuda a mantener un ambiente ácido en el intestino, inhibir el crecimiento de bacterias, hongos y parásitos patógenos al ser humano. Se metaboliza en glucosa y galactosa antes de ser absorbida por el intestino. Provee el 40% de la energía, pero además tiene otras funciones. La porción galactosa participa en la formación de los galactolípidos necesarios para el sistema nervioso central. (Muyphy et al., 2016; Paz et al., 2011).

El crecimiento del *Lactobacillus* es promovido por el factor bífido, un carbohidrato complejo que contiene nitrógeno, el cual no está presente en los derivados de leche de vaca. De ahí que los suplementos alimentarios dados en los primeros días de vida interfieren con este mecanismo protector (Muyphy et al., 2016).

Además de la lactosa, en la leche humana se han identificado más de 50 oligosacáridos de diferente estructura, muchos de los cuales contienen nitrógeno. Estos constituyen el 1.2% de la leche madura (comparado con el 0.1% en la leche de vaca). Los componentes de estos azúcares complejos incluyen glucosa, galactosa, fructosa, n-acetil glucosamina y ácido siálico y representan una porción significativa del nitrógeno no proteico de la leche humana (Paz et al., 2011).

4. Lípidos

Después del nacimiento, el principal aporte de energía en el niño lo constituyen las grasas. La leche humana proporciona el 50% de las calorías en forma de grasa. El niño consume esta dieta alta en grasa en un período en que están inmaduras tanto la secreción de lipasa pancreática como la conjugación de las sales biliares. Esta inmadurez se compensa por las lipasas linguales y gástricas y además por una lipasa no específica de la leche humana que se activa al llegar al duodeno en presencia de las sales biliares (Rudolph et al., 2016).

La presencia de un sustrato y su enzima en el mismo líquido, es algo exclusivo de la leche humana y en la de los gorilas. En la leche fresca esta lipasa estimulada por las sales biliares contribuye a la digestión del 30 al 40% de los triglicéridos en un período de 2 horas, situación particularmente importante en la alimentación de los niños prematuros, cuyas sales biliares y producción de lipasa pancreática están aún más deprimidas. Esta lipasa se destruye por el calor, por lo que es importante usar la leche humana fresca (Rudolph et al., 2016).

La grasa es el componente más variable de la leche humana. Las concentraciones de grasa aumentan desde 2 g/dL en el calostro, hasta alrededor de 4 a 4.5 g/dL a los 15 días post parto. De ahí en adelante siguen siendo relativamente estables, pero con bastantes variaciones interindividuales tanto en el contenido total de grasa, como en la composición de los ácidos grasos. Hay fluctuaciones diurnas, que son dependientes de la frecuencia de las mamadas. También hay una importante variación dentro de una misma mamada, siendo la leche del final de la mamada, 4 a 5 veces más concentrada en grasa que la primera. Se cree que esta mayor concentración de grasa de la segunda parte de la mamada tiene que ver con el mecanismo de saciedad del niño. Cuando la madre se extrae la leche, debe tener en cuenta esta diferencia, especialmente en el caso de prematuros, ya que la leche del final tiene más calorías (Rudolph et al., 2016).

La grasa de la leche humana es secretada en glóbulos microscópicos, de 1-10 μm . La membrana globular, que recubre los lípidos no polares, como los triglicéridos y el colesterol, está compuesta de fosfolípidos complejos. La composición de los ácidos grasos de la leche humana es relativamente estable, con un 42% de ácidos grasos saturados y 57% de poliinsaturados (Paz et al., 2011).

Los ácidos araquidónicos (C 20:4) y docosahexaenoico (C 22:6) participan en la formación de la sustancia gris y en la mielinización de las fibras nerviosas. Se forman a partir de los ácidos linoleico (C 18:2) y linolénico (C 18:3) respectivamente. Estos últimos se obtienen de la dieta de la madre. El contenido de ellos es alrededor de 4 veces mayor en la leche humana (0.4 g/dL) que en la de vaca (0.1 g/dL). A pesar de que los ácidos linoleico y linolénico se ven afectados por la dieta de la madre y por la composición de su grasa corporal, toda leche humana es rica en estos ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. La mayoría de las fórmulas contienen muy pocos o no los contienen, aunque a partir de 1989 algunos fabricantes los agregaron (Micheo, 1996).

La síntesis de las prostaglandinas depende de la disponibilidad de éstos ácidos grasos esenciales. Estas se encuentran distribuidas ampliamente en el tracto gastrointestinal del niño y contribuyen en forma importante en los mecanismos generales de defensa. La leche humana puede contener cantidades significativas de prostaglandinas que las fórmulas no contienen (Micheo, 1996).

5. Micronutrientes

La concentración de vitaminas en la leche humana es la adecuada para el niño, pero puede variar según la ingesta de la madre (Paz et al., 2011).

a. Vitaminas liposolubles

La absorción de vitaminas liposolubles en el lactante está relacionada con la variabilidad de la concentración de la grasa en la leche humana (Paz et al., 2011).

i. Vitamina A

La concentración de vitamina A en la leche humana es mayor que en la leche de vaca. En el calostro es el doble que en la leche madura (Quiroz y Quiroz, 2014).

ii. Vitamina K

La concentración de vitamina K es mayor en el calostro y en la leche de transición. Después de 2 semanas, en los niños amamantados, se establece la provisión de vitamina K por la microbiota intestinal. Cuando no se da el calostro o la leche temprana, el riesgo de enfermedad hemorrágica es mayor, a menos que se provea al niño vitamina K inmediatamente después del nacimiento (Quiroz y Quiroz, 2014).

iii. Vitamina E

El contenido de vitamina E en la leche humana cubre las necesidades del niño a menos que la madre consuma cantidades excesivas de grasas poliinsaturadas sin un aumento paralelo de vitamina E (Quiroz y Quiroz, 2014).

iv. Vitamina D

El contenido de vitamina D de la leche humana es bajo (0.15 mg/dL). En los niños amamantados con pecho exclusivo no se manifiestan deficiencias, probablemente debido a la presencia de vitamina D hidrosoluble en la fase acuosa de la leche en cantidades tan altas como 0.88 mg/dL (Paz et al., 2011).

Esta vitamina D hidrosoluble no se procesa en el tracto gastrointestinal, sino a través de la piel en presencia de luz solar. Se necesita sólo una buena exposición al sol para producir suficiente vitamina D. Se puede decir que sólo tienen riesgo de deficiencia de vitamina D las mujeres y niños que no consumen aceites marinos y que están totalmente cubiertos y no expuestos a la luz del día (Dingess et al., 2016).

b. Vitaminas hidrosolubles

En estas vitaminas pueden ocurrir variaciones dependiendo de la dieta materna. Los niveles son más altos en las madres bien nutridas. Las deficiencias de estas vitaminas en los niños son raras, aún en casos de mujeres desnutridas o vegetarianas que tienen mayor riesgo de deficiencia de vitamina B. La concentración de vitamina B12 en la leche humana es muy baja, pero su biodisponibilidad aumenta por la presencia de un factor específico de transferencia (Dingess et al., 2016).

Las concentraciones de niacina, ácido fólico y ácido ascórbico, son generalmente más altas que en la leche de los mamíferos rumiantes. Las usuarias de anticonceptivos orales por largo plazo pueden presentar niveles bajos de vitamina B6 en su leche. Aunque las madres no presentan signos, la insuficiencia de estas vitaminas en la leche puede tener consecuencias adversas para el niño. De ahí que es necesario que la madre las consuma diariamente en su dieta (Dingess et al., 2016).

c. Minerales

La concentración de la mayoría de los minerales en la leche humana: calcio, hierro, fósforo, magnesio, zinc, potasio y flúor, no es afectada significativamente por la dieta materna. Los mecanismos compensatorios, como una disminución en la excreción urinaria del calcio comienzan a actuar, y sólo en casos extremos se alterarán significativamente las reservas de los tejidos propios de la madre (Paz et al., 2011).

En el caso del flúor no hay evidencia de la transferencia de este mineral desde el plasma a la leche humana y al parecer es la mama la que inhibe este pasaje, encontrándose en la leche sólo en niveles traza. Las concentraciones de minerales en la leche humana son más bajas que en cualquiera de los sustitutos y están mejor adaptados a los requerimientos nutricionales y capacidades metabólicas del lactante (Paz et al., 2011).

i. Calcio, Fósforo

La relación calcio-fósforo en la leche humana es de 2:1. La leche de vaca tiene una mayor proporción de fósforo, lo que explica la hipocalcemia neonatal, común en los lactantes alimentados artificialmente. La disponibilidad de calcio en la leche de vaca disminuye también por la formación de jabones de calcio insolubles en el intestino, los cuales pueden causar obstrucción intestinal (Micheo, 1996).

ii. Hierro

La alta biodisponibilidad del hierro de la leche humana es el resultado de una serie de interacciones complejas entre los componentes de la leche y el organismo del niño: la mayor acidez del tracto gastrointestinal, la presencia de niveles apropiados de zinc y cobre, el factor de transferencia de lactoferrina, que impide que el hierro esté disponible para las bacterias intestinales, liberándolo sólo cuando los receptores específicos se unen a la transferrina, son factores importantes para aumentar la absorción del hierro (Micheo, 1996).

El hierro de la leche humana se absorbe en un 70%, el de la leche de vaca un 30% y en los sustitutos sólo el 10%. En los niños amamantados exclusivamente con leche humana en los primeros 6-8 meses de vida, la anemia por deficiencia de hierro es poco frecuente. Los niños amamantados por madres bien nutridas tienen suficiente hierro en sus depósitos hepáticos como para cubrir sus necesidades durante buena parte del primer año de vida. Estudios recientes han demostrado que la introducción temprana de otros alimentos en la dieta del niño amamantado altera esta absorción (Paz et al., 2011).

También se ha demostrado que el hierro suplementario puede causar problemas al saturar la lactoferrina. Al disminuir su efecto bacteriostático promueve el crecimiento de gérmenes patógenos que pueden dañar y causar un sangrado suficiente en el intestino (detectado microscópicamente) como para producir una anemia por falta de hierro. Por otra parte, la adición de hierro no hemínico puede reducir la absorción de cobre y zinc (Quiroz y Quiroz, 2014).

Por lo tanto la suplementación con hierro, tiene indicaciones específicas en caso de prematuridad o pérdida de sangre neonatal, aunque no está exenta de riesgos. También se recomienda suplementar a los lactantes entre los 6 meses y 1 año ya que su alimentación con fitatos no permite un aporte adecuado de hierro (Micheo, 1996).

iii. Zinc

El zinc es esencial para la estructura de las enzimas y su funcionamiento y para el crecimiento y la inmunidad celular. Las cantidades de zinc en la leche humana son pequeñas pero suficientes para cubrir las necesidades del niño sin alterar la absorción del hierro y del cobre (Quiroz y Quiroz, 2014).

La leche humana es terapéutica en caso de acrodermatitis enteropática, una enfermedad producida por deficiencia de zinc, que ocasionalmente ocurre en los niños alimentados con fórmula (Quiroz y Quiroz, 2014).

d. Hormonas

Una lista completa de las hormonas de la leche incluiría: oxitocina, prolactina, esteroides suprarrenales y ováricos, prostaglandinas y otras como: GnRH (hormona liberadora de gonadotropina), GRF (factor de liberación de hormona del crecimiento), insulina, somatostatina,

relaxina, calcitonina y neurotensina, que se encuentran en la leche en niveles mayores que los de la sangre materna y la TRA (hormona de liberación de la tirotrópina), TSH (hormona tiroideo estimulante), tiroxina, triiodotironina y eritropoyetina, en niveles menores que los del suero materno. La liberación de hormonas puede estar influenciada por componentes de la leche como las beta caseomorfinas humanas, péptidos opioides que pueden afectar el sistema nervioso central neonatal (Belén et al., 2009).

e. Nucleótidos

En la leche humana, están presentes nucleótidos, que afectan la absorción de las grasas y numerosos factores de crecimiento, entre los que se incluyen el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF I -II y III) y el factor de crecimiento de nervios (NGF) entre otros (Paz et al., 2011).

f. Enzimas

Las múltiples enzimas de la leche humana tienen diversas funciones. Algunas reflejan los cambios fisiológicos que ocurren en las mamas; otras son importantes para el desarrollo neonatal (enzimas proteolíticas, peroxidasa, lisozima, xantino-oxidasa) y otras aumentan las enzimas digestivas propias del infante (alfa-amilasa y lipasa estimulada por sales biliares). Muchas de ellas se encuentran en concentraciones más altas en el calostro que en la leche madura (García et al., 2016).

La lisozima es bacteriolítica contra bacterias Gram positivas y puede proteger contra algunos virus. Hay enzimas que tienen funciones inmunológicas directas y otras que pueden actuar en forma indirecta, promoviendo la maduración celular (García et al., 2016).

E. Contaminantes de la leche humana

1. Generalidades

De forma global, la lactancia materna constituye el alimento más saludable y menos contaminado para el lactante. Las fórmulas infantiles contienen igualmente trazas de sustancias químicas y requieren un proceso industrial complejo para su fabricación, en el que a pesar de los rigurosos controles de calidad, se ha descrito la presencia de tóxicos y contaminantes químicos y biológicos, con efectos negativos para la salud (Ares et al., 2013).

Por lo que la Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos, menciona que se convive con más de 120000 sustancias químicas, que pueden llegar al organismo a través de los alimentos, el aire y el agua contaminados. La presencia de compuestos químicos tóxicos es universal en todas las matrices biológicas, incluida la leche humana (Ares et al., 2013).

Según el artículo de Ares et al. (2013), la alimentación es la principal vía de exposición a sustancias tóxicas de la población general. Las sustancias químicas llegan a los alimentos por el uso de plaguicidas y otros agroquímicos durante su producción, por la contaminación del agua, suelo y aire de las zonas de producción y por la presencia de sustancias tóxicas en los envases o en los utensilios de cocina.

La lactancia que es una de las formas de alimentación para la mayoría de recién nacidos es una de las vías por las que el organismo de las mujeres excreta sustancias químicas sintéticas como: medicamentos, componentes de alimentos, bebidas, tabaco, productos de higiene y cosmética, contaminantes ambientales, componentes de bienes de consumo, plaguicidas y contaminantes laborales (Romano, 2008).

Se considera que las mayores exposiciones a tóxicos de los niños lactantes se producen en las primeras semanas de vida, cuando la madre excreta las sustancias acumuladas a lo largo de toda su vida. Al continuar la lactancia, se excretan en menor medida las sustancias a las que está expuesta cotidianamente la madre a través de los alimentos. Por tanto, la exposición a tóxicos se reduciría (en el caso de que la madre redujese su exposición) pero los beneficios de la lactancia se mantendrían (Romano, 2008).

Según Guardino y Santolaya (2000) existe la obligación de clasificar y etiquetar las sustancias que pueden excretarse a través de la leche humana con la frase de riesgo R64, la cual se le asigna a todas las sustancias y preparados absorbidos por mujeres que pueden interferir en la lactancia o que pueden estar presentes en la leche humana en cantidades suficientes para afectar a la salud del lactante. Sin embargo en Guatemala no se aplica este tipo de etiquetados ya que no existe ninguna ley que lo establezca.

Además, la leche humana se utiliza como indicador de la contaminación ambiental al existir una relación directa entre la presencia de algunos contaminantes como sustancias químicas sintéticas, ambientales y plaguicidas. Así, la leche humana es uno de los indicadores elegidos por

el Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes para medir la eficacia de las medidas adoptadas a escala mundial para eliminar estos contaminantes (Romano, 2008).

Por ser la leche humana el alimento idóneo para el neonato, es fundamental analizar su inocuidad y reconocer numerosos informes que refieren la presencia de residuos y contaminantes en la misma. Entre las múltiples causas de esta presencia se pueden citar las condiciones actuales del progreso en las actividades agrícolas y veterinarias, la industrialización, aumento de basura y su tratamiento, explotaciones mineras, control de plagas y enfermedades endémicas y la cadena productiva de los alimentos. Todo ello y sus interacciones con los factores geográficos, climáticos y sociales, configura un complejo panorama que incide sobre la salud (Flores, Carabias, Rodríguez y Herrero, 2002).

2. Contaminantes

Según Flores et al. (2002) los residuos y contaminantes presentes en la leche abarcan los grupos de plaguicidas, antibióticos, sulfonamidas, nitrofuranos, fasciolicidas, metales pesados, micotoxinas, bifenilos, policlorados, dibenzo-p-dioxinas y dibenzofuranos policlorados. Dentro de los más importantes se encuentran nitratos, nitritos, nitrosaminas, detergentes y desinfectantes.

a. Plaguicidas

Algunos de ellos sufren biotransformaciones dentro de los organismos vivos y se convierten en productos que aumentan su capacidad tóxica; es el caso de aldrín y heptacloro que se convierten en dieldrín y en epóxido de heptacloro respectivamente. En la etapa de lactancia se movilizan a la leche y ésta es la vía preferente de eliminación en los mamíferos femeninos (Flores et al., 2002).

También se ha evidenciado que en la leche humana se encuentran los plaguicidas organoclorados y que su contenido se ve influenciado por factores de la madre, como la edad, origen, número de lactancia, meses de lactancia, y hábitos alimenticios. Adicionalmente a la influencia del medio sobre los lactantes, la carga tóxica se ve aumentada con la presencia de organoclorados persistentes que están específicamente en la leche humana y que el recién nacido recibe en condición de máxima vulnerabilidad ya que sus sistemas desintoxicantes no están maduros (Flores et al., 2002).

Los plaguicidas organofosforados y carbamatos manifiestan una toxicidad superior a la de los organoclorados y pueden aparecer en la leche después de ser ingeridos por vía oral, por lo que

tiene especial importancia el establecimiento de sus LMR (Límite máximo de residuos) que se presentan en la tabla 1 y 2.

