

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

EVALUACIÓN DE RIESGOS SEMICUANTITATIVA DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS EN QUESO FRESCO ARTESANAL PRODUCIDO EN ECUADOR

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN GESTIÓN DE LA SEGURIDAD Y
CALIDAD ALIMENTARIA

ALUMNA: Nancy Soraya Gallegos Maldonado

TUTOR ACADEMICO: Antonio Martínez López

COTUTORA: María Dolores Rodrigo

Curso Académico: 2018-2019

VALENCIA, 13 de septiembre del 2019

EVALUACIÓN DE RIESGOS SEMICUANTITATIVA DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EN QUESO FRESCO ARTESANAL PRODUCIDO EN ECUADOR

Nancy Gallegos Maldonado, Antonio Martínez López ¹, María Dolores Rodrigo Aliaga ¹

RESUMEN

El interés en desarrollar una metodología aceptada internacionalmente que permita evaluar la importancia de los riesgos microbiológicos ha desembocado en la evaluación de riesgos microbiológicos en alimentos y en el desarrollo de programas sencillos que permitan la priorización de riesgos a bajos costos, este es el caso del sQMRA2. Por otro lado, la intoxicación alimentaria por estafilococos se adquiere al ingerir alimentos contaminados con la toxina estafilocócica, que conlleva a grandes pérdidas tanto económicas como en la calidad de los alimentos y particularmente de los quesos. En Ecuador el queso fresco artesanal es manufacturado en áreas rurales donde no existe un adecuado seguimiento y control a las condiciones higiénico sanitarias de fabricación que permita asegurar su calidad comercial. La finalidad de este estudio fue analizar la funcionalidad del programa sQMRA2 para priorizar el riesgo de *S. aureus* en queso fresco producido en Ecuador considerando dos regiones. Para este estudio el nivel final de *S. aureus* encontrado en las investigaciones fue indicador del nivel de la toxina estafilocócica en los quesos y la temperatura de almacenamiento estuvo especialmente asociada al riesgo de una intoxicación estafilocócica. Los resultados confirmaron un riesgo existente en la venta al por menor en las dos regiones estudiadas, siendo en ambos casos la probabilidad de enfermar superior al 50% para una población normal.

PALABRAS CLAVE: *S. aureus*, queso, riesgo, toxina, sQMRA2.

RESUM

L'interès en desenvolupar una metodologia acceptada internacionalment que permeti avaluar la importància dels riscos microbiològics ha desembocat en l'avaluació de riscos microbiològics en aliments i en el desenvolupament de programes senzills que permetin la priorització de riscos a baixos costos, aquest és el cas del sQMRA2 . D'altra banda, la intoxicació alimentària per estafilococs s'adquireix en ingerir aliments contaminats amb la toxina estafilocócica, que

¹ Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC), Calle Catedrático Agustín Escardino Benlloch, 7, 46980 Paterna, Valencia.

comporta a grans pèrdues tant econòmiques com en la qualitat dels aliments i particularment dels formatges. A l'Equador el formatge fresc artesanal és manufacturat en àrees rurals on no hi ha un adequat seguiment i control a les condicions higièniques i sanitàries de fabricació que permeti assegurar la seua qualitat comercial. La finalitat d'aquest estudi va ser analitzar la funcionalitat del programa sQMRA2 per prioritzar el risc de *S. aureus* en formatge fresc produït a l'Equador considerant dues regions. Per a aquest estudi el nivell final de *S. aureus* trobat en les investigacions va ser indicador del nivell de la toxina estafilocòcica en els formatges i la temperatura d'emmagatzematge va estar especialment associada al risc d'una intoxicació estafilocòcica. Els resultats van confirmar un risc existent en la venda al detall en les dues regions estudiades, sent en ambdós casos la probabilitat d'emmalaltir superior al 50% per a una població normal.

PARAULES CLAU: *S. aureus*, formatge, risc, toxina, sQMRA2.

ABSTRACT

The interest in developing an internationally accepted methodology to assess the importance of microbiological risks has resulted in the evaluation of microbiological risks in food and in the development of simple programs that allow the prioritization of risks at low costs, this is the case of sQMRA2 . On the other hand, staphylococcal food poisoning is acquired by eating food contaminated with staphylococcal toxin, which leads to large economic losses as well as in the quality of food and particularly cheese. In Ecuador, artisanal fresh cheese is manufactured in rural areas where there is no adequate monitoring and control of sanitary hygienic manufacturing conditions that ensure its commercial quality. The purpose of this study was to analyze the functionality of the sQMRA2 program to prioritize the risk of *S. aureus* in fresh cheese produced in Ecuador considering two regions. For this study the final level of *S. aureus* found in the investigations was an indicator of the level of staphylococcal toxin in cheeses and the storage temperature was especially associated with the risk of staphylococcal poisoning. The results confirmed an existing risk in retail sale in the two regions studied, being in both cases the probability of becoming ill above 50% for a normal population.

KEY WORDS: *Staphylococcus aureus*, cheese, risk, toxin, sQMRA2

1. INTRODUCCIÓN

Los intentos de evaluar la naturaleza de los riesgos que representan los patógenos transmitidos por los alimentos para los consumidores han sido asumidos por la industria alimentaria como un medio para garantizar alimentos seguros.

En la década de 1990 en particular, se vio un creciente compromiso del gobierno y la industria para desarrollar una metodología aceptada internacionalmente que permita evaluar la importancia de los riesgos microbiológicos. Todo este interés ha desembocado en el desarrollo de la evaluación de riesgos microbiológicos en alimentos. La evaluación de riesgos es una de las tres actividades del Análisis de Riesgos, las otras dos son la gestión de riesgos fundamentalmente llevada a cabo por los gobiernos y la comunicación del riesgo que tiene como objetivo difundir convenientemente las alertas alimentarias o las decisiones de gestión. Estas tres actividades interactúan entre sí de tal manera que se pueda dar una respuesta adecuada a un peligro en concreto (Brown y Stringer, 2002).

La evaluación de riesgos microbiológicos es un proceso basado en la ciencia que envuelve varias etapas con el último fin de establecer la probabilidad de que ocurra y la severidad de un efecto adverso sobre la salud, conocido o potencial en una población dada. Las etapas en las que se basa la evaluación de riesgos microbiológicos son las siguientes: Identificación del peligro, caracterización del peligro, evaluación de la exposición y caracterización del riesgo (Brown y Stringer, 2002).

Sobre la base del marco del Codex Alimentarius Commission (CAC), se pueden realizar evaluaciones de riesgo microbiológicas cualitativas o cuantitativas (Lammerding y Fazil, 2000).