Tabla 1 Límite máximo de residuos e ingesta diaria admisible de plaguicidas organoclorados en leche

Plaguicida	LMR (mg/Kg base grasa)	IDA (mg/Kg de peso corporal/día)
B-HCH	0.01	
Aldrín + Dieldrín	0.006	0.0005
Endrín	0.004	0.002
Heptacloro + epóxido de heptacloro	0.006	0.0005
DDT + metabolitos	0.05	0.020
Endosulfán	0.004	
Clordano	0.002	

*LMR=Límite máximo de residuos;
IDA= Ingesta diaria admisible.

Fuente: Flores, Carabias, Rodríguez, y Herrero, 2002.

Tabla 2 Límite máximo de residuos de plaguicidas organofosforados y carbamatos en leche

Plaguicida	LMR (mg/Kg base grasa)	IDA (mg/Kg de peso corporal. día)
Clorpirifos	0.01	0.01
Clorfenvinfos	0.0005	0.008
Coumaphos	0.0005	0.02
Diazinón	0.002	0.02
Disulfotón	0.0003	0.02
Diclorvos	0.004	0.02
Ethión	0.002	0.02
Fenthión	0.001	0.05
Metil-paraoxón	0.0003	0.01
Triclorfón	0.01	0.05
Aldicarb	0.003	0.01
Benomyl	0.02	0.1
Carbaryl	0.01	0.1
Pirimicarb	0.02	0.05

*LMR=Límite máximo de residuos
IDA= Ingesta diaria admisible.

Fuente: Flores, Carabias, Rodríguez, y Herrero, 2002.

b. Elementos pesados

Los elementos de rastreo, como el mercurio (Hg) y el arsénico (As), son algunos de los xenobióticos más dañinos porque son generalizados y persistentes en el medio ambiente. Hg y As pueden afectar negativamente el desarrollo del sistema nervioso fetal y neonatal (Ortega y Ferris, s.f.).

Por lo que la exposición a As y Hg presenta importantes problemas de salud pública, especialmente para neonatos, cuando se considera la posibilidad de transferencia de contaminantes a través de la leche humana. Las madres están expuestas a As y Hg por vía oral, de inhalación y dérmica. La vía oral se considera la principal exposición (Gaxiola et al., 2014).

El plomo, otro elemento pesado que es acumulado en los huesos de la madre es removido durante el embarazo, lo que representa una fuente endógena para el feto, siendo los niveles de metal proporcionalmente mayores conforme avanza el periodo de gestación. También esta fuente endógena puede contaminar la leche humana, siendo más elevados los niveles de Pb conforme se alarga el periodo de lactancia (Rivera, 2004).

c. Microorganismos

Tradicionalmente, se ha considerado que la leche humana era estéril mientras se encontraba dentro de la glándula mamaria. Sin embargo, actualmente se sabe que constituye una fuente de bacterias para el intestino infantil, y uno de los factores clave en el inicio y desarrollo de la microbiota intestinal del neonato; Desde un punto de vista cuantitativo, la concentración bacteriana en leche fresca obtenida de una mujer sana es muy moderada, y habitualmente se sitúa en torno a 100-300 unidades formadoras de colonias (UFC)/mL, aunque en algunos casos se pueden alcanzar valores de hasta aproximadamente 1000 UFC/mL (Arroyo et al., 2011).

i. Infecciones bacterianas graves

a. Gram positivo

Uno de los principales factores de la contaminación de leche humana es por la mastitis, que es la infección de las glándulas mamarias que provoca obstrucción en ellas. En estos casos, los agentes responsables suelen ser estafilococos coagulasa negativos (fundamentalmente *Staphylococcus*

epidermidis) y algunas especies de estreptococos, como *Streptococcus mitis* o *Streptococcus salivarius* (Arroyo et al., 2011).

1. Brucelosis

Enfermedad causada por bacterias del género *Brucella*, la cual se puede transmitir a través de la leche humana; si la madre ha sido diagnosticada cuando ya ha comenzado la lactancia, es muy probable que el niño esté contagiado y ambos necesiten tratamiento (Díaz, 2005).

2. Sífilis

La presencia de lesiones cutáneas de sífilis en el pecho o en el pezón contraindica la lactancia materna, ya que pueden contener el treponema. El niño debe ser aislado de la madre y recibir tratamiento con penicilina G si lo precisa. Cuando la madre completa el tratamiento y las lesiones cutáneas han curado, se puede reanudar la alimentación al pecho (Díaz, 2005).

ii. Infecciones virales

a. Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) tipo 1 puede ser transmitido a través de la leche humana. La infección materna por VIH constituye una contraindicación para la lactancia en países desarrollados dependiendo de la carga viral presente en la madre, se conoce que los niveles de VIH presentes en la leche materna son comparativamente más bajos que los que se encuentran en el plasma sanguíneo (Pérez, 2001).

b. Virus de la leucemia humana de células T (HTLV-A)

El virus de leucemia humana de células T (HTLV-A) causa linfoma de células T del adulto y ha demostrado la transmisión del tipo I y II, a través de la leche humana. Por lo que la infección materna por este virus es una contraindicación para la alimentación de lactancia, siempre y cuando se disponga de sustitutos adecuados. Se ha comprobado que la congelación inactiva el virus HTLV-I (Vázquez et al., 2009).

c. Herpes simple

El virus del herpes simple se ha aislado en la leche humana, pero su transmisión por esta vía es rara. Únicamente si la madre presenta lesiones herpéticas activas en los pezones o cerca de ellos debe interrumpirse la lactancia materna hasta que las lesiones sanen; si el herpes se localiza en un solo pecho, el niño puede seguir alimentándose del otro pecho (Díaz, 2005).

d. Hepatitis C (VHC)

Aunque el ácido ribonucleico (ARN) del virus de la hepatitis C (VHC) ha sido aislado en la leche humana, no se ha documentado ningún caso de contagio por esta vía. El centro para el Control y Prevención de Enfermedades y la Academia Americana de Pediatría consideran que la infección por el virus de la hepatitis C no contraindica la lactancia materna. Se ha señalado que sería prudente suspender temporalmente la lactancia si la madre infectada por VHC tiene grietas con sangrado en los pezones (Díaz, 2005).

e. Citomegalovirus (CMV)

La leche puede contener también anticuerpos específicos frente al virus, pero dichos anticuerpos no protegen frente a la infección (la tasa de infección por CMV en lactantes de madres portadoras es del 63%). En los lactantes a término la infección cursa de forma asintomática o con síntomas leves y no deja ningún tipo de secuelas, por lo que las madres portadoras del CMV (no seroconvertida reciente) pueden amamantar sin riesgo a su hijo nacido a término sano. La pasteurización y la congelación inactivan el CMV y reducen de forma considerable el riesgo de transmisión (Díaz, 2005).

f. Varicela

Si la madre no presenta lesiones en la mama, puede extraerse la leche para dársela a su hijo hasta que sea posible alimentarlo directamente al pecho, si la infección materna se produce durante la lactancia, después de las 48 horas siguientes al parto y la madre no tiene lesiones en la mama, puede continuar con la lactancia materna. Los anticuerpos presentes en la leche humana contribuirán a mejorar la evolución de la varicela, si el lactante finalmente la contrae (Díaz, 2005).

g. Sarampión

Si la madre contrae el sarampión durante la lactancia está indicado separarla de su hijo, ya que esta enfermedad es contagiosa desde antes de iniciarse el exantema. Si se produce la rara circunstancia de una madre susceptible a la infección y que haya estado expuesta inmediatamente antes del parto, se aconseja separar al niño de su madre hasta que transcurran 72 horas desde el inicio del exantema. Durante este periodo, se puede dar leche humana obtenida mediante extracción manual o sacaleches (Díaz, 2005).

iii. Infecciones por parásitos sanguíneos

a. Chagas

Esta enfermedad es causada por el *Trypanosoma cruzi*, la transmisión por la leche humana es muy rara. Se ha comprobado que la pasteurización inactiva el parásito, por lo que se puede recomendar este procedimiento en la fase aguda de la enfermedad, en la que el riesgo de transmisión puede ser algo mayor (Díaz, 2005).

d. Micotoxinas

i. Generalidades

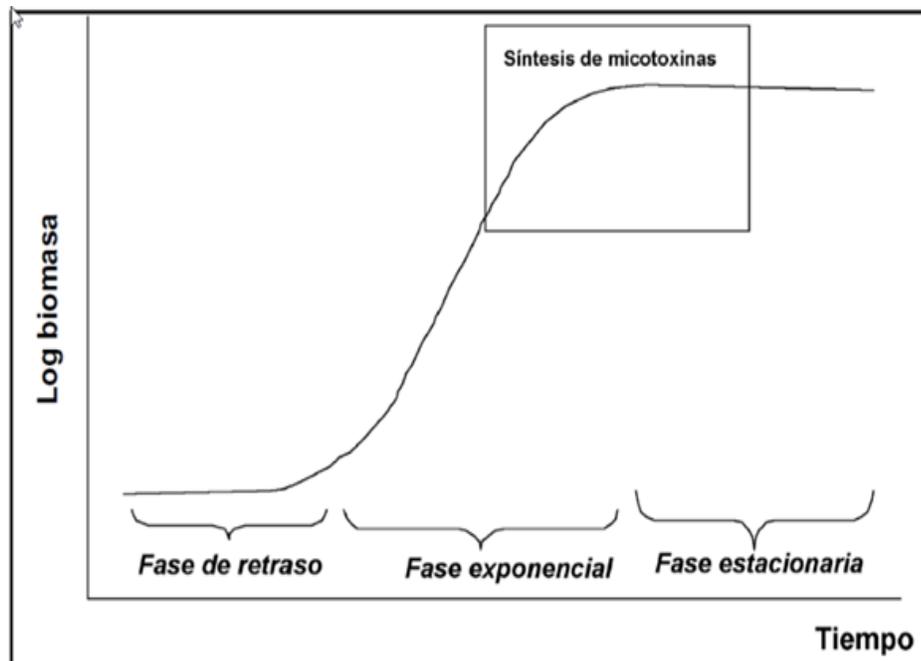
Las micotoxinas son un grupo muy amplio de metabolitos secundarios de origen fúngico caracterizadas por presentar una elevada toxicidad tanto para el hombre como para los animales, toxicidad que puede comprender desde el desarrollo de actividades carcinogénicas, teratogénicas o mutagénicas hasta la producción de desórdenes de tipo hormonal o inmunosupresor (Sanchis, Marin y Ramos, 2000).

Estas sustancias son altamente cancerígenas, tóxicas e inducen cáncer de hígado. Se han detectado en diferentes cultivos en el campo, cosecha, transporte y almacenamiento en el hogar. El maní y el maíz son productos que se contaminan con facilidad (Bogantes, 2004).

El maíz es probablemente el producto de mayor preocupación mundial debido a que crece en climas favorables al desarrollo de los hongos. Sin embargo, algunos procedimientos usados en la elaboración de subproductos del maíz, como las tortillas mediante la oxidación o alcalinización, son capaces de reducir la contaminación del producto final (Cornejo y Villaroel, s.f.).

Las micotoxinas son compuestos de bajo peso molecular producidos por hongos filamentosos principalmente de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, a determinadas condiciones de temperatura, humedad y sustrato. Estos hongos pueden crecer en una amplia gama de productos agrícolas en el campo, en cosecha, y en almacenamiento. Las micotoxinas aparecen como contaminantes naturales y su producción suele suceder al final de la fase exponencial o al principio de la fase estacionaria del crecimiento del hongo (Figura 1), siendo a menudo asociado con la diferenciación y la esporulación (Ballesteros, 2014).

Figura 1 Fases de crecimiento fúngico y localización de la síntesis de micotoxinas



Fuente: Ballesteros, 2014.

Entre los factores ambientales más importantes que influyen sobre el crecimiento de los hongos y la producción de micotoxinas están la temperatura y la actividad de agua, que a su vez está muy relacionada con la humedad relativa ambiental. Otros factores que influyen en la proliferación de los hongos y la producción de micotoxinas en los alimentos pueden ser los daños mecánicos y la acción de agentes biológicos tales como insectos y roedores, lo que aumentan la susceptibilidad a la infección, añadiendo que estos pueden portar esporas de hongos e introducirlas en los productos atacados (Ballesteros, 2014).

ii. Clasificación de las micotoxinas

Las principales micotoxinas que afectan a los alimentos son: Aflatoxinas (producidas por hongos del género *Aspergillus*), Ocratoxinas (producidas por hongos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*), Tricotecenos, Fumonisin y Zearalenona (producidas por hongos del género *Fusarium*) y Patulina (producidas por hongos del género *Penicillium*) (Fundación vasca para la seguridad alimentaria, 2005).

En cuanto a la toxicidad crónica, la Agencia Internacional de Investigación sobre el cáncer (IARC, por sus siglas en inglés), clasifica varias micotoxinas como carcinógenas o potencialmente carcinógenas para el hombre, de acuerdo a los siguientes grupos:

Grupo 1: el agente es carcinógeno en humanos

Grupo 2A: el agente probablemente carcinógeno en humanos; existe limitada evidencia en humanos pero suficiente con animales.

Grupo 2B: el agente posiblemente carcinógeno; la evidencia en humanos es limitada y tampoco hay suficiente evidencia con animales de experimentación.

Grupo 3: el agente no es clasificable como carcinógeno para humanos, y no puede incluirse en otro grupo.

Grupo 4: el agente probablemente no es carcinógeno en humanos; la evidencia disponible, tanto de humanos como de experimentación animal así lo sugiere.

(Ballesteros, 2014).

Tabla 3 Principales micotoxinas clasificadas por la IARC.

Micotoxinas	IARC
Aflatoxinas	1
Aflatoxina M1	2B
Citrinina	3
Fumonisina B1	2B
Ocratoxina A	2B
Toxinas derivadas de <i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> (zearalenona, deoxinivalenol)	3
Toxinas derivadas de <i>Fusarium sporotrichioides</i> (toxina T-2)	3

Fuente: Ballesteros, 2014

iii. Efectos de las micotoxinas

Las micotoxinas pueden producir una disminución de las defensas inmunitarias en el ser humano y en los animales, pudiendo aumentar la susceptibilidad a determinadas infecciones. Así mismo, las micotoxinas pueden actuar sobre el metabolismo de los carbohidratos y de los lípidos, así como la actividad de diversas enzimas participantes en dichos metabolismos. También tienen

efectos sobre determinados órganos blanco, que suelen ser: sistema nervioso central, sistema gastrointestinal, hígado, riñón y piel (Fundación vasca para la seguridad alimentaria, 2005).

Debido al daño potencial que las micotoxinas pueden ejercer sobre la salud humana y animal, desde el descubrimiento de las aflatoxinas en la década de 1960, y con mayor o menor prontitud, muchos países han establecido reglamentos para su control, centrados básicamente en las aflatoxinas. No obstante, otras micotoxinas como las fumonisinas, ocratoxina A y los tricotecenos podrían adquirir, en breve, una mayor importancia para el sector agroalimentario debido a que éste puede verse forzado a controlar su presencia en los alimentos (Sanchis, et al., 2000).

a. Ocratoxina

La ocratoxina A está clasificada como posiblemente cancerígena para el ser humano por sus propiedades carcinogénicas, mutagénicas, teratogénicas siendo específicamente nefrotóxica e inmunotóxica (Elika, 2013).

b. Tricotecenos

Los efectos tóxicos de las toxinas T-2 y HT-2 incluyen, reducción de peso, dermatotoxicidad, daño hepático, toxicidad reproductiva, neurotoxicidad, así como efectos hematotóxicos e inmunotóxicos (Elika, 2013).

c. Fumonisinias

La absorción de las fumonisinas es muy baja (aproximadamente 5% en sangre) y son rápidamente distribuidas y eliminadas por orina y heces, tan sólo una pequeña concentración se acumula en los tejidos como el hígado y los riñones, principales órganos diana (Elika, 2013).

d. Zearalenona

Debido a su actividad estrogénica y la de sus metabolitos, niveles plasmáticos altos de zearalenona pueden relacionarse con alteraciones endometriales en las mujeres y crecimiento de carcinomas mamarios. Asimismo, en el cerebro actúa como estrógeno agonista. No obstante, no hay datos suficientes para conocer los efectos tóxicos en humanos (Elika, 2013).

e. Patulina

Se ha comprobado en estudios experimentales que la patulina es una neurotoxina y que produce lesiones anatomopatológicas graves en las vísceras. Aunque se ha dicho que la patulina induce

sarcomas localizados, no se ha detectado actividad mutagénica en la mayoría de los ensayos a corto plazo (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), sf).

e. Aflatoxinas

i. Generalidades

Las aflatoxinas son un grupo de metabolitos secundarios generalmente tóxicos producidos principalmente por dos especies del género *Aspergillus* spp; Los cuales requieren ciertas condiciones especiales para su crecimiento y producción. El hongo puede crecer desde 4°C a 45°C, mientras que la toxina producida por el hongo de 11°C a 35°C, con una temperatura óptima de 22°C y una humedad relativa del 80-90%. Las especies más relacionadas con la producción de aflatoxina son *Aspergillus parasiticus*, que produce aflatoxinas B y G, y *Aspergillus. flavus*, que sólo produce aflatoxinas B, éste último encontrado frecuentemente en las partes aéreas de las plantas (flores, hojas), mientras que *A. parasiticus* se aísla principalmente del suelo (Fundación vasca para la seguridad alimentaria, 2005).

Tabla 4 Condiciones ambientales para la producción de aflatoxinas.

Toxina producida por	Temperatura	pH	Actividad de agua	Humedad relativa
<i>A. flavus</i>	13-37°C (óptima 16-31°C)	2-8 (óptimo 6)	0.82-0.99 (óptimo 0.95-0.99)	>14%
<i>A. parasiticus</i>	12-40°C (óptima 25°C)	2-8 (óptimo 6)	0.86-0.99 (óptimo 0.95)	>14%

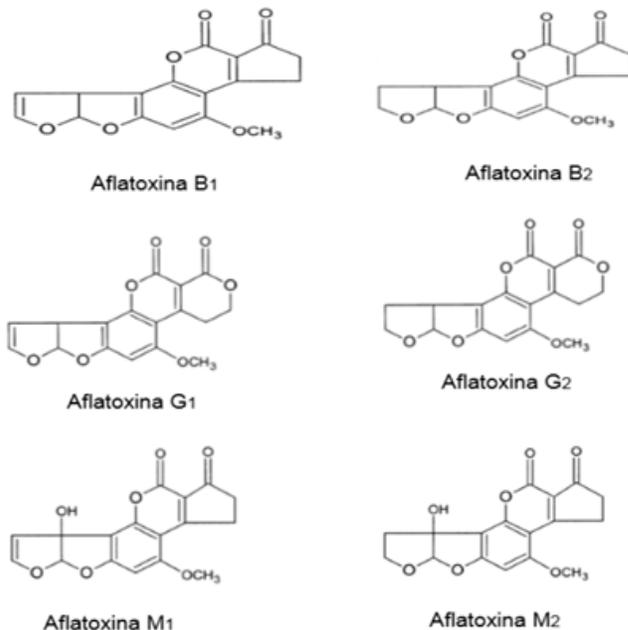
A= *Aspergillus*

Fuente: Ballesteros, 2014.

Las aflatoxinas químicamente pertenecen al grupo de derivados de las bisfuranoisocumarinas. Se presume que su síntesis se relaciona con la condensación de una Acetil CoA que reacciona con tres o más grupos malonatos produciendo malonilCoA, que junto con más Acetil CoA forman un compuesto policetónico, luego de una ciclización y aromatización forma antrona y su compuesto oxidado que es el ácido norsolínico; otra serie de reacciones que forman las aflatoxinas. Aunque han sido identificados al menos 20 tipos diferentes de aflatoxinas, las más comunes son la B1, B2,

G1 y G2, M1 y M2, siendo las cuatro primeras las más relacionadas con los efectos tóxicos. (Fundación vasca para la seguridad alimentaria, 2005).

Figura 2 Estructura química de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ y M₂



Fuente: Ballesteros, 2014.

Las aflatoxinas M₁ y M₂ son metabolitos oxidativos de las aflatoxinas B₁ y B₂ producidos por los animales tras la ingestión de éstas, aparecen en la leche humana (tanto animal como humana), la orina y las heces (Ballesteros, 2014).

Son moléculas altamente ionizables y por ello muy reactivas. Poseen un gran efecto inmunosupresor ya que inhiben la fagocitosis y la síntesis proteica interrumpiendo la síntesis del ADN, ARN y proteínas en el ribosoma. Además, la absorción de los aminoácidos se ve alterada y la retención hepática de éstos aumenta (Ballesteros, 2014).

ii. Efectos de las aflatoxinas

La enfermedad causada por la ingestión de aflatoxinas se denomina aflatoxicosis, de la cual se han identificado dos formas, la primera es la intoxicación aguda grave, lo que resulta en daño hepático directo, enfermedad o muerte posterior, y la segunda es la exposición sub-sintomática crónica (Ballesteros, 2014).

AFM1 son compuestos hepatotóxicos y carcinogénicos y sus efectos sobre la salud pública constituyen una permanente preocupación. La presencia de AFM1 ha sido reportada en leche humana y su detección es considerada como un biomarcador de exposición a AFB1 (Fundación vasca para la seguridad alimentaria, 2005).

La AFM1 generalmente es considerada como un subproducto de detoxificación de la AFB1, también es el metabolito presente en la leche de mujeres lactantes que consumen alimentos que contienen la toxina. Al igual que la aflatoxina 8,9- epóxido de AFB1, la AFM1 presenta dos estereoisómeros uno endoepóxido y un exoepóxido (Ballesteros, 2014).

En el período de lactancia materna los niveles de AFB1 en la sangre del niño generalmente disminuyen (Turner et al., 2007), esto debido al metabolismo de las aflatoxinas en el organismo de la madre. Sin embargo, existe un nivel de toxicidad considerable debido a la generación del metabolito hidroxilado, la AFM1, la cual es excretada en la leche humana. Aunque este metabolito es menos cancerígeno que la AFB1, puede tener actividad citotóxica (World Health Organization International Agency for Research on Cancer (IARC), 2002).

Henry y colaboradores (2001) indican que el almacenamiento de la leche contaminada congelada y otros productos lácteos por algunos meses no parecen afectar el contenido de la AFM1, lo cual indica que la toxina es estable a bajas temperaturas.

a. AFM1 en Latinoamérica

En Bogotá-Colombia Sánchez, (2014) determinó que el 90% de muestras de leche humana fueron positivas para AFM1 con una media de 5.2×10^{-26} mg/mL y un rango de 0.9 a 18.5×10^{-26} mg/mL. Este estudio demuestra la alta exposición de madres y recién nacidos a AFB1 y a AFM1 y destaca la necesidad de regular más estrictamente, la presencia de estas toxinas en alimentos para consumo humano.

En Nabón-Ecuador el 11.5% de las muestras de leche humana fueron positivas para AFM1 y el 5.12% para AFB1. El valor medio de la concentración de AFM1 fue de 0.032 μ g/kg y para AFB1 fue de 0.023 μ g/kg. Se evaluó la relación con la fuente dietaria observando una relación estadísticamente significativa ($p < 0.001$) entre el consumo de queso tierno y la contaminación de la leche humana con AFM1 y AFB1 (OR= 1.04 y 1.05 respectivamente). Por lo que los hábitos

alimentarios de las madres lactantes del cantón Nabón están relacionados con la presencia de aflatoxinas en la leche humana. (Ballesteros, 2014).

F. Antecedentes de aflatoxinas en Guatemala

Marroquín (1995), cuantificó AFM1 en leche fluida de vaca sin encontrar evidencia de está aflatoxina en la leche analizada; sin embargo, comprobó que el método empleado es adecuado para detectar AFM1 en leche fluida, al obtener resultados positivos en muestras contaminadas con los patrones que se corrieron al mismo tiempo que las muestras.

Pérez (1995), comprobó la presencia de aflatoxinas en pescado seco que se expende en los mercados municipales de la ciudad de Guatemala, encontró niveles positivos en 80%, de los cuales todos superan los niveles permitidos. Los expendios Terminal zona 4 y la Presidenta son los que presentaron mayores contenidos de aflatoxinas. Donde se encontró que el hongo de mayor incidencia en las muestras estudiadas fue *A. flavus*.

Yabilat (1997), encontró que el 13% de muestras de hígado de res analizadas presentaron contaminación con aflatoxinas, de estas el 50% sobrepasan el límite permitido por la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos (FDA) para consumo humano. Así pues el hígado de res, es susceptible a depósitos de toxinas y el haber encontrado AFB1 en éste, es un indicador de contaminación por hongos en los alimentos del ganado vacuno.

Bermúdez (2011), determinó la presencia de AFM1 en leche cruda de vaca, la presencia de AFM1 se detectó en todas las lecherías evaluadas. Los resultados obtenidos en este estudio sobre las 18 muestras analizadas para detectar la presencia de AFM1 oscilaron desde el nivel de concentración más bajo que fue de 0.04 (ppb) a la concentración más elevada de 0.07 (ppb). Sin embargo, todas las concentraciones se encontraban debajo del límite permisible que establece el FDA norma CPG Sec. 527.400.

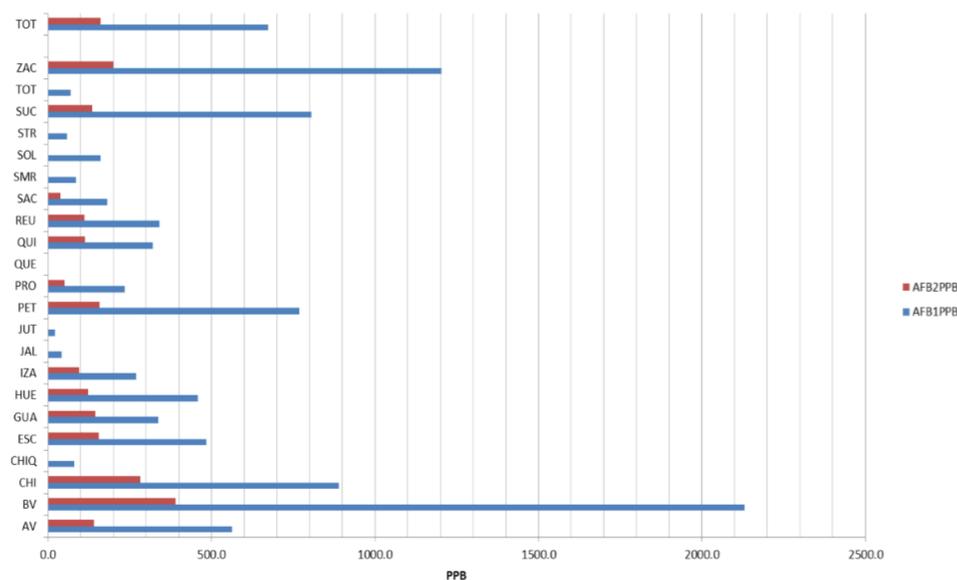
En un estudio realizado por Maldonado (2014), encontraron que en dos de las cinco empresas analizadas que importan y almacenan maíz, los niveles de aflatoxinas totales superan las 20 ppb establecidas por la norma COGUANOR 34 047 y en el 100% de las muestras se encontró la presencia de aflatoxinas B1, B2 G1 y G2.

Sobresale el proyecto FODECYT 04-2012 encabezado por Torres (2013), el cual tenía como objetivo principal el determinar, caracterizar y evaluar las aflatoxinas que influyen en el retardo de talla para edad en niños de Guatemala, encontrando que en el 70.1% de los hogares visitados (n=155) se consume maíz con aflatoxinas y en 14% de ellos los niveles exceden a las 20 ppb aceptadas. El 73% de las muestras analizadas tienen menos de 20 ppb de aflatoxinas, mientras que el 27% restante oscila entre 21 y 6000 ppb. A partir de estos datos se determinó la prevalencia de aflatoxinas en maíz consumido por niños de baja talla de Guatemala, encontrándose que el 70% de los hogares de niños menores de dos años (dentro de la ventana de los primeros mil días de vida, cuya alimentación determina el crecimiento y desarrollo del ser humano) consumen maíz con aflatoxinas (Torres, 2013).

Asimismo, por primera vez se realizó un estimado de la exposición a aflatoxinas en niños guatemaltecos que habitan en los diez municipios con mayor prevalencia de retardo en talla, encontrándose que, en promedio un niño entre 6 y 24 meses de edad de estas regiones está expuesto a 220.3 ppb de aflatoxinas/Kg de peso corporal/día (28.1-116.7), valor mínimo = 0, valor máximo = 6641 (Torres, 2013).

A partir del estudio de Torres (2013), se concluyó que el maíz de tierras bajas de Guatemala tiene niveles significativamente más elevados de aflatoxinas que el de tierras altas (ubicadas a >1000 m de altitud). Los niveles más elevados de aflatoxinas reflejan AFB1 y se observan en Petén, Baja Verapaz, Izabal y Suchitepéquez como se observa en la gráfica 4. Petén y Suchitepéquez son la principal fuente de maíz guatemalteco a la venta porque sus excedentes de producción son los mayores. Las planicies orientales, el Altiplano Central y el Altiplano Occidental tienen los niveles más bajos de AFB. La Costa del Pacífico, el Altiplano Norte y el Petén, tienen los niveles más altos de AFB. Y lo más importante la AFB1 es la forma más abundante de aflatoxina B en Guatemala, diez veces más abundante que la AFB2.

Figura 4 Guatemala: Media de muestras de aflatoxinas por encima de 20 ppb por departamento.



Fuente: Torres, 2013.

G. Normativa para aflatoxinas en leche humana

1. Food and Drug Administration (FDA)

La comisión de la FDA de Estados Unidos establece el nivel de acción de contaminación por aflatoxinas en productos de leche fluida, siendo de 500 ng/L. Además, indica que la aflatoxina que presenta mayor incidencia es la AFM1, por lo que el límite se estableció con base a las concentraciones encontradas de los monitoreos regulares de leche y productos lácteos contaminados (U.S. Food and Drug Administration (FDA), 2015).

2. Unión Europea (UE)

La legislación de la UE establece para leche cruda, leche destinada a la fabricación de productos a base de leche y leche de consumo tratada térmicamente, una concentración máxima permitida específica para AFM1 de 50 ng/L. En el caso de preparados para lactantes, preparados de continuación (incluidas la leche para lactantes y la leche de continuación) y alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales dirigidos específicamente a los lactantes, la concentración máxima permitida de AFM1 es de 25 ng/L (Comisión Europea, 2007).

3. Codex Alimentarius

El Código de Prácticas para reducir la aflatoxina B1 presente en las materias primas y los piensos suplementarios para animales productores de leche fue adoptado por la Comisión del Codex Alimentarius en su 22° período de sesiones de 1997. En 2001, el Codex Alimentarius de la Comunidad Europea establece un nivel máximo de 50 ng/L de AFM1 (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), 2000).

4. Comisión Guatemalteca de Normas (COGUANOR)

En Guatemala no hay normas que regulen la concentración permitida de AFM1 específicamente. La norma COGUANOR NGO 34 040 Leche de vaca sin pasteurizar no la contempla como parte de los análisis o características de las características de la leche. Sin embargo, la contaminación de la leche no puede ser completamente prevenida porque la AFB1 ocurre naturalmente en los granos. No es práctico eliminar por completo la AFB1 de los alimentos, ni de la leche. Sin embargo, es posible controlar la cantidad de AFM1 presente en la leche, limitando la cantidad de Aflatoxina en los alimentos para animales o en los que se ingieren en la dieta humana, como lo son los granos de maíz, que son base para una gran variedad de alimentos, en cuyo caso se especifica un límite de 20 ng/L, según la Norma COGUANOR NGO 34 047 (Comisión Guatemalteca de Normas (COGUANOR), 1997; Comisión Guatemalteca de Normas (COGUANOR), s.f.).

H. Métodos de Detección de Micotoxinas

Debido que las micotoxinas no son antigénicas, los primeros estudios que se desarrollaron tuvieron como enfoque lograr la conjugación con proteínas o polipeptidos que pudieran servir como transportadores en las condiciones óptimas de producción de anticuerpos en conejos y en otros animales. Con los avances en la tecnología se han logrado producir anticuerpos monoclonales contra diversas micotoxinas (Medina, 1994).

Se han desarrollado diferentes tipos de inmunoensayos que en su mayoría son muy sensibles, específicos y fáciles de operar, sin embargo Medina (1994) indica que la sensibilidad de las determinaciones se incrementa cuando se utiliza un procedimiento adecuado de limpieza de los extractos.

Según Medina (1994) se debe tener en cuenta que la mayoría de los inmunoensayos se basa en la competición por los sitios de enlace de los anticuerpos entre las toxinas presentes en la muestra y las micotoxinas conjugadas, por lo que es necesario contar con una micotoxina perfectamente marcada además del anticuerpo específico en el sistema de ensayo. También es necesario contar con un buen método de extracción de micotoxinas y un procedimiento adecuado de separación de toxinas enlazadas y libres. Debe conocerse el grado de especificidad de los anticuerpos, entrecruzamiento, contra compuestos análogos, y debido a que siempre existe la posibilidad de que algún constituyente de la muestra reaccione con los anticuerpos se hace necesario estudiar detalladamente cada tipo de matriz, antes de realizar los ensayos respectivos.

1. Radioinmunoensayos (RIA)

El procedimiento de radioinmunoensayos comprende la incubación de un anticuerpo específico simultáneamente con una solución de una muestra o bien una solución estándar de concentración conocida y una cantidad constante de una toxina marcada. Después de la separación de las toxinas libres y enlazadas, se determina la radioactividad en cada una de estas fracciones. La concentración de la toxina en la muestra se determina comparando con una curva estándar, que se establece graficando la relación de radioactividades en la fracción enlazada y la fracción libre contra el logaritmo de la concentración de las toxinas sin marcar. Aunque esta técnica es una herramienta que proporciona resultados exactos, el método implica el uso de la radioactividad, por lo que se utiliza exclusivamente en laboratorios de investigación y en algunas instalaciones industriales (Medina, 1994).

2. Inmunoensayos Competitivos de Enzimas Ligadas (ELISA)

Dos sistemas de ELISA se han usado para el análisis de micotoxinas y ambos son ensayos competitivos heterogéneos. En general el sistema ELISA es aproximadamente de 10 a 100 veces más sensible que los radioinmunoensayos para el caso de micotoxinas purificadas. Logrando detectar valores tan bajos como 2.5 pg de micotoxinas puras (Dorner & Cole, 1989).

a. ELISA directo

En el ensayo competitivo directo, los anticuerpos se inmovilizan en una fase sólida, esferas o tubos de poliestireno, esferas de nylon o tarjetas de material plástico, o bien placas para microtitulación. La muestra en solución o el estándar de toxina es generalmente incubada simultáneamente con el conjugado enzimático. Después de los lavados apropiados, la cantidad de

enzima conjugada que reacciona con el anticuerpo se determina por incubación con un sustrato en solución que contiene peróxido de hidrógeno que actúa como un oxidante cromógeno. El color resultante se mide ya sea visualmente o por medio de un espectrofotómetro. En este ensayo, las toxinas presentes en el extracto de la muestra y los conjugados enzimáticos de las toxinas compiten por los mismos sitios de enlace presentes en el anticuerpo inmovilizado en la superficie sólida. Debido a que las concentraciones de conjugado enzimático y de anticuerpo son constantes, la intensidad del color es inversamente proporcional a la concentración de toxina (Dorner & Cole, 1989).

b. ELISA indirecto

En el ensayo ELISA indirecto un conjugado formado por la micotoxina enlazada a una proteína o un polipéptido se inmoviliza en una placa de microtitulación. La placa se incuba con el anticuerpo específico en presencia o ausencia de las micotoxinas homólogas. La cantidad de anticuerpo enlazado al conjugado proteínico inmovilizado en la placa es determinado después por la reacción con un complejo enzimático IgG, que se encuentra disponible comercialmente y por la subsecuente reacción con el sustrato. Así la toxina en las muestras y la toxina en la fase sólida compiten con los mismos sitios de unión con el anticuerpo específico en solución (Dorner & Cole, 1989).