Las evaluaciones de riesgo cualitativas proporcionan un tratamiento descriptivo de la información, basado principalmente en la recopilación y revisión de literatura y datos científicos. La mayoría de las evaluaciones de riesgos microbiológicos tradicionales en el sector alimentario han sido, y siguen siendo, principalmente cualitativas. Las evaluaciones de riesgo cualitativas también son la única opción cuando los datos, el tiempo u otros recursos son limitados. Alternativamente, se puede abordar como una primera evaluación de un problema de inocuidad de los alimentos y/o para determinar si es necesario un enfoque cuantitativo más sofisticado.

Las evaluaciones cuantitativas de riesgo (QMRA) son análisis matemáticos de datos numéricos, basados en modelos matemáticos y probabilísticos. En general se recomienda el desarrollo de enfoques cuantitativos para la evaluación de riesgos microbiológicos, basándose en el supuesto de que estos aumentarán la transparencia, brindarán una mejor comprensión del riesgo microbiológico, al tiempo que permiten comparaciones entre procesos o entre la efectividad de diferentes opciones de control. Los modelos matemáticos en la evaluación cuantitativa de riesgos microbiológicos calculan la propagación de un patógeno a través de la cadena alimentaria, describiendo, por ejemplo para la carne:

animales en granjas, transporte, sacrificio, corte, venta al por menor y preparación por parte del consumidor. Se utiliza un modelo de efecto para estimar el número de casos de enfermedades causadas por el consumo de porciones de alimentos contaminados (Nauta et al., 2007).

Un modelo de QMRA a escala completa cuesta mucho tiempo y dinero, tanto para el desarrollo como para la adquisición de datos (literatura, mediciones, obtención de expertos), lo que implica que generalmente solo se puede analizar una combinación patógeno-producto alimenticio (Nauta et al., 2007). En consecuencia se están invirtiendo esfuerzos para desarrollar programas sencillos que permitan una priorización de riesgos a menor costo, sin dejar de dar una información cuantitativa o semicuantitativa. Este es el caso del sQMRA2 desarrollado por Chardon y Evers (2014).

Staphylococcus aureus es uno de los principales patógenos responsables de la mastitis clínica y subclínica en bovinos, caprinos y ovinos. Su presencia conlleva grandes pérdidas económicas y una disminución en la calidad de la leche, y además es una fuente de contaminación para la leche cruda y los productos lácteos derivados afectando entre otros a la industria del queso (Cortimiglia et al., 2015). *S. aureus* es una bacteria patógena ubicua que pertenece a la familia *Micrococcaceae* (FDA, 2012). Muchas de las cepas pueden ser coagulasa positiva o negativa y tienen la capacidad de crear toxinas altamente estables al calor cuando se desarrollan en el alimento contaminado. Las toxinas se nombran por una letra del alfabeto (A-O) en el orden en que fueron descubiertos (EFSA, 2003), entre ellas, las toxinas de tipo A y D son las principales responsables de la intoxicación alimentaria por estafilococos (Hummerjohann et al., 2014). El microorganismo en cuestión es capaz de producir la toxina en un amplio intervalo de condiciones: temperatura de 10 - 48 °C (óptimo 40-45°C); pH de 4 - 9,6 (óptimo 7-8); actividad de agua igual o superior a 0,85 (óptimo 0,98); y concentración de sal de 0 - 10 % (óptimo 0% sal) (EFSA, 2003).

La intoxicación alimentaria por estafilococos es una enfermedad que se adquiere al ingerir alimentos contaminados con la toxina. Los alimentos que generalmente están involucrados son: leche, crema, queso, jamón, salchichas, ensaladas, champiñones y alimentos precocidos (Hummerjohann et al., 2014). Se caracteriza por producir dolor abdominal, náuseas, cólicos, vómitos y diarrea. Se considera una de las enfermedades transmitidas por los alimentos más comunes en todo el mundo, aunque la mayoría de los casos no se informan porque no requieren intervención médica (Linage et al., 2012).

Entre los 1993 y 2000 en América Latina se produjeron 191 brotes por intoxicación estafilocócica con 6,433 afectados y 2 muertes. De estos brotes, 48 correspondieron a Venezuela de los cuales en 40 casos el queso fue el alimento involucrado, afectando a un gran número de personas (INPPAZ, 2000). En Ecuador el Ministerio de Salud Pública (MSP) reporta que en los años 2017 y 2018 existieron 11,442 y 15,387 intoxicaciones alimentarias respectivamente y en lo que va del año 2019 se han producido 7,136 intoxicaciones alimentarias bacterianas, a pesar de conocer estas cifras el MSP no ofrecen mayor

información sobre el microorganismo causante o sus toxinas (MSP, 2019), por lo que no se puede asociar a estas intoxicaciones con la toxina estafilocócica.

Por otro lado en Ecuador el 35% de la leche generada se destina a la producción de queso fresco artesanal el cual es manufacturado en áreas rurales donde las condiciones higiénico sanitarias han carecido del seguimiento y control necesario para asegurar la obtención de productos de calidad. Los trabajos de investigación en relación con la calidad microbiológica de los quesos artesanales son escasos. Sin embargo, existen tesis de investigación donde se ha identificado a *S. aureus* coagulasa positivo con alta prevalencia en quesos artesanales en algunas provincias del país (Arguello et al., 2015).

El objetivo del presente trabajo es analizar la funcionalidad del programa sQMRA2 para priorizar riesgos de *Staphylococcus aureus* en queso fresco producido en Ecuador considerando dos escenarios o regiones bien diferenciadas la Costa y Sierra.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Herramientas de modelización utilizadas en el estudio

2.1.1 sQMRA2 (SWIFT QUANTITATIVE MICROBIOLOGICAL RISK ASSESSMENT VERSIÓN 2)

El modelo sQMRA2 realiza una evaluación de riesgos en la que se sigue la propagación de un patógeno a través de una parte de la cadena alimentaria, comenzando en la fase de venta minorista y terminando con el número de casos de personas enfermas (Chardon y Evers, 2014).

El sQMRA2 se implementa como una hoja de cálculo en el Excel, a partir de aquí el programa permite realizar simulaciones Monte Carlo mediante el uso de distintos softwares (@ RISK, Simular o R, por ejemplo), para el presente trabajo se utilizó el @RISK.

El programa consta de una hoja donde se implementa el modelo, otra de resultados y finalmente una de datos de referencia. En la hoja donde se implementa el modelo, se insertan los valores para cada parámetro de entrada o inputs de cada categoría, los parámetros que incluye son: consumo y venta al por menor (retail), almacenamiento, contaminación cruzada, preparación, infección y enfermedad. En la hoja de resultados se presentan las gráficas de atribución de las rutas de transmisión almacenamiento, contaminación cruzada y preparación en términos de exposición. Las gráficas de atribución de la exposición se presentan como la fracción de número total de ufc ingeridas a nivel de población y la gráfica de la atribución del efecto sobre las rutas de transmisión se expresa como una fracción del número total de casos. Se estima la disminución relativa del número de casos cuando la ruta de transmisión considerada se desactiva (Chardon y Evers, 2014). Y por último se tabulan los valores de salida u outputs tales como porciones contaminadas, ufc en la venta al por menor,

almacenamiento, preparación, número de casos, DALY, costos de la enfermedad y el riesgo relativo por cada 100000 personas.