3. Ensayos cualitativos rápidos

Cuando se busca obtener información cualitativa de manera muy rápida, de 10 a 15 minutos, es posible utilizar sistemas ELISA, directos o indirectos, que requieren periodos más cortos de incubación en los que se ha ajustado la concentración de anticuerpos. Principalmente se han desarrollado sistemas en que los anticuerpos se inmovilizan en un filtro de papel o en una membrana que se monta ya sea en una tarjeta de plástico (*card screen test*), en una copa de plástico (*cup test, cite*), o en una jeringa (*Cite probe*). La reacción se lleva a cabo sobre la membrana humedecida. Medina (1994) indica que después de la reacción la ausencia o disminución de color, en el sitio donde se colocó la muestra indica la presencia de la toxina en la muestra.

4. Columnas de inmunoafinidad

En este procedimiento los anticuerpos monoclonales específicos para una micotoxina en particular se inmovilizan formando un gel, que se empaca en una columna. Cuando el extracto de un insumo o de un alimento terminado se hace pasar a través de la columna, la micotoxina queda combinada con los sitios de unión del anticuerpo, mientras que el resto de los componentes del

extracto no se combinan, se procede a eliminar cualquier compuesto que haya quedado retenido, posteriormente se eluye la micotoxina con una solución metanólica. La solución resultante se pasa a través de un sistema por cromatografía de líquidos o bien se derivatiza y se lee en un fluorómetro especialmente diseñado (Medina, 1994).

IV. JUSTIFICACIÓN

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) (2004) el maíz proporciona hasta el 45% y 59% de la ingesta diaria de calorías y proteínas, respectivamente, además de ser uno de los alimentos más consumidos a nivel rural en la población guatemalteca. Este, puede contaminarse con hongos que producen metabolitos secundarios tóxicos, como las aflatoxinas en diferentes condiciones de temperatura y humedad.

Las aflatoxinas causan daño a la salud porque son sustancias hepatotóxicas, carcinogénicas, teratogénicas y mutagénicas, además de inmunosupresoras ya que inhiben la fagocitosis.

A nivel internacional se han publicado estudios que evidencian la presencia de aflatoxinas que son excretadas en fluidos biológicos, provenientes de la dieta, tanto en animales como seres humanos. El aumento de estudios enfocados en leche humana ha puesto en evidencia la presencia de aflatoxinas, con lo cual incrementa el riesgo de exposición de recién nacidos a éstas sustancias. Los recién nacidos son más susceptibles a la toxicidad de las aflatoxinas debido a una mayor variación del metabolismo basal, ya que ellos no tienen suficientes mecanismos bioquímicos para la detoxificación, además de presentar un sistema inmune en desarrollo, lo que causa una mayor susceptibilidad a este tipo de sustancias.

En Guatemala no se han llevado a cabo estudios en los cuales se evidencie la presencia de aflatoxinas en leche humana, a pesar de haberse demostrado la presencia en alimentos que forman parte fundamental de la dieta diaria de la población guatemalteca. Por tal motivo es necesaria la investigación para determinar la presencia de aflatoxinas en la leche humana de madres guatemaltecas, y en qué concentración; ya que por lo expuesto anteriormente representan un daño potencial para los recién nacidos, afectando su salud y desarrollo.

La determinación de aflatoxinas en leche humana contribuirá para identificar efectivamente las posibles causas o fuentes de contaminación a las que las madres están expuestas, y si estas son transmitidas posteriormente a los recién nacidos mediante la lactancia. Además de que este proyecto de investigación sentaría las bases para una continua línea de investigación en el campo de las aflatoxinas en leche humana en Guatemala.

V. OBJETIVOS

A. Objetivo general

Determinar la presencia de aflatoxina M1 en leche humana de mujeres guatemaltecas.

B. Objetivos específicos

1. Determinar los niveles de aflatoxina M1 en las leches de madres que atienden en el Hospital Departamental de Totonicapán “José Felipe Flores”, Hospital Nacional de Antigua Guatemala “Pedro de Bethancourt” y Hospital Nacional de San Marcos “Dr. Moisés Villagrán Mazariegos”.
2. Describir las características sociodemográficas y nutricionales de las madres.
3. Establecer posibles asociaciones entre la frecuencia de aflatoxina M1 y las características sociodemográficas y nutricionales

VI. HIPÓTESIS

No aplica, debido a que es un estudio descriptivo

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Universo de trabajo

Madres guatemaltecas que asistieron al banco de leche del Hospital Departamental de Totonicapán “José Felipe Flores”, banco de Leche Dr. Miguel Ángel Soto del Hospital Nacional de Antigua Guatemala “Pedro de Bethancourt” y banco de leche del Hospital Nacional de San Marcos “Dr. Moisés Villagrán Mazariegos”.

B. Muestra

120 Madres guatemaltecas

1. Criterios de inclusión:

- a. Madres guatemaltecas que asistan a los bancos de leche mencionados anteriormente
- b. Madres guatemaltecas que donen leche a los bancos de leche mencionados anteriormente.
- c. Madres guatemaltecas que acepten participar en el estudio.

2. Criterios de exclusión:

- a. Madres guatemaltecas que no acepten participar en el estudio.
- b. Madres guatemaltecas que estén tomando antibiótico.
- c. Madres guatemaltecas que su producción de leche sea muy baja.

C. Cálculo de muestra

La muestra fue calculada utilizando la fórmula para poblaciones infinitas.

$$n = \frac{Z^2 p(1-p)}{e^2}$$

Los parámetros ingresados en la fórmula fueron los siguientes:

Z =	1.96
Z ² =	3.8416
p =	0.5
1-p	0.5
e =	0.1
e ² =	0.01
Z ² p(1-p) =	0.9604
n =	96

Como resultado se obtuvo un $n = 96$ personas, considerando un 25% (24 madres) de deserción/desestimación (outliers) el n aumentó a 120, muestreando equitativamente en cada banco de leche humana (aproximadamente 40 madres por banco).

D. Diseño de Muestreo

El muestreo utilizado es el denominado continuo no probabilístico ya que la muestra a que se trabajó era seleccionada dada la accesibilidad y proximidad de los sujetos para la investigación.

E. Recursos

1. Investigadores

Integrantes del grupo de seminario

- Katterine Azucena Sagastume Morales
- Catherin Angelamaría Fuentes Orozco
- Carla Reneé Guerra Martínez

2. Asesores

- Licenciado Kevin Alexander Ortiz Barrientos
- Licenciada Ana Regina Cabrera Ayuso

3. Colaboradores

- Licenciada Brendy de Paz
- Licenciada Silvia España
- Licenciada Renata Moreira

4. Institucionales

- Banco de leche del Hospital Departamental de Totonicapán “José Felipe Flores”
- Banco de Leche Dr. Miguel Ángel Soto del Hospital Nacional de Antigua Guatemala “Pedro de Bethancourt”
- Banco de leche del Hospital Nacional de San Marcos “Dr. Moisés Villagrán Mazariegos”.

F. Físicos

1. Materiales

- Computadora
- Escritorio
- Impresora

- Resma de hojas
 - Tinta para impresiones
2. Equipo
- Refrigerador con rangos de -20°C
 - Refrigerador con rangos de 4°C
 - Balanza con rango 1-11 gramos
 - Espectro Mindray MR-96^a(Lector de micropocillos con un filtro de 650 nm)
 - Pipetas automáticas de 10-100 μL y 100 a 1000 μL
 - Agitador rotativo de placas
 - Agitador
 - Temporizador
 - Centrífuga con rotor para tubos de 50 cc
3. Material de laboratorio
- 96 micropocillos recubiertos con anticuerpos
 - Toallas de papel o material absorbente
 - Cubeta de plástico para uso de residuos
 - Tubos de 50 cc con tapas
 - Agua destilada o desionizada
 - Puntas de pipeta de 10-100 μL y 100 a 1000 μL
 - Pipetas Pasteur
 - Eppendorfs
 - Botella de lavado
 - Guantes
4. Reactivos
- Control de aflatoxinas M1 con etiqueta amarilla de 0, 5, 15, 30, 60 y 100 ng/L
 - Diluyente de muestra
 - Tampón de lavado 25x
 - Tampón de lavado diluido
 - Conjugado de aflatoxina-HRP con etiqueta azul
 - Solución de Sustrato K-Blue[®] con etiqueta verde

- Solución de parada con etiqueta roja
- 48 pozos de mezcla con etiqueta roja

G. Procedimiento

1. Toma de muestra

a. Invitación de participantes y proceso de consentimiento informado

La convocatoria de las madres se llevó a cabo al momento del ingreso a los respectivos bancos de leche y durante la recolección domiciliar. Se les abordó y se les dió a conocer generalidades del proyecto y el objetivo del mismo. Se les presentó el consentimiento informado de modo que ellas conocieran el nombre del proyecto, el propósito de la investigación, la metodología, los riesgos, los beneficios, la confidencialidad y derechos e información acerca de su asentimiento, y de acceder a la participación, se les solicitó que firmaran y colocarán la fecha en el consentimiento informado (Anexo 1)

Teniendo en cuenta los antecedentes respecto a aflatoxinas en el país, se diseñó una encuesta destinada a recolectar información que evaluó la dieta de las madres lactantes, con el fin de evaluar el consumo habitual (diario, semanal, mensual y anual) de alimentos susceptibles a contaminarse por aflatoxinas y se reportó la influencia de estos en la presencia o ausencia de estas toxinas en las muestras. La encuesta se aplicó previo a la recolección de la leche. Además, se recolectó información general de la madre como datos personales y estado de salud (Anexo 2).

b. Obtención de la muestra

Las muestras se obtuvieron de la misma forma en los tres bancos de leche.

El registro de las donantes y la entrevista se realizaron por el personal de enfermería del Banco de Leche, los cuales evaluaron si la donante llenaba los requisitos mínimos para donar según su evaluación y las respuestas de la entrevista. Se debe donar el excedente de leche en forma voluntaria, sin presiones ni exigencias de ningún tipo. Así también la donante decidió si interrumpía la donación de leche.

Se les orientó sobre las normas de higiene para la donación.

- No utilizar relojes, pulseras, anillos.

- Lavarse las manos con jabón antiséptico.
- Secarse con toallas de papel.
- Utilizar bata, gorro y mascarilla.
- No hablar mientras se realiza la donación de leche.
- Tener en cuenta que mientras mejor sean las condiciones de la recolección de leche, mejores son las características de la misma.
- Los utensilios mal higienizados pueden aumentar 30 veces la carga microbiana de la leche.
- Los trabajadores del banco de leche humana pueden contaminar la leche por mal higiene de manos, toser, estornudar o hablar sobre la leche.
- Debe utilizarse de preferencia agua hervida o tratada para la limpieza de los pechos.

c. Extracción de leche humana

- Se lavaron las manos correctamente
- Se realizaron un masaje circular de la base de las mamas hacia el pezón.
- Colocaron el dedo pulgar sobre la mama donde termina la areola y los otros dedos debajo donde termina la misma.
- Comprimieron la areola y la mama subyacente contra las costillas a través de los dedos pulgar e índice.
- Extrajeron la leche y descartaron las primeras gotas de cada lado.
- Repitieron el movimiento en forma rítmica, rotando la posición de los dedos alrededor de la areola para vaciar todas las áreas.
- Alternaron las mamas cada cinco minutos o cuando el flujo de leche disminuya. Repitieron el masaje y el ciclo tantas veces fuera necesario.
- Después de la extracción de leche pasaron un poco de leche sobre los pezones y dejaron secar al aire, para evitar agrietamientos e infecciones.
- Cuando se utilizaban bombas de extracción se cuidó que cada vez que el receptáculo esté lleno, sea vaciará a un frasco estéril.

Fuente: Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social y Programa de Seguridad Alimentaria y Nutricional (2011).

d. Etiquetado de leche humana extraída

Todos los frascos que contenían la leche extraída y fueron llevados al banco de leche humana, poseían una etiqueta con la siguiente información: nombre completo de la donante y la fecha especificando el día, mes y año de la primera extracción de leche.

Fuente: Kolbe, 2009.

e. Muestreo y almacenamiento

Las muestras se recolectaron en el tiempo necesario para completar las 40 muestras, en los 3 bancos de leche establecidos. Se homogenizó bien la muestra y se tomó un mililitro de cada muestra con pipetas Pasteur descartables, y se almacenaron en tubos Eppendorf, identificados con el código correspondiente. Estos se almacenaron en el congelador a una temperatura de -80°C , hasta finalizada la recolección de muestras en la localidad, Henry y colaboradores (2001) indican que el almacenamiento de la leche contaminada congelada y otros productos lácteos por algunos meses no parecen afectar el contenido de la aflatoxina M1. Posteriormente fueron atemperadas a temperatura ambiente en un período no mayor a 12 horas, previo al análisis, el cual se llevó a cabo en el laboratorio de reumatología del Hospital Roosevelt.

2. Análisis y procesamiento de muestras

a. Preparación de reactivos

- i. El sustrato K-Blue® estaba listo para usar
- ii. El conjugado de aflatoxina-HRP estaba listo para usar
- iii. La solución tampón de lavado se preparó vertiendo todo el contenido del frasco en un contenedor de 1 litro. Luego se lavó el recipiente de la solución con agua destilada y se vertió en el contenedor de un litro, para asegurar que no quedaran restos de la solución. Se llenó el contenedor de 1 litro con agua destilada y se agitó para asegurar que se mezclara uniformemente. Se tapó y almaceno el resto en refrigeración de 2 a 8°C .
- iv. Los pozos se mantuvieron sellados en la bolsa de aluminio hasta que eran utilizados completamente.

b. Calibración

- i. Todos los reactivos fueron atemperados a temperatura ambiente (18–30°C, 64–86°F) antes de su uso. Se analizaron todos los estándares y muestras en pocillos duplicados. Esto se logró mediante la transferencia de los estándares y muestras del pocillo de mezclado marcado de rojo al micropocillo recubierto de anticuerpos.
- ii. Se removió del pocillo de mezclado marcado de rojo cada muestra a testear más 6 pocillos marcados de rojo para controles y se colocaron en el soporte de pocillos.
- iii. Se removieron 2 pocillos cubiertos de anticuerpo por cada pocillo de mezclado marcado de rojo a ser utilizado. Se regresaron inmediatamente los pocillos recubiertos de anticuerpo que no eran utilizados al empaque de papel aluminio con desecante. Se selló el paquete de papel aluminio para proteger el anticuerpo. Se marcó un extremo de la “tira” con “1”, y se colocó la tira en el “soporte de pocillos” con el extremo marcado a la izquierda. No se marcó el interior o fondo de los pocillos.
- iv. Se agitó cada botella de reactivo previo a su uso.
- v. Se usó una punta de pipeta para cada una, se transfirió 250 µL de control al pocillo de mezclado marcado de rojo como se describe a continuación:

0	5	15	30	60	100
---	---	----	----	----	-----
- vi. Se usó una pipeta de 12 canales y se transfirió 100 µL del pocillo de mezclado marcado de rojo a 2 pocillos recubiertos de anticuerpos como se describe a continuación:

0	5	15	30	60	100
0	5	15	30	60	100
- vii. Se colocó el soporte de micropocillo en un agitador automático de placas (~600 rpm) y permitió la agitación continua por 20 minutos a temperatura ambiente (18–30°C, 64–86°F). Se descartó los pocillos de mezclado marcados de rojo.
- viii. Se vació el contenido de los pocillos recubiertos de anticuerpos. Se llenó los pocillos con tampón de lavado diluido y se vaciaron. Se repitió este paso un total de 5 veces, luego se giraron los pocillos al revés en una toalla de papel hasta que el resto de lavado se eliminó completamente.

- ix. Se transfirió el volumen necesario de conjugado de aflatoxina-HRP dentro de la botella de reactivo con la etiqueta azul.
- x. Con nuevas puntas en la pipeta de 12 canales se pipeteó 100 μ L de conjugado de aflatoxina-HRP en los pocillos.
- xi. Se colocó el soporte de micropocillo en un agitador automático de placas (~600 rpm) y permitió la agitación continua por 10 minutos a temperatura ambiente (18–30°C, 64–86°F).
- xii. Se vació el contenido de los pocillos recubiertos de anticuerpos. Se llenó los pocillos con tampón de lavado diluido y se vaciaron. Se repitió este paso un total de 5 veces, luego se giraron los pocillos al revés en una toalla de papel hasta que el resto de lavado se eliminó completamente.
- xiii. Se transfirió el volumen necesario de sustrato K-Blue dentro de la botella de reactivo con la etiqueta verde.
- xiv. Con nuevas puntas en la pipeta de 12 canales se pipeteó 100 μ L de sustrato en los pocillos.
- xv. Se colocó el soporte de micropocillo en un agitador automático de placas (~600 rpm) y permitió la agitación continua por 15 minutos a temperatura ambiente (18–30°C, 64–86°F).
- xvi. Se descartó el sustrato restante y se lavó con agua la botella de reactivo con la etiqueta verde.
- xvii. Se vertió la solución de parada dentro de la botella de reactivo con la etiqueta roja.
- xviii. Se limpió el exceso de sustrato de las puntas de la pipeta de 12 canales, se aseguraron las puntas y se pipeteó 100 μ L de la solución de parada a cada pocillo. Se mezcló deslizándolo hacia atrás y hacia delante en una superficie plana. Se descartaron las puntas de pipeta.
- xix. Se limpió la parte inferior de los micropocillos con una toalla de papel y se leyeron en el espectro Mindray MR-96 con un filtro de 630 nm.

Las burbujas de aire se eliminaron, ya que estas podían afectar los resultados analíticos. Los resultados se leyeron durante los próximos 20 minutos después de haber agregado la solución de parada.

- xx. Se leyeron y calcularon los resultados.

c. Pretratamiento de muestras

- i. Las muestras de leche fueron centrifugadas para separar la grasa durante 10 minutos a 3500 rpm a 10 ° C.
- ii. Después de la centrifugación, se colectó el sobrenadante y se descartó.
- iii. La leche desnatada se utilizó directamente en el ensayo (100 µL por pocillo).
NOTA: No se utilizó factor de dilución.

d. Realización de ELISA

Las muestras se trabajaron de la misma manera en las que se trabajó el calibrador, siguiendo los pasos descritos en la sección b.

e. Interpretación de resultados

Se interpretaron como: Positivo ≥ 4.3 ng/L y Negativo < 4.3 ng/L, con base en el límite de detección indicado por el proveedor (NEOGEN®).

El kit posee una validación externa del sitio beta para evaluar el rendimiento de Veratox para Aflatoxina M1 por 9 profesionales independientes de la industria. La recuperación media de aflatoxina M1 determinada por esta evaluación es mayor al 90%. La prueba ha sido diseñada para detectar la presencia de aflatoxina M1 en la leche y los productos lácteos (NEOGEN Corporation, 2014), lo cual valida la matriz utilizada en este estudio.

Además como validación interna se realizó una curva de calibración por kit y se utilizaron dos controles de AFM1 (Alto = 60 ng/L y Bajo = 5 ng/L) por cada corrida, para ratificar los resultados obtenidos de las muestras.

H. Diseño estadístico

1. Tipo de estudio

- El presente es un estudio observacional descriptivo transversal

2. Análisis y procesamiento de datos

a. Variables

- i. Cualitativa Nominal
 - Lugar
 - Estado civil

- Ocupación
 - Padece alguna enfermedad
 - Toma algún medicamento
 - Consumo de alimentos (tipo de alimento)
 - Positivo/negativo de AFM1 (positivo ≥ 4.3 ng/L y negativo < 4.3 ng/L)
 - Leche apta para consumo (apta < 25 ng/L y no apta > 25 ng/L)
- ii. Cualitativa ordinal
- Escolaridad
 - Gestas
 - Partos
 - Abortos
 - Etapa de lactación
- iii. Cuantitativa discreta
- Número de amamantamientos al día
- iv. Cuantitativa continua
- Edad de la madre
 - Edad del lactante

3. Procesamiento de datos

Se ingresaron todos los datos a Excel y estos se analizaron con estadística descriptiva. También se realizaron asociaciones entre las variables positivo/negativo de AFM1 y consumo de alimentos y variables sociodemográficas mediante Epi Info y STATA.

I. Aspectos éticos

Cada participante recibió un consentimiento informado, previo a la recolección de las muestras, para que estuviera enterada del estudio. Después de obtener los resultados, se informó a las pacientes su resultado de AFM1 en leche materna; en caso fue necesario, se le refirió a un centro asistencial, donde le brindan el seguimiento necesario.

VIII. RESULTADOS

Se analizaron 120 muestras de leche humana, de madres que asistieron a los bancos de leche de los municipios de Totonicapán, Antigua Guatemala y San Marcos, para determinar la presencia de AFM1. La tabla 1 muestra las características sociodemográficas de la población estudiada, donde la mayoría se encontró entre los 18 a 35 años (80.0%), casadas (60.8%) de escolaridad primaria (31.7%), amas de casa (72.5%), las cuales no padecen enfermedades ni toman medicamentos. Antigua Guatemala presenta la mayor cantidad de madres adolescentes, entre 13 a 17 años (12.5%), respecto a escolaridad, en Totonicapán fue mayor el nivel básico (42.5%), en Antigua el nivel primario (32.5%), y en San Marcos el diversificado (32.5%).

Tabla 1 Descripción sociodemográfica y epidemiológica de las madres guatemaltecas de los bancos de leche de los municipios de Totonicapán, Antigua Guatemala y San Marcos

Variable	General ^a	Totonicapán ^a	Antigua Guatemala ^a	San Marcos ^a
Edad (años)				
13 – 17	11 (9.2)	2 (5.0)	5 (12.5)	4 (10.0)
18 – 35	96 (80.0)	36 (90.0)	30 (75.0)	30 (75.0)
>35	13 (10.8)	2 (5.0)	5 (12.5)	6 (15.0)
Estado civil				
Casada	73 (60.8)	30 (75.0)	24 (60.0)	19 (47.5)
Soltera	18 (15.0)	4 (10.0)	2 (5.0)	12 (30.0)
Unida	29 (24.2)	6 (15.0)	14 (35.0)	9 (22.5)
Escolaridad				
Analfabeta	1 (0.8)	0 (0.0)	1 (2.5)	0 (0.0)
Primaria	38 (31.7)	13 (32.5)	13 (32.5)	12 (30.0)
Básicos	32 (26.7)	17 (42.5)	11 (27.5)	4 (10.0)
Diversificado	27 (22.5)	6 (15.0)	8 (20.0)	13 (32.5)
Universidad	22 (18.3)	4 (10.0)	7 (17.5)	11 (27.5)
Ocupación				
Personal de salud	9 (7.5)	2 (5.0)	6 (15.0)	1 (2.5)
Ama de casa	87 (72.5)	31 (77.5)	32 (80.0)	24 (60.0)
Estudiante	7 (5.8)	1 (2.5)	0 (0.0)	6 (15.0)
Otros	17 (14.2)	6 (15.0)	2 (5.0)	9 (22.5)
Padece alguna enfermedad				
Si ^b	11 (9.2)	4 (10.0)	4 (10.0)	3 (7.5)
No	109 (90.8)	36 (90.0)	36 (90.0)	37 (92.5)
Toma algún medicamento				
Si ^c	3 (2.5)	0 (0.0)	2 (5.0)	1 (2.5)
No	117 (97.5)	40 (100)	38 (95.0)	39 (97.5)

^a Frecuencia: (Porcentaje)

^b Enfermedades: arritmia sinusal respiratoria, diabetes, enfermedad renal, fiebre reumática, infección urinaria, infección de garganta, mastitis, presión alta, rinitis alérgica

^c Medicamentos: Metformina

Fuente: Datos obtenidos de Encuesta para evaluación de la dieta de madres guatemaltecas.

En la tabla 2 se observan las características epidemiológicas de las madres, la mayoría ha tenido entre 1 a 2 gestas y partos (71.6% y 80.0%, respectivamente), mientras que el 86.7% nunca ha tenido un aborto. El 50.8% de las madres tienen hijos lactantes menores a un mes (50.8%), los cuales son amamantados de 0 a 9 veces al día (59.2%). El 48.3% de las muestras de leche analizada provino de la etapa de lactación madura. Los hijos lactantes menores a un mes es la categoría con mayor porcentaje en Antigua Guatemala y San Marcos (77.5% y 52.5%) mientras que en Totonicapán lo constituyen entre 1 y 6 meses (40.0%).

Tabla 2 Datos gestacionales y de lactancia materna de las madres guatemaltecas de los bancos de leche de los municipios de Totonicapán, Antigua Guatemala y San Marcos

Variable	Frecuencia ^a	Totonicapán ^a	Antigua Guatemala ^a	San Marcos ^a
Gestas^b				
1 – 2	86 (71.6)	31 (77.5)	25 (62.5)	30 (75.0)
3 – 4	20 (16.7)	4 (10.0)	10 (25.0)	6 (15.0)
≥5	14 (11.7)	5 (12.5)	5 (12.5)	4 (10.0)
Partos^c				
1 – 2	96 (80.0)	33 (82.5)	31 (77.5)	32 (80.0)
3 – 4	18 (15.0)	5 (12.5)	6 (15.0)	7 (17.5)
≥5	6 (5.0)	2 (5.0)	3 (7.5)	1 (2.5)
Abortos^d				
0	104 (86.7)	34 (85.0)	34 (85.0)	36 (90.0)
1	12 (10.0)	5 (12.5)	5 (12.5)	2 (5.0)
≥2	4 (3.3)	1 (2.5)	1 (2.5)	2 (5.0)
Edad de lactantes (meses)				
<1	61 (50.8)	9 (22.5)	31 (77.5)	21 (52.5)
1 - <6	34 (28.3)	16 (40.0)	6 (17.5)	12 (35.5)
6 - <12	18 (15.0)	10 (25.0)	2 (5.0)	6 (15.0)
≥12	7 (5.8)	5 (12.5)	1 (2.5)	1 (2.5)
Amamantamientos al día				
0	1 (0.8)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (2.5)
1 – 9	70 (58.3)	20 (50.0)	23 (57.5)	27 (67.5)
10 – 14	38 (31.7)	16 (40.0)	14 (35.0)	8 (20.0)
15 - 20	11 (9.6)	4 (10.0)	3 (7.5)	4 (10.0)
Tipo de leche				
Calostro	39 (32.5)	5 (12.5)	20 (50.0)	14 (35.0)
Transición	23 (19.1)	2 (5.0)	15 (37.5)	6 (15.0)
Madura	58 (48.3)	33 (82.5)	5 (12.5)	20 (50.0)

^aFrecuencia: (Porcentaje)

^bGestas: Número de embarazos

^cPartos: Número de partos

^dAbortos: Número de abortos

Fuente: Datos obtenidos de Encuesta para evaluación de la dieta de madres guatemaltecas.

En cada BLH se tomaron 40 muestras, encontrando valores desde 4.3 hasta 32.2 ng/L. En la tabla 3 se observa que la AFM1 en la leche humana se encontró positiva en 33 de las 120 leches analizadas, lo que constituye el 27.5% de las muestras totales. La mayoría de casos provienen de las muestras obtenidas del banco de leche (BLH) de Antigua Guatemala (47.5%), seguido de San Marcos (20.0%) y Totonicapán (15.0%), diferencia que resultó significativa ($p = 0.002$).

Tabla 3 Frecuencia de Aflatoxina M1 en leche humana en los bancos de leche de los municipios de Totonicapán, Antigua Guatemala y San Marcos

BLH	AFM1 (%) ^a	
	Positivos ($\geq 4.3 \text{ ng/L}^b$)	Negativo ($< 4.3 \text{ ng/L}^b$)
Totonicapán	6 (15.0)	34 (85.0)
Antigua Guatemala	19 (47.5)	21 (52.5)
San Marcos	8 (20.0)	32 (80.0)
Total	33 (27.5)	87 (72.5)

^a%: Porcentaje

^bng/L: Nanogramos por Litro

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el programa Epi InfoTM 7.

Empleando el instrumento de evaluación de la dieta de las madres (anexo 2), se clasificaron los alimentos de acuerdo a 7 grupos: lácteos, cereales, panes y tortillas, preparaciones, huevos, bebidas diversas, nueces y frutos secos, las frecuencias de consumo de toda la muestra estudiada se catalogaron en: diario, semanal, mensual, anual y nunca (tabla 4).

De los alimentos que se consumen diario, los que se encontraron con mayor frecuencia son: del grupo de los lácteos, la leche de vaca y el queso (ambos con 9.2%); del grupo de los cereales, el arroz cocido (19.2%); del grupo de los panes y tortillas, la tortilla de maíz (81.7%); del grupo de las preparaciones, los frijoles (25.8%); del grupo de los huevos, los huevos de gallina (93.4%); del grupo de las nueces y frutos secos, las manías (2.5%); y del grupo de las bebidas diversas, la Incaparina (52.0%).

En la tabla 5 se observan las variables sociodemográficas y los alimentos obtenidos de la frecuencia de consumo, de las cuales únicamente la ocupación es significativa (OR = 0.36) al tener un valor p de 0.037. De los alimentos evaluados los fideos o pastas son el único alimento significativo (OR = 5.53) con un valor p de 0.030 y alimentos como el atol de elote, tamales, tostadas, cambrayes, enchiladas, pasas y avellanas poseen un valor indefinido al no contar con un consumo amplio por las madres evaluadas.

Tabla 4 Frecuencias de consumo de alimentos de las madres guatemaltecas de los bancos de leche de los municipios de Totonicapán, Antigua Guatemala y San Marcos

Alimento	Diario ^a (%)	Semanal ^b (%)	Mensual ^c (%)	Anual ^d (%)	Nunca ^e (%)
Lácteos					
Leche de vaca	11 (9.2)	42 (35.0)	21 (17.5)	2 (1.7)	44 (36.7)
Queso	11(9.2)	77 (64.2)	15 (12.5)	1 (0.8)	16 (13.3)
Crema	3 (2.5)	44 (36.7)	28 (23.3)	4 (3.3)	41 (34.8)
Yogurt	6 (5.0)	38 (31.2)	20 (16.7)	5 (4.2)	51 (42.5)
Cereales					
Arroz cocido	23 (19.2)	87 (72.5)	7 (5.8)	0 (0.0)	3 (2.5)
Cebada	31 (25.8)	19 (15.8)	4 (3.3)	1 (0.8)	65 (54.2)
Fideos/pasta	19 (15.8)	91 (75.8)	6 (5.0)	1 (0.8)	3 (2.5)
Elotes	3 (2.5)	24 (20.0)	16 (13.3)	51 (42.5)	26 (21.7)
Panes y Tortillas					
Pan ^f	97 (80.8)	22 (18.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.8)
Tortillas de maíz	98 (81.7)	17 (14.2)	4 (3.3)	1 (0.8)	0 (0.0)
Tortillas de harina	5 (4.2)	18 (15.0)	19 (15.8)	4 (3.3)	74 (61.7)
Tamalitos	67 (55.8)	20 (16.2)	10 (8.3)	5 (4.2)	18 (15.0)
Preparaciones					
Frijoles	31 (25.8)	67 (55.8)	1 (10.0)	1 (0.8)	9 (7.5)
Tamales	2 (1.7)	46 (38.3)	29 (24.2)	34 (28.3)	9 (7.5)
Tostadas	1 (0.8)	44 (36.7)	40 (33.3)	3 (2.5)	32 (26.7)
Cambrayes	0 (0.0)	6 (5.0)	10 (8.3)	7 (5.8)	97 (80.8)
Chuchitos	2 (1.7)	51 (42.5)	41 (34.2)	13 (10.8)	13 (10.8)
Enchiladas	0 (0.0)	27 (22.5)	33 (27.5)	6 (5.0)	54 (45.0)
Huevos					
Huevos de gallina	71 (59.2)	41 (34.2)	2 (1.7)	0 (0.0)	6 (5.0)
Nueces y frutos secos					
Manías	3 (2.5)	30 (25.0)	29 (24.2)	7 (5.8)	51 (42.5)
Pasas	1 (0.8)	10 (8.3)	14 (11.7)	17 (14.2)	78 (65.0)
Avellanas	1 (0.8)	4 (3.3)	5 (4.2)	9 (7.5)	101 (84.2)
Bebidas diversas					
Incaparina	63 (52.0)	45 (37.5)	5 (4.2)	0 (0.0)	7 (5.8)
Mosh/Avena	33 (27.5)	66 (55.0)	7 (5.8)	1 (0.8)	13 (10.8)
Arroz con leche/chocolate	9 (7.5)	47 (39.2)	29 (24.2)	2 (1.7)	33 (27.5)
Atol de elote	0 (0.0)	14 (11.7)	19 (15.8)	52 (43.3)	35 (29.7)
Atol de maicena	6 (5.5)	23 (19.2)	16 (12.5)	7 (5.8)	69 (57.5)
Café	50 (41.7)	26 (21.7)	6 (5.0)	1 (0.8)	37 (30.8)

^a Diario: lo consume al menos una vez al día.

^b Semanal: lo consume al menos una vez a la semana.

^c Mensual: lo consume al menos una vez al mes.

^d Anual: lo consume al menos una vez al año.

^e Nunca: no lo consume.

^f Dulce, francés, pirujo,

Fuente: Datos obtenidos de Encuesta para evaluación de la dieta de madres guatemaltecas, 50 agrupados según la tabla de Composición de Alimentos de Centro América del Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP), 2012.

Tabla 5 Razón de oportunidades de las variables sociodemográficas respecto a presencia de AFM1 con regresión logística, de las madres guatemaltecas de los bancos de leche de los municipios de Totonicapán, Antigua Guatemala y San Marcos.

Variables	Consume (%) ^a	No consume (%) ^b	OR	Intervalos de confianza	<i>p</i>
VARIABLES SOCIODEMOGRÁFICAS					
Edad de la madre	-	-	0.99	0.91-1.08	0.902
Estado civil	-	-	2.20	0.78-6.19	0.135
Escolaridad	-	-	1.38	0.73-2.61	0.320
Ocupación	-	-	0.36	0.14-0.94	0.037
Número de veces de amamantamiento	-	-	0.91	0.78-1.77	0.265
Tipo de leche	-	-	0.46	0.21-1.02	0.056
ALIMENTOS					
Leche de vaca	11 (9.2)	109 (90.9)	2.67	0.31-23.03	0.372
Queso	11(9.2)	109 (90.9)	1.04	0.15-7.07	0.965
Crema	3 (2.5)	117 (97.5)	4.21	0.06-291.15	0.506
Yogurt	6 (5.0)	114 (95.0)	0.13	0.00-14.26	0.399
Arroz Cocido	23 (19.2)	97 (80.8)	1.84	0.36-9.47	0.463
Cebada	31 (25.8)	89 (74.2)	0.72	0.13- 4.00	0.709
Fideos/Pasta	19 (15.8)	101 (84.2)	5.53	1.17-26.07	0.030
Elotes	3 (2.5)	117 (97.5)	2.55	0.08-79.69	0.593
Pan ^c	97 (80.8)	23 (19.2)	3.18	0.64-15.79	0.155
Tortillas de maíz	98 (81.7)	2 (18.3)	0.29	0.058-1.50	0.142
Tortillas de harina	5 (4.2)	115 (95.8)	8.04	0.54-119.24	0.130
Tamalitos	67 (55.8)	53 (44.2)	0.48	0.12-1.94	0.307
Frijoles	31 (25.8)	89 (74.2)	0.22	0.03-1.53	0.125
Tamales	2 (1.7)	118 (98.3)	1		
Tostadas	1 (0.8)	119 (99.2)	1		
Cambrayes	0 (0.0)	120 (100.0)	1		
Chuchitos	2 (1.7)	118 (98.3)	3.22	0.05-194.53	0.576
Enchiladas	0 (0.0)	120 (100.0)	1		
Huevos de gallina	71 (59.2)	49 (40.8)	0.90	0.27-3.04	0.870
Manías	3 (2.5)	117 (97.5)	5.13	0.11-245.52	0.408
Pasas	1 (0.8)	119 (99.2)	1		
Avellanas	1 (0.8)	119 (99.2)	1		
Incaparina	63 (52.0)	57 (47.5)	0.429	0.10-1.77	0.243
Mosh /Avena	33 (27.5)	87 (72.5)	1.21	0.29-5.06	0.790
Arroz con chocolate	9 (7.5)	111 (92.5)	0.60	0.06-6.28	0.675
Atol de elote	0 (0.0)	120 (100.0)	1		
Atol de maicena	6 (5.5)	114 (94.5)	1.41	0.07-27.08	0.818
Café	50 (41.7)	70 (58.3)	1.08	0.32-3.67	0.897

^a Consume: Diario

^b No consume: Semanal, mensual, anual y nunca.