Además se presenta una hoja con datos de referencia que permite comparar el riesgo relativo obtenido.

2.1.2 COMBASE

Combase es una base de datos de modelos matemáticos predictivos que se puede utilizar vía web. Esta herramienta permite simular el comportamiento de los microorganismos tanto durante su inactivación como su crecimiento, bajo diferentes parámetros medioambientales como son: la temperatura, el pH, la concentración de sal o la actividad de agua.

En el presente estudio se ha utilizado el Combase para predecir el crecimiento de *Staphylococcus aureus* en función de parámetros medioambientales como son la temperatura, concentración de sal y pH.

El resultado es el número de ufc/g al final del periodo de almacenamiento (MPD) y el tiempo de duplicación de la población en horas (Dbl time). Esta información es necesaria como parámetros de entrada en el sQMRA2.

2.2 Búsqueda de información y definición de los valores de entrada para el sQMRA2 y el ComBase

Para poder utilizar las herramientas de simulación y modelización es necesario realizar una búsqueda de información en distintas fuentes y artículos científicos para obtener los datos necesarios a incorporar en los programas. Por otra parte, es necesario definir el ámbito en el que se va a llevar a cabo el estudio para poder conseguir la máxima información posible (país, ciudad, comunidad, población normal o de riesgo, etc). En el presente trabajo se ha considerado a Ecuador como el país en el que se va a focalizar la evaluación de riesgos, para una población normal, es decir, sin riesgos adicionales como sería el caso de los ancianos, niños menores de 5 años o mujeres embarazadas que pudieran condicionar el resultado relativo de la evaluación que se realice. Si la información necesaria no se encuentra en el ámbito seleccionado, se recurre a la información que proporcionan otros países de América y Europa.

El alimento considerado en este caso es el queso fresco artesanal procedente de las regiones Costa y Sierra de Ecuador. En consecuencia, se ha considerado dos escenarios para el queso artesanal en el punto de venta minorista de la región Costa y la región Sierra, ambas zonas presentan aspectos diferenciales en cuanto a la temperatura ambiente y a la venta al por menor que hacen interesante comparar el riesgo relativo de *Staphylococcus aureus*.

2.2.1 CONSUMO Y VENTA AL POR MENOR (RETAIL)

2.2.1.1 TAMAÑO DE LA PORCIÓN Y PORCIONES CONSUMIDAS

El tamaño de la porción se ha definido de acuerdo con las recomendaciones dadas en la guía de nutrición española (Carbajal, 2004).

La información sobre el consumo de queso por habitante en Ecuador se obtuvo del Centro de la Industria Láctea (CIL) (Revista Líderes, 2017).

2.2.1.2 PORCENTAJE DE PORCIONES CONTAMINADAS EN RETAIL

En esta sección se puede realizar una estimación puntual de las porciones contaminadas en base a investigaciones o utilizar datos de vigilancia de los sistemas de información epidemiológica del país de interés. Para este trabajo se tomaron los resultados de las tesis de investigación microbiológica del queso artesanal de las dos regiones de Ecuador de Castillo (2013); Cedeño (2015) y Yugcha (2016).

2.2.1.3 CONCENTRACIÓN DE UFC EN Log₁₀/g EN LAS PORCIONES CONTAMINADAS

Para determinar los niveles de concentración del patógeno en el punto de venta minorista de ciudades de la Costa y Sierra ecuatoriana se ha tomado como punto de referencia los resultados de las tesis de Castillo (2013) y Cedeño (2015), los cuales analizaron microbiológicamente quesos artesanales.

2.2.2 ALMACENAMIENTO

2.2.2.1 CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

Para este trabajo de investigación se han seleccionado las siguientes categorías: temperatura ambiente y temperatura de refrigeración, ya que de acuerdo con estudios realizados se observó que los quesos estaban almacenados mayoritariamente a temperatura ambiente (80%), solo un pequeño porcentaje de vendedores mantenían los quesos en refrigeración en el lugar de venta (20%) (USAID, 2007).

Para el tiempo máximo de almacenamiento se establecieron 72 horas para las dos regiones a temperatura ambiente y para el tiempo medio de almacenamiento 36 horas. (Carrillo y Mondragón, 2011). Finalmente las temperaturas de almacenamiento consideradas son 30°C para la Costa y 20°C para la Sierra (INAMHI, 2013). En condiciones de refrigeración se estableció una temperatura de 5° C y tiempo máximo de almacenamiento de 168 horas (7 días) tiempo aproximado de vida útil de un queso fresco.

2.2.2.2 CARACTERÍSTICAS DE CRECIMIENTO E INACTIVACIÓN DEL PATÓGENO

En este apartado se muestran los siguientes ítems: tiempo mínimo de generación del patógeno en el producto (horas) y densidad máxima de la población microbiana en el alimento. Para obtener estos datos se utilizó la herramienta online “ComBase” donde se ingresó la información de la tabla 1.

TABLA 1. Parámetros de entrada para el programa ComBase para las regiones Costa y Sierra

| | Parámetros | | Referencias |
|----------------------|-----------------------|-----------------------|--|
| | Costa | Sierra | |
| Carga inicial | 10 ⁴ ufc/g | 10 ⁴ ufc/g | (Reglamento Europeo (CE) n° 2073/2005) |
| Temperatura | 30°C | 20°C | (INAMHI, 2013) |
| pH | 6,33 | 5,16 | (Cedeño, 2015); (Castillo, 2013) |
| % Sal (NaCl) | 3,3 | 2,1 | (Ramírez et al., 2016) |

Finalmente, la temperatura óptima y mínima de crecimiento del patógeno se obtuvo de la literatura científica.

2.2.3 CONTAMINACIÓN CRUZADA

En la venta al por menor existe la posibilidad de que se produzca contaminación cruzada, por ejemplo por las manos del operario a los instrumentos de corte y de estos al queso durante el loncheado del mismo. También se puede producir contaminación cruzada en el hogar a través de tablas de cortar y cuchillos. Si tenemos en cuenta estos hechos y asumimos que puede haber contaminación cruzada, debemos considerar dos aspectos: el porcentaje de las porciones que causan contaminación cruzada y dada la contaminación cruzada cuál es la fracción en log10 de ufc del patógeno en una porción que termina siendo ingerida en el momento del consumo. Esta información se ha obtenido del trabajo de investigación de Cedeño (2015) y Castillo (2013).

2.2.4 PREPARACIÓN DEL ALIMENTO

En este apartado el sQMRA2 contempla diferentes acciones en la cocina. En el se debe reflejar si el alimento se va consumir crudo o se va a cocinar, en este último caso se debe indicar que el producto puede estar poco hecho o bien hecho. El queso artesanal es un producto elaborado con leche sin pasteurizar, y por lo general se consume crudo o no se somete a ningún tratamiento con calor en la cocina del hogar por consiguiente se ha tomado en cuenta solo el parámetro “raw” crudo. A veces puede ir como ingrediente en un sándwich, pero el tiempo de

calentamiento de este si lo hubiera no sería suficiente para inactivar a los microorganismos o la toxina.

2.2.5 INFECCIÓN Y ENFERMEDAD

2.2.5.1 PARÁMETROS DEL MODELO DOSIS – RESPUESTA

El sQMRA2 propone dos modelos de dosis–respuesta, uno binomial y otro beta binomial. El modelo seleccionado es el binomial, el cual contempla una r que es una constante específica para cada patógeno. Por lo cual es necesario calcular el valor de r . Para esto se ha tomado como referencia el trabajo de Buchanan et al., (1997), en el cual se siguen una serie de cálculos considerando una población normal. En el trabajo se relaciona el número de células de un agente biológico consumido con la probabilidad de un efecto adverso en la población consumidora. El valor r ayuda a definir la forma de la curva dosis-respuesta y para su cálculo se ha utilizado la siguiente ecuación:

$$r = -[\ln(1 - P)]/N \quad (1)$$

donde: P = probabilidad de un efecto adverso, N = número de agente biológico consumido (ufc).

Se recomienda asegurarse de tomar datos que permitan obtener un valor de r conservador para la población evaluada (Buchanan et al., 1997).

2.2.5.2 DALY POR CASO

DALY (Disability-Adjusted Life Year) está expresado como la suma de años de vida perdidos por mortalidad prematura y años perdidos por discapacidad, ponderados con un factor entre 0 y 1 por la severidad de la enfermedad (Murray y López, 1996).

$$DALY = YLL + YLD \quad (2)$$

donde: YLL = número de años de vida saludable perdidos por mortalidad prematura; YLD = número de años perdidos por discapacidad.

2.2.5.3 COSTES DE LA ENFERMEDAD POR CASO (C.O.I)

La información referente al coste de la enfermedad se tomará del contexto internacional, debido a que el coste de la enfermedad es un parámetro económico que no solo considera los costes sanitarios de la enfermedad (consultas, hospitalización, medicación, entre otros) sino también las pérdidas de productividad (Kopper, 2009).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Datos de entrada calculados para la modelización

En la tabla 2 se muestran los parámetros de entrada utilizados en la modelización.

TABLA 2. Parámetros de entrada para la modelización en el sQMRA2

| | | | | |
|--|------------|---------------|-----------------------|---------------|
| Tamaño de la población | 8' 435 150 | | | |
| Periodo de consumo (días) | 365 | | | |
| Porciones consumidas (porción/mes) | 1,42 | | | |
| | COSTA | | SIERRA | |
| Consumo y venta al por menor (retail) | | | | |
| Tamaño de la porción (g) | 100 | | 100 | |
| Porciones contaminadas en retail (%) (Prevalencia) | 100 | | 83,33 | |
| Concentración de ufc en log10/g en las porciones contaminadas | 6 | | 4 | |
| Almacenamiento | | | | |
| Condiciones de almacenamiento | Ambiente | Refrigeración | Ambiente | Refrigeración |
| Porciones almacenadas en cada categoría (%) | 80 | 20 | 80 | 20 |
| Tiempo medio de almacenamiento (en horas) | 36 | 84 | 36 | 84 |
| Tiempo máximo de almacenamiento (en horas) | 72 | 168 | 72 | 168 |
| Temperatura media de almacenamiento (° C) | 30 | 5 | 20 | 5 |
| Características de crecimiento e inactivación del patógeno | | | | |
| Tiempo mínimo de generación del patógeno en el producto (horas) | 0,506 | | 2,29 | |
| Temperatura óptima de crecimiento (° C) | | | 37 | |
| Temperatura mínima de crecimiento (° C) | | | 10 | |
| Densidad máxima de la población microbiana en el alimento (ufc/g) | | | 10 ⁴ | |
| Contaminación cruzada | | | | |
| Porcentaje de porciones que causa contaminación cruzada | | | 100 | |
| Fración de una porción que termina siendo ingerida en log10 de ufc | 3 | | 2 | |
| Preparación del alimento | | | | |
| Porción cruda (%) | | | 100 | |
| Infección y enfermedad | | | | |
| Parámetros del modelo dosis – respuesta (<i>r</i>) | | | 6,4x10 ⁻¹⁶ | |
| DALY/caso (Pérdida de calidad de vida) | | | 0,001 | |
| Costo de la enfermedad (\$/caso) | | | 250 | |

3.1.1 CONSUMO Y VENTA AL POR MENOR

El dato de porciones consumidas reflejado en la tabla 2 se ha calculado tomando en cuenta los siguientes aspectos: la porción de queso fresco recomendada para la población adulta es de 80 a 125 gramos (Carbajal, 2004), tomando como referencia este dato, se ha establecido que cada porción será de 100 gramos de queso y también se considera que el consumo de queso en Ecuador es de 1,7 kg al año por habitante. En base al consumo anual y mediante una regla de tres se calculó la porción consumida /persona/mes la cual fue 1,42.

3.1.2 ALMACENAMIENTO

El tiempo máximo de almacenamiento a temperatura ambiente se estableció en base a lo mencionado por Carrillo y Mondragón, (2011) quienes evaluaron un queso artesanal producido a partir de leche cruda que se comercializaba sin envase, características que se asocia al queso evaluado en el estudio. Los autores establecieron una vida útil de tres días (72 horas), este dato se aplicó a la región Costa y región Sierra.

3.1.3 CARACTERISTICAS DE CRECIMIENTO E INACTIVACIÓN DEL PATÓGENO

Mediante la herramienta ComBase se calcularon los parámetros de crecimiento para *S. aureus*. Los resultados indican que el tiempo mínimo de generación del patógeno fue de 0,506 horas en la Costa y 2,29 horas en la Sierra, este dato representa el tiempo en horas en las que se duplica la población del patógeno. La Densidad Máxima de la población microbiana (MPD) se mantuvo constante para los 2 escenarios.

Con el ComBase se obtuvo también la curva de crecimiento de *S. aureus* para cada región. En la región Costa^(a) (concentración de sal en el queso 3,3%) se observa que a las 5 horas de almacenamiento el queso alcanzará una población superior a 10^5 ufc/g, mientras que en la región Sierra^(b) (concentración de sal en el queso 2,1%) la concentración de microorganismos sería superior a 10^5 ufc/g a partir de las 22 horas de almacenamiento bajo las condiciones ambientales de la zona (Figura 1). Asimismo se consideró una concentración de sal del 7% esta es la máxima cantidad de sal añadida encontrada en un queso Salvadoreño (Ramírez et al., 2016) para las dos regiones y se encontró que con esta concentración de sal a las 7 horas ya se obtendría una población superior a 10^5 ufc/g en la región Costa, esta misma población se obtendrá en la Sierra a las 35 horas de almacenamiento, el aumento de la concentración de sal hizo que el tiempo para alcanzar 10^5 ufc/g en la región Sierra aumente en 13 horas, mientras que se produjo un incremento de solo 2 horas para la región Costa. Por lo que se puede observar un mejor efecto conservador en el queso de la región Sierra, no obstante no es significativo considerar solo este parámetro (% sal) ya que tanto la temperatura como la carga microbiana inicial ejercen influencia y finalmente el

aumentar la cantidad de sal no daría el tiempo de conservación suficiente para la región Costa. En general, se considera que *S. aureus* enterotoxigénico debe alcanzar niveles de al menos 10^5 a 10^6 UFC/g o ml para producir cantidades detectables de enterotoxina (FDA 1992).

Por lo tanto, las condiciones ambientales a las que están almacenados los quesos podrían suponer un riesgo para el consumidor si consideramos que en la venta al por menor los quesos pueden mantenerse a esas condiciones por más de 1 día siendo evidente el alto riesgo de que en los quesos se haya producido la toxina.

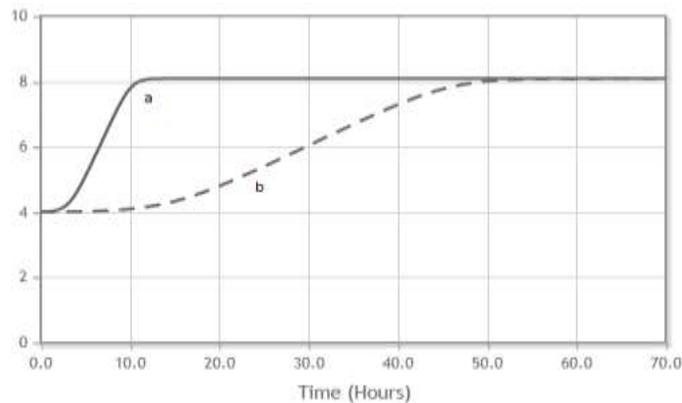


FIGURA 1. Crecimiento de *S. aureus* a concentración de 3,3% de NaCl a 30° C en la Costa^(a) y a concentración de 2,1% de NaCl a 20° C en la Sierra^(b)

3.1.4 CONTAMINACIÓN CRUZADA

Durante el almacenamiento, venta al por menor (generalmente mercados) y comercialización del queso sin envase puede ocurrir contaminación cruzada por lo que se ha considerado un 100% de probabilidad (caso más desfavorable). La probabilidad de ingerir una porción contaminada es del 50% es decir si consideramos que por lo general son 200 gramos los que se compran de queso, y la porción se estableció en 100 gramos la carga bacteriana que puede ser ingerida es la mitad de la concentración de ufc en el producto contaminado, ya que se contempla que la carga bacteriana está repartida uniformemente en todo el queso.

3.1.5 PREPARACIÓN

En el caso de la preparación del alimento se consideró únicamente el parámetro crudo tomando en cuenta lo siguiente: si el queso pasa por algún tratamiento térmico en el hogar este no tendría ningún efecto para destruir la toxina estafilocócica, debido a que su estabilidad térmica está influenciada por: la naturaleza del alimento, el pH, la presencia de NaCl, etc. y el tipo de toxina. La

SEA (Enterotoxina estafilocócica A) más comúnmente encontrada en alimentos, por ejemplo, es relativamente más estable al calor a pH 6,0 o más alto que a pH 4,5 – 5,5, si la toxina estafilocócica no se desactiva por completo, la reactivación por calor puede ocurrir bajo ciertas circunstancias como la cocción, el almacenamiento o la incubación (Tatini, 1976). En general, puede ser necesario calentar a 100 ° C durante al menos 30 minutos para destruir la toxina no purificada (Reed, 1993).

3.1.6 INFECCIÓN Y ENFERMEDAD

En cuanto al parámetro del modelo dosis respuesta, el cálculo del valor de r se centró en tomar datos sobre la incidencia anual de la enfermedad estafilocócica transmitida por queso y los niveles del agente biológico en el alimento. Se desarrolló una estimación intencionalmente conservadora de relación dosis - respuesta para un patógeno transmitido por alimentos (Buchanan et al., 1997). El valor de r obtenido fue de $6,45E-16$.

Para el valor de DALY se ha tomado en consideración un valor muy bajo ya que en la investigación realizada no se ha encontrado estudios que reporten la pérdida de calidad de vida a causa de una Intoxicación alimentaria estafilocócica (IAE), ya que los síntomas asociados a una IAE rara vez persisten y la recuperación es normalmente rápida. La muerte es rara a causa de esta intoxicación. El porcentaje de mortalidad varía desde el 0,03% en la población general hasta 4,4% en las poblaciones más sensibles, niños y personas de edad (Holmberg y Blake, 1984).

El estudio para establecer el costo de la enfermedad con datos bibliográficos muestra que en Latinoamérica y el Caribe no se logra conocer la incidencia real y por lo tanto es difícil conocer los costos asociados a las Enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA's) debido a la falta de información asociada a la ocurrencia de brotes y patógenos implicados, por lo que se ha tomado en cuenta un estimado. En un estudio en Estados Unidos en 1995, se evaluaron entre 3,3 y 12,3 millones de casos de ETA's, con un costo medio de \$1,270 por caso entre gastos médicos y pérdidas de productividad, causadas por siete patógenos entre ellos *Staphylococcus aureus* (Butzby et al., 1996). Para Costa Rica la estimación de la magnitud del impacto socioeconómico de las ETA's es un asunto de primordial importancia, por lo que en un estudio se han centrado en calcular los costos de atención de la salud, dando como resultado \$250 por caso de ETA.

3.2 Resultados de la modelización

Como primer resultado se evidencian las gráficas de atribución de la exposición y efecto.

Con respecto al almacenamiento (figura 2) se observa que en la Costa el factor que más influye es la temperatura de almacenamiento (30° C) la cual es la mayor ruta de transmisión para el desarrollo de ufc y por tanto causa del 100%

de casos. De igual manera ocurre en la región Sierra donde el factor temperatura de almacenamiento (figura 3), sería el mayor responsable de los casos.

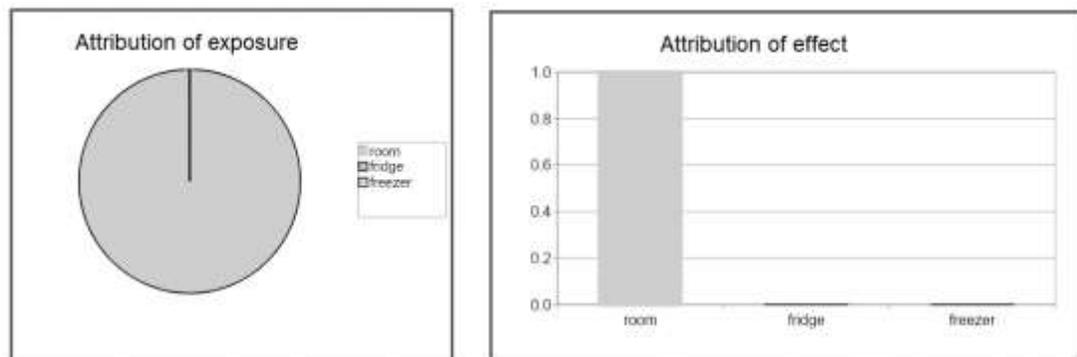


FIGURA 2. Atribución de la exposición y atribución del efecto en el almacenamiento a temperatura ambiente (30°C) en la región Costa.

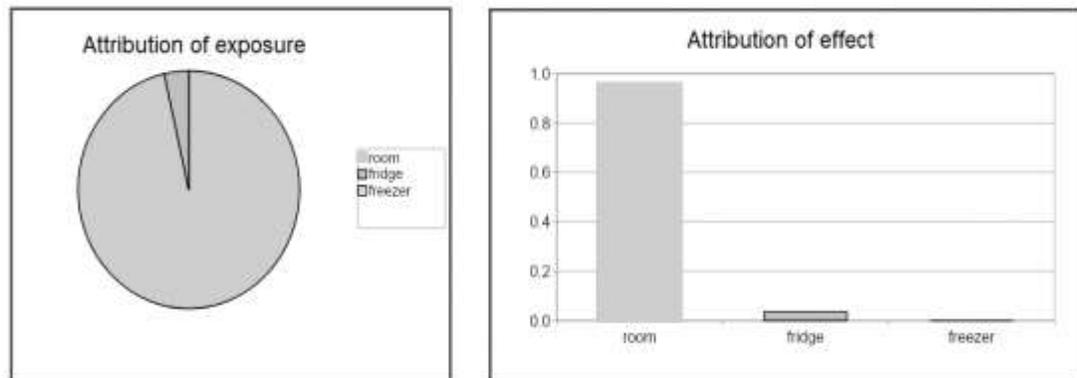


FIGURA 3. Atribución de la exposición y atribución del efecto en el almacenamiento a temperatura ambiente (20°C) en la región Sierra.

La tabla 3 muestra los resultados correspondientes a las simulaciones en las que se puede ver tanto el riesgo relativo y número de ufc en la venta al por menor, el almacenamiento y preparación. Como se observa la concentración de *S. aureus* en la venta al por menor es similar para los quesos frescos vendidos en ambas regiones, esto implicaría un riesgo muy parecido para ambos casos. En cuanto al almacenamiento y preparación se diferencian en 4 ciclos logarítmicos por lo que el riesgo relativo varía, como resultado se obtiene un mayor número de casos en la región Costa. En cuanto al DALY se obtiene como resultado cero debido a que es un parámetro que no se ha considerado que esté implicado en la intoxicación estafilocócica y sus potenciales secuelas y por consiguiente pérdida de calidad de vida. Por otro lado los costos por enfermar son mayores para la región Costa.

TABLA 3. Resultados de la modelización en la región Costa y Sierra

| Producto: | Queso | RR (100 000 | Queso | RR (100 000 |
|-----------------------------|------------------|-------------|------------------|-------------|
| | Costa | habitantes) | Sierra | habitantes) |
| Patógeno: | <i>S. aureus</i> | | <i>S. aureus</i> | |
| Retail (no. de ufc) | 2,5E+11 | 96,10 | 2,1E+11 | 79,79 |
| Almacenamiento (no. de ufc) | 8,7E+15 | 1,6E+07 | 9,7E+11 | 1,80E+03 |
| Preparación (no. de ufc) | 7,4E+15 | 6,7E+10 | 8,2E+11 | 7,50E+06 |
| Número de casos | 4,9 | 0,07 | 2,4 | 0,034 |
| DALY población | 0 | 0,0018 | 0 | 0,0002 |
| C.O.I (\$) población | 1224 | 0,05 | 884 | 0,05 |

*RR: riesgo relativo

Una vez conocidas la cantidad de ufc de cada apartado es importante conocer la relación que estas guardan con la producción y cantidad de toxina generada ya que en la mayoría de casos la enfermedad corresponde a una intoxicación por toxina estafilocócica como consecuencia del desarrollo del microorganismo en el queso durante el almacenamiento, bien en lugar de venta al por menor o en los hogares. Según la gráfica de relación lineal entre ufc/mL y ng toxina/mL (figura 4), una carga microbiana de 10^{10} ufc/mL producirá 10^3 ng/mL de toxina.

En la venta al por menor la concentración de la toxina para las dos regiones seguiría siendo 10^3 ng/mL y de igual forma para en el almacenamiento y preparación en la Sierra debido a que presenta los mismos ciclos logarítmicos, no así para el caso del almacenamiento y preparación en la región Costa ya que al calcular la cantidad de toxina generada con un población de 10^{15} se producirán 10^8 ng/mL toxina.

La bibliografía muestra que apartir de una ingesta próxima a 200 ng/mL ó g de toxina podrían presentarse síntomas de intoxicación estafilocócica (FDA, 2012). Asao et al (2003) reportó que la ingesta total del SEA que causa intoxicación alimentaria es de aprox. 20–100 ng y determinó los volúmenes de leche procesada que darían como resultado una ingesta de 20 ng de toxina. Aunque existen diferentes datos asociado a la producción de una intoxicación debida a la toxina estafilocócica, hay que considerar que los síntomas dependen de la edad, el estado inmunitario y otros factores de salud en los consumidores de los alimentos. Por lo cual se ha estimado como dosis tóxica para este estudio 200 ng/ml ó gramos.

Por todo lo mencionado anteriormente los resultados obtenidos en este trabajo indicarían una probabilidad alta de intoxicación estafilocócica en la persona que consuma el queso artesanal.

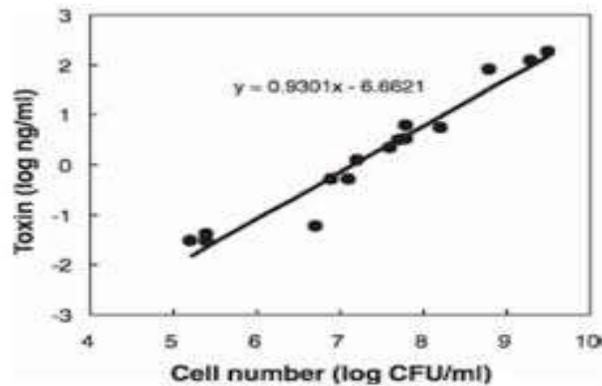


FIGURA 4. Relación lineal entre log ufc/mL y log ng toxina/mL (Kim et al., 2009)

La curva dosis respuesta de la figura 5 permite comparar la ID50 establecida en unos 1000 ng/mL con la cantidad de toxina del producto y poder así calcular el aumento del nivel de contaminación para que cause la enfermedad. Como se comentó anteriormente los resultados de las regiones Costa y Sierra superarían los 1000 ng/ml de toxina, por lo tanto tomando en cuenta la gráfica dosis-respuesta la probabilidad de enfermar sería superior al 50% para una población normal.

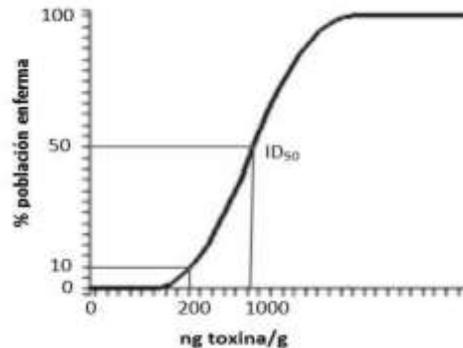


FIGURA 5. Modelo dosis-respuesta de la toxina estafilocócica (FDA, 2012); (Fernández N, 2015).

3.3 Crecimiento de *S. aureus* en condiciones de refrigeración

Una vez hecha la modelización con las condiciones ambientales reales de las dos regiones, se evidencian riesgos para la población, por lo que se proponen cambios en las condiciones de almacenamiento.

Aunque la realidad es que los quesos durante su venta se almacenan a temperatura ambiente tal como se ha establecido en las modelizaciones llevadas a cabo en el ComBase 30° en la Costa y 20° en la Sierra, se ha realizado un cambio en la condiciones de almacenamiento para describir el efecto de la

temperatura, suponiendo que al momento de la venta los quesos estén refrigerados a una temperatura de 7,5 °C. La figura 6 muestra que en el caso de la región Costa^(a) a las 250 horas (10 días) los quesos alcanzarían una población superior a 10^5 ufc/g, esta misma población en la región Sierra^(b) no se alcanzaría hasta las 350 horas (14 días). Considerando que la vida útil de este producto ronda sobre los 7 días, considerar temperaturas de refrigeración entre los 5 - 7 °C daría margen suficiente como para que no se desarrolle el microorganismo hasta unos niveles que resulten peligrosos o se produzca suficiente toxina estafilocócica.

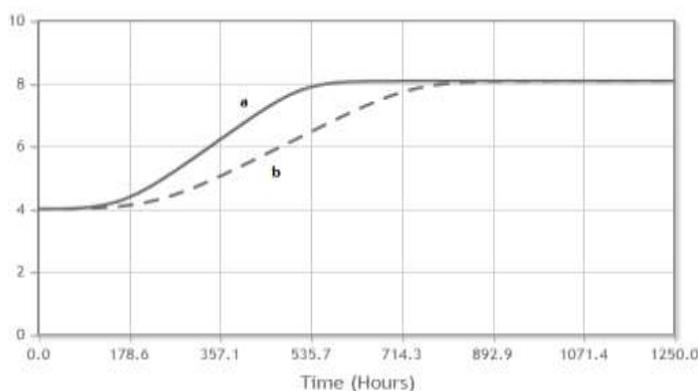


FIGURA 6. Crecimiento de *S. aureus* a concentración de 3,3% de NaCl a 7,5° C en la Costa^(a) y a concentración de 2,1% de NaCl a 7,5° C en la Sierra^(b)

Finalmente al considerar que la temperatura de almacenamiento es el factor determinante para que no ocurra la producción de la toxina estafilocócica se ha realizado una simulación en la cual se consideran los parámetros óptimos de temperatura, evidentemente el número de ufc aún es mayor a 10^5 ufc (tabla 4), pero si consideramos la gráfica de relación lineal entre log ufc/mL ó gramos y log ng toxina/mL a estas condiciones a pesar de tener una carga microbiana alta no se estaría produciendo toxina, la causante de enfermar.

TABLA 4. Resultados para las dos región (Costa y Sierra) considerando condiciones óptimas de almacenamiento para el queso artesanal

| Producto: | Queso Artesanal | RR (100 000 habitantes) |
|-----------------------------|-------------------------|--------------------------------|
| Patógeno: | <i>S. aureus</i> | |
| Retail (no. de ufc) | 2,5E+08 | 0,10 |
| Almacenamiento (no. de ufc) | 2,5E+08 | 0,47 |
| Preparación (no. de ufc) | 1,0E+08 | 927,02 |
| Número de casos | 0,0 | 1,0E-09 |
| DALY población | 0,0 | 2,5E-11 |
| C.O.I (\$) población | 0,0 | 7,4E-10 |

*RR: riesgo relativo

4. CONCLUSIONES

El programa sQMRA2 permitió priorizar el riesgo de *Staphylococcus aureus* en queso fresco artesanal producido en Ecuador, ya que se obtuvo información de importancia en cuanto al riesgo existente en la venta al por menor en las regiones de la Costa y Sierra de Ecuador.

La probabilidad de enfermar es superior al 50% para una población normal (población sin riesgos adicionales) en las dos regiones estudiadas.

Las temperaturas habituales en estas dos regiones contribuyen a que exista un elevado riesgo de intoxicación por la toxina estafilocócica dado que son temperaturas que favorecen el desarrollo de *S. aureus* hasta unos niveles que permiten la generación de suficiente toxina para enfermar.

Finalmente el almacenamiento y no romper la cadenas de frío (temperatura de refrigeración por debajo de 7 °C) en los quesos tanto en el punto de venta al por menor como en el refrigerador doméstico significarían que el queso artesanal no se constituya en un peligro para la salud de la población, ya que se podría controlar la producción de la toxina estafilocócica.

AGRADECIMIENTOS

A mi madre Isabel por ser mi mayor apoyo y confiar en mí siempre, gracias por todo.

A mi padre Hugo por ser mi guía y darme ánimos para seguir adelante con mis estudios.

A mi amiga Jazmín por estar junto a mí apoyándome incondicionalmente. Contigo este año se ha convertido en la mejor experiencia a nivel profesional y personal. Gracias amiga.

A mi amiga Moni por ser mi ejemplo de que con esfuerzo y constancia se logran muchas cosas. Gracias por darme fuerzas día a día.

A Daniel por estar pendiente de mí y brindarme su amor incondicional a pesar de la distancia.

A mi tutor Antonio por ser un eje fundamental en todo el trabajo de investigación, por su paciencia y consejos. Gracias.

5. REFERENCIAS

- Arguello, P.; Lucero O.; Castillo, G.; Escobar, S.; Albuja, A.; Gallegos, J.; Carrascal, A. Calidad microbiológica de los quesos artesanales elaborados en zonas rurales de Riobamba (Ecuador). [en línea]. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá. (2015) Dirección URL: < <https://dspace.espace.edu.ec/bitstream/123456789/4983/1/56T00630%2>>
- Asao T, Kumeda Y, Kawai T, Shibata T, Oda H, Haruki K, Nakazawa H, Kozaki S, 2003. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiology and Infection*

130, 33–40.

- Brown, M.; Stringer, M. 2002. Microbiological risk assessment in food processing. CRC Press pp 1-4, ISBN1855735857
- Buchanan, R.; Damert, W. 1997. Use of epidemiologic and food survey data to estimate a purposefully conservative dose-reponse relationship for *Listeria monocytogenes* levels and incidence listeriosis. *Journal of Food Protection*, 60(8).
- Butzby, J.C.; Roberts, T.; Lin, J.C; MacDonald, J.M. 1996. Bacterial foodborne disease: Medical costs and productivity losses. U.S. Dept. of Agr., Econ. Res. Serv., AER No. 741.
- Carbajal, A. "Guía de nutrición". [en línea]. *Departamento de Nutrición. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.* (2004) Dirección URL: <<https://www.ucm.es/nutricioncarbajal/>>
- Carrillo M; Mondragón F. 2011. Estudio de vida útil del queso asadero; *Revista de la Facultad de Salud Pública y Nutrición*, Vol. 12, No. 3.
- Castillo-Segovia, G. 2013. Prevalencia de bacterias patógenas *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*, en quesos frescos elaborados artesanalmente en las parroquias rurales del cantón Riobamba. Tesis de Grado. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Escuela de Bioquímica y Farmacia
- Cedeño-Tapia, M. 2015. Calidad del queso fresco en diferentes lugares de procedencias y lugares de comercialización en Quevedo. Tesis de Grado. Universidad Técnica Estatal de Quevedo
- Revista Líderes. 2017. Noticia: yogures y quesos son la apuesta para ganar mercado (El CIL reporta consumo de queso en Ecuador). Dirección URL:<<https://www.revistalideres.ec/lideres/yogures-quesos-apuesta-lacteos-alpina.html>>. [Consulta: 20 May. 2019]
- Chardon, J.; Evers, E. 2014. Manual sQMRAv2 (swift Quantitative Microbiological Risk Assessment version 2)
- Cortimiglia, C.; Bianchini, V.; Franco, A.; Caprioli, A.; Battisti, A.; Colombo, L.; Stradiotto, K.; Vezzoli, F.; Luini, M. 2015. Short communication: Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* in bulk tank milk from dairy goat farms in Northern Italy. *Journal of Dairy Science* 98, 2307-2311.
- EFSA. 2003. Opinion of the Scientific committee on veterinary measures relating to public health on Staphylococcal enterotoxins in milk products, particularly cheeses. 1-73
- Fernández-Hidalgo N, 2015. Evaluación de riesgo de *Staphylococcus aureus* en queso. Tesis de postgrado. Universidad Politécnica de Valencia.
- Food Drug Administration (FDA). 1992. *Staphylococcus aureus*, In: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook (bad Bug Book), Center for Food Safety and Applied Nutrition. Dirección URL: <<http://vm.cfsan.fda.gov/~mow/intro.html>>. [Consulta: 16 Jul. 2019]
- Food Drug Administration (FDA). 2012. Bad Bug Book-Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. 1-292.
- Holmberg, S.; Blake, P. 1984. Staphylococcal Food Poisoning in the United States: New Facts and Old Misconceptions. *JAMA*. 1984;251(4):487–489. doi:10.1001/jama.1984.03340280037024
- Hummerjohann, J.; Naskova, J.; Baumgartner, A.; Graber, H.U. 2014. Enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* genotype B as a major contaminant in Swiss raw milk cheese. *Journal of Dairy Science* 97, 1305-1312.
- INAMHI (Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología). 2013. *Anuario meteorológico*. Dirección URL:<http://www.serviciometeorologico.gob.ec/docum_institucion/anuarios/meteorologicos/Am_2013.pdf>. [Consulta: 10 Jun. 2019]
- INEC. 2010. Datos población ecuatoriana. Dirección URL: <<http://www.ecuadorencifras.gob.ec/resultados/>>. [Consulta: 05 Jun. 2019]
- INEN. 2010. Norma general para quesos frescos no madurados. Dirección URL: <<https://archive.org/details/ec.nte.1528.2012/page/n1>>. [Consulta: 05 Jun. 2019]
- Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis – Organización Panamericana de la Salud (INPPAZ-OPS/OMS). 2000. Sistema de Información Regional para la Vigilancia de Enfermedades Transmitidas por Alimentos: Brotes de Intoxicación estafilocócica.1993-2000.

- Kim, H.J., Griffiths, M.W., Fazil, A.M., Lammerding, A.M., 2009. Probabilistic Risk Model for Staphylococcal Intoxication from Pork-Based Food Dishes Prepared in Food Service Establishments in Korea. *Journal of Food Protection* 72, 1897-1908
- Kopper, G.; Calderón, G.; Schneider, S.; Domínguez, W.; Gutiérrez, G. 2009. Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico. Estudios de caso en Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua
- Lammerding, A.; Fazil, A. 2000. Hazard identification and exposure assessment for microbial food safety risk assessment. *Int J Food Microbiol.* Jul 15;58(3):147-57
- Linage, B.; Rodríguez-Calleja, J.; Otero, A.; García-Lopez, M.; Santos, J. 2012. Characterization of coagulase-positive staphylococci isolated from tank and silo ewe milk. *Journal of Dairy Science* 95, 1639-1644.
- Ministerio de Salud Pública del Ecuador (MSP). Enfermedades transmitidas por agua y alimentos, [en línea]. Dirección URL: <<https://www.elcomercio.com/actualidad/alimentos-contaminacion-oms-nutricion-salud.html>>. [Consulta: 08 Ag. 2019].
- Murray, C.; López, A. 1996. Evidence-based health policy lessons from the Global Burden of Disease Study. *Scien-ce.* 274: 740-3.
- Nauta, M. J., Jacobs-Reitsma, W. F., y Havelaar, A. H. 2007. A risk assessment model for *Campylobacter* in Broiler Meat. *Risk Analysis*, 27(4), 845-861.
- Ramírez J, Aguirre J, Aristizabal V, Castro S (2016). La sal en el queso: diversas interacciones.
- Reed G.H. 1993. Foodborne illness (Part 1): Staphylococcal ("Staph") food poisoning. *Dairy, Food and Environmental Sanitation*, 13 (11), 642.
- Reglamento (CE) nº 2073/2005 de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.
- Tatini, S. 1976. Thermal stability of enterotoxins in food. *J. Milk Food Technol*, 39, 432-38.
- USAID. 2007. Valoración microbiológica del riesgo de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénica coagulasa positivo en queso fresco. Programa MIDAS, p 33-37.
- Yugcha-Pilamunga, S. 2016. Determinación de la presencia de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes y multiresistentes aislados en quesos frescos artesanales elaborados en zonas rurales de Riobamba. Tesis de Grado. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Escuela de Bioquímica y Farmacia.