^c Dulce, francés, pirujo, bollos, etc.

Fuente: Datos obtenidos de Encuesta para evaluación de la dieta de madres guatemaltecas.

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La contaminación con micotoxinas en alimentos consumidos durante la gestación y la lactancia pueden exponer al feto y recién nacido a los efectos adversos de las aflatoxinas durante estas etapas críticas del desarrollo y crecimiento (Sánchez, 2014). El objetivo principal de este estudio fue determinar la presencia de AFM1 en leche humana de mujeres guatemaltecas, en los Bancos de Leche de los Hospitales de Totonicapán, Antigua Guatemala y San Marcos así como realizar una descripción sociodemográfica y epidemiológica de los datos obtenidos.

Se analizó la leche de 120 madres guatemaltecas, comprendidas entre los 13 y 45 años de edad, donde la mayoría se encontró entre los 18 a 35 años (80.0%). Según el Institut Marquès (2017), el rango de edad de los 21 a 29 años es donde las mujeres poseen la mayor fertilidad, grupo donde se ubica la mayoría de la población estudiada y similar a otros estudios en Latinoamérica (Ballesteros, 2014; Sánchez, 2014; Cantú, 2014). El porcentaje de madres adolescentes (13-17 años) encontrado fue de 9.2%, en donde la mayoría era proveniente de Antigua Guatemala. Según datos de la OMS y OPS (2011), en el país las adolescentes se convierten en madres a temprana edad debido a desinformación sobre sexualidad, o por matrimonios en edad muy precoz, otras son embarazadas como resultado de violaciones sufridas en sus propios hogares, lo cual provoca consecuencias psicológicas para ellas. En general, este grupo etario no lo han analizado en otros estudios, únicamente Sánchez (2014), que reportó un 6.0% de madres adolescentes (Organización Mundial de la Salud (OMS) y Organización Panamericana de la Salud (OPS), 2011).

En cuanto al estado civil de la población en la tabla 1 se observa que la mayoría es casada (60.8%). La encuesta nacional de salud materno infantil (ENSMI) realizada en Guatemala durante los años 2014-2015, confirma esta tendencia ya que según las características generales de las entrevistadas la clasificación de mujeres casadas era de un 35.3%, que representa el mayor porcentaje (Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS), Instituto Nacional de Estadística (INE), International Coach Federation (ICF), 2017).

La mayoría de las madres cursó el nivel primario (31.7%), sin embargo, en Totonicapán fue mayor el nivel básico, en Antigua Guatemala el nivel primario, y en San Marcos, el diversificado, como se observa en la tabla 1. Datos que concuerdan con los obtenidos en la ENSMI, donde la mayor cantidad de mujeres entrevistadas cursó el nivel diversificado en el departamento de San Marcos (MSPAS, INE, ICF, 2017).

En el ámbito nacional la tasa global de fecundidad (TGF) es de 3.1 hijos por mujer, lo que concuerda con los antecedentes gineco-obstétricos encontrados, puesto que las mujeres evaluadas en su mayoría presentaron entre 1 a 2 embarazos y partos. El 86.7% de las madres nunca ha tenido un aborto (tabla 2), sin embargo, un estudio realizado en 6 países latinoamericanos estima que los abortos espontáneos constituyen entre 15 y 25% de las mujeres hospitalizadas por complicaciones durante el embarazo. Guatemala es el país latinoamericano con mayor tasa de mortalidad materna (190 por cada 100,000 nacidos vivos), donde las complicaciones de aborto causan el 24% de las muertes (MSPAS, INE, ICF, 2017; Sandoval, 2002).

El Departamento de Salud de Florida, Estados Unidos (2017), aconseja que el número de amamantamientos depende de los meses de edad del lactante, de 0 a 2 meses él bebe tiende amamantar 8 a 12 veces o más al día; de 2 a 4 meses, de 8 a 10 veces y de 4 a 6 meses de 6 a 8 veces. En el estudio, el rango de edad de los lactantes fue de 0 días hasta 18 meses, en donde predominaron los lactantes menores a un mes (50.8%), provenientes principalmente de Antigua Guatemala y San Marcos; únicamente en Totonicapán la mayoría era perteneciente al rango de 1 a <6 meses, con un 40.0%. Los bebés eran amamantados de 1 a 9 veces al día en su mayoría, sin embargo, se encontró que un 9.6% amamanta hasta 20 veces al día, lo que supera el número aconsejable (tabla 2).

Al analizar las muestras de leche, se encontraron 33 muestras positivas para AFM1 (≥ 4.3 ng/L, valor del límite de detección) (tabla 3), con una incidencia del 27.5%. Al realizar la comparación con otros estudios similares se encontró que la incidencia es baja al igual que la reportada en Irán, Ecuador y Egipto en donde se reportan valores de 1.2 – 35.0% a diferencia de los estudios de Turquía, Colombia y México que reportan datos de 89.2 – 95.0%. La diferencia entre los datos obtenidos en las incidencias de estos estudios puede deberse al criterio empleado para establecer el punto de corte, estos se resumen en el anexo 3. El punto de corte empleado en este estudio expone una probable razón para que la incidencia obtenida sea baja en comparación con otros de Latinoamérica (Jafarian & Pourradi, 2013; Ballesteros, 2014; Turner et al., 2007; Altun, Gürbuz & Ayag, 2016; Sánchez, 2014; Cantú, 2014).

En el 2013, Torres evidenció que la producción de maíz en Sacatepéquez, San Marcos y Totonicapán supera (en orden decreciente) el límite establecido por COGUANOR para AFB1, dato que es importante para el presente estudio, debido a que en la tabla 3 se puede observar que el BLH

de Antigua Guatemala fue el lugar donde se encontró la mayor cantidad de casos positivos de AFM1, con 19 muestras (47.5%), seguido de San Marcos con 8 (20.0%) y Totonicapán con 6 (15.0%). Por lo que dicha contaminación con AFM1 encontrada en la leche humana puede deberse a la contaminación del maíz por AFB1, ya que se encontró la misma tendencia, respecto a AFM1, en dichos departamentos.

Alrededor del mundo se han realizado estudios sobre los niveles de AFM1 en leche humana, en el anexo 4 se puede observar que los niveles de contaminación varían dependiendo del país y del tipo de alimentación de la población. Los métodos utilizados en estos estudios para determinar la contaminación de AFM1 en la leche humana han sido principalmente ELISA y cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC por sus siglas en inglés), sin embargo, la sensibilidad de cada método explica las diferencias en las concentraciones determinadas de AFM1 en la leche y, por lo tanto, puede afectar las estimaciones de ingestión. Los niveles de AFM1 encontrados en el presente estudio son similares a los encontrados en Colombia y México, a pesar de que estos utilizaron HPLC para su detección (Mulunda, Ngoma, Nyirenda, Motsei & Bakunzi, 2013; Altun et al., 2016).

Los niveles encontrados de AFM1 fueron desde 4.3 hasta 32.2 ng/L. Estos valores no sobrepasan el límite establecido en leche cruda por la UE (50 ng/L) y FDA (500 ng/L), pero cabe mencionar que se encontraron muestras que superan los límites máximos establecidos para sucedáneos de la leche materna (25 ng/L). Si los alimentos que exceden los niveles máximos de aflatoxinas establecidos en las normativas internacionales antes mencionadas, se consumen ocasionalmente, la exposición dietética promedio a largo plazo podría aumentar hasta en un 20% el consumo total de aflatoxinas, por ende, al consumirlos diariamente, el porcentaje de consumo total de aflatoxinas es más elevado (European Food Safety Authority (EFSA), 2007).

Debido a que los niños lactantes tienen una dieta limitada a leche materna y/o sucedáneos de esta, y existen datos que evidencian que ellos son más vulnerables que los adultos a la hepatotoxicidad aguda resultante de la ingestión de aflatoxinas. El nivel máximo de AFM1 es menor para niños lactantes que para adultos (IARC, 2002) y dado que la AFM1 aún no está identificada como agente carcinogénico y mutagénico, no es posible establecer un valor de referencia toxicológico en leche materna por debajo del cual no se induzca efectos adversos (Sánchez, 2014) por lo que se toma el límite utilizado para sucedáneos de la leche materna.

Dos de las muestras analizadas en este estudio superan el límite establecido por la UE para sucedáneos de la leche materna, ambas obtenidas en el BLH de San Marcos, entre las características que comparten las dos madres están, que no padecen ninguna enfermedad y no toman medicamentos, ambas amamantan a sus hijos en el rango de 0 a 9 veces con etapa de lactación madura y tienen valores similares de AFM1 (31.9 y 32.2 ng/L), en cuanto a los alimentos evaluados, la frecuencia de consumo difiere en cada una.

Se evaluó la dieta habitual de las madres mediante un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos, para lo cual, estos se clasificaron en siete grupos (por ser los de mayor susceptibilidad a contaminación con aflatoxinas). En la tabla 4, se resumen los alimentos que se consumen con mayor frecuencia, destacan los de consumo diario, puesto que son los que presentan un mayor riesgo de exposición, donde sobresalen de cada grupo la leche de vaca, el queso, la cebada, las tortillas de maíz, el pan, los frijoles, los huevos de gallina, las manías y la incaparina. Lo que concuerda con el análisis realizado por Menchú y Méndez (2011), sobre la situación alimentaria en Guatemala realizado por el INCAP, según los resultados de este estudio los alimentos que conforman el patrón de consumo concuerdan con los obtenidos.

El instrumento empleado para evaluar la frecuencia de consumo de alimentos permitió obtener datos de tipo descriptivo, lo que representa una limitación para este estudio, puesto que no se recolectaron datos de su composición, ingredientes, preparación y el número de porciones consumidas, lo que no permite un análisis más profundo de los resultados. Por lo que se recomienda realizar en estudios futuros un cuestionario como el que sugiere Pinheiro (s.f.), quien indica que la adición de las porciones de alimentos posibilita el diseño de cuestionarios cuantitativos, los cuales permiten estimar la cantidad ingerida de cada alimento, lo que a su vez facilita la estimación de la ingesta de macro, micro y no nutrientes, además habitualmente se utiliza en estudios epidemiológicos para evaluar las asociaciones entre hábitos alimentarios y enfermedades.

La evaluación de la asociación de la presencia de AFM1 con las características sociodemográficas, epidemiológicas y de los alimentos consumidos por las madres se realizó mediante una regresión logística (tabla 5). Factores como la edad de la madre, estado civil, número de veces de amamantamiento y la etapa de lactación no están asociados con la presencia de AFM1 en la leche materna, a excepción de la ocupación de la madre (OR = 0.36; $p = 0.037$), con un intervalo de confianza (IC) ancho (0.14 – 0.94) lo que puede deberse a la heterogeneidad de la

muestra por ser un muestreo por conveniencia y a la cantidad de muestras recolectadas, estos resultados son similares a los obtenidos en estudios previos donde la mayoría son amas de casa al igual que en el presente estudio (Ilesanmi & Ilesanmi, 2011; Kang et al., 2015; Cantú, 2014), puesto que un bajo nivel educativo reduce las oportunidades de desempeñar una ocupación profesional, lo cual deja únicamente al cónyuge como la única fuente de ingresos económicos lo que a la vez incide sobre el poder adquisitivo de las personas y como consecuencia limita los recursos para acceder a alimentos tanto en cantidad como en calidad nutricional (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación (FAO), 1996).

Entre los alimentos consumidos por las madres y la presencia de AFM1, se encontró que únicamente el consumo de fideos o pasta estaba asociado (OR = 5.53, $p = 0.030$) con la presencia de AFM1, encontrándose nuevamente un ancho de intervalo muy amplio (1.17-26.07), lo que lo hace perder precisión. En Guatemala no hay antecedentes de estudios de aflatoxinas en fideos o pasta. El principal ingrediente para la elaboración de las pastas es la harina de trigo, la cual puede ser fuente de contaminación por aflatoxinas debido a condiciones de almacenamiento inadecuadas, que propician el crecimiento de hongos como *A. flavus* y *A. parasiticus*, que producen AFB1 y AFB2 (Mejía, Alvarado y Vásquez, 2014). Keller, Araujo, Fonseca & Welke (2016), indican que en comparación con otras micotoxinas, la AFB1, presenta mayor resistencia a los tratamientos térmicos, por lo que la reducción de aflatoxina es más baja en la pasta debido a la forma de calor utilizada durante la preparación, la cocción en agua hirviendo utiliza una temperatura más baja comparada con los productos de panadería, lo cual puede contribuir a que se presenten mayores niveles de contaminación con AFM1 en la leche de las madres que consumen pasta contaminada con AFB1.

Este es uno de los primeros estudios sobre aflatoxinas en el país que demuestra la presencia de AFM1 en la leche de madres guatemaltecas, se trata de un estudio exploratorio en donde las muestras se seleccionaron por conveniencia. El cual busca crear mayor interés en el tema por parte de grupos asociados y abrir líneas de investigación respecto al campo de las aflatoxinas en leche humana en Guatemala, y generar mayor información sobre la situación actual de la misma.

Entre las limitaciones encontradas en la realización del presente estudio se puede mencionar que el número de muestra fue insuficiente para la cantidad de variables a evaluar. El cuestionario no permitió evaluar si la frecuencia de consumo de alimentos está asociada directamente a la

positividad de AFM1 en leche humana. Así mismo en estudios futuros se podría determinar si las madres poseen alta concentración de AFM1 en sangre y si se relaciona con la cantidad de micotoxina que se encuentra en la leche.

X. CONCLUSIONES

1. Se determinó la presencia de Aflatoxina M1 en 33 muestras de leches de madres guatemaltecas, con una incidencia del 27.5%.
2. Los niveles de Aflatoxina M1 en las muestras de leche de madres que asisten a los bancos de leche de los municipios de Totonicapán, Antigua Guatemala y San Marcos oscilan entre 4.3 y 32.2 ng/L.
3. Las madres guatemaltecas que asisten a los bancos de leche son adultos jóvenes de, 18 a 35 años, casadas, de escolaridad primaria, amas de casa, que no presentan enfermedad o toman algún medicamento y han tenido entre 1 y 2 gestas y partos.
4. Los alimentos más consumidos de forma diaria por las madres que asisten a los bancos de leche de los municipios de Totonicapán, Antigua Guatemala y San Marcos son pan, tortillas de maíz y los huevos de gallina.
5. Aunque hay evidencia, no se pudo demostrar la asociación de la presencia de aflatoxinas respecto a algún alimento en particular.

XI. RECOMENDACIONES

1. Aumentar el tamaño de muestra del estudio de acuerdo a la cantidad de variables que se quieran evaluar, para obtener resultados significativos.
2. Adecuar los criterios de inclusión para realizar estudios en grupos de muestra más expuestas a aflatoxinas.
3. Obtener datos más precisos acerca de la alimentación de las madres guatemaltecas, especificando la frecuencia y porción de alimentos consumidos.
4. Comparar los niveles de aflatoxinas en lactantes después de haber sido amamantados con leche humana con aflatoxinas, para evaluar el riesgo de exposición.
5. Determinar la presencia de AFM1 en leche humana en otros municipios del país para poder comparar la frecuencia de la presencia de aflatoxinas.
6. Evaluar la efectividad del proceso de pasteurización respecto a la eliminación de las aflatoxinas.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akobeng, A. (2006). Effect of breastfeeding on risk of coeliac disease: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Archives of Diseases in Childhood*, 4(91), 39–43.
- Altun, K., Gürbüz, S. & Ayag, E. (2017). Aflatoxin M1 in human breast milk in southeastern Turkey. *Springer*, 33(2), 103-107. doi: [10.1007/s12550-016-0268-4](https://doi.org/10.1007/s12550-016-0268-4)
- Ares, S., Díaz, N., Hernández, M., Ortega, J. Paricio, J. y Landa, L. (2013). Contaminantes químicos y lactancia materna: tomando posiciones. *Anales de pediatría*, 79(6), 391-395.
- Arroyo, R., Mediano, P., Martín, V., Jiménez, S., Delgado, S., Fernández, M., Marín, J. y Rodríguez, M. (2011). Diagnóstico etiológico de las mastitis infecciosas: propuesta de protocolo para el cultivo de muestras de leche humana. *Revista Pediátrica*, 69(6), 276-281.
- Ballesteros, A. (2014). *Evaluación de la prevalencia de aflatoxina M1 (AFM1) en la leche materna y su relación con la fuente dietaria de aflatoxinas. Caso estudio: Nabón, Ecuador*. (Tesis de maestría). Universidad del Tolima Nabón, Ecuador.
- Belén, J., Veranes, A., Castillo, A., Rizo, R. y Cádiz, A. (2009). Lactancia materna e inmunidad. Impacto social. *Medisan*, 13(1), 1-11.
- Bermúdez, R. (2011). *Determinación de la presencia de aflatoxina M1 en leche cruda proveniente de explotaciones lecheras asociadas a cooproleche en la región de la costa sur de Guatemala*. (Tesis de licenciatura). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Bogantes, L. (2004). Aflatoxinas. *Acta Médica Costarricense*, 46(4), 174-178.
- Cantú, F. (2014). *Evaluación de la incidencia y niveles de aflatoxina M1 en leche materna de madres donadoras en la región centro-sur de México*. (Tesis de Maestría). Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.
- Chua, S., Arulkumaran, S., Lim, I, Selamat, N. & Ratnam, S. (1994). Influence of breast feeding and nipple stimulation on post-partum uterine activity. *British Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 1(1), 804–805.

- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. (2002). Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50 302 women with breast cancer and 96 973 women without the disease. *Medical Lancet*, 360(1), 187–195.
- Comisión Guatemalteca de Normas (COGUANOR). (1997). Norma Guatemalteca Obligatoria 34 040. Leche de vaca sin pasteurizar. Guatemala.
- Comisión Guatemalteca de Normas (COGUANOR). (s.f.). Norma Guatemalteca Obligatoria 34 047. Maíz en grano. Guatemala.
- Comisión Europea. (2007). *Reglamento (CE) No. 1881/2006 de la Comisión, de 19 de diciembre de 2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios*. Recuperado de: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=CELEX%3A32006R1881>
- Cornejo, J. y Villaroel, O. (s.f.). *Antecedentes generales sobre las aflatoxinas y otras micotoxinas y elementos a tener en cuenta para el diseño de prácticas correctas de cultivo y elaboración de nueces*. Recuperado de: <http://web.minsal.cl/portal/url/item/72fd6274dad8792ee04001011f0109e4.pdf>
- Departamento de Salud de Florida (2017). *Alimentos para el primer año del bebe*. Recuperado de: http://www.floridahealth.gov/programs-and-services/wic/nutrition-materials/_documents/food-for-babys-first-year-spa.pdf
- Díaz, N. (2005). ¿En qué situaciones está contraindicada la lactancia materna? *Acta Pediátrica Española*, 63(1), 321-327.
- Dingess, K., Valentine, C., Ollberding, N., Davidson, B., Woo, J., Summer, S., Peng, Y., Guerrero, L., Ruiz, G., Ran, R., McMahan, R., Brenna, T. & Morrow, A. (2016). Branched-chain fatty acid composition of human milk and the impact of maternal diet: the global exploration of human milk (GEHM) study. *American Society for Nutrition, impress*, 105(1), 1-8. doi:10.3945/ajcn.116.132464

- Dorner, J.W. & Cole, R.J. (1989). Comparison of two ELISA screening test with liquid chromatography for determination of aflatoxin in raw peanuts. *Journal of Association of Official Analytical Chemist*, 72(6), 962-964.
- Duncan, B. (1993). Exclusive breast feeding for at least 4 months protects against otitis media. *Pediatrics*, 3(91), 867-872.
- Elika, Fundación vasca para la seguridad agroalimentaria. (2013). *Fumonisin*. Recuperado de: http://www.elika.eus/datos/pdfs_agrupados/Documento120/23.Fumonisin.pdf
- Elika, Fundación vasca para la seguridad agroalimentaria. (2013). *Zearalenona*. Recuperado de: http://www.elika.eus/datos/pdfs_agrupados/Documento111/22.Zearalenona.pdf
- Elika. Fundación vasca para la seguridad agroalimentaria. (2013). *Ocratoxina A*. Recuperado de: http://www.elika.net/datos/pdfs_agrupados/Documento109/20.Ocratoxina%20A.pdf
- Elika, Fundación vasca para la seguridad agroalimentaria. (2013). *Sustancias Indeseables I. Alimentación animal*. Recuperado de: http://www.elika.eus/datos/pdfs_agrupados/Documento108/T2%20y%20HT2%202013%20cast.pdf
- European Food Safety Authority (EFSA). (2007). Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products. *The EFSA Journal*, 4(46), 1-127.
- Flores, G., Carabias, R., Rodríguez, E. y Herrero, H. (2002). Presencia de residuos y contaminantes en leche humana. *Salud Pública*, 76(2), 133-147.
- Fundación vasca para la seguridad alimentaria. (2005). *Aflatoxina M1 en leche*. Recuperado de: <http://www.elika.net/datos/riesgos/Archivo10/AFLATOXINA%20M1%20LECHE.pdf>
- García, R. (2011). Composición e inmunología de la leche humana. *Pediátrica de México*, 32(4), 223-230.

- García, C., Affolter, M., Vinyes, G., De Castro, C., Karagounis, L., Zhang, Y., Wang, P. & Thakkar, S. (2016). Amino acid composition of breast milk from urban chinese mothers. *Nutrients*, 8(606), 1-10. doi: 10.3390/nu8100606
- Gaxiola, R., Labrada, V., De Jesús, A., Acosta, B., Méndez, L. & Zenteno, T. (2014). Interaction between mercury (Hg), arsenic (As) and selenium (Se) affects the activity of glutathione S-transferase in breast milk; possible relationship with fish and shellfish intake. *Revista Nutrición Hospitalaria*, 30(2), 436-446.
- Guardino, S. y Santolaya, M. (2000). *Tóxicos para la reproducción femenina*. Recuperado de: http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTécnicas/NTP/Ficheros/501a600/ntp_542.pdf
- Guzmán, E., Sempe, M. y Guzmán, C. (2016). *Buenas prácticas de manufacturas en los bancos de leche de la red nacional de Bancos de leche humana de Guatemala*. (Tesis de licenciatura). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Henry, S., Whitaker, T., Rabbani, I., Bowers, J., Park, D., Price, W., Bosch, F., Pennington, F., Verger, P., Yoshizawa, T., Egmond, H., Jonker, M. & Coker, R. (2001). *Aflatoxin M1*. Recuperado de: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je02.htm>
- Huffman, S. & Combest, C. (1990). Role of breast-feeding in the prevention and treatment of diarrhoea. *Journal of diarrhoeal diseases research*, 8(3), 68-81.
- Ilesanmi, F. & Ilesanmi, O. (2011). Knowledge of aflatoxin coontamination in groundnut and the risk of its ingestion among health workers in Ibadá, Nigeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 1(1). 493-495.
- Institut Marquès. (2017). *Las cinco etapas de la vida de una mujer*. Recuperado de: <https://institutomarques.com/noticias/noticias-2017/las-5-etapas-la-vida-fertil-la-mujer/>
- International Agency for Research on Cancer (IARC). (2002). *Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalence and styrene*. Francia: OMS.
- Jafarian, A. & Pourradi, N. (2013). Aflatoxin M1 contamination of human breast milk in Isfahan, Iran. *Advanced Biomedicl Research*, 2(4), 1-5.

- Kang, M., Nkurunziz, P., Muwanika, R., Qian, G., Tang, L., Song, X., Xue, K., Nkwata, A., Ssempebwa, J., Lutalo, T., Asiki, G., Serwadda, D., Seeley, J., Kaleebu, P., Nalugoda, F., Newton, R., William, J. & Wang, J. (2015). Longitudinal evaluation of aflatoxin exposure in two cohorts in south-western Uganda. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 32(8), 1322- 1330. doi: 10.1080/19440049.2015.1048749
- Keller, E., Araujo, L., Fonseca, F. & Welke, J. (2016). Estimated exposure to zearalenone, ochratoxin A and aflatoxin B1 through the consume of bakery products and pasta considering effects of food processing. *Food and Chemical Toxicology*. 89(1). 85-91.
- Klement, E., Cohen, R., Boxman, J., Joseph, A. & Reif, S. (2004). Breastfeeding and risk of inflammatory bowel disease: a systematic review with meta-analysis. *American Journal of Clinical Nutrition*, 8(20), 1342–1352.
- Kramer, M. (2001). Promotion of Breastfeeding. Intervention Trial (PROBIT): a randomized trial in the Republic of Belarus. *Journal of the American Medical Association*, 2(85), 413–420.
- Kolbe, M. (2009). *Implementación de buenas prácticas de manufactura y elaboración del plan de análisis de peligros y puntos críticos de control – HACCP- en el Banco de leche materna del Hospital Nacional Pedro de Bethancourt, San Felipe de Jesús Antigua Guatemala.* (Tesis de Licenciatura). Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Rafael Landívar.
- Linares, M. (2013). *Concentración de inmunoglobulina A en muestras de leche materna durante las fases de procesamiento en el banco de leche humana del hospital nacional “Pedro de Bethancourt de la Antigua Guatemala Sacatepéquez.* (Tesis de licenciatura). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Maldonado, M. (2014). *Determinación del contenido de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en maíz almacenado en cinco empresas importadoras.* (Tesis de licenciatura). Facultad de Agronomía. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Marild, S. (2004). Protective effect of breastfeeding against urinary tract infection. *Acta Pediátrica*, 2(93), 164–168.

- Marroquín, H. (1995). *Estudio comparativo de los niveles en leches fluidas pasteurizadas y no pasteurizadas que se distribuyen en la ciudad capital*. (Tesis de licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Medina, J.C. (1994). *Determinación de micotoxinas por medio de ensayos inmunoquímicos*. En Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) (Ed), *Control de calidad de insumos y dietas acuícolas*. Recuperado de: <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab482s/AB482S15.htm>
- Mejía, N., Alvarado, P. y Vásquez, N. (2014). Determinación de aflatoxinas en productos derivados de cereales de consumo humano en mercado de Trujillo (Perú). *Revista Científica de Estudiantes*, 2(2). 30–36.
- Menchú, M. y Méndez, H. (2011). *Análisis de la situación alimentaria en Guatemala*. (Informe No. 1). Guatemala: Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP). Recuperado de: www.incap.int/index.php/.../663-guatemala-informe-analisis-de-situacion-alimentaria
- Micheo, K. M. (1996). *Comparación de cuatro métodos para cuantificación de lípidos en leche materna*. (Tesis de licenciatura). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social y Programa de Seguridad Alimentaria y Nutricional (2011). *Curso procesamiento y control de calidad de la leche humana. Módulo 01*. Guatemala: Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social.
- Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS), Instituto Nacional de Estadística (INE), International Coach Federation (ICF), (2017). *Encuesta Nacional de Salud Materno Infantil (ENSMI). 2014-2015*. Recuperado de: https://www.ine.gob.gt/images/2017/encuestas/ensmi2014_2015.pdf
- Mulunda, M., Ngoma, L., Nyirenda, M., Motsei, L. & Bakunzi, F. (2013). A decade of aflatoxin M1 surveillance in milk and dairy products in developing countries (2001-2011): *Review*. *Intech open science*, 25(2), 39-60. doi: [org/10.5772/53286](https://doi.org/10.5772/53286)

Muyphy, K., Curley, D., Callaghan, T., O'Shea, A., Dempsey, E., O'Toole, P., Ross, P., Ryan, A. & Stanton, C. (2016). The composition of human milk and infant faecal microbiota over the first three months of life: a pilot study. *Nature*, 7(1), 1-10. doi: 10.1038/srep40597

NEOGEN Corporation. (2014). Validation report for Veratox® for aflatoxin M1. Recuperado de: <http://foodsafety.neogen.com/en/veratox-aflatoxin-m1>

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). (s.f.) *Micotoxinas de importancia mundial*. Recuperado de: <http://www.fao.org/docrep/005/Y1390S/y1390s04.htm>

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación (FAO), (1996), *Alimentos para el consumidor: comercialización, elaboración y distribución. Cumbre Mundial Sobre la Alimentación*. Recuperado de: <http://www.fao.org/docrep/003/w2612s/w2612s08.htm#BM6>

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). (2000). *Codex Alimentarius. Requisitos Generales*. Roma: Organización de las Naciones Unidad para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Organización Mundial de la Salud (OMS).

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). (2004). *Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones en el año 2003*. Roma: Organización de las Naciones Unidad para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Organización Mundial de la Salud (OMS).

Organización Mundial de la Salud (OPS) y Organización Panamericana de la Salud (OPS). (2011). *Embarazos en adolescentes*. Recuperado de: http://www.paho.org/gut/index.php?option=com_content&view=article&id=423:embarazos-en-adolescentes&Itemid=213

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2016). *Lactancia materna exclusiva*. Recuperado de: http://www.who.int/nutrition/topics/exclusive_breastfeeding/es/

- Organización Mundial de la Salud (OMS) y Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF). (1981). Código Internacional de Comercialización de Sucedáneos de la Leche Materna. Recuperado de: <https://www.mimp.gob.pe/webs/mimp/lactarios-institucionales/pdf/codigo-Intl-Comercializacion-Sucedaneos-Leche-Materna.pdf>
- Ortega, J. y Ferris, J. (s.f.). Ataques al ecosistema de la lactancia, contaminantes medioambientales en la leche materna. *Pediatric Environmental Health Speciality*, 163(1), 337-338.
- Paz, R., Zalles, L. y Cruz, W. (2011). Lactancia materna vs. nuevas fórmulas lácteas artificiales: evaluación del impacto en el desarrollo, inmunidad, composición corporal en el par madre/niño. *Gaceta Médica Boliviana*, 34(1), 6-10.
- Pérez, L. (1995). *Presencia de aflatoxinas y zearalenonas en pescado seco de consumo popular e influencia sobre algunas de sus características químicas*. (Tesis de licenciatura). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Pérez, R. (2001). La promoción de lactancia materna en la era del SIDA. *Panamá Salud Publica*, 9(6), 357-361.
- Pinheiro, A. (s.f.) *Encuestas alimentarias: Diseño, aplicación, análisis, interpretación, construcción de índices*. Recuperado de: <https://www.u-cursos.cl/medicina/2012/1/NUEVNUGE3/1/material.../bajar?id>
- Quiroz M. E. y Quiroz, E. G. (2014). *Concentración de inmunoglobulina A secretoria –IgAs- en muestras de leche materna cruda y pasteurizada*. (Tesis de licenciatura). Facultad de Ciencias Médicas. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Rivera, L. (2004). Daño neurológico secundario a la intoxicación por plomo en niños. *Revista de Universidad Nacional Autónoma de México*, 47(4), 154-156.
- Romano, D. (2008). Lactancia materna: ¿Fuente de contaminantes ambientales o vía de protección frente a los tóxicos? *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 110(6), 1-6.
- Rosenblatt, K. & Thomas, D. (1993). Lactation and the risk of 45 epithelial ovarian cancer. *International Journal of Epidemiology*, 22(2), 192–197.

- Rudolph, M., Young, B., Harris, K., Krebs, N., Harris, W. & MacLean, P. (2016). Human milk fatty acid composition: comparison of novel dried milk spot versus standard liquid extraction methods. *Mammary Gland Biol Neoplasia*, 21(3-4), 131-138. doi 10.1007/s10911-016-9365-4
- Sadauskaite, V. (2004). Longer breastfeeding is an independent predictive factor against development of type 1 diabetes in childhood. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 2(2), 150–157.
- Sánchez, P. (2014). *Determinación de niveles de aflatoxina M1 en leche materna: estudio observacional descriptivo en muestras recolectas en un hospital pediátrico de referencia de la ciudad de Bogotá, durante el año 2013*. Recuperado de: <http://www.bdigital.unal.edu.co/46059/>
- Sanchis, V., Marin, S. y Ramos, A. (2000). Control de micotoxinas emergentes. Situación legislativa actual. *Revista Iberoamericana de Micología*, 17(1), 69-76.
- Sandoval, E. (2002). *Caracterización epidemiológica del aborto. Hospital Regional de Zacapa, Guatemala*. (Tesis de Licenciatura). Facultad de Ciencias Médicas. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Silfverdal, S., Bodin, L. & Olcén, P. (1999). Protective effect of breastfeeding: An ecological study of *Haemophilus influenzae* meningitis and breastfeeding in a swedish population. *International Journal of Epidemiology*, 28(1), 152–156.
- Torres, O. (2013). *Determinación, caracterización y evaluación de aflatoxinas que influyen en el retardo de talla para edad en niños de Guatemala*. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYT). Recuperado de: <http://glifos.concyt.gob.gt/digital/fodecyt/fodecyt%202012.04.pdf>
- Turner, P., Poluchronaky, N., Mykkänen, H., Gong, Y., Amra, H., Abdel, M. & El.nezami, H. (2007). Determinants of aflatoxin M1 in breast milk in a select group of Egyptian mothers. *Food Additives and Contaminants*, 23(7), 700-708.

- U.S. Food and Drug Administration (FDA). (2015). *Guidance for industry: Action levels for poisonous or deleterious substances in human food and animal feed*. Recuperado de: <https://www.fda.gov/food/guidanceregulation/guidancedocumentsregulatoryinformation/chemicalcontaminantsmetalsnaturaltoxinspesticides/ucm077969.htm#afla>
- Vázquez, S., Alonso, C., Medina, C., Bustos, G., Martínez, M. y Pallas, C. (2009). Puesta en marcha del banco de leche maternal donada en una unidad neonatal. *Anales de Pediatría*, 71(4), 343-348.
- World Health Organization International Agency for Research on Cancer (IARC). (2002). *Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene*. Recuperado de: <https://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol82/mono82.pdf>
- Yabilat, J. (1997). *Determinación de aflatoxinas en hígado de res que se comercializa en las carnicerías de la ciudad de Guatemala*. (Tesis de licenciatura). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala.

XIII. ANEXOS

Anexo 1 Formato del consentimiento escrito informado para las madres participantes del estudio.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

1. Introducción

- 1.1 Usted está cordialmente invitada a participar en el proyecto de investigación “**Frecuencia de la Aflatoxina M1 en leche humana de madres guatemaltecas**”, de manera gratuita y voluntaria.
- 1.2 Este documento denominado Consentimiento Informado tiene como propósito brindarle toda la información correspondiente al estudio, los procedimientos que se llevarán a cabo y a su participación en el. Si tiene alguna duda en cualquiera de los apartados, puede consultarla con los encargados.

2. Antecedentes

- 2.1. Este estudio forma parte de una serie de investigaciones que se han realizado en el país acerca de la leche humana, sobre todo a nivel de la Escuela de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, dirigidas a la caracterización de la leche humana dentro de la población guatemalteca. En este caso la línea de investigación es por los contaminantes que se encuentran presentes en la leche; específicamente la Aflatoxina M1, la cual es una sustancia toxica para el hígado, produciéndole enfermedades y daño a su cuerpo. Por lo que la determinación de aflatoxinas en leche humana servirá de guía para poder identificar efectivamente las posibles causas o fuentes de contaminación a las que las madres están expuestas, y si estas son transmitidas posteriormente a los recién nacidos mediante la lactancia.

3. Propósito del estudio

- 3.1. Este proyecto de investigación tiene como propósito principal determinar la frecuencia de la Aflatoxina M1 en leche humana de madres guatemaltecas. Además de describir las características sociodemográficas y alimenticias de las participantes.

4. Diseño de estudio

- 4.1. Este es un estudio descriptivo de tipo transversal
- 4.2. Tendrá una duración de 6 meses
- 4.3. Se tomará un aproximado de 40 muestras de leche por cada uno de los bancos de leche incluidos en el estudio, para un total de 120

5. Lo que se le pedirá que haga en su participación

- 5.1. Se tomará una muestra de un (1) mililitro de la leche que usted donará al banco de leche. La cual será obtenida con el procedimiento establecido por cada uno de los bancos para la extracción de leche.
- 5.2. Se registrarán sus datos personales, sociodemográficos y alimenticios, en términos de frecuencia y cantidad, mediante una encuesta de consumo de alimentos, por lo que se le pedirá que brinde información y datos veraces.

6. Que pacientes pueden participar

Para ser considerada apta para donación, debe cumplir los siguientes requisitos:

- 6.1. Estar amamantando o extrayendo su leche humana para su propio hijo/a.

- 6.2. No fumar más de 10 cigarrillos por día.
- 6.3. No usar medicamentos incompatibles con el amamantamiento.
- 6.4. No usar alcohol o drogas ilícitas.
- 6.5. Preferiblemente realizar exámenes (Hematología completa, VDRL, VIH) cuando la tarjeta del control prenatal no estuviera disponible o la donante no haya realizado control prenatal o exámenes previos al parto.
- 6.6. Estar en uso pleno de sus facultades mentales.

7. Que pacientes no pueden participar

- 7.1. Todas las madres no aptas para donar en el banco de leche

8. Responsabilidad de los pacientes

- 8.1. Las participantes del estudio deben brindar una muestra de leche y dar datos veraces para la encuesta, de no hacerlo, serán excluidas.

9. Riesgos

- 9.1. Este estudio no presenta ningún riesgo para usted o la salud de su hijo.

10. Que se hará en caso de efectos adversos, complicaciones o molestias

- 10.1. No se ha demostrado ni reportado ningún efecto adverso al momento de la donación de leche humana ya que el procedimiento no es invasivo. Sin embargo, si presenta alguna molestia al momento de la extracción, hacérselo saber al personal encargado, el cual se encuentra bien entrenado y decidirá si suspender la donación o cambiar el método de extracción.

11. Beneficios

- 11.1. Se le informará el resultado de la concentración de Aflatoxina M1 en su leche materna, y si esta es o no apta para el consumo de su hijo.
- 11.2. En caso sea necesario, se le referirá a un centro asistencial, donde se le brindará seguimiento a usted y a su hijo lactante.

12. Participación voluntaria

- 12.1. Usted no está obligada a participar en este estudio, su participación será voluntaria. Usted no perderá nada si decide no participar. Además, puede retirarse del estudio en cualquier momento que desee. Si así lo decide, deberá notificarlo al encargado del estudio al finalizar de leer este documento.
- 12.2. Su donación de leche no se verá afectada si usted decide no participar en este estudio.

13. Compensación por participación

- 13.1. Usted no recibirá ningún beneficio económico ni remuneración por participar en el presente estudio.

14. Publicación y confidencialidad

- 14.1. La información personal, socioeconómica y alimenticia no será divulgada. Los resultados obtenidos de los análisis de laboratorio no se les entregará a terceras personas, serán analizados únicamente por el personal encargado.

15. A quien debe llamar en caso de complicación o preguntas

15.1. Cualquier duda o consulta puede realizarla con las investigadoras

Carla Reneé Guerra Martínez	31070719
Catherin Angelamaría Fuentes Orozco	56309611
Katterine Azucena Sagastume Morales	58596557

16. Consentimiento del participante

Al firmar este documento hago constar que:

- 16.1. He leído en su totalidad el consentimiento
- 16.2. He recibido respuesta a todas mis preguntas
- 16.3. Deseo participar voluntariamente
- 16.4. Puedo negar o retirarme cuando lo desee
- 16.5. Firmo el consentimiento voluntariamente
- 16.6. Recibo fotocopia del mismo firmada totalmente

Nombre	Firma
Identificación	Fecha

En caso de una analfabeta

Nombre de testigo	Firma
Identificación	Fecha
Nombre de quien obtuvo el consentimiento	Firma
	Fecha

Anexo 2 Formato de encuesta para evaluación de la dieta para las madres participantes del estudio



ENCUESTA PARA EVALUACIÓN DE LA DIETA DE MADRES GUATEMALTECAS

No. de Registro: _____ Fecha: ____/____/____

Datos Personales

1. Nombre completo: _____
2. Lugar y Fecha de nacimiento: _____
Edad: _____
3. Dirección: _____
4. Teléfono: _____
5. Estado Civil: Casada Soltera Unida Divorciada Viuda
6. Escolaridad: _____ Ocupación: _____

Estado de Salud

1. Padece alguna enfermedad: Si No ¿Cuál?: _____
2. Toma algún medicamento: Si No ¿Cuál?: _____
3. Número de embarazos: _____
4. Número de hijos vivos: _____
5. Presentan alguna enfermedad: Si No ¿Cuál?: _____
6. Número de hijos muertos: _____
7. ¿De qué han muerto?: _____

Información del Lactante

1. Edad del lactante: _____ meses
2. Da lactancia materna exclusiva: Si No
3. ¿Cuántas veces amamanta al día? _____
8. Presenta alguna enfermedad Si No ¿Cuál?: _____

Resultados del Análisis

1. Aflatoxina M1: Presencia (<5ppt) Ausencia (<5ppt)
2. Leche apta para consumo Apta (<20ppb) No Apta (>20ppb)

Cuestionario de Frecuencia de Consumo

Grupo de alimento	Lista de Alimentos	Frecuencia de Consumo					Observaciones
		Diario	Semanal	Mensual	Anual	Nunca	
Lácteos	Leche de vaca						
	Queso						
	Crema						
	Incaparina						
	Yogurt						
Cereales	Arroz cocido						
	Mosh/Avena						
	Frijoles						
	Cebada						
	Fideos/pasta						
	Arroz con leche o chocolate						
	Pan (dulce, francés, pirujo, bollos, etc.)						
	Elotes						
	Atol de elote						
	Atol de maicena						
	Tamales						
	Tamalitos						
	Tostadas						
	Cambrayes						
	Chuchitos						
Enchiladas							
Tortillas de maíz							
Tortillas de harina							
	Huevos de gallina						
Frutos secos	Manías						
	Café						
	Pasas						
	Avellanas						

Anexo 3 Incidencias y puntos de corte de AFM1 en países de primer y tercer mundo.

País	Incidencia (% ^a)	Punto de corte	Referencia
Irán	1.2	5.0 ng/L,	Jafarian & Pourradi, 2013.
Ecuador	11.5	14.0 ng/kg	Ballesteros, 2014.
Egipto	35.0	60.0 ng/L,	Turner et al., 2006.
Turquía	89.2,	5.0 ng/L,	Altun, Gürbüz & Ayag, 2016
Colombia	90.0	2.0 ng/L	Sánchez, 2014.
México	95.0%,	1.3 ng/L	Cantú, 2014

^a Porcentaje

En el anexo 3 se observa las incidencias, así como los puntos de corte que fueron reportados en los estudios de AFM1 en diversos países.

Anexo 4 Rangos de AFM1 en países del primer y tercer mundo.

País	Rangos (ng/L ^a)
Irán	7.0-18.0
Ecuador	15.0-60.0
Turquía	9.6-80.0
Australia	28.0-1031.0
Italia	6.0-229.0
Tailandia	39.0-1736.0
Egipto	10.0-50.0
Sierra Leona	3.0-336000.0
Sudán	5.0-64.0
Ghana	194.0
Colombia	0.9-18.5
México	1.4-34.2

^a Nanogramo por litro

Fuente: Mulunda, Ngoma, Nyirenda, Motsei & Bakunzi, 2013; Altun, Gürbüz & Ayag, 2016.

En el anexo 4 se observa los rangos que fueron reportados en los estudios de AFM1 en diversos países. En el cual el rango más alto fue en Sierra Leona y el más bajo en Colombia e Irán.

Anexo 5 Muestras de leche materna recolectadas



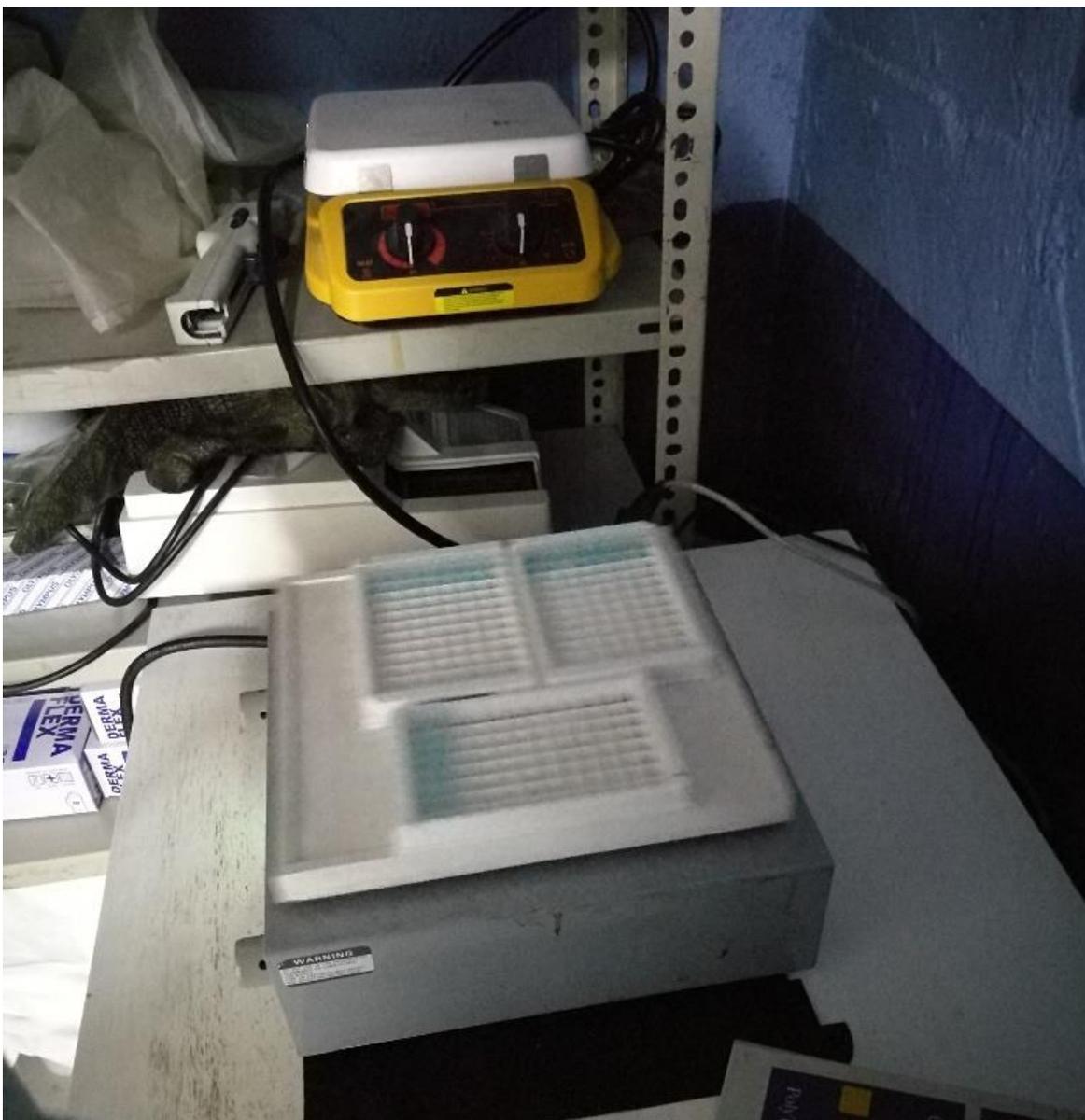
Las muestras de 1 mililitro de leche humana se recolectaron en eppendorff que fueron identificados según el lugar de toma de muestra.

Anexo 6 Procesamiento y análisis de muestras



El procesamiento y montaje de muestras se trabajó en campana de flujo laminar, con las medidas de bioseguridad respectivas.

Anexo 7 Agitación de las placas de ELISA



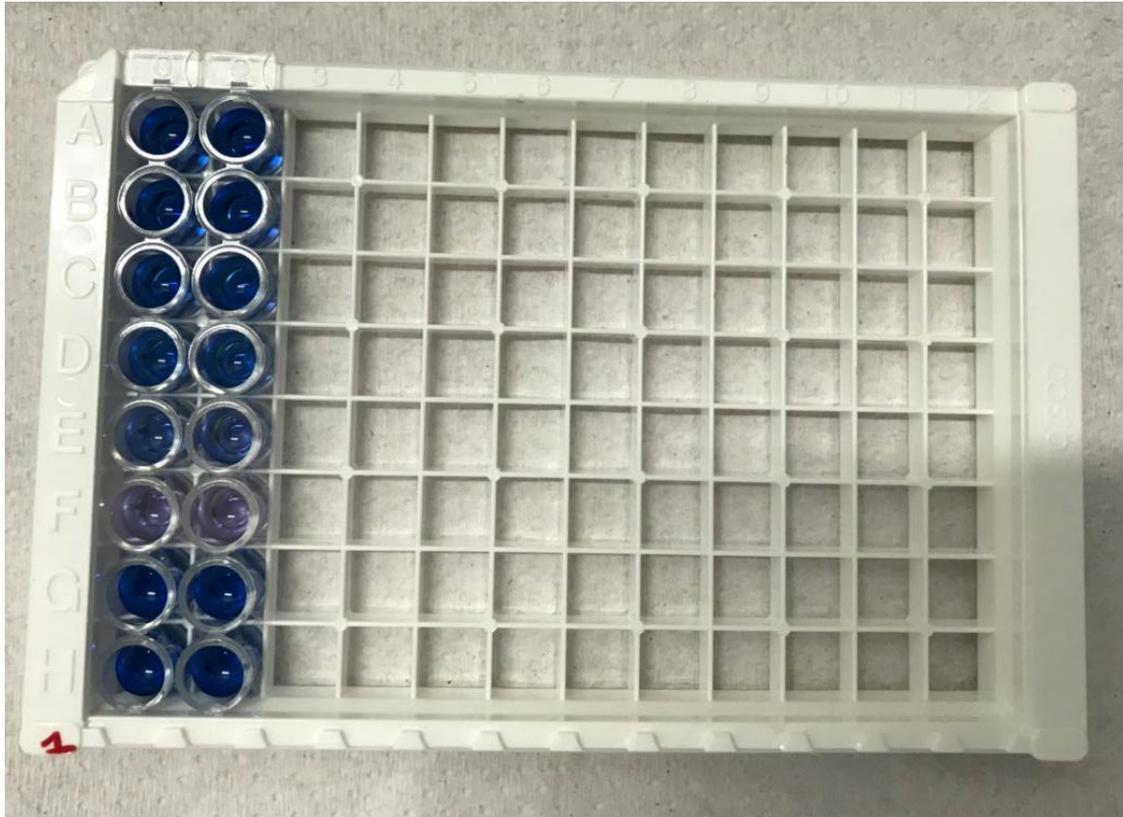
Se requirió de la agitación de las placas de manera uniforme durante 10 y 15 minutos según la metodología planteada.

Anexo 8 Espectrofotómetro y placas de ELISA



Para la lectura de las muestras se requirió de un espectrofotómetro, con una longitud de onda de 630 nm, para obtener las absorbancias respectivas

Anexo 9 Placas con los pocillos de ELISA



Placa de ELISA previo a su lectura, en la cual se encuentran montados los calibradores.

Anexo 10 Resultados de las absorbancias obtenidas con el espectrofotómetro

```

*****
*                PLATE READER                *
*          S/N 1722  rev. 4.05                *
*          STP  rev. 1.01                    *
*          12/02/18  8:10                    *
*****

```

===== 12/02/18 11:55 =====
Primary Filter : 630 nm

	1	2
A	2.103	1.970
B	1.903	1.721
C	1.601	1.435
D	1.277	1.120
E	0.892	0.777
F	0.610	0.552
G	2.016	1.860
H	2.124	1.998

CV = 35.9%

```

===== 12/02/18 11:59 =====
Primary Filter : 630 nm

```

	1	2
A	2.058	2.043
B	2.001	1.993
C	2.042	2.013
D	1.961	1.987
E	2.072	1.911
F	2.103	2.071
G	1.948	1.921
H	1.960	2.042

CV = 2.8%

Se obtuvieron las absorbancias por duplicado de los calibradores, las cuales sirvieron para determinar las curvas de calibración y de las muestras analizadas para determinar posteriormente su concentración de AFM1.

Catherin Angelamaría Fuentes Orozco
Autora

Katterine Azucena Sagastume Morales
Autora

Carla Reneé Guerra Martínez
Autora

Lic. Kevin Alexander Ortiz Barrientos
Asesor

Lic. Ana Regina Cabrera Ayuso
Asesor

MSc Alba Marina Valdés de García
Revisora

MSc Alba Marina Valdés de García
Directora
Escuela Química Biológica

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda
Decano
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia