

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO**

**CARRERA:
BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**TEMA:
CONCENTRACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS DE CALOSTRO BOVINO
UTILIZANDO TECNOLOGÍA DE MEMBRANAS**

**AUTORA:
ANA LUCÍA PÁEZ FIALLOS**

**DIRECTORA:
ELENA DEL ROCÍO COYAGO CRUZ**

Quito, mayo del 2015

**DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD Y AUTORIZACIÓN DE USO
DEL TRABAJO DE TITULACIÓN**

Yo, Autorizó a la Universidad Politécnica Salesiana la publicación total o parcial de este trabajo de titulación y su reproducción sin fines de lucro.

Además, declaró que los conceptos y análisis desarrollados y las conclusiones del presente trabajo son de exclusiva responsabilidad del autor.

Quito, mayo del 2015

Ana Lucía Páez Fiallos

CI: 1722021183

DEDICATORIA

Esta tesis está especialmente dedicada

A DIOS por bendecirme y darme la fortaleza para continuar en el camino de la vida.

A mi mamita Carmen que es el ángel que me cuida y me ilumina todos los días.

A mis padres Hilda y Orlando por el apoyo y por enseñarme a trabajar duro para
alcanzar mis metas.

A mi hermano Santiago y mi cuñada Lucia por apoyarme siempre en las buenas y
más en las malas, por ser el pilar más fuerte que me ha permitido sostenerme y no
decaer.

A mis hermanos Daniel y Paul por los momentos vividos y lecciones aprendidas.

A mis sobrinas Emily y Melani, a mi sobrino Daniel Jeremías por las sonrisas
arrancadas y por brindarme el amor más puro que uno puede tener.

A mis familiares y amigos que de cada día han hecho un recuerdo maravilloso
guardado en mi corazón.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Politécnica Salesiana.

A las haciendas que han dado apertura y colaboración para obtener las muestras.

Al Laboratorio de Calidad de la Leche UPS Cayambe por brindarme el apoyo y conocimiento.

Al Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad CIVABI.

A la Planta Piloto de la Universidad Tecnológica Equinoccial en la Carrera de Ingeniería de Alimentos por permitirme la utilización de su equipo.

A la Ing. Elena del Rocío Coyago Cruz Msc. por ser mi directora que ha enriquecido científica y humanamente el tiempo en el que se ha desarrollado este trabajo.

A todas las personas que han ayudado con su conocimiento y apoyo en el desarrollo de esta tesis.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN	1
1.1 Calostro bovino	5
1.2 Inmunoglobulinas.....	7
1.2.1 Inmunoglobulinas Calostro Bovino	8
1.2.1. Inmunidad Pasiva en bovinos.....	9
1.3. Métodos de cuantificación	11
1.3.1. MilkoScan FT 6200-Foss.....	11
1.3.2. Calostrometro.....	12
1.3.3. Conteo de células somáticas.....	13
1.3.4. Análisis bacteriológico del calostro bovino	14
1.3.5. Métodos Cromatográficos.....	15
1.3.5.1. Cromatografía líquida de alta eficacia HPLC.....	15
1.4. Tecnología de membranas.....	17
1.4.1. Generalidades.....	17
1.4.2. Tipos de separación con membranas.....	18
1.4.3. Microfiltración	19
CAPITULO 2	20
MARCO METODOLÓGICO	20
2.1. Selección de muestras	20
2.2. Análisis físico químico y microbiológico del calostro bovino.....	21
2.2.1. Composición físico química:	21
2.2.2. Densidad.....	21
2.2.3. Acidez titulable	22
2.3. Análisis microbiológico de calostro bovino.....	22
2.3.1. Contaje de bacterias totales.....	22

2.3.2. Contaje de células somáticas.....	23
2.3.3. Recuento de Coliformes totales y E. coli.	23
2.4. Cinética de decremento inmunoglobulinas de calostro bovino.....	23
2.4.1. Cromatografía líquida de alta resolución HPLC.....	23
2.5. Separación de componentes inmunológicos de calostro tecnología de membranas	24
2.5.1. Microfiltración	24
CAPÍTULO 3	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
3.1. Selección de la raza de ganado mayoritaria en el cantón Cayambe.....	26
3.2. Análisis físico químico del calostro bovino	28
3.4. Análisis microbiológico de calostro bovino.....	41
3.4.1. Recuento de Coliformes totales, Echerichia coli.	46
3.5. Cinética de decremento inmunoglobulinas de calostro bovino.....	47
3.5.1. Cromatografía líquida de alta resolución HPLC.....	47
3.6. Separación de componentes inmunológicos de calostro con tecnología de membranas	53
3.6.1. Microfiltración	53
CONCLUSIONES	61
RECOMENDACIONES	64
LISTA DE REFERENCIAS	65
ANEXOS	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características y composición química del calostro y leche de ganado Holstein.	6
Tabla 2: Clasificación de procesos con membranas	19
Tabla 3. Variación de condiciones de Microfiltración.....	25
Tabla 4. Descripción de Puntos de muestreo.	27
Tabla 5: Porcentaje de animales de raza y número de partos de las Haciendas seleccionadas.....	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 6. Resultado del análisis físico químico muestras Hacienda la Alegría.....	29
Tabla 7. Resultado del análisis físico químico muestras Hacienda San Carlos.	31
Tabla 8. Resultado del análisis físico químico muestras Hacienda San Mateo.	32
Tabla 9. Resultado de concentración de inmunoglobulina muestras calostro bovino. Hacienda La Alegría.	38
Tabla 10 Resultado de concentración de inmunoglobulina muestras calostro bovino. Hacienda San Carlos.	39
Tabla 11. Resultado de concentración de inmunoglobulina muestras calostro bovino Hacienda San Mateo	40
Tabla 12. Promedio resultado análisis microbiológico Hacienda La Alegría.....	42
Tabla 13. Promedio resultado análisis microbiológico Hacienda San Carlos.	43
Tabla 14. Promedio resultado análisis microbiológico Hacienda San Mateo.....	44
Tabla 15. Promedio general análisis fisicoquímico y microbiológico de todas las muestras analizadas.....	46
Tabla 16. Resultado recuento de Colifomes totales y Echerichia coli muestras microfiltración.....	47
Tabla 17. Resultado de los picos reportados en el análisis de HPLC marca Varian modelo ProStar 320 del patrón plasma sanguíneo bovino.	48
Tabla 18. Resultado de los picos reportados en el análisis de HPLC marca Varian modelo ProStar 320 vacas de las tres haciendas. Tiempo de retención 1,42.	52
Tabla 19. Condiciones y resultados proceso de microfiltración muestra 1.....	54
Tabla 20. Condiciones y resultados proceso de microfiltración muestra 2.....	55
Tabla 21. Diseño experimental test estadístico ANOVA de dos vías para medir la variación en la concentración.....	59

Tabla 22. Resultados análisis equipo HPLC marca Varian modelo ProStar 320 muestras proceso de microfiltración.	60
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representación esquemática de la estructura de la inmunoglobulina G.	8
Figura 2: Tecnología de MilkoScan FT2 proceso de análisis de muestras	11
Figura 3: Valores contenidos en el calostrómetro para su interpretación	12
Figura 4: Tecnología de BactoScan™ FC. Muestra en la celda de flujo	15
Figura 5: Esquema del HPLC	16
Figura 6: Correlación de propiedades de membranas con rangos de separación.....	18
Figura 7 Promedio de resultado del análisis físico químico de 6 ordeños vacas de la Hacienda la Alegría.....	29
Figura 8 Promedio de resultado del análisis físico químico de 6 ordeños vacas de la Hacienda San Carlos	31
Figura 9 Promedio de resultado del análisis físico químico de 6 ordeños vacas de la Hacienda San Mateo	32
Figura 10. Concentración de Inmunoglobulinas Vacas Hacienda La Alegría.	38
Figura 11: Concentración de Inmunoglobulinas Vacas Hacienda San Carlos.....	39
Figura 12: Concentración de Inmunoglobulinas Vacas Hacienda San Mateo.....	40
Figura 13. Promedio de Resultado de seis ordeños análisis microbiológico contaje de bacterias totales y células somáticas Hacienda la Alegría.	42
Figura 14. Promedio de Resultado de seis ordeños análisis microbiológico contaje de bacterias totales y células somáticas Hacienda San Carlos.....	43
Figura 15. Promedio de Resultado de seis ordeños análisis microbiológico contaje de bacterias totales y células somáticas Hacienda San Carlos.....	44
Figura 16: Cromatograma plasma sanguíneo.....	49
Figura 17: Cromatograma leche.....	50
Figura 18: Cromatograma Calostro.....	51
Figura 19. Promedio resultado de áreas de seis ordeños de las tres haciendas.....	52
Figura 20: Microfiltración del calostro bovino a 1,5 bar de PTM muestra 2, a 33° C y membrana de 0,45μ.....	56
Figura 21: Microfiltración del calostro bovino a 2,5 bar de PTM muestra 2, a 35° C y membrana de 0,45μ.....	56
Figura 22. Proceso de microfiltración. Muestra 1 Microfiltración Entrada – Permeado – Concentrado.	57

Figura 23. Proceso de microfiltración. Muestra 2 Microfiltración Entrada – Permeado – Concentrado.	58
--	----

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXOS 1: Preparación de frascos de frascos para muestreo.....	71
ANEXOS 2. Cromatogramas HPLC queso mozzarella fresco.....	72
ANEXOS 3. Cromatogramas HPLC proteínas lácteas.	73

RESUMEN

El presente trabajo consistió en concentrar inmunoglobulinas de calostro bovino para lo cual se realizó la selección de la raza de ganado en el cantón Cayambe, en tres haciendas diferentes, y se evaluó el calostro desde el primer hasta el sexto ordeño de cuatro vacas; la evaluación incluyó análisis físico-químicos y microbiológicos. Además se cuantificó la cinética de decremento de inmunoglobulinas que se evaluó con la ayuda de la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (*HPLC*) utilizando patrón de referencia de plasma sanguíneo bovino, finalmente la concentración de inmunoglobulinas se realizó utilizando tecnología de membranas con la evaluación microbiológica en cada corriente de salida del proceso de microfiltración. Los valores encontrados fueron evaluados por el test estadístico ANOVA de dos vías.

Los resultados obtenidos señalan que en el análisis físico químico se obtuvo valores máximos de proteína total del 16,9%, grasa 14%, lactosa 7,6%, sólidos totales 39,1%, sólidos no grasos 24,8%, densidad de 1,115 g/mL y acidez titulable de 42,67 ° Dornic; se determinó el pico más representativo con área máxima de 98997186, en un tiempo de retención promedio de 1,3805 min. El concentrado de inmunoglobulinas de calostro bovino fue independiente del proceso aplicado para la concentración por tecnología de membranas.

Palabras claves: calostro bovino, inmunoglobulinas, membranas, microfiltración, cromatografía.

ABSTRACT

The work was concentrated bovine colostrum immunoglobulins to which livestock breed selection held at the canton of Cayambe is chose three farms and four cows took samples of bovine colostrum from first to sixth milking, analysis was performed physico-chemical in which composition, density and acidity was determined. Through the colostrometer determined the concentration of immunoglobulins also microbiological analysis of bovine colostrum by equipment that uses flow cytometry analysis.

To determine the kinetics of decrease was managed team of high resolution HPLC with gradient Elution liquid chromatography using as pattern plasma blood cattle. The process of membrane technology was micro-filtration to concentrate by varying temperature and pressure parameters, analysis of coliforms and *Echerichia coli*, also to check the concentration after the microfiltration process was analyzed the area by *HPLC*.

Two-way ANOVA statistical test was applied to measure the variation in the concentration of bovine colostrum immunoglobulins. Chemical physical analysis yielded maximum values of total 14, lactose 7.6, solid total 39.1, solid non fat 24.8 16.9, fat protein, density of 1,115 gmL and titratable acidity of 42.67 ° Dornic; It was determined the most representative peak with maximum area of 98997186, in a time of 1,3805 mean retention. Bovine colostrum immunoglobulin concentrate is independent of the process applied to the concentration by membrane technology.

Key words: bovine colostrum immunoglobulins, membranes, microfiltration, chromatography technology.

INTRODUCCIÓN

La producción de leche es de vital importancia para la mayoría de las familias de la sierra ecuatoriana, las cuales representan unidades de producción agropecuarias (UPA's) inferiores a 20 hectáreas que constituyen el 78.7% de las unidades de producción lechera, 336000 fincas y el 86.8% de estas UPA's no son tecnificadas. Estas fincas productoras de leche proporcionan trabajo a más de 500000 personas y en las más grandes superan las 80000 (Chauveau, 2007, pág. 45).

Según Campos, Carrillo, Loaiza, y Giraldo (2007, pág. 2) el calostro es la primera secreción láctea de los mamíferos obtenida después del parto. Las características del calostro se conservan especialmente en los primeros días de ordeño desde el primero hasta octavo día. Las secreciones posteriores se las conoce como leche de transición hasta que la leche se torne completamente normal.

Para que la vaca produzca leche aprovechable debe pasar por la etapa de producción de calostro lo cual es la primera fuente de nutrientes para los terneros recién nacidos, además que constituye la mejor herramienta y la más barata fuente para mejorar los procesos de cría en los terneros, disminuir la mortalidad y la presencia de algunas situaciones como diarreas, cólicos, deshidrataciones y aún neumonías (Elizondo J. , Pasteurización del calostro: Mecanismo para disminuir la diarrea en terneras., 2007, pág. 44).

De acuerdo con Elizondo J. (2007, pág. 272) el calostro es primera fuente de nutrientes para los terneros recién nacidos. El calostro posee casi el doble de los sólidos totales presentes en la leche, el contenido de proteína, grasa, vitaminas y minerales es mayor, mientras que la concentración de lactosa es menor. Es importante mencionar que la concentración de proteínas específicamente inmunoglobulinas y péptidos se reduce considerablemente después del inicio de la lactancia y en los ordeños subsecuentes.

Elizondo J. A. (2007, pág. 53) menciona que en el calostro bovino se encuentran principalmente tres tipos de inmunoglobulinas como son: IgG en un 85%, IgM 5% e IgA 7%, siendo la más importante las de la clase IgG y en especial la IgG1. Las otras inmunoglobulinas tienen significativos roles fisiológicos, la preponderante cantidad de IgG total o IgG1 en el suero sanguíneo es un indicativo adecuado de la transferencia de inmunidad pasiva para terneros.

El calostro bovino se lo utiliza como producto hiperinmune ya que posee un satisfactorio campo de desarrollo de alternativas para el alivio de infecciones humanas relacionadas a estados inmunodeficientes, SIDA, criptosporidiosis, rotavirus intestinal en los recién nacidos o controlar brotes epidémicos de enfermedades como la shigelosis, la colibacilosis o el cólera (Valdivia, Martínez, & Ortiz, 2014, pág. 19).

Al concentrar la IgG que es el principal componente inmunológico del calostro bovino y que está considerada como una de las más importantes inmunoglobulinas en humanos debido a que es activa contra una gran diversidad de microorganismos, muchos de los cuales son ahora resistentes a antibióticos (Valdivia, Martínez, & Ortiz, 2014, pág. 23) teóricamente sólo bastaría inocular por vía parenteral o intramamaria algún antígeno para producir el efecto protector deseado.

El calostro no presenta importancia comercial y su gran valor radica en el potencial inmunológico en nutrición, protección e hidratación que brinda al bovino recién nacido y al humano; por tales razones, es importante investigar las inmunoglobulinas presentes en el calostro bovino y concentrarlas mediante tecnología de membranas que es un proceso de separación que permite en algunos casos aislar y en otros; concentrar varios productos con altos grados de eficiencia, sin el uso de productos químicos y bajos usos de energía para una aplicación con fines funcionales, por lo que la investigación de calostro bovino apoyará a un amplio campo a favor de la salud animal y humana.

Por otra parte la tecnología de membranas usa membranas que actúan como paredes de separación selectiva, atrapando ciertas sustancias y dejando pasar otras, este proceso confiere la selectividad y productividad (Arqués, Fernández, & Rodríguez, 2003, pág. 29), por tanto es una tecnología que ayuda en el proceso de concentración

de las inmunoglobulinas del calostro bovino. El desarrollo de esta tecnología permite producir inmunoglobulinas provenientes del calostro bovino que contengan suficientes concentraciones de anticuerpos contra un amplio rango de bacterias, virus, protozoarios así como contra varias toxinas bacterianas, por tanto el uso de los concentrados de inmunoglobulinas presentan un amplio rango de aplicación a nivel funcional y farmacéutico, los cuales pueden ser utilizados para prevenir diferentes afecciones profilácticas.

Los diferentes concentrados por tecnología de membranas deben seguir protocolos de caracterización físico-química y microbiológica inicial que permitan evidenciar los diferentes componentes de la materia a microfiltrar, estas características se ven influenciadas en gran medida por la presencia de enfermedades de la vaca como la mastitis, efecto de número de ordeños postparto, infecciones sistémicas de la madre, acidosis metabólica y la deficiencia de proteínas y minerales en la ración alimenticia (Elizondo J. A., 2007, pág. 54), por tanto la caracterización inicial permitirá obtener rendimientos del proceso del uso de tecnología de membranas.

Objetivos:

Objetivo general:

Determinar estadísticamente el mejor proceso de tecnología de membranas para la concentración de inmunoglobulinas de calostro bovino.

Objetivos específicos:

- Seleccionar la raza de ganado mayoritaria en el cantón Cayambe
- Caracterizar físico-química y microbiológicamente el calostro bovino.
- Determinar la cinética de decremento de inmunoglobulinas de calostro bovino.
- Utilizar tecnología de membranas para concentrar inmunoglobulinas del calostro bovino.

Hipótesis:

Hipótesis alternativa:

El concentrado de inmunoglobulinas de calostro bovino es dependiente del proceso aplicado para la concentración por tecnología de membranas.

Hipótesis nula:

El concentrado de inmunoglobulinas de calostro bovino es independiente del proceso aplicado para la concentración por tecnología de membranas.

Variables

Variables Independientes:

- Características físico-químicas y microbiológicas
- Concentración de inmunoglobulinas en el suero de calostro bovino.
- Selectividad de la membrana
- Productividad de la membrana
- Especímenes bovinos bajo estudio

Variable Dependiente:

Porcentaje de concentración de inmunoglobulina de calostro bovino.

CAPITULO 1

MARCO TEÓRICO

1.1 Calostro bovino

Según la norma INEN 003 (1984, pág.1) define al calostro como la secreción mamaria que da la vaca desde los siete días antes, hasta los siete días después de su parto, cambiando la composición drásticamente a medida que transcurre el tiempo postparto y con ello se altera el patrón galactopoiético en el ganado bovino, como se muestra en la tabla 1.

Está compuesto principalmente por inmunoglobulinas, que proporcionan a los recién nacidos su protección inmunológica durante las primeras semanas de vida además contiene altas cantidades de linfocitos, neutrófilos, macrófagos, factores de crecimiento y hormonas como la insulina y el cortisol los cuales constituyen un papel importante en la estimulación del desarrollo del tracto gastrointestinal y otros sistemas en las crías recién nacidas (Elizondo J. A., 2007, pág. 53).

El calostro es la acumulación de secreciones en la glándula mamaria en las últimas semanas de la gestación, bajo la influencia de los estrógenos y progesterona, por lo tanto es la primera leche disponible en la glándula mamaria después del nacimiento (COMUNIV, 2001, pág. 1).

Cornelli (2010 , pág. 6) menciona que el calostro no puede ser considerado como leche, a pesar de que es originado por las glándulas mamarias ya que el calostro se secreta por un determinado periodo de tiempo. El calostro es un complejo de sustancias que se puede definir como: complejo de moduladores fisiológicos.

Tabla 1.

Características y composición química del calostro y leche de ganado Holstein.

Variable	Calostro (ordeño post - parto)			Leche
	1	2	3	
Gravedad específica	1.056	1.045	1.035	1.032
Sólidos totales, %	23.9	17.9	14.1	12.5
Grasa,%	6.7	5.4	3.9	3.6
Sólidos no grasos, %	16.7	12.2	9.8	8.6
Proteína total, %	14.0	8.4	5.1	3.2
Caseína, %	4.8	4.3	3.8	2.5
Albúmina, %	0.9	1.1	0.9	0.5
Inmunoglobulinas, %	6.0	4.2	2.4	0.09
Inmunoglobulina G, g/dl	3.2	2.5	1.5	0.06
Nitrógeno no protéico, %	8.0	7.0	8.3	4.9
Lactosa, %	2.7	3.9	4.4	4.9
Calcio,%	0.26	0.15	0.15	0.13
Potasio,%	0.14	0.13	0.14	0.15
Sodio,%	0.14	0.13	0.14	0.15
Vitamina A, µg/dl	295	190	113	34
Vitamina E, µg/g de grasa	84	76	56	15
Riboflavina, µg/ml	4.83	2.71	1.85	1.47
Colina, mg/ml	0.70	0.34	0.23	0.13

*Adaptado de Davis y Drackley (1998).

Nota: (Elizondo J. , 2007).

El calostro contiene agua, energía, proteína, vitaminas y minerales en altos porcentajes así como también posee elementos protectores de la mucosa del intestino (aglutininas, interferón, interleukinas), factores de crecimiento y anticuerpos (inmunoglobulinas) que permiten el desarrollo del sistema inmunitario, para proveer

protección contra bacterias entéricas y un apropiado crecimiento del animal (Flores & Romero, 2013, pág. 14).

Flores y Romero (2013, pág. 1) mencionan que el calostro bovino contiene inmunoglobulinas importantes para los recién nacidos, que ayudan a adaptarse a las condiciones externas de su nuevo ambiente. El calostro presenta color amarillo a rosa, consistencia espesa, y contiene dos veces más sólidos y energía, seis veces más proteína, sesenta veces más inmunoglobulinas, tres veces más minerales y cien veces más vitamina A que la leche normal.

Es considerado como un alimento con altos niveles de inmunoglobulinas, lo cual es ideal para aumentar el sistema inmunológico (protección) en los recién nacidos, ya que debido al tipo de placentación que desarrolla durante el periodo de gestación, nacen en condición que los predispone a padecer diferentes enfermedades como animales agamaglobulinemicos, principalmente en la etapa crítica en la vida de cada recién nacido (Flores & Romero, 2013, pág. 1).

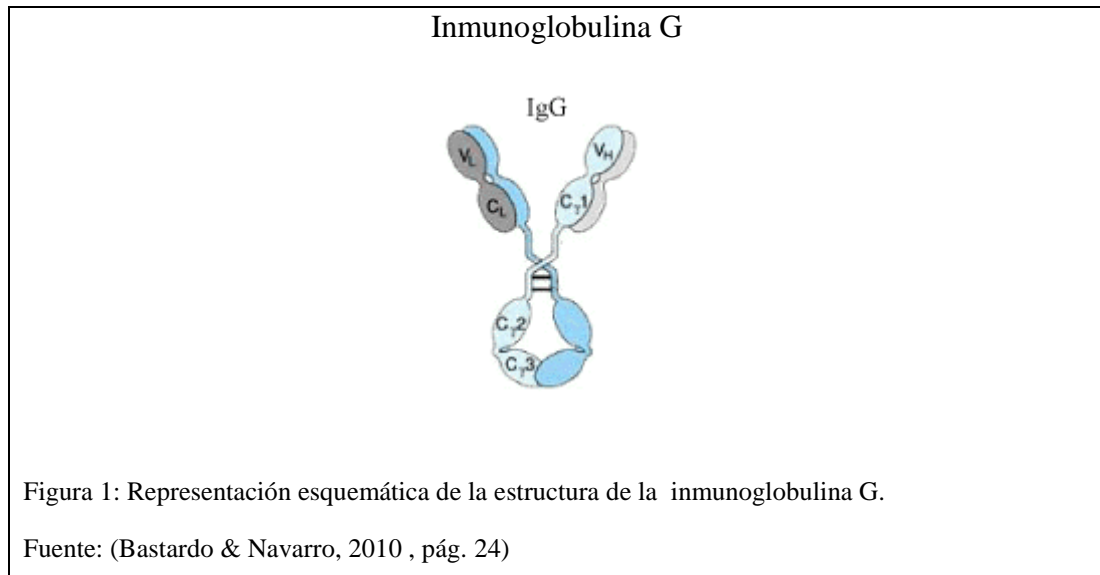
En diferentes estudios el calostro bovino ha sido aprobado para el consumo del ser humano, debido a que la estructura molecular de los factores de crecimiento e inmunológicos es muy similar aquella encontrada en los seres humanos, además que posee mayores niveles de inmunoglobulina G una proteína que es activa contra una gran diversidad de microorganismos y factores de crecimiento entre otros (Cornelli, 2010 , pág. 4).

1.2 Inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas son glicoproteínas que están formadas por cadenas polipeptídicas agrupadas y dependiendo del tipo, poseerá una o varias unidades estructurales básicas (Bastardo & Navarro, 2010 , pág. 24). Las Inmunoglobulinas están compuestas por cuatro cadenas polipeptídicas unidas entre sí por puentes disulfuro y otras uniones de tipo no covalente (Bastardo & Navarro, 2010 , pág. 24).

Los polipéptidos de bajo peso molecular se los denomina cadenas ligeras o cadenas L (Light) y las de alto peso molecular, cadenas pesadas o cadenas H (Heavy); dos

cadenas ligeras y dos cadenas pesadas se agrupan de tal manera que existe una proximidad espacial entre los cuatro extremos amínicos de las cadenas ligeras y pesadas por una parte, y entre los dos extremos carboxílicos de las cadenas pesadas por otra (Bastardo & Navarro, 2010 , pág. 24).



Las inmunoglobulinas son las moléculas encargadas de proteger al organismo contra las infecciones y son parte importante del sistema inmune. Estas actúan en la identificación y destrucción de los patógenos que puedan infectar a los animales y seres humanos (Mella, 2014, pág. 1).

1.2.1 Inmunoglobulinas Calostro Bovino

El calostro contiene grandes cantidades de inmunoglobulinas que son transferidas desde el torrente sanguíneo de la madre (Elizondo J. , 2007, pág. 272). Tiene tres tipos de inmunoglobulinas: IgG, y dos isotipos IgG1 y IgG2, IgA, e IgM. Contiene aproximadamente 70 - 80% de IgG, 10 - 15% de IgM y 10 - 15% de IgA (Elizondo J. , 2007, pág. 273). El 60% de las IgA se sintetizan en la glándula mamaria, las IgG proceden del plasma de la madre, la IgM procede de la glándula mamaria y del plasma. La IgG1 e IgG2 se transportan desde la sangre hasta el calostro por medio transporte altamente específico. El proceso comienza alrededor de las 8 semanas antes del parto y se acentúa 2 a 3 semanas antes del parto. Este proceso mueve grandes cantidades de IgG (particularmente IgG1) de la sangre a la glándula mamaria. Después del parto la

vaca necesita varias semanas para resintetizar la IgG perdida. Las Ig M y A son sintetizadas por los plasmocitos en la glándula mamaria (Flores & Romero, 2013, pág. 6).

El 80 al 85% de todas las inmunoglobulinas del calostro bovino la constituye la inmunoglobulina G, su principal función es identificar y destruir agentes patógenos que causan enfermedades. Las Ig G1 y G2 trabajan juntas para suministrar al recién nacido la inmunidad pasiva que es la inmunidad proporcionada por la vaca y no sintetizados por el recién nacido hasta que se desarrolla la inmunidad activa propia del animal (Lozic, 2013, pág. 8). Esta inmunoglobulina es la única que pueden pasar a través de la placenta y proporciona la inmunidad pasiva a través de la transferencia de inmunoglobulinas que encuentran en el calostro que son transferidos al aparato digestivo del recién nacido, protegiéndole contra infecciones bacterianas, hasta que el recién nacido puede sintetizar sus propios anticuerpos (Flores & Romero, 2013, pág. 5).

El calostro bovino posee IgM que neutraliza los virus y evita su anexión a las mucosas corporales y la IgA que neutralizan las toxinas de origen bacteriano (Araúz, Fuentes, Batista, Ramón, & Caballero, 2011, pág. 4).

Bastardo & Navarro (2010 , pág. 38) menciona que la inmunoglobulina M se caracteriza por poseer capacidad neutralizante, precipitante, aglutinante, fijar, activar la respuesta inmune, sin embargo no atraviesa activamente las membranas biológicas.

1.2.1. Inmunidad Pasiva en bovinos

El bovino nace sin inmunoglobulinas maternas y no es funcional el sistema inmunológico del recién nacido en los primeros meses de vida de forma suficiente para dar la protección contra las enfermedades virales, bacterianas y parasitarias (Araúz, Fuentes, Batista, Ramón, & Caballero, 2011, pág. 3). El calostro es esencial en los rumiantes para transferir las inmunoglobulinas y dar la protección de la cría en sus primeros meses de vida; especialmente para transferir la IgG que es la inmunoglobulina prevalente. El consumo adecuado del calostro permite que los

factores proteicos anti proteolíticos contra la tripsina y quimiotripsina protejan los anticuerpos en el tracto intestinal; evitando la alteración de las proteínas calostrales (Araúz, Fuentes, Batista, Ramón, & Caballero, 2011, pág. 4).

La transferencia pasiva es la transferencia de inmunoglobulinas desde la madre al recién nacido, es de vital importancia para la protección de los recién nacidos de enfermedades infecciosas, la fallida transferencia pasiva es una condición que predispone al recién nacido al desarrollo de enfermedades (Astudillo, 2011, pág. 6).

De acuerdo a Cano (2014, pág. 1) los becerros al nacer son agamaglobulinemicos, nacen con niveles de gammaglobulinas muy bajas, porque la placenta de la madre no permite el paso de inmunoglobulinas al ternero, y esto se debe por el tipo de placentación cotiledonaria de los bovinos ya que el útero está en contacto con los cotiledones de la placenta fetal.

Los terneros de producción lechero necesitan del traspaso de las inmunoglobulinas de la madre presentes en el calostro (transferencia de inmunidad pasiva), que es necesario para la protección contra enfermedades infecciosas y la supervivencia del ternero , debido a que el sistema inmune del recién nacido es inmaduro e incapaz de producir suficientes inmunoglobulinas pues la placenta impide su transferencia al feto previo al nacimiento (Sánchez, Elizondo, & Arroyo, 2012, pág. 322).

De acuerdo a Arroyo & Elizondo (2014, pág. 280) los terneros de producción lechera nacen habitualmente sin inmunoglobulinas y dependen de la ingesta de calostro para obtener inmunoglobulinas que ayudan a protegerse contra enfermedades infecciosas. El tracto gastrointestinal del recién nacido, está diseñado para permitir, durante las primeras 24 horas de vida, la absorción de moléculas grandes, incluyendo las inmunoglobulinas.

Las inmunoglobulinas del calostro se absorben en el intestino delgado por micropinocitosis en las células cilíndricas del epitelio, el transporte y absorción de las inmunoglobulinas calostrales a través del epitelio intestinal se lleva a cabo por medio de vacuolas que llegan a los vasos linfáticos, de ahí pasan al conducto torácico y posteriormente a la sangre (Cano, 2014, pág. 1).

Esta transferencia de inmunidad pasiva es muy rápido y se logran detectar inmunoglobulinas en el conducto linfático torácico en 80 – 120 minutos después de ingerir el calostro, en 24 horas las células epiteliales de tipo fetal han sido reemplazadas en su totalidad por células incapaces de absorber inmunoglobulinas (Cano, 2014, pág. 1).

1.3. Métodos de cuantificación

1.3.1. MilkoScan FT 6200-Foss

Método analítico para conocer la composición de leche y se lo puede aplicar en calostro bovino, es un analizador automático que presenta alta capacidad de análisis de muestras, alrededor de 60 muestras por hora. MilkoScan mide parámetros de grasa, proteína total, caseína, lactosa, grasas, sólidos no grasos, sólidos totales, urea, ácidos grasos libres, punto de congelación - depresión, ácido cítrico, pH, mono y poli ácidos grasos no saturados, ácidos grasos totales insaturados, ácidos grasos saturados y temperatura de la muestra (FOSS, 2013, pag. 3).

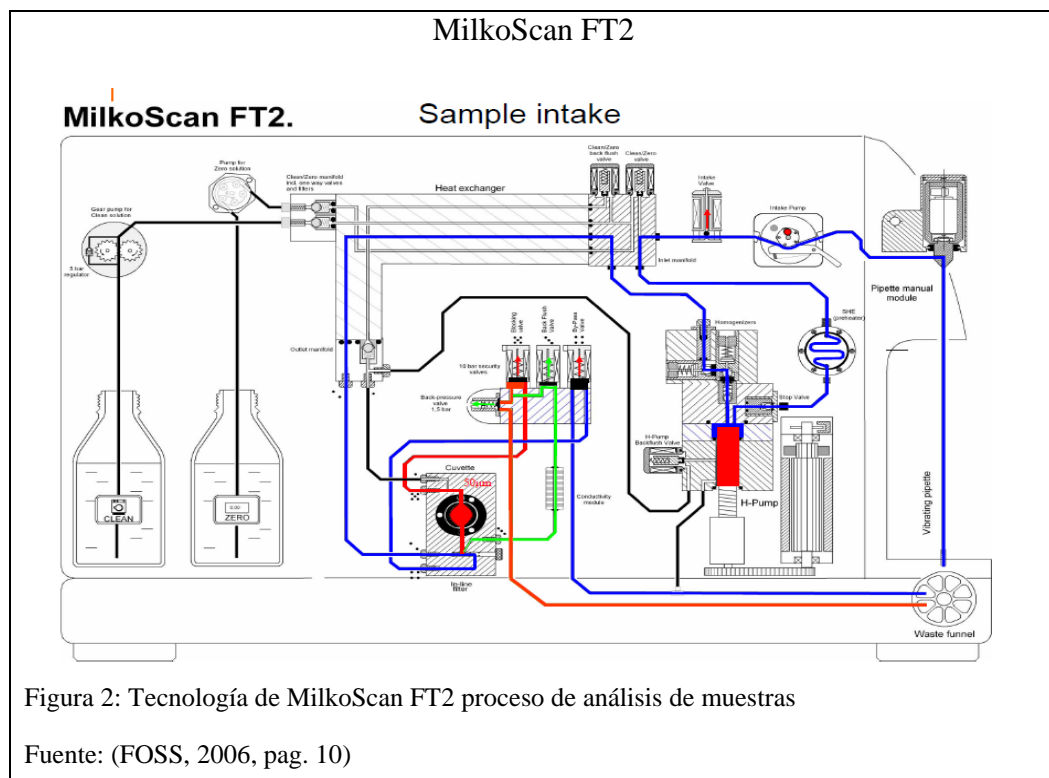


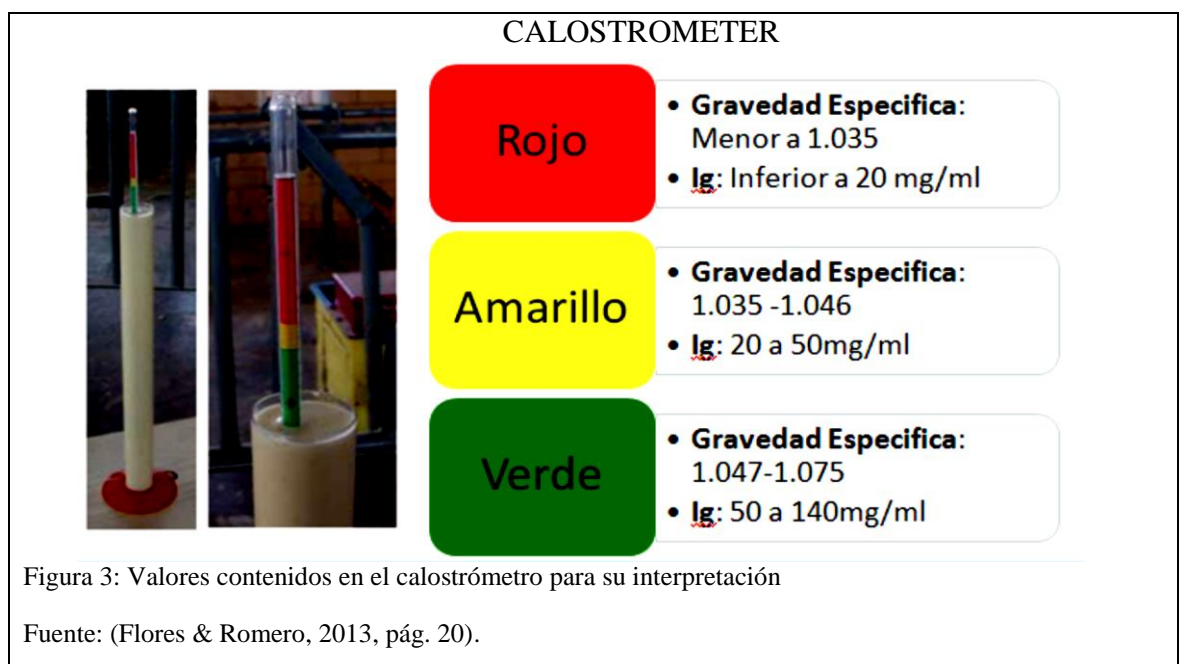
Figura 2: Tecnología de MilkoScan FT2 proceso de análisis de muestras

Fuente: (FOSS, 2006, pag. 10)

1.3.2. Calostrometro

La calidad del calostro depende principalmente de la cantidad de inmunoglobulinas, específicamente inmunoglobulina G el cual es el factor más importante para determinar la calidad del calostro.

Para determinar la concentración de inmunoglobulinas se utiliza la técnica del calostrometro que es un equipo que trabaja como un lactodensímetro común, estima la densidad del calostro por su peso específico, así se cuantifica indirectamente el nivel de inmunoglobulinas. El aparato posee 3 áreas definidas con colores, cada una corresponde al nivel estimado de inmunoglobulinas presente en el calostro. El color rojo simboliza calostro de mala calidad, gravedad específica menor a 1,035 y concentración de inmunoglobulinas inferior a los 20 mg/mL. El color amarillo simboliza calostro de calidad aceptable, gravedad específica de 1,035 a 1,046 y concentración de inmunoglobulinas de 20 a 50mg/mL. El color verde simboliza un calostro de excelente calidad, gravedad específica de 1,047 a 1,075 y concentración de inmunoglobulinas entre 50 a 140mg/mL de calostro. La técnica del calostrometro requiere de la colecta de calostro en una probeta de 250 mL y la consideración de la temperatura para evitar medidas erróneas (Flores & Romero, 2013, pág. 19).



1.3.3. Conteo de células somáticas

Hernández (2008, pág. 2) define a las células somáticas como células blancas propias del organismo que sirven como defensa a la glándula mamaria de la vaca contra organismos patógenos. El conteo de células somáticas (CCS) es el número de células por mililitro de leche, es por consiguiente un indicador útil para la concentración de leucocitos en leche. El indicador de la salud de la glándula mamaria es representado por CCS.

De acuerdo a Kutscher (1998, pág. 3) las secreciones mamarias bovinas contienen varios tipos de células blancas las cuales son polimorfonucleares, linfocitos y macrófagos. Las células epiteliales constituyen menos de un 2% del número total de células somáticas de la leche de la vaca, pero en las cuatro primeras semanas de lactancia pueden superar el 15%.

Durante la calostrogénesis las células somáticas están aproximadamente de 25% de polimorfonucleares, 50% de macrófagos y 25% de linfocitos, después de una semana post-parto la proporción de macrófagos disminuye en favor de los polimorfonucleares, con lo cual ambos tipos de células constituyen cerca de un 37% hasta el día siete post-parto. El número de células en el calostro de una glándula mamaria no infectada, decae progresivamente a partir de la segunda semana previo al parto, con recuentos celulares entre $1,0 \times 10^6$ y $2,7 \times 10^6$ pocos días antes del parto (Kutscher, 1998, pág. 6)

Según FOSS Analytical A/S, 2004 (pág. 2) para asegurar la calidad de la leche cruda se debe realizar el recuento de células somáticas. La información sobre el recuento de células somáticas rápida y precisa ayuda a los productores lecheros la prevención la mastitis subclínica del ganado, una enfermedad que afecta a la calidad y cantidad de leche que puede producir una vaca.

El equipo Fossomatic™ FC ejecuta un análisis exacto de la leche mediante conteo de células somáticas. Utiliza tecnología de citometría de flujo, técnica utilizada para el conteo y caracterización de células y partículas. El equipo cuenta células somáticas basándose en el reconocimiento de ADN de las células. Una mezcla de leche y solución de tinción pasa través de una celda de flujo, en la cual las células somáticas

se exponen a la luz de una longitud de onda específica. Las células emiten pulsaciones de luz fluorescentes con una longitud de onda diferente las cuales son cuantificadas. El diseño de la celda de flujo asegura que solamente una célula somática se detecta en un momento determinado (FOSS, 2013, pag. 4).

1.3.4. Análisis bacteriológico del calostro bovino

El calostro puede representar una de las potenciales fuentes de agentes infecciosos para el recién nacido, se ha recomendado que el calostro fresco para alimentar al recién nacido debe contener menos de 100 000 UFC / mL de bacterias totales y menos de 10000 UFC / mL recuento de coliformes totales. Las bacterias en el calostro pueden interferir con la absorción pasiva de anticuerpos a través del intestino y en la circulación, reduciendo la transferencia de la inmunidad pasiva en el recién nacido por esa razón la contaminación microbiana del calostro es una preocupación de los productores lecheros (Flores & Romero, 2013, pág. 20).

BactoScan TM FC mide la calidad higiénica de la leche por el análisis de bacterias en la leche cruda (FOSS, 2012, pág. 2) se basa en la tecnología de citometría de flujo que permite análisis precisos e instantáneos de bacterias de la leche. La citometría de flujo se basa en el principio en la cual una suspensión de las células se tiñe y se fuerza a través de capilares, que es iluminada delante del objetivo del microscopio (FOSS, 2012, pág. 4). Cada célula que pasa es registrada por una foto electrónica adjunta al microscopio, los grupos de bacterias se separan en solo bacterias, que posteriormente se tiñen con las manchas de ADN como se muestra en la Figura 4.

BactoScan™ FC

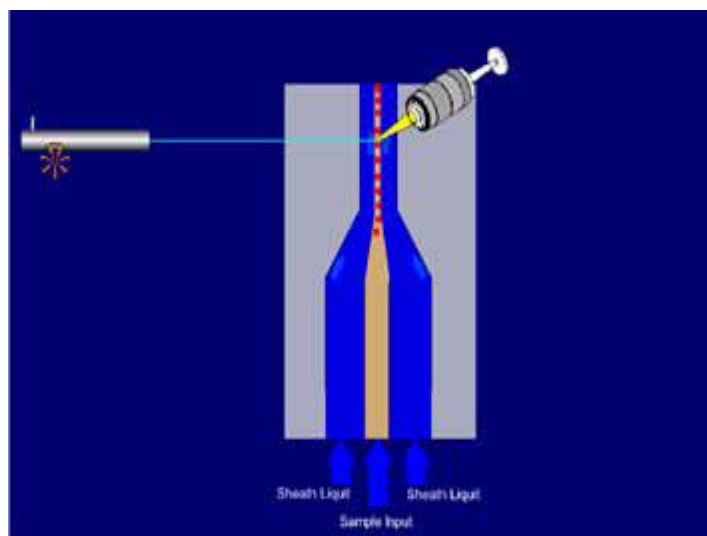


Figura 4: Tecnología de BactoScan™ FC. Muestra en la celda de flujo

Fuente: (FOSS, 2012, pág. 2).

1.3.5. Métodos Cromatográficos

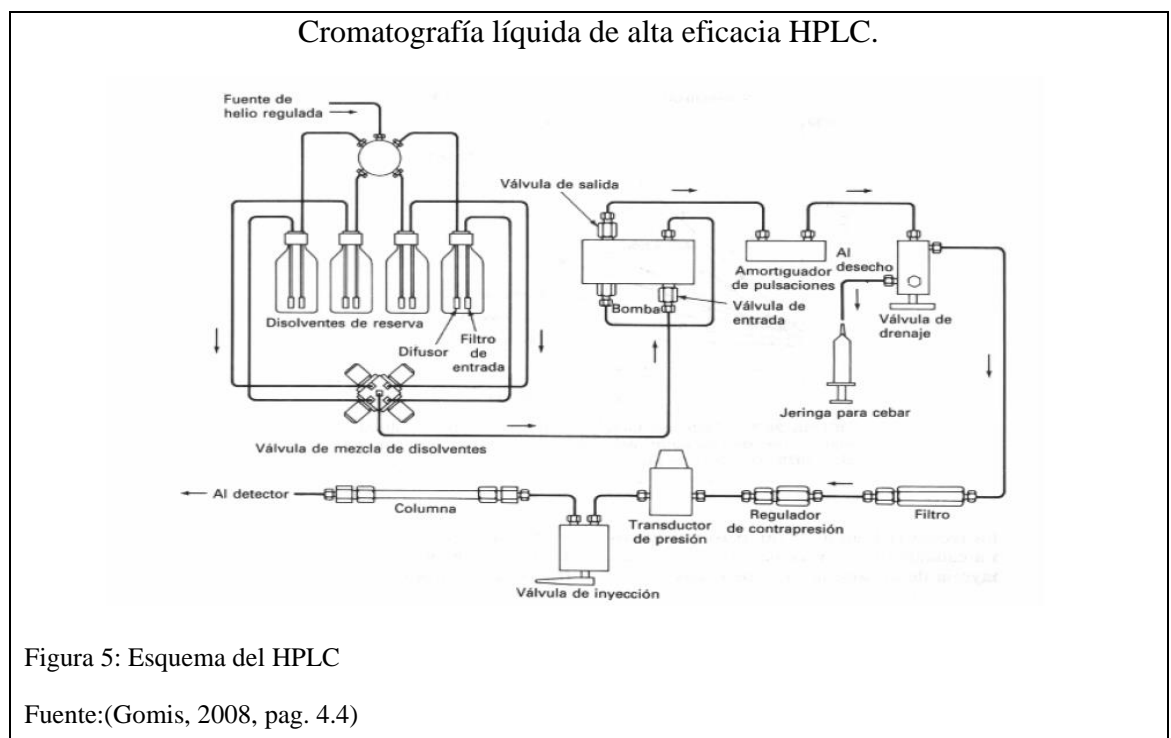
Todos los procesos cromatográficos se basan en la utilización de una columna que contiene un material que puede absorber de manera selectiva moléculas basándose en alguna diferencia en su estructura físico química.. La velocidad de paso de un componente es inversamente proporcional a la intensidad de la interacción con la fase móvil (Ibáñez, 2007, pág. 8). El material usado en la columna así como el método de elución utilizado depende de la base en la que se fundamente la separación (Ibáñez, 2007, pág. 8).

1.3.5.1. Cromatografía líquida de alta eficacia HPLC.

Según Universidad Nacional Autónoma de México, 2007, pág. 1) en la cromatografía líquida la fase móvil es un disolvente o mezcla de disolventes y la fase estacionaria un sólido que interactúa con las sustancias que se desea separar (cromatografía líquido-sólido), o bien un líquido inmiscible con la fase móvil, depositado en la superficie de un sólido (cromatografía líquido - líquido).

Se puede realizar diferentes arreglos experimentales para este tipo de cromatografía en columna, en capa delgada o en papel. En la cromatografía de columna, la fase estacionaria se encuentra relleno un tubo; en la cromatografía de capa delgada se extiende sobre una lámina de vidrio o aluminio formando un lecho de espesor uniforme; en la cromatografía en papel la fase estacionaria es la solución acuosa contenida en el interior de las celdas formadas por las fibras de la celulosa, y es por tanto una forma de cromatografía líquido - líquido (Universidad Nacional Autónoma de México, 2007, pág. 1).

En la cromatografía líquida, la fase móvil es un líquido que fluye a través de una columna que contiene a la fase fija. La separación cromatográfica en HPLC es el resultado de las interacciones específicas entre las moléculas de la muestra en ambas fases, móvil y estacionaria (Ozores & Aguado, 2015, pág. 1). La cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC, de high-performance liquid chromatography) no está limitada por la volatilidad o la estabilidad térmica de la muestra, tiene la capacidad de separar macromoléculas y especies iónicas, productos naturales lábiles, materiales poliméricos y una gran variedad de otros grupos polifuncionales de alto peso molecular como se muestra en la figura 5.



1.4. Tecnología de membranas

1.4.1. Generalidades

La Comparativa de ampliación E.D.A.R. (2014, pág. 5) define a una membrana como una lámina que permite el paso selectivo de sustancias en su interior. Las fuerzas impulsoras en el flujo de las sustancias está determinada por la presión, potencial eléctrico y concentración además que la selectividad permitirá acumular o deshacer la carga del flujo de las sustancias. Los procesos membranarios lo componen una serie de técnicas de separación que se fundamenta en emplear un gradiente, de presión o electrostático, para exigir el paso del componente de una disolución a través de una membrana porosa semipermeable, para obtener una separación sobre la base del tamaño, e incluso de la carga molecular (Chacón A. C., 2006, pág. 243).

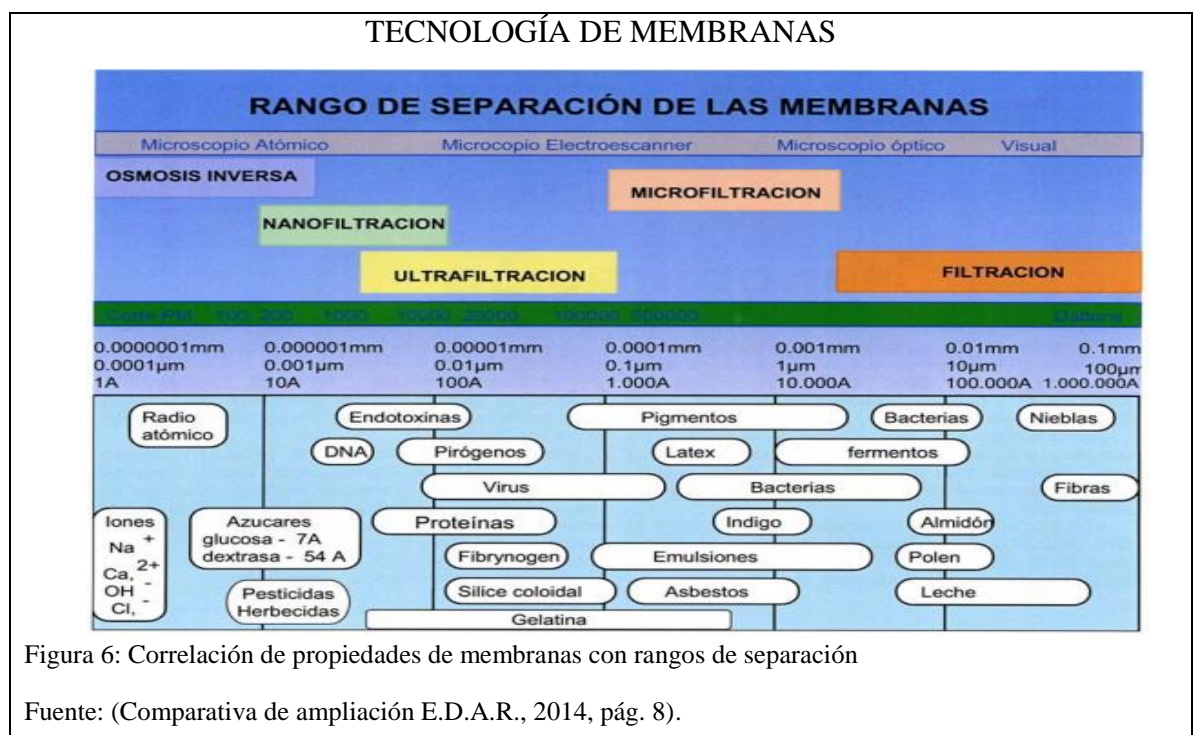
La tecnología de membrana es genéricamente una serie de procesos de separación diferentes y muy característicos. Estos procesos son similares porque en ellos se utiliza una membrana. El proceso de separación por membranas se basa en la utilización de membranas semi-permeables (Camacho, 2009, pág. 11).

El funcionamiento de estos procesos se fundamenta en la separación por una membrana que actúa como un filtro que deja pasar idealmente el agua, dependiendo del tamaño del poro de la membrana, mientras retiene sólidos suspendidos y otras sustancias. Existen varios métodos que facilitan el paso de las sustancias a través de una membrana, en la cual se consideran la aplicación de alta presión, la introducción de un potencial eléctrico y el mantenimiento de un gradiente de concentración en los lados de la membrana (Camacho, 2009, pág. 11).

Riquelme (2010, pág. 10) menciona que las técnicas de separación con membranas permiten concentrar y separar diversos productos y subproductos de soluciones concentradas a temperatura ambiente compitiendo económicamente con otras técnicas convencionales. En la industria láctea en la actualidad se están utilizando varios procesos con membranas ya que permiten obtener efluentes con menores niveles de cargas contaminantes, además de la recuperación del agua del suero de la leche para

su reutilización en el consumo directo y a su vez, generar beneficios económicos en la recuperación de proteínas y otros componentes (Riquelme, 2010, pág. 10)

La filtración por membrana como se muestra en la Figura 6, es una técnica que se utiliza para purificar o concentrar disoluciones y suspensiones o bien para fraccionar una mezcla de varios solutos y se puede utilizar como alternativa a la floculación, las técnicas de purificación de sedimentos, la adsorción (filtros de arena y filtros de carbón activado, intercambiadores iónicos), extracción o destilación (Sanchez, 2007).



1.4.2. Tipos de separación con membranas

Atendiendo a la naturaleza de las fuerzas impulsoras podemos dividir los procesos de membranas según la tabla 2:

Tabla 2:

Clasificación de procesos con membranas

Fuerza impulsora	Factor de separación	Operación
Presión	Tamaño	Filtración
Presión y concentración	Difusividad o tamaño	Ósmosis inversa
Campo eléctrico	Carga	Electrodialisis
Concentración	Carga o tamaño	Dialisis
Otras	Difusividad y solubilidad	Pervaporación y transporte activo

Nota: (Comparativa de ampliación E.D.A.R., 2014, pág. 6)

1.4.3. Microfiltración

Brito, Picho, Vera, y Vaillant (2010, pág. 50) mencionan que la microfiltración tangencial utiliza membranas en el proceso físico de separación el cual consiste en remover los componentes de una mezcla líquida en función del tamaño de partícula, la microfiltración se fundamenta en un mecanismo de filtración, en el que la mezcla líquida fluye bajo presión sobre la superficie de la membrana aplicando presión ya que poseen un tamaño molecular menor al de las porosidades de la membrana, ciertos solutos y el solvente pasan a través de la membrana y otros solutos que poseen tamaño superior a $0,10 \mu\text{m}$, que son levaduras, bacterias, coloides y partículas finas que son retenidos después del proceso consiguiendo un permeado estéril y libre de sólidos en suspensión.

Según Camacho (2009, pág. 1) la microfiltración se la utiliza como un pre- tratamiento para la ultrafiltración del suero de leche ya que clarifica el lactosuero y retiene la mayor cantidad de grasas, microorganismos y caseína.

La microfiltración se utiliza para separar partículas de $0,05$ y $10 \mu\text{m}$ de tamaño, las presiones que se aplica fluctúan entre $0,5$ y 3 bar. Las partículas retenidas están en función a sus dimensiones, forma y tamaño. Principalmente se usa para retener sólidos en suspensión, también se lo emplea como etapa de concentración, limpieza o como tratamiento previo a la ósmosis inversa y a la nano filtración (Ibáñez, 2007, pág. 14).

CAPITULO 2

MARCO METODOLÓGICO

La fase experimental se desarrolló en los laboratorios de la Universidad Politécnica Salesiana campus Girón laboratorios de la Carrera en Ingeniería en Biotecnología, Laboratorio de la leche-Cayambe (CILEC) y en la planta piloto de la Universidad Tecnológica Equinoccial en la Carrera de Ingeniería de Alimentos.

2.1. Selección de muestras

Se realizó el levantamiento de información en centros de acopio y clientes vinculados con el Laboratorio de Calidad de la Leche Cayambe. Para la selección de razas se realizó una investigación bibliográfica de las razas mayoritarias en Cayambe y se seleccionó las más predominantes en tres haciendas diferentes del cantón Cayambe, considerando cuatro animales que tengan la misma edad, número de partos y alimentación y se extrajo un litro de calostro durante 6 ordeños para determinar la cinética de decremento.

El proceso de recuperación de muestras se realizó en frascos previamente esterilizados como señala el anexo 1, colocando en el frasco de tapa blanca 40 mL de calostro y una pastilla de Bronopol comercial, además se colocó 40 mL de calostro en el frasco con tapa roja con dos gotas de azidiol y luego se agitó.

Cada recipiente se etiquetó fijando un código a cada una de las muestras obtenidas, los códigos fueron asignados en combinación de dígitos y texto, los cuales indican la naturaleza de la muestra (CB) calostro bovino, siglas del nombre de las vacas o nombres de las haciendas, la parte numérica se asigna de acuerdo al número de ordeños, además el Laboratorio de Calidad de la Leche Cayambe asigna códigos numéricos de acuerdo a la secuencia de los análisis realizados.

Las muestras seleccionadas para el análisis fueron trasladadas al laboratorio; se conservó en la cadena de frío y las muestras control congeladas hasta su posterior análisis.

2.2. Análisis físico químico y microbiológico del calostro bovino

2.2.1. Composición físico química:

Los frascos de tapa blanca se colocaron a Baño María en un rango de temperatura de 37 a 42°C. La muestra se homogenizó y sometió al analizador MilkoScan FT 6200-Foss, que reportó los siguientes parámetros: grasa, proteína, lactosa, sólidos totales (ST) y sólidos no grasos (SNG).

2.2.2. Densidad

Se aplicó la metodología descrita en la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 11 (1984, pág. 2).

a) Preparación de la muestra

- Llevar la muestra a una temperatura aproximadamente igual a la del baño de agua.
- Mezclar mediante agitación suave hasta que se homogenice la muestra.

b) Procedimiento

- Verter la muestra hasta llenar la probeta tomar en cuenta en mantener la probeta inclinada para evitar la formación de espuma.
- Introducir la probeta en el baño de agua, en tal forma que el nivel de agua quede de 1 cm a 3 cm por debajo del borde de la probeta.
- Estabilizar la temperatura de la leche con una variación máxima de $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$
- Determinar su valor mediante el termómetro.
- Sumergir suavemente el lactodensímetro hasta que esté cerca de su posición de equilibrio e imprimirle un ligero movimiento de rotación para impedir que se adhiera a las paredes de la probeta.
- Durante la inmersión debe desbordarse la leche de tal manera que la zona de lectura del lactodensímetro quede por encima del plano superior de la probeta.
- Esperar que el lactodensímetro quede en completo reposo
- Leer la medida de la graduación correspondiente al menisco superior y registrar su valor.
- Se realizó tres repeticiones para cada muestra.

2.2.3. Acidez titulable

Se aplicó la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 0013 (1984, pág. 2)

a) Preparación de la muestra

- Llevar la muestra a una temperatura aproximada de 20°C.
- Mezclar mediante agitación suave hasta que esté homogénea la muestra.

b) Procedimiento

- Realizar por duplicado la determinación sobre la misma muestra preparada.
- Lavar y secar el matraz Erlenmeyer en la estufa a $103^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 30 min.
- Dejar enfriar en el desecador y pesar con aproximación al 0,1 mg.
- Agitar lentamente tres o cuatro veces la botella que contiene la muestra preparada
- Transferir al matraz Erlenmeyer
- Pesar 20 g de muestra.
- Diluir el contenido del matraz con un volumen dos veces mayor de agua destilada.
- Agregar 2 cm³ de solución indicadora de fenolftaleína.
- Agregar, lentamente y con agitación, la solución 0,1 N de hidróxido de sodio, justamente hasta conseguir un color rosado persistente.
- Continuar agregando la solución hasta que el color rosado persista durante 30 s.
- Leer en la bureta el volumen de solución empleada, con aproximación a 0,05 cm³.
- Se realizó tres repeticiones para cada muestra.

2.3. Análisis microbiológico de calostro bovino

2.3.1. Contaje de bacterias totales.

- Se tomó los frascos de tapa roja y colocó en Baño María a temperatura de 37 a 42°C.
- Se agitó la muestra y se analizó de forma automática por el equipo Bacto Scan 50-H Foss.

2.3.2. Contaje de células somáticas

- Se tomó los frascos de tapa blanca y colocó en Baño María a temperatura de 37 a 42°C.
- Se agitó la muestra y se analizó de forma automática por el equipo Fossomatic Minor- Foss.

2.3.3. Recuento de Coliformes totales y E. coli.

Se aplicó la metodología de 3M Petrifilm (2015, págs. 7- 8).

- Poner la placa Petrifilm en una superficie plana.
- Levantar el film superior.
- Colocar 1 ml de la muestra en el centro del film inferior.
- Bajar el film superior con cuidado evitando introducir burbujas de aire.
- Colocar el aplicador en el film superior sobre el inóculo con la cara lisa hacia abajo.
- Con cuidado, ejercer una presión sobre el aplicador para repartir el inóculo sobre el área circular antes de que se forme el gel. No girar ni deslizar el aplicador.
- Levantar el aplicador. Esperar al menos un minuto a que solidifique el gel.
- Incubar $24\text{h} \pm 2\text{h}$ a $32^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$

2.4. Cinética de decremento inmunoglobulinas de calostro bovino

2.4.1. Cromatografía líquida de alta resolución HPLC.

a) Preparación de la muestra

- Se agregó 5 ml de ácido clorhídrico 1M y se dejó en reposo durante 15 min para que la caseína se precipite en su punto isoeléctrico.
- Se centrifugó a 2 000 rpm durante 15 min a 4°C

- Se filtró mediante unidades de filtración millipore tipo Millex – HV membrana Durapore PVDF, 0.45 micras de poro de 13 mm de diámetro antes del análisis HPLC.
- b) Preparación de fases para HPLC
- La Fase A compuesta por 0.1 v/v Ácido Trifluoroacético en agua ultra pura, se pesó 2g de Ácido Trifluoroacético y se colocó en 1,98 litros de agua ultra pura HPLC.
 - La Fase B 0.1% v/v Ácido Trifluoroacético en acetonitrilo se pesó 2g de Ácido Trifluoroacético y se colocó en 1,98 litros en acetonitrilo tipo HPLC.
 - Se filtró las fases mediante bomba de vacío con membranas de 0,45 μ .
 - Se desgasificó las fases durante 30 minutos.
- c) Procedimiento HPLC.

Se colocó las muestras preparadas en el equipo de cromatografía líquida de alta resolución HPLC marca Varian modelo ProStar 320, una columna C18 marca Varian de 150 x 4,6 mm, con un diámetro de partícula de 5 μ m, y se corrió las muestras a un caudal de 1 mL min⁻¹ a una longitud de onda de detección 200 – 300 nm con un volumen de inyección 20 μ L y la temperatura de la columna a 30° C durante 40 minutos. Con gradiente de elución de 0-35 min 30% de fase B y 70 % fase A; 35 min 50% A y 50% B; a los 40 min 30% B y 70 % A.

2.5. Separación de componentes inmunológicos de calostro tecnología de membranas

2.5.1. Microfiltración

a) Procedimiento

- Se seleccionó las muestras que contienen el 50% de concentración de inmunoglobulinas.
- Se realizó un prefiltrado con una tela de lino de tamaño de poro de 0.1 mm de diámetro para retirar materias contaminantes de gran tamaño.

- Se colocó todas las muestras seleccionadas en un contenedor estéril de 15 litros.
- Se calentó a baño María hasta que la muestra llegue a 33 y 35 °C de temperatura.
- Se colocó en el microfiltrador con una membrana de tamaño de poro 0,36 µm con 1,5 y 2,5 bar de presión. con volumen de entrada de 15 L.
- Se aplicó el diseño experimental test estadístico ANOVA de dos vías para medir la variación en la concentración de Ig de calostro bovino trabajando en tres condiciones diferentes de microfiltración manteniendo constante el individuo de estudio, el flujo de microfiltración.

Tabla 3.

Variación de condiciones de Microfiltración.

Muestra entrada	Temperatura	Presión (kPa)	Flujo del permeado	Tiempo de flujo	Área de concentración de inmunoglobulinas calostro bovino HPLC
M1	T1	P1	F1	t 1	
M1	T1	P1	F2	t 2	
M1	T1	P1	F3	t 3	
M2	T2	P2	F1	t 1	
M2	T2	P2	F2	t 2	
M2	T2	P2	F3	t 3	

Nota: Elaborado por Páez (2014).

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Selección de la raza de ganado mayoritaria en el cantón Cayambe

La producción lechera es una fuente económica principal e indispensable para el avance de las familias campesinas ya que la producción agrícola no asegura los ingresos necesarios para proporcionar estabilidad económica.

Requelme y Bonifaz (2012, pág. 56) mencionan que los páramos bajos de Cayambe, en la provincia de Pichincha pertenecen a la Región Húmedo Sub Temperado RMHST que se extiende desde los 3 000 a 4 000 msnm, la temperatura es de 6 a 12°C y las precipitaciones oscilan entre 1 000 a 1 500 mm anuales, debido a estas condiciones la raza más adaptable y predominante de ganado es la Holstein.

Las razas especializadas en producción de leche como la Holstein producen una mayor cantidad de calostro, pero de menor calidad en cuanto que la Guernesey, Jersey, Ayrshire y pardo suizo son razas de menor producción de leche, con un contenido de sólidos totales más alto. Las razas destinadas a la producción de carne, producen menor cantidad de calostro de mejor calidad, compensando así, el bajo volumen de este (Campos, Carrillo, Loaiza, & Giraldo, 2007, pág. 4).

Las haciendas seleccionadas poseen diversidad en cuanto a razas híbridas y puras como se muestra en las tablas 4 y 5, además de estar ubicadas a diferentes alturas y poseer diferente alimentación; FEDNA (2015, pág. 6) indica que dietas bajas en proteína o energía durante el periodo seco provocan una menor producción de calostro y una menor concentración de Ig coincidiendo con Campos, Carrillo, Loaiza, y Giraldo (2007). Las haciendas presentaron diferentes manejos en la alimentación así: en la hacienda La Alegría y San Carlos aplicaban manejo pastoreo y alimentación balanceada, la hacienda San Mateo el sistema Ración Totalmente Mezclada (RTM) en la cual se subministra a los animales raciones en la mañana y en la tarde alimento balanceado y pastoreo. Hay que tomar en cuenta que la alimentación de los animales depende del estado preparto y postparto ya que los animales en preparto necesitan mayor suplementación de calcio, fósforo y sodio (UNAM , 2015, pág. 16).

Tabla 4.

Descripción de Puntos de muestreo.

Hacienda	Dirección	Vacas	Raza	Número de partos
Hacienda la Alegría	Comunidad la Convalencia parroquia Olmedo Cayambe 0° 02' 53,38" n altitud 2893 msnm.	1	Mestiza holstein	segundo
		2	F2 cruce hostein y jersey	segundo
		3	Holstein pura	primero
		4	Holstein pura	segundo
Hacienda San Carlos	Vía Guayllabamba Tabacundo 0°02'44.6"n 78°10'30.8"w altura 2830 msnm.	1	Hostein neoseolandes	tercero
		2	Hostein	tercero
		3	Hostein	segundo
		4	Hostein	primero
Hacienda San Mateo	Juan Montalvo puente la Josefina rio Guachala 0°02'26.4"n 78°08'46.4"w altura 2890 msnm	1	Hostein neoseolandes	tercero
		2	Hostein	tercero
		3	Hostein	segundo
		4	Hostein	segundo

Nota: Elaborado por Páez (2015).

La transferencia de inmunoglobulinas hacia el calostro se realiza durante las últimas 2 a 4 semanas de gestación, un parto prematuro o un periodo de secado excesivamente corto originan calostros bajos en Ig. Los partos inducidos tanto por glucocorticoides como por prostaglandinas reducen en general los niveles de Ig y específicamente los de Ig del tipo “G” (FEDNA, 2015, pág. 7), por tanto se seleccionaron vacas con diferentes partos como se muestra en la Tabla 5; además las diferentes razas producen leche cuya composición varía, aunque dentro de límites reducidos, conservando ciertos caracteres que son la cantidad de leche producida y su riqueza global las que varían de una raza a otra y de una manera inversamente proporcional (Alais y Godina, 1987, pág. 20).

Tabla 5:

Porcentaje de animales de raza y número de partos de las Haciendas seleccionadas.

Hacienda	Animales Razas		Partos			Total de ordeños
	% Puros	% Híbridos	% Primero	% Segundo	% Tercero	
HACIENDA LA ALEGRIA	50	50	25	75	0	6
HACIENDA SAN CARLOS	75	25	25	25	50	6
HACIENDA SAN MATEO	100	0	0	50	50	6

Nota: Elaborado por Páez (2015).

3.2. Análisis físico químico del calostro bovino

La leche cruda está compuesta por proteína, agua, lactosa, minerales, grasa, y vitaminas los cuales determinan la calidad, estos parámetros van a variar según la raza y el tipo de alimentación que se ofrezca al animal (WingChing & Mora, 2013, pág. 203).

La leche de los rumiantes se distingue por una elevada proporción de caseína en el contenido total de nitrógeno, además de una elevada proporción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular en la grasa, consecuencia de un especial proceso de síntesis. La disminución de los parámetros de calidad en composición se debe a que las leches de vaca y cabra son mejor equilibradas desde el punto de vista de distribución de los tres componentes principales: contienen alrededor del 4% de cada uno de ellos proteína, grasa y lactosa (Alais & Godina, 1987, pág. 20). Los resultados obtenidos muestran que al sexto ordeño todos los componentes se estabilizan alrededor del 4%

La actividad secretora de la glándula mamaria se encuentra bajo la dependencia de un complejo hormonal lactógeno elaborado por el lado anterior de la hipófisis. La glándula mamaria efectúa la síntesis de la mayor parte de componentes orgánicos de la leche: lactosa, materia grasa, caseínas, β -lactoglobulina, α -Lactoalbúmina, y ácido cítrico, los otros componentes proceden directamente del circuito sanguíneo principalmente las inmunoglobulinas (Alais & Godina, 1987, pág. 16).

Tras el parto la glándula mamaria segrega calostro cuya composición y aspecto es muy diferente a los de la leche perfecta ya que la actividad de síntesis de la mama no se encuentra plenamente desarrollada, el líquido secretado contiene una elevada proporción de inmunoglobulinas (Alais & Godina, 1987, pág. 28).

La grasa es considerada la variable más importante para la industrialización de la leche, se sintetiza en la mayoría en las células secretoras de la glándula mamaria y constituye cerca del 3% de la leche. Según WingChing y Mora (2013, pág. 203) la grasa oscila entre 2,5 a 5,5% (p/p), de acuerdo a la Norma INEN 9 (2012, pág. 2) la leche cruda debe cumplir en grasa el valor mínimo de 3,0 % (p/p), como se muestra en la Tabla 6, 7 y 8 los porcentajes de grasa en calostro para las muestras en estudio cumplen los

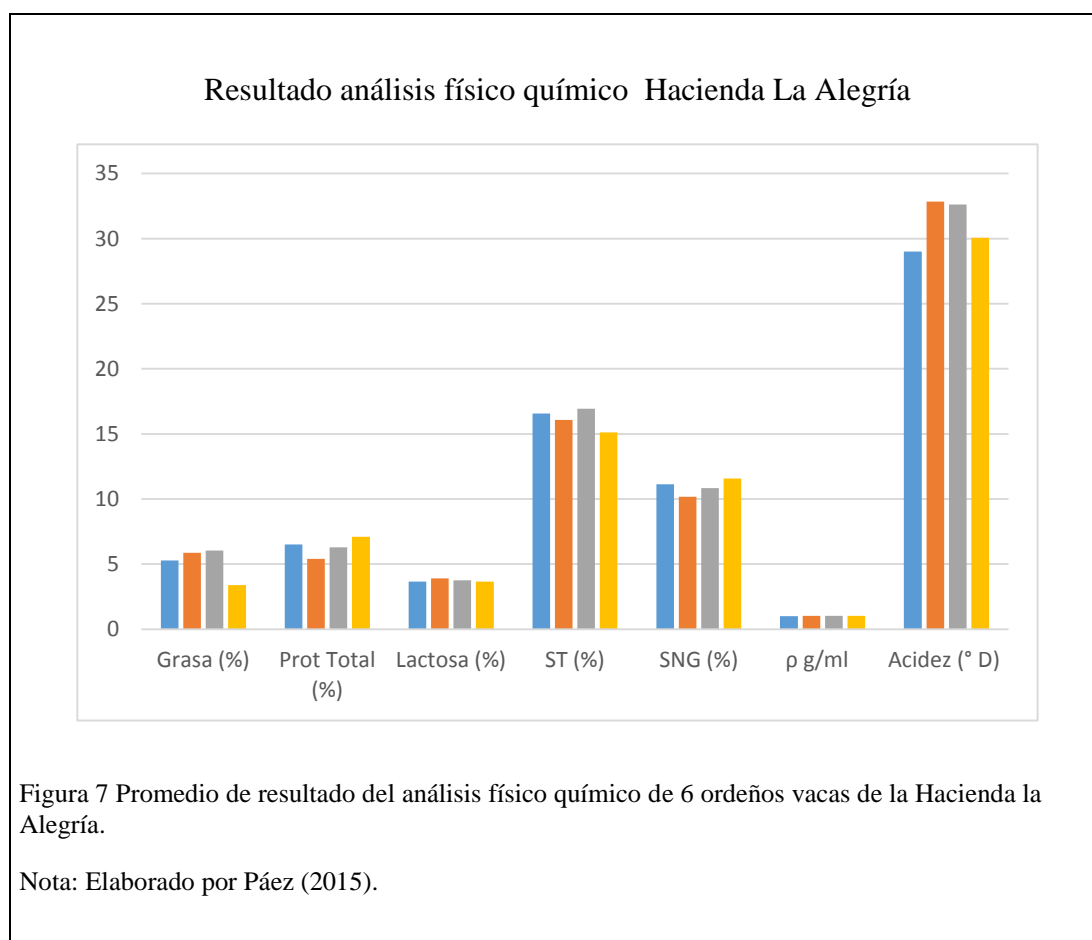
parámetros establecidos para la leche, llegando a valores máximos de 8% y mínimos de 3,29% .

Tabla 6.

Resultado del análisis físico químico muestras Hacienda la Alegría.

Hacienda	Vaca	Grasa (%)	Prot Total (%)	Lactosa (%)	ST (%)	SNG (%)	ρ g/ml	Acidez ° Dornic
Hacienda La Alegría	1	5,29	6,52	3,65	16,56	11,13	1,012	29
	2	5,88	5,41	3,90	16,07	10,17	1,021	32,84
	3	6,03	6,28	3,75	16,94	10,84	1,028	32,61
	4	3,38	7,10	3,65	15,12	11,58	1,030	30,06

Nota: Elaborado por Páez (2015).



Según Elizondo (2007, pág. 273), señala que las características y composición química del calostro de ganado Holstein presenta un porcentaje de grasa de 6,7; 5,4; 3,9 , desde el primer al tercer ordeño respectivamente, estos valores concuerdan con

los obtenidos para el calostro ya que presentan un valor promedio de 4,7, coincidiendo con lo expuesto por Campos, Carrillo, Loaiza, y Giraldo (2007, pág. 2) así como Araúz, Fuentes, Batista, Ramón, y Caballero, (2011, pág. 3), además se presenta un valor mínimo de 1,6 por debajo de los rangos establecidos por la norma INEN 9 (2012, pág. 2) y valor máximo de 14,0. Los resultados de la muestra de calostro bovino en los 6 ordeños varían consecutivamente y decrecen como se presenta en las Tablas 6, 7 y 8.. La cantidad de grasa en vacas de primer parto son mayores que las vacas de segundo y tercer parto como se muestran en las Figuras 7, 8 y 9, las vacas de segundo parto presentan valores similares al 5% de grasa en fracción de masa todos los valores están relacionados directamente con la raza y la alimentación. La Hacienda San Mateo demuestra que aunque sean vacas con diferente número de partos el tipo de alimentación que aplican ayuda a asegurar que los valores de grasa sean similares además que la cantidad de grasa se vea afectada por el estado sanitario de la ubre presentando disminuciones significativas cuando se presentan procesos inflamatorios o infecciosos.

Tabla 7.

Resultado del análisis físico químico muestras Hacienda San Carlos.

Hacienda	Vaca	Grasa (%)	Prot Total (%)	Lactosa (%)	ST (%)	SNG (%)	ρ g/ml	Acidez ° Dornic
Hacienda San Carlos	1	4,14	5,96	4,17	15,07	10,86	1,023	32,17
	2	5,48	6,34	3,86	15,37	10,05	1,022	30,39
	3	5,34	5,91	4,41	16,28	11,05	1,021	30,78
	4	8,00	8,46	4,80	21,97	14,05	1,025	26,17

Nota: Elaborado por Páez (2015).

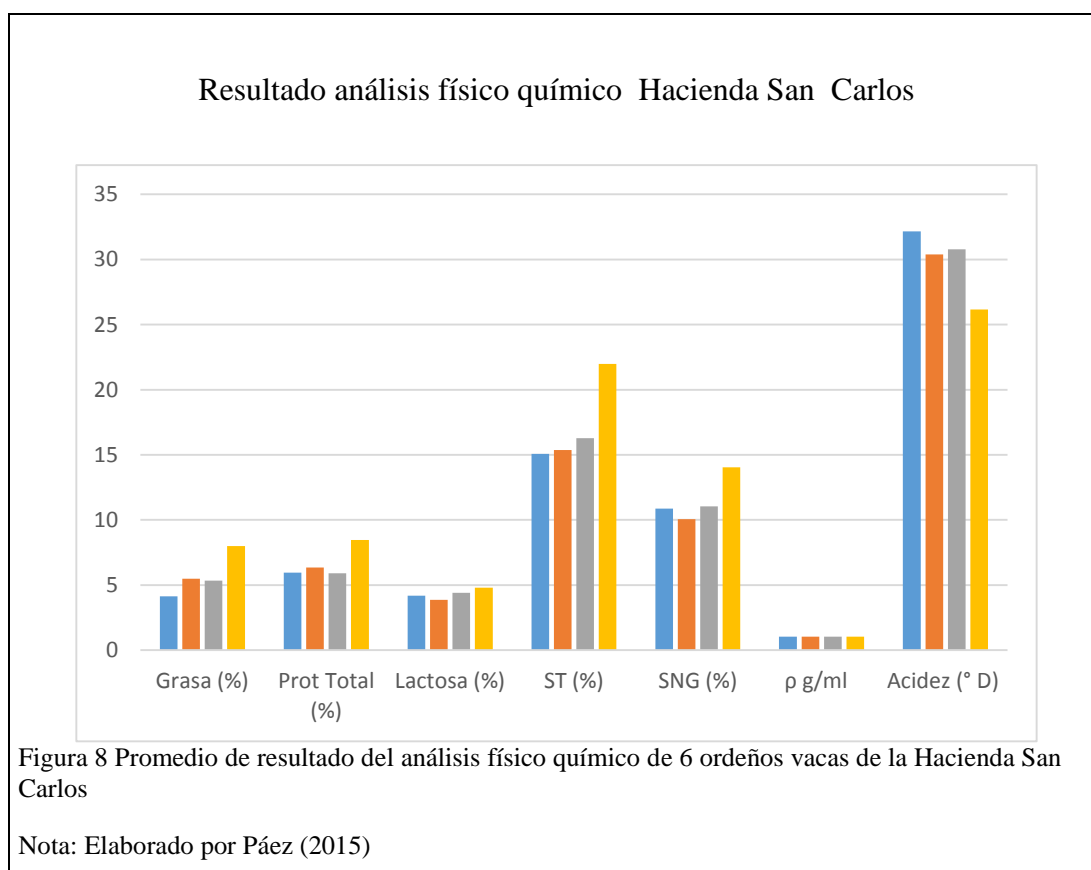
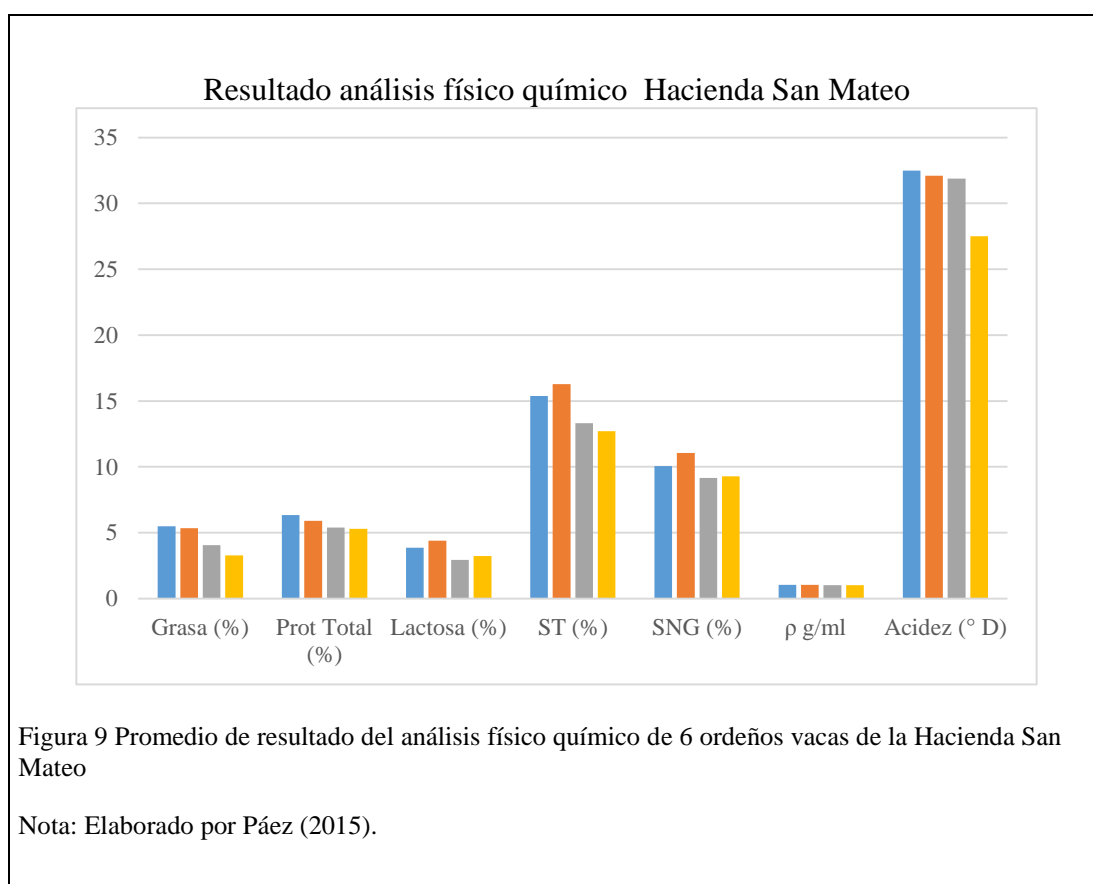


Tabla 8.

Resultado del análisis físico químico muestras Hacienda San Mateo.

Hacienda	Vaca	Grasa (%)	Prot Total (%)	Lactosa (%)	ST (%)	SNG (%)	ρ g/ml	Acidez ° Dornic
Hacienda San Mateo	1	5,48	6,34	3,86	15,37	10,05	1,042	32,50
	2	5,34	5,91	4,41	16,28	11,05	1,040	32,11
	3	4,07	5,40	2,95	13,31	9,15	1,027	31,89
	4	3,29	5,29	3,24	12,72	9,28	1,031	27,50

Nota: Elaborado por Páez (2015).



De acuerdo a Agudelo y Bedoya, (2005, pág. 40) el contenido de grasa puede variar por factores como la raza y la alimentación, manteniéndose constante en los diversos períodos de lactación por tanto según los resultado obtenidos el porcentaje de grasa se encuentra alrededor de 5% que es superior a los parámetros establecidos en la leche normal.

Las proteínas son las que más fluctuaciones experimentan en el transcurso de un período de lactación, varían desde 9% al 16% que es la tasa que puede alcanzar en el calostro (Agudelo & Bedoya, 2005, pág. 40), mientras que Fortín y Perdomo (2009, pág. 1) menciona en el cuadro de composición nutricional del calostro, que el porcentaje de proteína desde el primer al quinto ordeño presenta valores desde 14,00; 8,40; 5,10; 4,20; 4,10 respectivamente y estos valores disminuyen hasta un valor promedio de 3,3% en leche cruda (Bermudo, y otros, 2010, pág. 37); De acuerdo a los resultados tabla 6, 7, y 8 el calostro bovino analizado presenta un valor promedio de todas las muestras hasta el sexto ordeño de 6,1, con un mínimo de 2,2 y un máximo de 16,9, las vacas de la hacienda La Alegría presentaron en el primer ordeño valores de 7,21 hasta 13,02, en la Hacienda San Carlos valores desde 10,31 hasta 16,92 y en la Hacienda San Mateo valores de 7,34 a 13,45% , observándose que la proteína total tendió a decrecer consecutivamente en cada ordeño,

La lactosa se origina principalmente de la glucosa de la sangre, la glándula mamaria la sintetiza a partir de ácidos grasos volátiles en rumiantes (Alais & Godina, 1987, pág. 27) y normalmente en leche cruda la proporción de lactosa está entre 3,8 y 5,3 % (p/p) (WingChing & Mora, 2013, pág. 204). En el calostro bovino del ganado Holstein los niveles de lactosa en el primer ordeño fueron de 2,7 en el segundo ordeño 3,9 y en el tercer ordeño de 4,4 % llegando a niveles de leche de 4,9 que continúa ascendiendo hasta llegar a parámetros normales para un animal de producción lechera (Elizondo J. , 2007, pág. 273). En las muestras analizadas las tres haciendas presentan niveles mínimos de lactosa de 1,1; 1,56; 1,64 que corresponden al primer ordeño de las vacas 2 – 3 - 4 de la hacienda San Mateo, estos valores ascienden rápidamente mientras transcurren las horas hasta llegar a niveles de 4,11; 4,51 y 4.08 respectivamente. Además el análisis de muestras presenta valores máximos en porcentaje de 7,6 con un promedio de todas las muestras analizadas de 3,7, como muestran las Figura 7, 8 y 9, el porcentaje en calostro bovino asciende consecutivamente de acuerdo a los ordeños; ya que la concentración de lactosa se encuentra relacionada con el mantenimiento de la osmolalidad en la leche. La mayor concentración de lactosa beneficia la movilización del agua del perfil plasmático próximo a la zona basal de la célula epitelial mamaria para compensar en el citoplasma la inclusión y exocitosis vesicular hídrica hacia el lumen alveolar (Araúz, Fuentes, Batista, Ramón, & Caballero, 2011, pág. 12).

Además los resultados obtenidos concuerdan con Elizondo J. (2007, pág. 272) ya que el contenido de proteína y grasa es mayor y disminuye consecutivamente de acuerdo al número de ordeños debido a la capacidad de biosíntesis de la glándula mamaria, que aumenta por la estimulación que se da en el ordeño, la concentración de lactosa es menor y aumenta progresivamente durante los ordeños posteriores, además el calostro contiene aproximadamente el doble de los sólidos totales presentes en la leche. La concentración de proteínas y péptidos disminuye rápidamente después del inicio de la lactancia.

El calostro contiene cerca del doble de sólidos totales que la leche (Elizondo J. , 2007, pág. 272) desde 23,9 17,9; 14,1; desde el primer ordeño hasta los ordeños subsecuentes. Las muestras analizadas de las tres haciendas según las Tablas 6, 7, 8 presentan valores promedios máximos de 21,69, y en diferentes ordeños de 39,1 en especial de la vaca 4 de la hacienda La Alegría; 22,52 de la vaca 2 de la misma hacienda y un promedio de 15,3 de todas las muestras analizadas; según establece la norma INEN 9 (2012, pág. 2) para leche cruda el mínimo de sólidos totales es de 11,2% de fracción de masa, quedando evidenciada que el calostro cumple con los parámetros establecidos en la norma .

El porcentaje de sólidos no grasos de acuerdo a la norma INEN 9 (2012, pág. 2) para leche cruda tiene un valor mínimo de 8,2, en las muestras analizadas el resultado con valores mínimos es de 5,6 y el valor máximo de 24,8, que corresponden a la vaca 4 de la hacienda San Carlos en el primer ordeño y valores promedio máximo de 14,05 para la Hacienda San Carlos según se muestra en la tabla 7, concordando con lo expuesto por Astudillo (2011, pág. 3) el que menciona que los valores para sólidos no grasos en calostro bovino raza Holstein son de 16,7; 12,2 y 9,8 en los ordeños post parto cuyos datos son similares a los obtenidos.

El calostro de máxima calidad presenta un alto contenido de sólidos totales (24.0 %), grasa (7.0 %), proteína (14.0 %) y lactosa (2.7 %) (Araúz, Fuentes, Batista, Ramón, & Caballero, 2011, pág. 4), una de las muestras de mejor calidad en la Hacienda La Alegría corresponde a la vaca 4, en la Hacienda San Carlos la vaca 3 y la vaca 4 y en la Hacienda San Mateo la vaca 2 y los mejores parámetros de calidad del calostro se

obtuvieron en el primer ordeño, concordando con lo expuesto por muchos autores como se indicó anteriormente.

Las vacas de primer parto son Holstein puras con composiciones de calostro alto, en vacas híbridas y puras de segundo y tercer parto el calostro es de buena calidad pero no supera los valores obtenidos por la raza Holstein primer parto. Las concentraciones de algunos componentes son muy altas en los primeros ordeños obtenidas a pocas horas después del parto, con disminución posterior en los siguientes seis ordeños, excepto la lactosa que aumenta gradualmente hasta llegar a los parámetros establecidos para leche comercial cuyo resultado concuerda con Astudillo (2011, pág. 4), además para producir calostro de alta calidad se debe suministrar un alimento altamente balanceado que proporcione al animal en el periodo seco los nutrientes necesarios para su mantenimiento y posterior producción de leche (Campos, Carrillo, Loaiza, & Giraldo, 2007, pág. 4).

Campos, Carrillo, Loaiza, y Giraldo (2007, pág. 9) menciona que la densidad del calostro de excelente calidad es de 1,047 a 1,075; aceptable calidad de 1,035 a 1,046 y baja calidad con valores de densidad menor a 1,035 concordando con Rocha, Bouda, Medina, Nuñez, y Yabuta (1998, pág. 162), por tanto las muestras analizadas presentan densidad relativamente constante como muestran las figuras 7, 8 y 9. La hacienda La Alegría como se muestra en la tabla 6 presenta calostro de excelente calidad en el primer ordeño correspondiente a la vaca 3 con una densidad de 1,04752, el restante de muestras presentan calostro de aceptable y baja calidad hasta el sexto ordeño como se puede observar en la vaca 1 con valores de 0,98032. Las vacas de la hacienda San Carlos como se muestra en la tabla 6 presentan en general calostro de aceptable calidad y calostro de baja calidad a las 60 horas de ordeño como se puede observar en la vaca 1 con valores de 1,00657. Las vacas de la hacienda San Mateo como se muestra en la Tabla 8 presentan en general muestras de calostro que son de excelente calidad en las primeras horas de ordeño con una densidad de 1,08762 y calostro de baja calidad al sexto ordeño con valores de 0,98719 para la vaca 1.

La acidez de la leche inmediatamente después del ordeño es generada principalmente por los fosfatos, las caseínas y el dióxido de carbono que constituyen partes de los componentes principales (Chacón A. , 2006, pág. 56). El calostro analizado presenta

datos desde las primeras horas de ordeño de 42,67 ° Dornic hasta el sexto ordeño de 20,00 ° Dornic, las cuales expresan diferencias significativas hasta llegar a los valores normales que la norma INEN 9 (2012, pág. 2) establece como requisito para leche cruda parámetro acidez titulable como ácido láctico en % de fracción de masa de mínimo 0,13 y máximo 0,17 . De acuerdo a Schnettler (1998, pág. 28) los valores de acidez en ° Dornic hasta el séptimo día se encuentran entre 39,32 a 2,6 ° Dornic valores que son similares a los datos obtenidos.

El inicio de la fase de calostrogénesis está regulada por varias hormonas. El nivel de estrógenos sanguíneos aumenta rápidamente mientras el nivel de progesterona disminuye y la secreción de prolactina aumenta. Estos cambios en los niveles hormonales gatillan el inicio de la síntesis de alfa-lactoalbúmina. El aumento simultáneo de la secreción de corticoesteroides aumenta la cantidad de retículo endoplásmico rugoso y lleva a una diferenciación del aparato de Golgi, lo cual posteriormente conduce a un aumento en la síntesis de proteínas (Schnettler, 1998, pág. 9); además Rocha, Bouda, Medina, Nuñez, y Yabuta (1998, pág. 162) menciona que se ha establecido una relación entre la densidad del calostro y su concentración de inmunoglobulinas por lo tanto la densidad constituye un indicativo de calidad del calostro.

Las inmunoglobulinas del calostro proceden principalmente de las proteínas plasmáticas, por transporte selectivo de la sangre a la leche sin modificación alguna (IgG y IgM) y en menor grado la producción local de IgA de los linfocitos de la glándula mamaria (FEDNA, 2015, pág. 6). Las inmunoglobulinas calostrales proceden fundamentalmente de las proteínas plasmáticas, por transporte selectivo de la sangre a la leche sin modificación alguna (IgG y IgM) y en menor grado la producción local de IgA de los linfocitos de la glándula mamaria.

Un mes antes del parto se inicia la transferencia de IgG e IgM de la sangre al tejido mamario alcanzando el máximo nivel al momento del parto gracias a la gran vasodilatación existente. El contenido de inmunoglobulinas (Ig) del calostro depende de diversos factores: la edad, el número de parto, la raza, el estado nutricional, el programa de vacunación, el parto prematuro, la lactación prematura (pérdida de leche), el tiempo transcurrido después del parto, el estado sanitario general e individual de la

mama o factores de manejo del calostro como el tiempo y la temperatura de almacenamiento (FEDNA, 2015).

Elizondo J. A.(2007, pág. 6) menciona que la concentración de inmunoglobulinas en el calostro al momento del parto es muy variable entre vacas ya que el calostro producido por vacas de primer parto tienen concentraciones menores de inmunoglobulinas que el producido por vacas con mayor número de parto, además que la inmunidad adecuada requiere de una concentración de IgG en suero de al menos 10 mg/mL (1000 mg/dL o 10g/l) (Elizondo J. A., 2007, pág. 54).

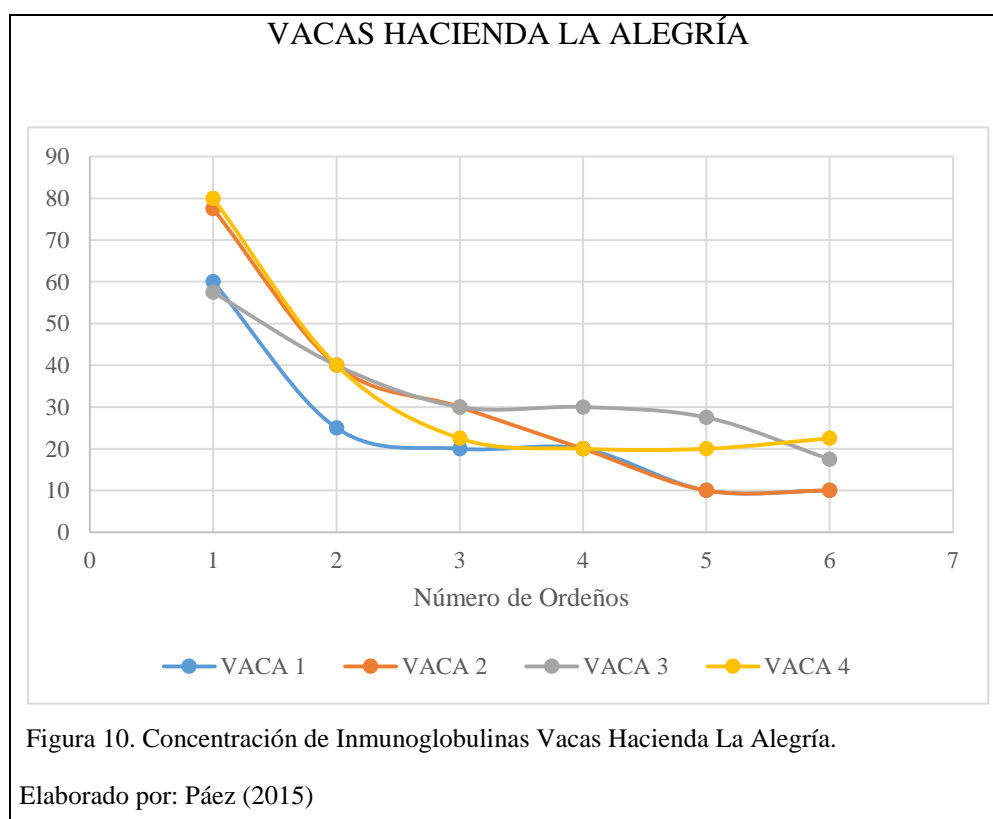
Al analizar el calostro de las haciendas seleccionadas desde el primer ordeño hasta el sexto ordeño se determinó diferencias significativas como muestran las tablas 9; 10 y 11 y figuras 10, 11 y 12, ya que las vacas tienen diferentes números de partos, los valores que de acuerdo a la escala del calostrometer (Flores & Romero, 2013, pág. 19) el rango para calostro de excelente calidad es de 50 a 140 mg/mL. En la hacienda La Alegría las vacas 1, 2 y 4 son de segundo parto y el calostro presentó valores de excelente calidad ya que la concentración de inmunoglobulinas según la Tabla 9 y Figura 10 es de 60; 77,5 y 80 respectivamente en el primer ordeño, la vaca 4 de la misma hacienda presentó valores para el primer ordeño de 57,5 considerado de excelente calidad pero que no alcanzó los valores promedio para las otras vacas de la misma hacienda.

Tabla 9.

Resultado de concentración de inmunoglobulina muestras calostro bovino. Hacienda La Alegría.

Número ordeños	VACA 1	VACA 2	VACA 3	VACA 4
	CONCENTRACIÓN IG mg/mL			
1	60	77,5	57,5	80
2	25	40	40	40
3	20	30	30	22,5
4	20	20	30	20
5	10	10	27,5	20
6	10	10	17,5	22,5

Nota: Elaborado por Páez (2014).



En la Hacienda San Carlos como se muestra en la tabla 10 y figura 11, las vacas 1 y 2 fueron de tercer parto, el calostro presentó valores de 80 a 60 mg/mL que correspondieron a excelente calidad, la vaca 3 de segundo parto presentaron valores de 70 mg/mL correspondiente a calidad excelente y la vaca 4 de primer parto presentó valores de calostro de 97,5 mg /mL superior a la categorización de excelente calidad.

En la Hacienda San Mateo como se muestra en la tabla 11 y figura 12, las vacas 1 y 2 fueron de segundo parto y las vacas 3 y 4 de tercer parto, presentaron valores de 80, 120, 110 mg/mL respectivamente correspondiendo a muestras de calostro de excelente calidad..

Tabla 10

Resultado de concentración de inmunoglobulina muestras calostro bovino. Hacienda San Carlos.

NÚMERO ORDEÑOS	VACA 1	VACA 2	VACA 3	VACA 4
	CONCENTRACIÓN IG mg/mL			
1	80	60	70	97,5
2	30	40	20	40
3	27,5	30	20	22,5
4	20	10	20	12,5
5	10	10	20	10
6	12,5	5	12,5	10

Nota: Elaborado por Páez (2014).

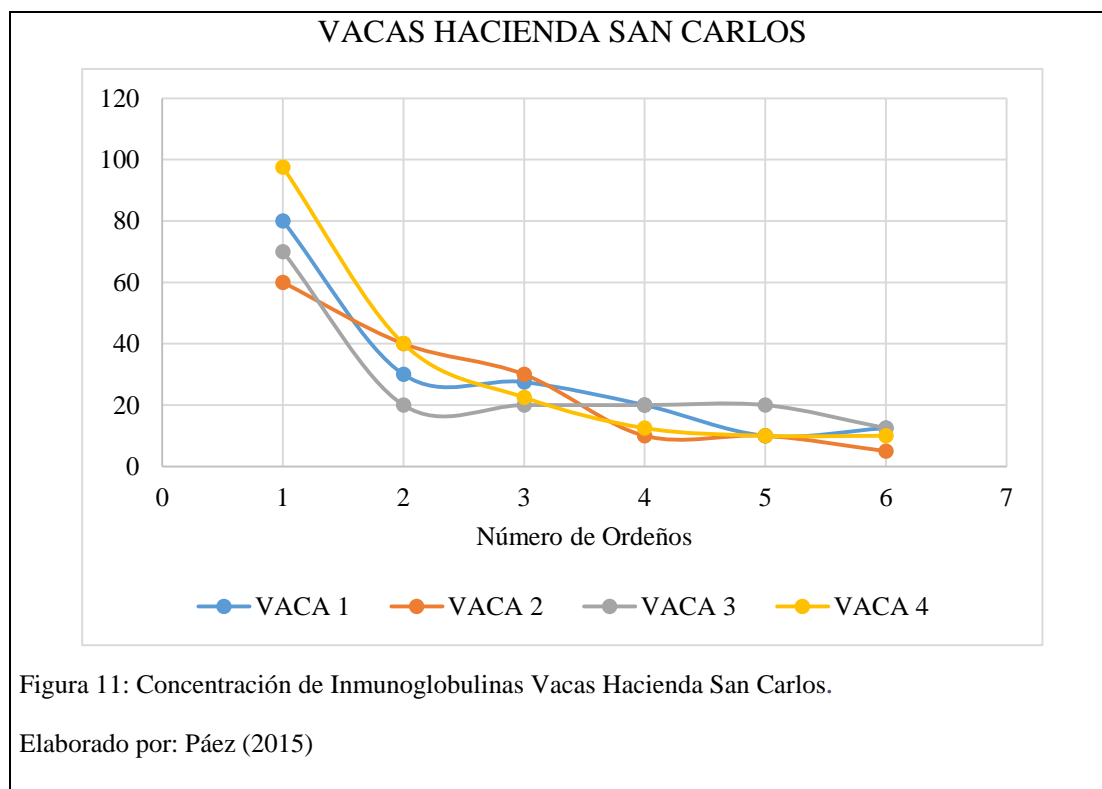
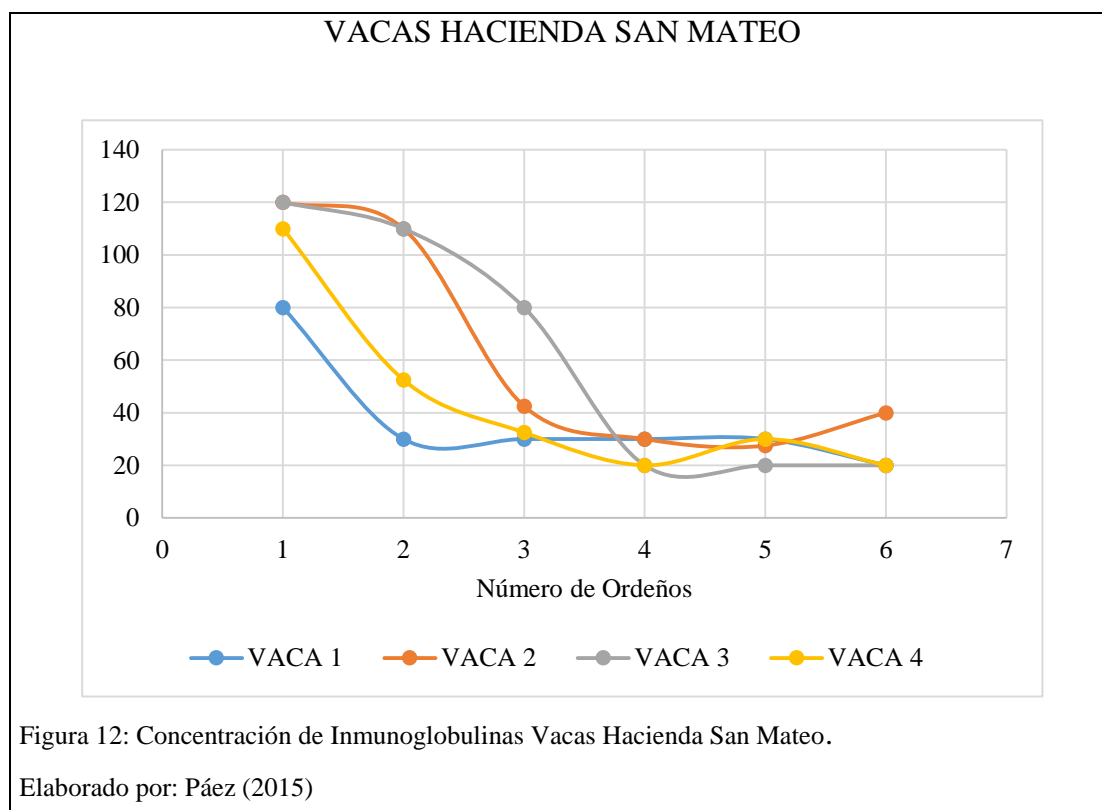


Tabla 11.

Resultado de concentración de inmunoglobulina muestras calostro bovino Hacienda San Mateo

NÚMERO ORDEÑOS	VACA 1	VACA 2	VACA 3	VACA 4
	CONCENTRACIÓN IG mg/mL			
1	80	120	120	110
2	30	110	110	52,5
3	30	42,5	80	32,5
4	30	30	20	20
5	30	27,5	20	30
6	20	40	20	20

Nota: Elaborado por Páez (2014).



Como se pudo evidenciar en el análisis de las tres haciendas el número de partos no están directamente relacionados en la concentración de inmunoglobulinas ya que según Rocha, Bouda, Medina, Nuñez, y Yabuta (1998, pág. 162) las causas de disminución de la concentración de inmunoglobulinas calostrales se encuentra la mastitis, las infecciones sistémicas de la madre, acidosis metabólica, el efecto del

número de ordeños posparto, la deficiencia de proteínas y minerales en la ración alimenticia. Además de que la concentración de inmunoglobulinas disminuyen significativamente en los ordeños subsecuentes al parto (Elizondo J. , 2007, pág. 272), además Flores y Romero (2013, pág. 15) señalan que el tipo de parto influye en la concentración, los partos difíciles y los partos inducidos bajo efecto de glucocorticoides o prostaglandinas en general reducen los niveles de inmunoglobulinas, específicamente inmunoglobulina G.

3.4. Análisis microbiológico de calostro bovino

Las bacterias pueden afectar la salud del becerro ya que compiten por los sitios de absorción de las inmunoglobulinas (Elizondo J. , 2007, pág. 44) por esta razón el nivel de inmunoglobulinas no es suficiente para proteger al recién nacido de enfermedades durante las primeras semanas de vida ya que nacen sin inmunidad pasiva la cual es adquirida.

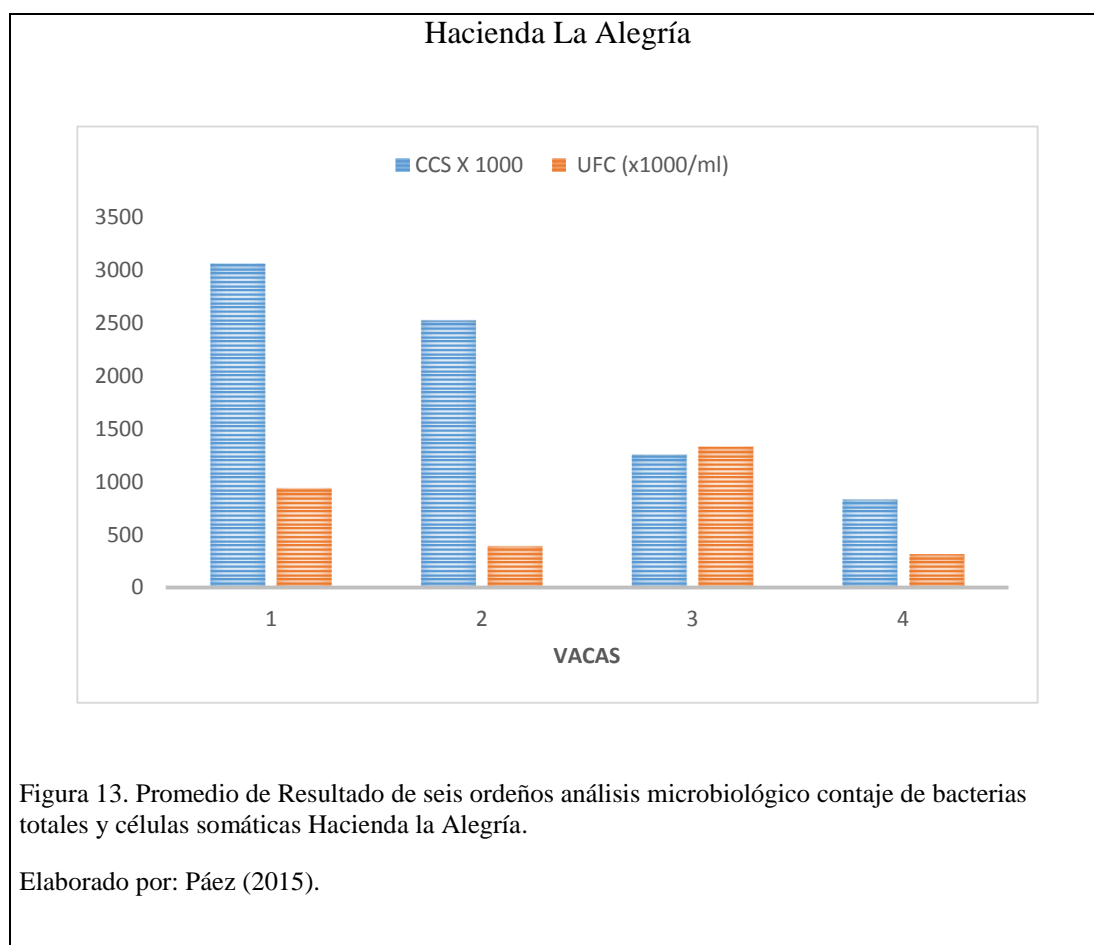
De acuerdo a la Normativa Argentina para bacterias en leche cruda, se considera como normal ($\leq 100\ 000$ UFC/mL), aceptable ($100\ 000 <x \leq 1.5 \times 10^6$) UFC/mL), fuera de norma ($> 1.5 \times 10^6$ UFC/mL) a leches que muestren estos parámetros. De acuerdo a la norma INEN 9 (2012, pág. 3) establece como requisito microbiológico para recuento de microorganismos aerobios mesófilos REP, UFC/cm³ límite máximo de $1,5 \times 10^6$. Las muestras analizadas presentan valores variables según se observa en las Figuras 13, 14 y 15 y Tablas 12, 13 y 14, desde el primer hasta los subsecuentes ordeños, el valor máximo de CBT en la hacienda La Alegría correspondiente al primer ordeño fue de 6962 UFC (x 1000/mL), hasta llegar al valor mínimo de 22 UFC (x 1000/mL). En la Hacienda San Carlos el valor máximo de CBT fue de 7209 UFC (x 1000/mL) y el mínimo 28 UFC (x 1000/mL) y en la Hacienda San Mateo de Guachalá el valor máximo fue de 2045 UFC (x 1000/mL) y mínimo de 5 UFC (x 1000/mL) valores normales comparados con los reportados para la leche.

Tabla 12.

Promedio resultado análisis microbiológico Hacienda La Alegría.

Hacienda	Vaca	CCS X 1000	UFC (x1000/ml)
Hacienda La Alegría	1	3056,17	934,33
	2	2522,83	390,67
	3	1253,5	1326,83
	4	831,17	315,33

Nota: Elaborado por Páez (2015)



Las bacterias totales están directamente relacionadas con las células somáticas ya que en el periodo seco de la vaca gestante, la misma está expuesta a microorganismos. Las bacterias en el calostro pueden pasar hacia el torrente sanguíneo, causando una septicemia, además pueden provocar diarrea en los becerros. Algunos de los patógenos que pueden estar presentes en el calostro, ya sea procedentes de la glándula mamaria o de la contaminación en el manejo pueden ser *Mycobacterium avium spp. Paratuberculosis*, *Salmonella spp.*, *Micoplasma spp.*, *Listeria monocytogens*

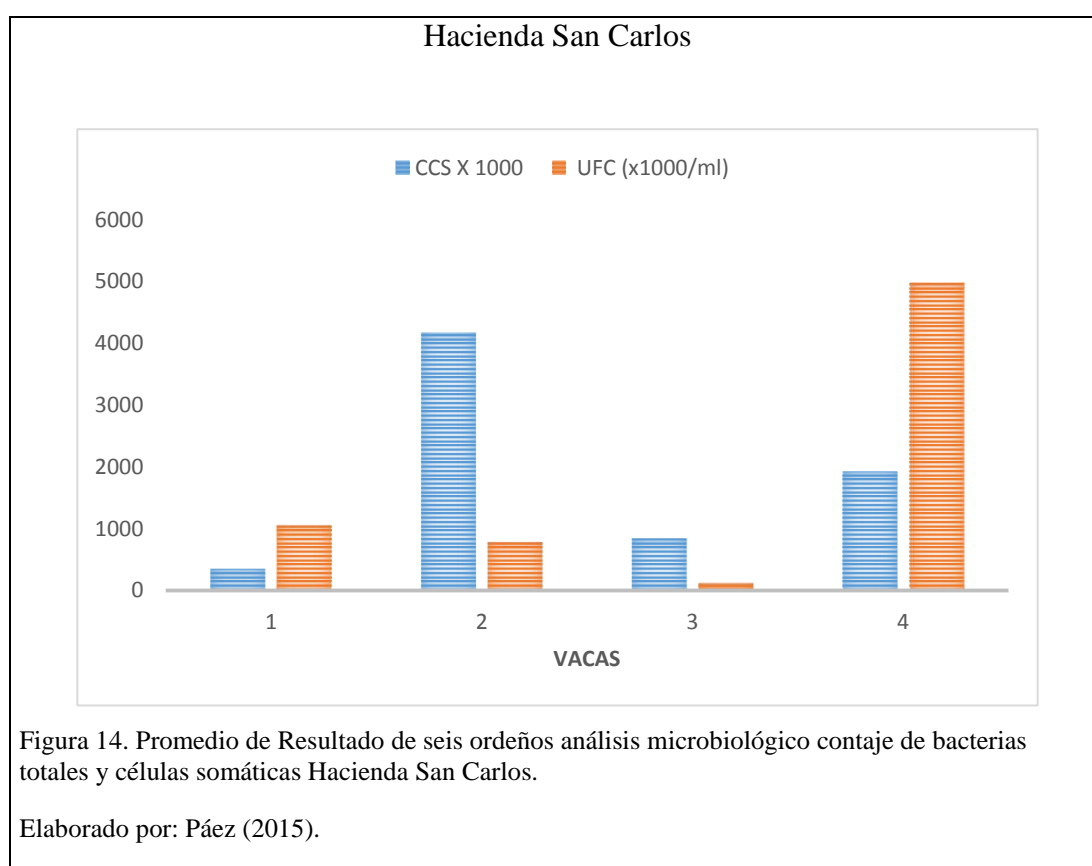
Campylobacter spp., *Mycobacterium bovis* y *Escherichia coli* (Elizondo J., 2007, pág. 44)

Tabla 13.

Promedio resultado análisis microbiológico Hacienda San Carlos.

Hacienda	Vaca	CCS X 1000	UFC (x1000/ml)
Hacienda San Carlos	1	348,17	1055,33
	2	4172,5	783,15
	3	842,33	122
	4	1927,83	4977,17

Nota: Elaborado por Páez (2015)



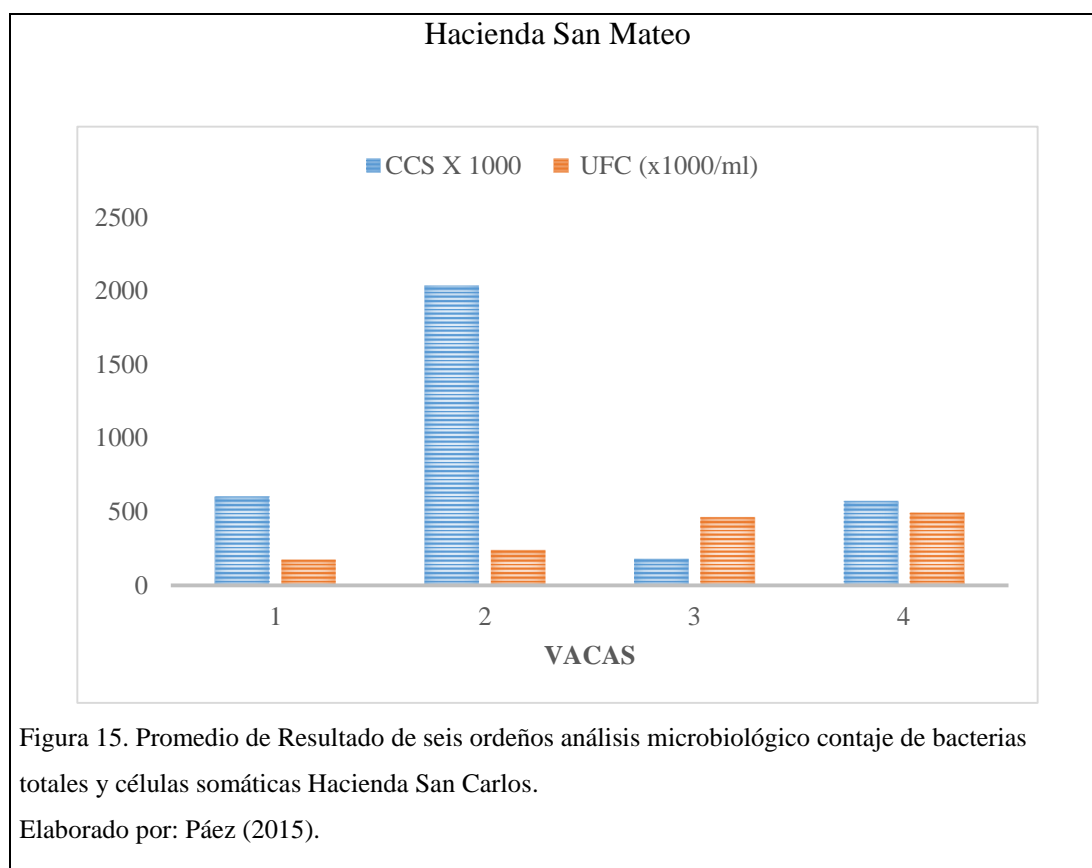
Los resultados promedios de la vaca 3 de la Hacienda La Alegría para el primer parto presentó valores de CCS y CBT relativamente similares como se muestra en la Figura 13 mientras que la vaca 4 de la Hacienda San Carlos con el mismo número de partos presentó valores altos de CCS y las vacas de segundo y tercer parto presentan valores variables, estas variaciones pueden deberse al manejo sanitario que se le dé al animal durante el periodo de producción de calostro y leche.

Tabla 14.

Promedio resultado análisis microbiológico Hacienda San Mateo.

Hacienda	Vaca	CCS X 1000	UFC (x1000/ml)
Hacienda San Mateo	1	604,83	177,00
	2	2036,33	241,83
	3	183,17	462,67
	4	573,17	496

Nota: Elaborado por Páez (2015)



El recuento de células somáticas asegura alta calidad en la leche cruda (FOSS, 2013, pág. 1), además es un determinante indicador de la salud de la glándula mamaria (Hernández, 2008, pág. 2). El Laboratorio de Calidad de la Leche en UPS-Cayambe trabajó con criterios de aceptación a partir de una muestra referencia comercial FMA que estuvo calibrada entre valores de 355 a 401 CCS x 1000/mL; además se consideró una muestra como alta cuando presentaron valores de 860 a 786 CCS x 1000/mL, media 375 a 328 CCS x 1000/mL, baja 203a 173 y un blanco de 3 a 8, con coeficiente de variación con escalas de 150000 el 6%; de 300000 el 5%; de 450000 del 4%; de 750000 el 3% y en 1500000 el 3%.

Las vacas durante el periodo seco, el cual es el periodo sin leche que se inicia regularmente unos 60 días antes de la fecha señalada al parto, después de suspender el ordeño diario, la ubre de la vaca preñada se satura de leche, las células reducen su capacidad metabólica con rapidez, histológicamente las células grasas y tejido conectivo son las predominantes en el periodo seco (UNAM, 2010 , pág. 422).

Las células somáticas son células del organismo (varios tipos de leucocitos o células blancas de la sangre) están presentes en la leche en niveles bajos. El incremento del número de estas células dentro del alveolo, es un indicador como respuesta a la infección (Hernández, 2008, pág. 14), con los resultados se determinó que las vacas normalmente después del parto presentaron niveles altos de CCS y CBT ya que la glándula mamaria se encuentra infectada, posteriormente estos valores se reducirán debido a que la infección disminuye con la estimulación y el manejo que se dé a la glándula mamaria, además en el periodo seco de la vaca aumenta el número de células somáticas debido a que la glándula mamaria está expuesta a microorganismos patógenos.

El número de células somáticas aumentan y disminuyen progresivamente en los ordeños posteriores hasta llegar a los niveles normales de leche cruda como lo describe la norma INEN 9 (2012, pág. 3) con un límite máximo de $7,0 \times 10^5$ en recuento de células somáticas / cm^3 y niveles por debajo de la norma de 59 CCS x 1000/ mL. De acuerdo a Hernández (2008, pág. 16) las glándulas mamarias que nunca se han infectado normalmente tienen CCS de 20 000 a 50 000 células/mL.

Tabla 15.

Promedio general análisis fisicoquímico y microbiológico de todas las muestras analizadas.

Parámetros	Haciendas		
	La Alegría	San Carlos	San Mateo
Grasa (%)	5,73	5,74	4,55
Prot Total (%)	6,33	6,67	5,74
Lactosa (%)	3,74	4,31	3,62
ST (%)	16,17	17,17	14,42
SNG (%)	10,93	11,5	9,88
ρ g/ml	1,02	1,02	1,04
Acidez (° D)	31,13	29,88	31
CBT UFC (x1000/mL)	741,79	2056,9	344,38
CCS X 1000/mL	1915,92	1822,71	849,38
Conc Ig (mg/mL)	30,83	32,50	51,04

Nota: Elaborado por Páez (2015).

Al analizar los datos de la tabla 15, que corresponden a los promedios generales se observa que la hacienda San Carlos es la que presentó valores más altos en relación a las otras haciendas; en cuanto a alimentación aplica sistema de alimentación balanceada y pastoreo a una altura de 2830 msnm, con 75% de razas puras y 25% híbridas.

3.4.1. Recuento de Coliformes totales, *Echerichia coli*.

Se realizó el recuento de *Coliformes totales* y *Echerichia coli* mediante placas petrifilm en las muestras seleccionadas para microfiltración la tabla 16 muestra los resultados observados a las 24 horas de crecimiento de acuerdo a la guía 3M Petrifilm (2015, pág. 16) el recuento de colonias es 0 o negativo (-), por lo que las burbujas de fondo fueron pequeñas o puntiformes y no presentaron una colonia asociada, además las burbujas son una característica del gel de la placa y no resultado del crecimiento de coliformes ni *E. coli*. Según (Vasek, Cabrera, Coronel, Giori, & Fusco, 2004, pág. 17), los valores elevados de microorganismos contaminantes son considerados como indicadores de las condiciones higiénico-sanitarias con las que se realizó el proceso Es importante el análisis microbiológico en el proceso de microfiltración ya que la separación de bacterias lácteas puede constituir un agente significativo en el colmataje de la

membrana dado que los microorganismos logran formar biopelículas (Chacón A. C., 2006, pág. 247).

Tabla 16.

Resultado recuento de *Coliformes totales* y *Echerichia coli* muestras microfiltración.

Muestra	<i>Coliformes Totales</i>	<i>Echerichia coli</i>
	Placas Petrifilm 24 h	
Entrada 1	-	-
Permeado 1	-	-
Concentrado 1	-	-
Entrada 2	-	-
Permeado 2	-	-
Concentrado 2	-	-

Nota: Elaborado por Páez (2015).

3.5. Cinética de decremento inmunoglobulinas de calostro bovino.

3.5.1. Cromatografía líquida de alta resolución HPLC

Se utilizó plasma sanguíneo bovino como patrón de análisis ya que las inmunoglobulinas bovinas comercialmente no fueron encontradas; el plasma sanguíneo bovino está compuesto por proteína 6,5 a 8 %; agua 90 – 91 %, carbohidratos < 1 %, grasa 0,1 -1% y sales 1,2% (Cifuentes, 2012, pág. 10) . Se extrajo sangre de una vaca raza Holstein de segundo parto y se procesó al igual que las muestras de análisis, se aplicó el método de análisis descrito para determinar proteínas con áreas de picos detectados entre el minuto 1 y 2 según se expresa en la tabla 17 con varias repeticiones y dos diluciones como se muestra en la figura 16. Además se utilizó leche cruda como muestra comparativa cualitativa de componentes como se muestra en la figura 17 y el área del pico en la tabla 17.

Tabla 17.

Resultado de los picos reportados en el análisis de HPLC marca Varian modelo ProStar 320 del patrón plasma sanguíneo bovino.

RESULTADO PICOS HPLC		
Patrones	Tiempo de retención	Área
Plasma 1	1,57	57371785
Plasma 2	1,35	52853248
Plasma 50 %	1,47	15272872
Plasma 100 %	1,37	30541880
Leche	1,40	7774043

Nota: Elaborado por Páez (2015).

Xiao-yu, y otros (2012, pág. 76) mencionan que el 20 % de proteína totales de la leche bovina se encuentran en el suero. La proteína de suero de leche contiene α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, albúmina de suero bovino, lactoferrina, inmunoglobulinas, glicomacropéptido y factores de crecimiento. En pruebas preliminares se aplicó la longitud de onda recomendada para el análisis de proteína de calostro, a 215 nm en el cual no presentó ningún pico representativo debido a esto se aplicó un barrido en un rango de 200 a 300 nm de longitud de onda, el equipo utilizado detectó la longitud de onda automáticamente donde se presentó mayor absorbancia para emitir los resultados correspondientes. En la corrida de leche cruda se determinó varios picos significativos a diferentes tiempo de retención como muestra la Figura 17.

De acuerdo a la figura de Giraldo, García, Coimbra, y Luera (2010, pág. 23) en la cual se muestra un cromatograma típico de estándares de α -lactoalbumina y β -lactoglobulina, observando tiempos de retención para estas proteínas de 20 y 27 minutos así como también se puede observar en el cromatograma figura 16 figura 17 y figura 18, así como en los anexos 2 y 3 un pico representativo en los primeros minutos de retención que concuerda con los picos de los Cromatogramas obtenidos en las muestras de calostro de las tres haciendas y plasma sanguíneo bovino analizado mediante la técnica aplicada, estos valores concuerdan con los estudios realizados por Xiao-yu, y otros (2012, pág. 79)

CROMATOGRAMA PLASMA SANGUÍNEO BOVINO

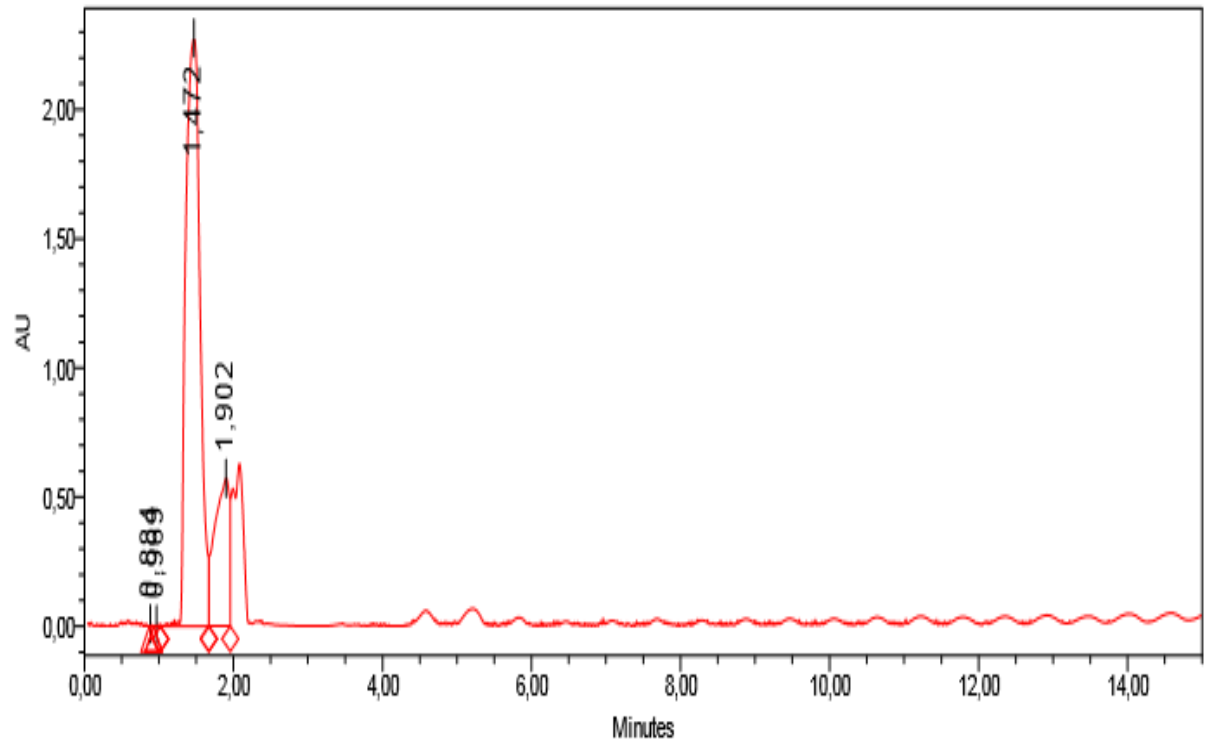


Figura 16: Cromatograma plasma sanguíneo

----- Tipo de Canal 3D PDA/FLR; Canal de Descripción 2998 (200-300) nm; Descripción del canal de Procesado PDA TotalPlot (200,0 nm to 300,0 nm); Tipo de Canal de Procesado 2D Derived; Vial Id (Result).

Elaborado por: Páez (2015).

CROMATOGRAMA LECHE

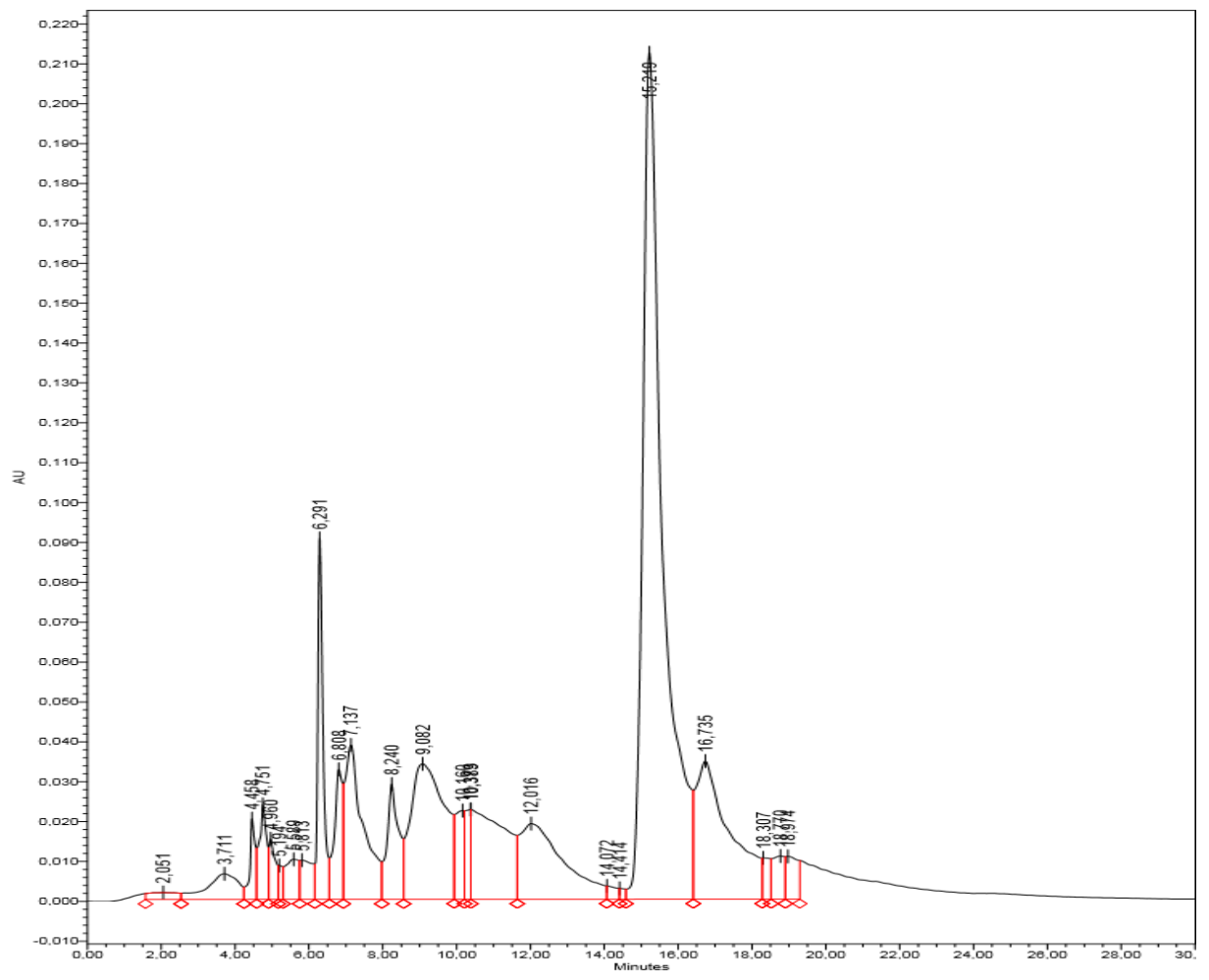


Figura 17: Cromatograma leche

----- Tipo de Canal 3D PDA/FLR; Canal de Descripción 2998 (200-300)nm; Descripción del canal de Procesado PDA TotalPlot (200,0 nm to 300,0 nm); Tipo de Canal de Procesado 2D Derived; Vial Id (Result).

Elaborado por: Páez (2015)

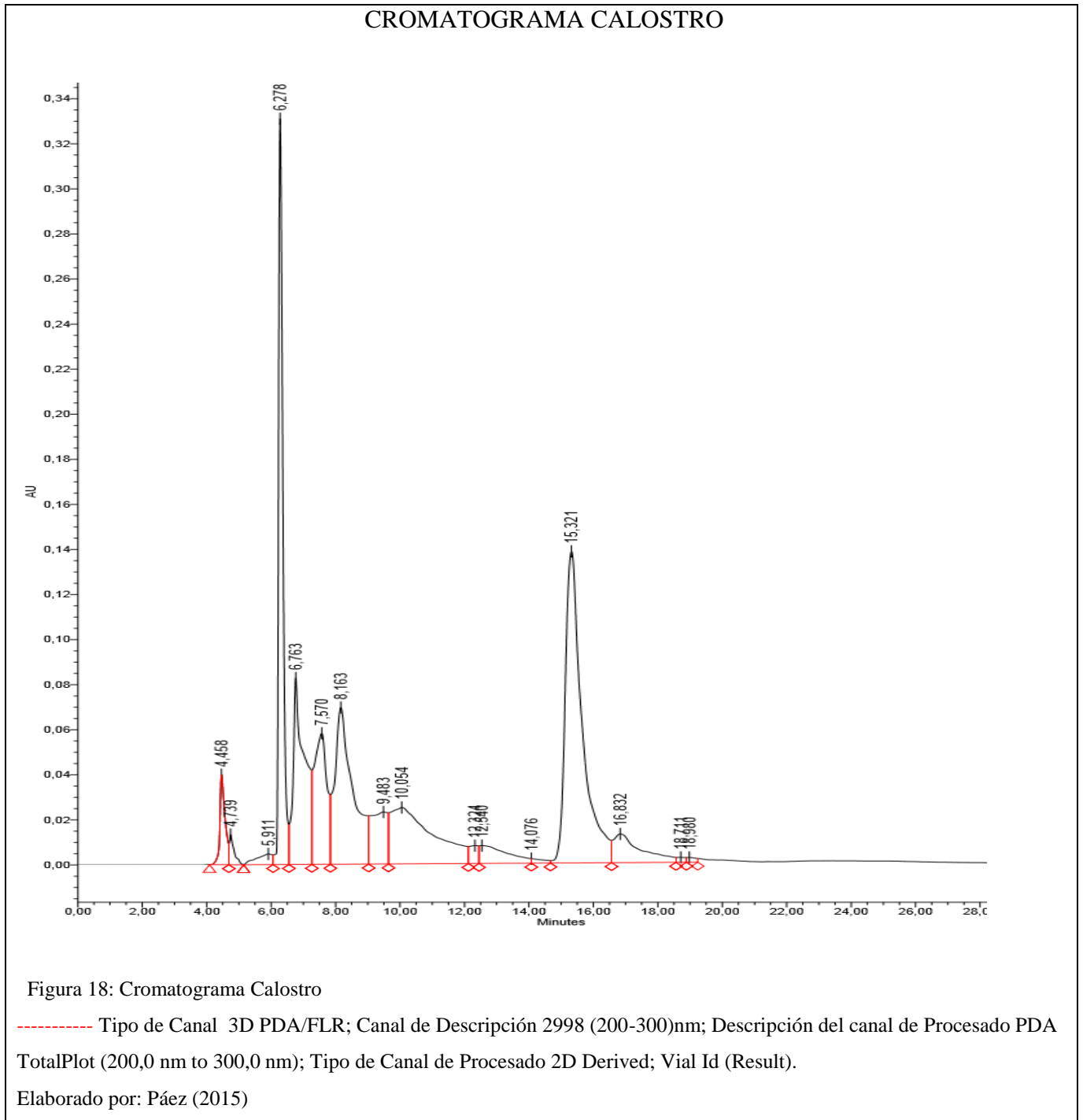


Tabla 18.

Resultado de los picos reportados en el análisis de HPLC marca Varian modelo ProStar 320 vacas de las tres haciendas. Tiempo de retención 1,42.

VACA	HACIENDA LA ALEGRÍA	HACIENDA SAN CARLOS	HACIENDA SAN MATEO
1	17376444,2	26081557,7	18793976,7
2	86440516,7	18142424,2	16454436,2
3	34750978,8	34750978,8	34058334,3
4	22097452	15695955,2	28473770,3

Nota: Elaborado por Páez (2015).

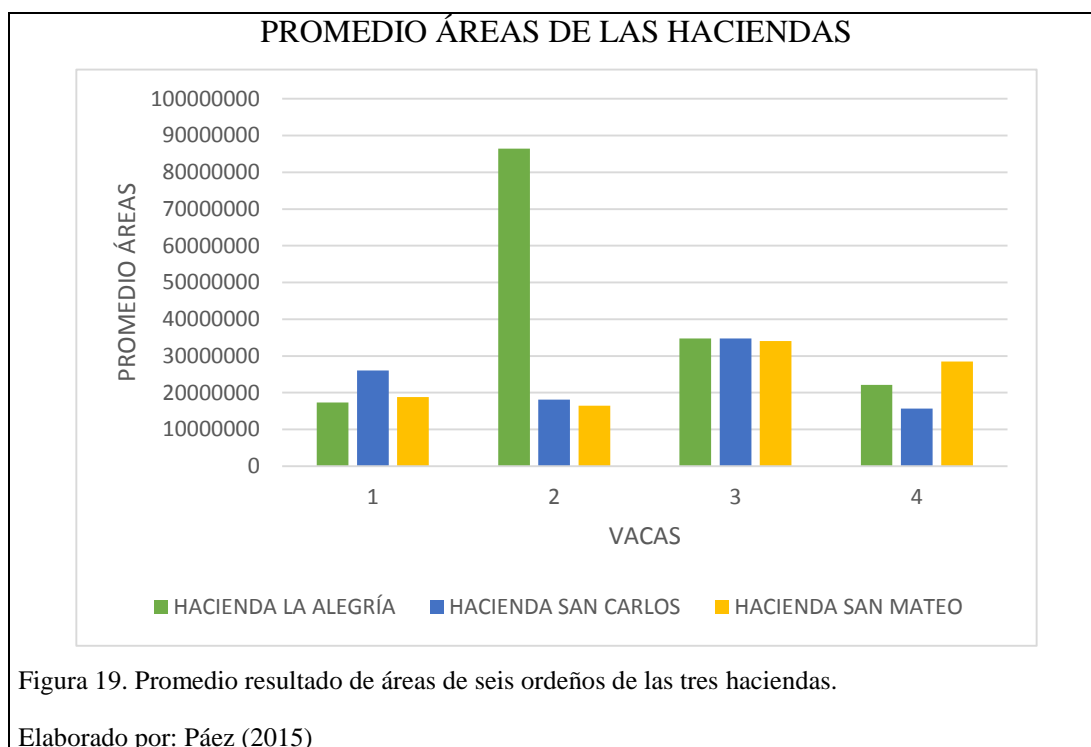


Figura 19. Promedio resultado de áreas de seis ordeños de las tres haciendas.

De acuerdo a los promedios presentados en la tabla 18 y figura 19 la vaca 2 de la Hacienda La Alegría es la mejor en producción de proteínas con calostro de excelente calidad, ya que tiene una área de 86440516,7 que es superior a los estándares comparativos, así como también al producto concentrado.

3.6. Separación de componentes inmunológicos de calostro con tecnología de membranas

3.6.1. Microfiltración

De las 72 muestras obtenidas de las tres haciendas se seleccionó las que contenían hasta el 50% de concentración de inmunoglobulinas, se colocó dos días antes del proceso, en refrigeración para su descongelamiento ya que el calostro se debe manipular apropiadamente para evitar la desnaturalización de las proteínas y los anticuerpos. Para el proceso de microfiltración se realizó un prefiltrado de la muestra de entrada en un tamiz de lino, se calentó lentamente en agua Baño María hasta alcanzar una temperatura corporal promedio de los animales de 38.8°, debido a que la temperatura disminuye la viscosidad del fluido, ayuda en el proceso de filtración y por lo general el equipo incrementa dicha temperatura debido a la fricción de moléculas (Camacho, 2009, pág. 22). Se obtuvo dos muestras de entrada, se microfiltró variando parámetros como se señala en la Tabla 19 y 20 como por ejemplo temperatura de entrada para las muestras: 33 °C y 35°C, además la presión transmembrana de 1,5 y 2,5 bar respectivamente, dado que la microfiltración utiliza membranas porosas de 0,1 a 5 μ se utilizó la membrana de 0,45 μ y el rango de presiones de 0,1 a 3 bares de presión transmembrana según estable Camacho, (2009, pág. 13) y volumen de entrada de 15 y 13 L.

Para el análisis de microfiltración se evaluó el flujo del permeado que varió de acuerdo al tiempo según se observa en la figura 20 y 21; por otro lado se debió considerar que la permeabilidad de la membrana (L_m) es el inverso a la resistencia y en microfiltración las membranas presentan resistencias típicas de $1 \cdot 10^{-11}$ m y las unidades son 1/m (Camacho, 2009, pág. 21), además se debió considerar que el factor de retención volumétrica del proceso (FRV) relaciona el volumen de alimentación V_a y el volumen del retenido V_r (Camacho, 2009, pág. 22).

Tabla 19.

Condiciones y resultados proceso de microfiltración muestra 1

Muestra 1	
Área membrana	0,45μ
Temperatura entrada	33 °C
Temperatura permeado	25°C
Temperatura del concentrado	25°C
Temperatura del refrigerante	18,7°C
Presión	1,5 bar
Tiempo de operación proceso	15 min
Volumen entrada	15
Volumen permeado	1,55
Volumen entrada sobrante	7,8
Volumen muerto del equipo	0,65
Volumen concentrado	5
FRV	3

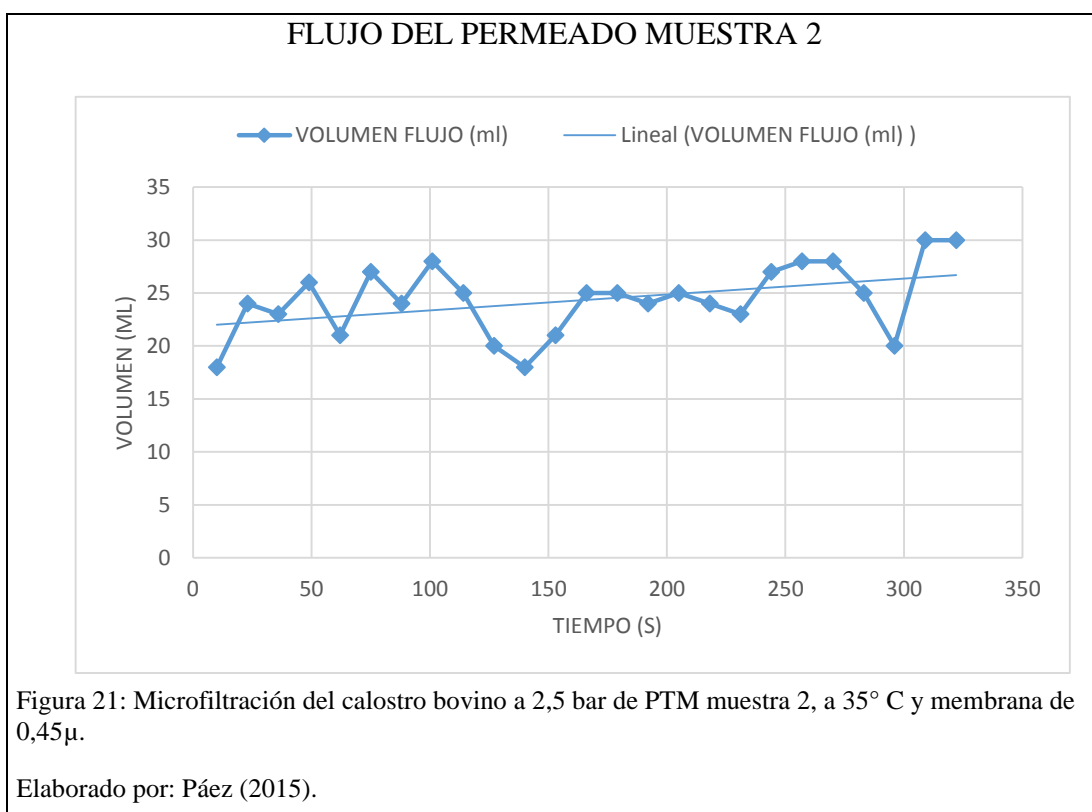
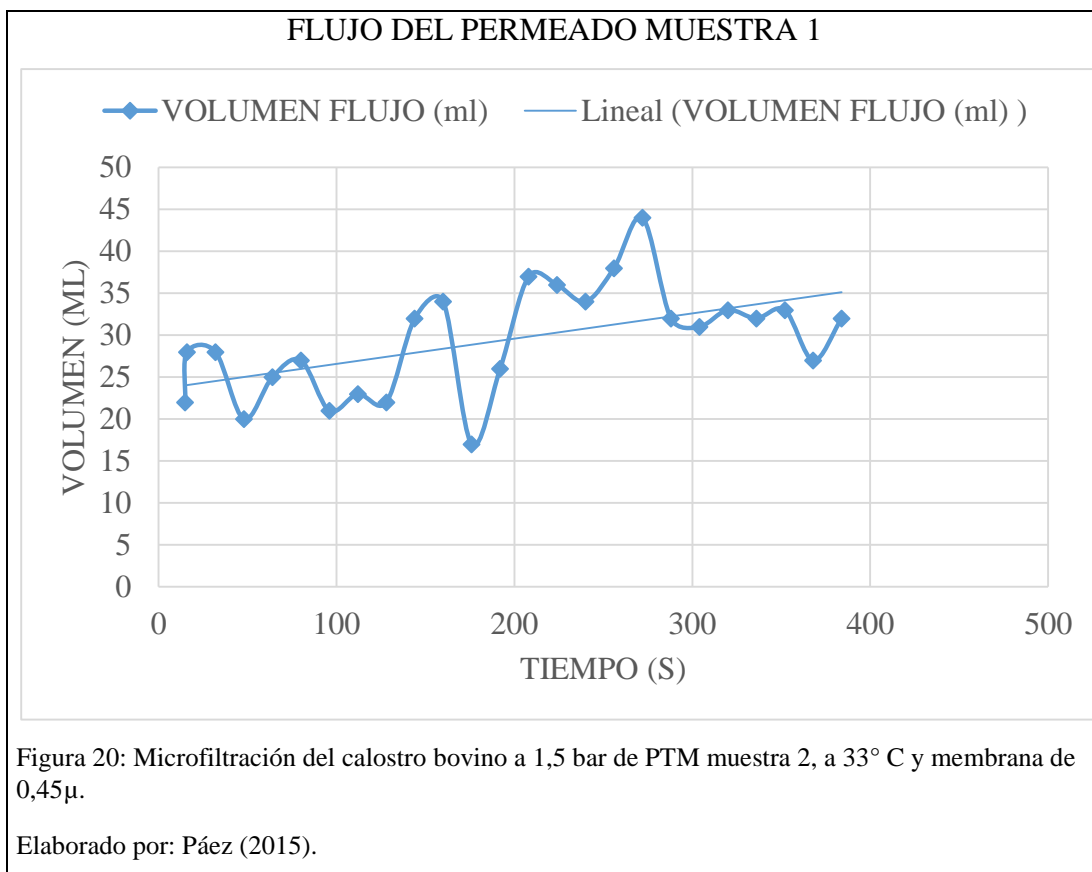
Nota: Elaborado por Páez (2014)

Tabla 20.

Condiciones y resultados proceso de microfiltración muestra 2.

Muestra 2	
Área membrana	0,45μ
Temperatura entrada	35 °C
Temperatura permeado	20,8°C
Temperatura del concentrado	31,6°C
Temperatura refrigerante	18°C
Presión	2,5 bar
Tiempo de operación proceso	15 min
Volumen entrada	13
Volumen permeado	1,2
Volumen entrada sobrante	6
Volumen concentrado	5
Volumen muerto del equipo	0,8
FRV	2,6

Nota: Elaborado por Páez (2015)



Para determinar el flujo del permeado se tomó un volumen (ml) a determinando tiempo (s) durante 25 repeticiones. En la Tabla 19 y 20 se reportó los parámetros y resultados de la microfiltración para la muestra 1, el volumen de entrada de 15 L, temperatura 33 °C a presión transmembrana de 1,5 bares, el flujo del permeado aumentó y disminuyó progresivamente manteniéndose inestable en los 15 min que correspondió al tiempo de operación del equipo, el volumen del permeado fue de 1,55 L, el volumen de concentrado de 5L, el equipo retuvo producto en su estructura llamado volumen muerto que en este caso fue de 0,65 L y para la muestra 2 el volumen de entrada fue de 13 L, temperatura 33 °C a presión transmembrana de 2,5 bares, el flujo del permeado se mantuvo relativamente constante en los 15 min de operación del equipo, el volumen del permeado fue de 1,2 L, el volumen de concentrado 5 L, y el volumen muerto de 0,8 L. En las dos muestras microfiltradas el permeado presentó aspecto líquido, coloración amarillo translucido, y el concentrado olor característico del calostro, consistencia espesa y coloración blanca amarillenta, se puede observar que el concentrado se clarifico y presenta mejor apariencia que la muestra de entrada como se muestra en las figuras 22 y 23.

RESULTADO PROCESO DE MICROFILTRACIÓN



Figura 22. Proceso de microfiltración. Muestra 1 Microfiltración Entrada – Permeado – Concentrado.

Elaborado por: Páez (2015).

RESULTADO PROCESO DE MICROFILTRACIÓN



Figura 23. Proceso de microfiltración. Muestra 2 Microfiltración Entrada – Permeado – Concentrado.

Elaborado por: Páez (2015).

Al realizar el diseño experimental test estadístico ANOVA de dos vías para medir la variación en la concentración de inmunoglobulinas como se muestra en la Tabla 21, con $p= 0,298$ y 96% de variación se evidencia que están dentro del mismo grupo, por lo tanto se acepta la hipótesis nula planteado en la investigación “el concentrado de inmunoglobulinas de calostro bovino es independiente del proceso aplicado para la concentración por tecnología de membranas” ya que depende principalmente de la composición y calidad del producto, además si se observa un aumento considerable al concentrar el producto tanto en composición como en características organolépticas.

Tabla 21.

Diseño experimental test estadístico ANOVA de dos vías para medir la variación en la concentración.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Muestra	6241	1	6241	1,09287608	0,298460007	3,940162717
Columnas	580948,84	1	580948,84	101,7313076	9,71168E-17	3,940162717
Interacción	2916	1	2916	0,510627568	0,47660136	3,940162717
Dentro del grupo	548219,52	96	5710,62			
Total	1138325,36	99				

Nota: Elaborado por Páez (2015)

Para comprobar la concentración del calostro se realizó el análisis en el equipo HPLC con la metodología aplicada para determinar la cinética de decremento, en la Tabla 22 se reportó los resultados que presentaron diferencia significativa ya que se considera un concentrado cuando aumenta la proporción de la sustancia en el muestra filtrada, observando que las áreas de los picos de acuerdo al tiempo de retención si aumentan gradualmente después del proceso de microfiltración.

Tabla 22.

Resultados análisis equipo HPLC marca Varian modelo ProStar 320 muestras proceso de microfiltración.

Resultado picos HPLC		
Muestras	Tiempo de retención	Área
Entrada 1	1,339	18450729
Permeado 1	1,347	344576
Concentrado 1	1,398	26401272
Entrada 2	1,368	24917354
Permeado 2	1,349	464568
Concentrado 2	1,363	25596325

Nota: Elaborado por Páez (2015)

CONCLUSIONES

La raza ganadera mayoritaria en Cayambe es la raza Holstein ya que es la raza más adaptable a las condiciones climáticas de la zona además es una raza especializada en producción de leche y producen mayor cantidad de calostro.

El calostro contiene grasa, sólidos totales, proteína, sólidos no grasos, vitaminas y minerales en altos porcentajes, así como también posee elementos protectores de la mucosa del intestino como aglutininas, interferón, interleukinas, factores de crecimiento y inmunoglobulinas que permiten el desarrollo del sistema inmunitario del recién nacido.

El calostro bovino contiene mayor cantidad de proteína total, grasa, casi el doble de sólidos totales y sólidos no grasos que la leche y concentración de lactosa es menor, aumenta progresivamente durante los ordeños posteriores, además contiene aproximadamente el doble de los sólidos totales presentes en la leche.

La concentración de proteínas totales disminuye después del inicio de la lactancia ya que la estimulación que produce el becerro aumenta la capacidad de síntesis de la glándula mamaria.

La acidez del calostro es por naturaleza acida y está estrechamente relacionada a la cantidad de microorganismos que posee, el manejo que se le da al animal al momento del ordeño y el procesamiento y almacenamiento que se le da al producto.

La concentración de inmunoglobulinas en calostro al momento del parto no es constante, el número de partos de la vaca no está directamente relacionado con la concentración, sino con el manejo, alimentación, patología y el tipo de parto.

Existe relación entre la densidad del calostro y su concentración de inmunoglobulinas por lo tanto la densidad constituye un indicativo de calidad, a mayor densidad mayor concentración de inmunoglobulinas y mejor calidad del calostro.

El análisis microbiológico del calostro es indispensable el contaje de bacterias por que las bacterias pueden competir con los sitios de absorción de las inmunoglobulinas del recién nacido y afectan el al transferencia de inmunidad pasiva en los animales, además en los procesos de tecnología de membranas es un factor importante a considerar ya que algunas bacterias apelmazan la membrana y complican el proceso.

El contaje de células somáticas en leche es indicador de la salud de la glándula mamaria aunque histológicamente es normal que niveles altos de células somáticas en calostro por el periodo seco de la vaca en gestación.

Los métodos cromatográficos permiten determinar y cuantificar sustancias, para determinar la cinética de decremento de inmunoglobulinas y al no poseer patrón específico de inmunoglobulinas el procedimiento aplicado permite determinar proteínas y el plasma sanguíneo es la fuente con mayor cantidad de proteínas en el bovino.

El tiempo de retención para determinar proteínas en calostro bovino con fases móviles de acetonitrilo, ácido trifluoroacético, y agua, a una longitud de onda de detección de 200 - 300 aplicando gradiente de elución se encuentran entre los minutos 1 y 2.

Al utilizar microfiltración la concentración de inmunoglobulinas si aumenta considerablemente además que se obtiene un producto libre de bacterias y el concentrado es independiente del proceso aplicado para concentrar debido a que depende de la calidad del calostro que se someta al proceso.

El proceso de microfiltración es capaz de reducir la cantidad de bacterias y de esporas, separar y concentrar componentes sin afectar sus propiedades físico químico y organoléptico ya que no utiliza agentes químicos en su proceso.

El concentrado de inmunoglobulinas de calostro bovino es independiente del proceso aplicado para la concentración por tecnología de membranas, no depende de la variación de parámetros en el proceso de microfiltración sino de composición y calidad del calostro aunque existe un considerable aumento de proteínas en el producto final.

De las tres haciendas analizadas la hacienda San Carlos es la que presenta valores más altos en el análisis fisicoquímico y microbiológico.

RECOMENDACIONES

Tomar en cuenta todas las medidas sanitarias para la manipulación del calostro, almacenar a temperaturas adecuadas para conservar los componentes especialmente las inmunoglobulinas que son de vital importancia para la salud del recién nacido.

Continuar con la investigación de inmunoglobulinas en calostro bovino ya que presenta un amplio potencial en el área terapéutica para pacientes con deficiencias inmunológicas tanto animales como humano.

Aplicar el método utilizado en el trabajo para obtener un producto concentrado de alta calidad y con elevados niveles de inmunoglobulinas para alimentación.

LISTA DE REFERENCIAS

- 3M Petrifilm . (19 de Marzo de 2015). *Guía de Interpretación 3M Petrifilm Placas para Recuento de Coliformes totales y Echerichia coli*. Obtenido de http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Petrifilm_guias.pdf
- Agudelo, D. A., & Bedoya, O. (2005). *Composición nutricional de la leche de ganado vacuno*. *Revista Lasallista de Investigación*, vol. 2, núm. 1, 38 - 42.
- Alais, C., & Godina, A. L. (1987). Principios de Técnica Lechera . En C. Alais, & A. L. Godina, *Ciencia de la Leche* (pág. 873). Barcelona : Reverté S. A.
- Araúz, E., Fuentes, A., Batista, J., Ramón, V., & Caballero, S. (2011). *Potencial calostropoietico en vacas multíparas 3/4 pardo suizo cebú y perfil químico, inmunológico y energético del calostro secretado en las primeras seis horas después del parto*. *REDVET Revista Electrónica de Veterinaria* , 3- 7.
- Arqués, J., Fernández, M., & Rodríguez, E. (2003). *Tratamientos combinados de bacteriocinas y otros sistemas inhibitorios para la mejora de la seguridad de los productos lácteos*. España: Universidad Complutense de Madrid.
- Arroyo, J. J., & Elizondo, J. A. (2014). Prevalencia de falla en la transferencia de inmunidad pasiva en ternras de lechería . *Agronomía Mesoamericana* , 279-285.
- Astudillo, R. (2011). Efecto de la suplementación con un reemplazante de calostro bovino sobre la inmunidad pasiva en terneros holstein friesland nacidos en invierno o primavera. *UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS*, 16-31.
- Bastardo, D., & Navarro, M. (2010). Valores de inmunoglobulinas en pacientes pediaticos tratados con calostro bovino. *servicio de inmunologia. Hospital Universitario Dr. Luis Razetti Barcelona Anzoátegui* , 17- 45.
- Bermudo, F., Cepeda, J. F., Juárez, M., Esteban, M., Hernández, E., & Prieto., I. (2010). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre proteínas lácteas, alergias y sus métodos de análisis. *Revista del Comité Científico N ° 13* , 37-57.
- BioGroup, A. (29 de Diciembre de 2014). *APS BioGroup*. Obtenido de Qué es El Calostro?: <http://es.apsbiogroup.com/colostrum/about.php>
- Brito, B., Picho, L., Vera, E., & Vaillant, F. (2010). Estudio de las Condiciones Óptimas deOperación para la Obtención de Jugo Clarificado de Granadilla (Passiflora Ligularis L.) através de la Microfiltración Tangencial. . *Revista Tecnológica ESPOL - RTE*.
- Camacho, M. E. (2009). Obtención de un concentrado proteico del suero de la leche de vaca utilizando tecnología de membranas. *Escuela Politécnica Nacional* .

- Campos, R., Carrillo, A. F., Loaiza, V., & Giraldo, L. (2007). El calostro: herramienta para la cría de terneros. *Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira. Departamento de Ciencia Animal.*, 1-10.
- Cano, P. (11 de Diciembre de 2014). *Inmunidad Pasiva en Bovinos*. Obtenido de <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/departamentos/rumiantes/archivos/INMUNIDAD%20PASIVA%20EN%20BOVINOS.doc>
- Castellano, M. E., Cádiz, A., Sánchez, L., & Borrero, H. (1997). Utilización de la ultrafiltración en la producción de las inmunoglobulinas. *Rev Cubana Farm.*
- Chacón, A. (2006). Comparación de la titulación de la acidez de leche caprina y bovina con hidróxido de sodio y cal común saturada. *Agronomía Mesoamericana 17* , 55-61.
- Chacón, A. C. (2006). Tecnologías de membranas en la agroindustria láctea. *Agronomía Mesoamericana 11(2)*, 243-264.
- Chauveau, C. (2007). La Producción Lechera en las Economías Campesinas de la Sierra, Dinamismo Económico y Pluriactividad. *Libre comercio y lácteos: la producción de leche en el Ecuador entre el mercado nacional y la globalización. SICA*, 45-50.
- Cifuentes, D. (2012). Empleo del plasma sanguíneo de bovino en productos cárnicos emulsionados como la mortadela. *Universidad Tecnológica Equinoccial. Facultad de Ciencias de la Ingeniería*, 1-87.
- Comparativa de ampliación E.D.A.R. (11 de diciembre de 2014). *ANEJO A. MEMBRANAS (ULTRAFILTRACIÓN)*. Obtenido de <https://upcommons.upc.edu/pfc/bitstream/2099.1/4432/2/Anejo%20A%20Membranas.pdf>
- COMUNIV. (2001). Importancia y uso del calostro en Bovinos. *Fisiología animal y nutrición* .
- Cornelli, U. (2010). ARD COLOSTRUM Modulador Fisiológico Antioxidante a base de calostro bovino liofilizado y pasteurizado para la protección del estrés oxidativo del tracto gastrointestinal. *Novever Cor. Con. International.*, 6- 19.
- Cortada, A., & Rodríguez, O. (2009). *Principales métodos de conservación de leches fermentada. Ciencia y Tecnología de Alimentos Vol.18, No. 2, 2008*. Cuba: D-Instituto de Investigaciones para la Industria Alimentaria.
- Echeto, O. E., Vargas, J. D., Oviedo, M. A., Vale, M. G., Castejón, O., & García, M. (2002). Niveles de inmunoglobulinas (IgM, IgG e IgA) en suero sanguíneo de búfalos de agua, bajo dos sistemas de amamantamiento diferentes. *Revista Científica, FCV- LUZ/ Vol. XII, N° #*, 193-210.
- Elizondo, J. (2007). Alimentación y Manejo del Calostro en el Ganado de Leche. *Agronomía Mesoamericana vol 18*, 271-281.
- Elizondo, J. (2007). Pasteurización del calostro: Mecanismo para disminuir la diarrea en terneras. *ECAG Informa N° 42*, 44-46.

- Elizondo, J. A. (2007). Importancia del calostro en la crianza de terneras. *ECAG informa* N° 89, 53-54.
- Elizondo, J. A. (2007). Importancia y Manejo de Calostro en el Ganado de Leche. *Curso RAPCO (Regional Animal Production Courses)*, 1-11.
- Elizondo, J. A. (27-32). Concentración de inmunoglobulinas totales en calostro de vacas en explotaciones lecheras de Costa Rica. *Agron. Mesoam.* 26, 2015.
- FEDNA. (30 de Abril de 2015). *NUtrición del Ternero Neonato* . Obtenido de XV Curso de Especialización. Avances en Nutrición y Alimentación Animal : <http://www.uco.es/servicios/nirs/fedna/capitulos/99CAP11.pdf>
- Flores, R., & Romero, A. (2013). Calidad del calostro y estatus inmunitario de terneras en su primera semana de vida por medio de la densidad de proteínas sericas en cuatro ganaderías lecheras del departamento de Sonsonate. *Universidad del Salvador* , 3-10.
- Fortín, A., & Perdomo, J. (2009). Determinación de la calidad del calostro bovino a partir de la densidad y de la concentración de IgG y del número de partos de la vaca y su efecto en el desarrollo de los terneros hasta los 30 días de edad. *ZAMORANO CARRERA DE CIENCIA Y PRODUCCIÓN AGROPECUARIA*, 1-11.
- FOSS. (2006). MilkoScan FT2 - state of the art dairy analyser. *FOSS*, 10.
- FOSS. (2012). BactoScan™ FC. The approved rapid method for determination of total bacteria in raw milk. *FOSS*, 1-8.
- FOSS. (2013). Fossomatic™ FC Somatic cell counting for raw milk testing. *FOSS*, 1-7.
- FOSS. (2013). MilkoScan™ FT + for routine compositional raw milk analysis. *FOSS*, 1-7.
- FOSS Analytical A/S. (2004). El éxito fácil. Recuento de células somáticas con el Fossomatic™ Minor. *Dedicated Analytical Solution*, 1 - 5.
- Giraldo, A., E.García, E., R.Coimbra, J. S., & Luera, W. E. (2010). Separación de proteínas de suero de leche por cromatografía líquida . *Scientia Agropecuaria*, 21-26.
- Godden, S. (2008). Colostrum Management for Dairy Calves. *Vet. Clin. Food Anim.* 24, 19 - 24.
- Gomis, V. (2008). Tema 4. Cromatografía de líquidos de alta resolución. *Docencia - Ingeniería y Arquitectura - Manuales / Temas GITE DIQUI Manuales / Temas.*, 4.7- 4.31.
- Hernández, J. (2008). Importancia del conteo de células somáticas en la calidad de la leche. *Revista Electrónica de Veterinaria Volumen IX Número 9*, 1-20.
- Hurley, W. L., & Theil, P. K. (2011). Perspectives on Immunoglobulins in Colostrum and Milk. *Nutrients* , 442 - 474.

- Ibáñez, R. (2007). Estudio de la ultrafiltración de proteínas modelo con membranas cerámicas. *Universidades de Granada Departamento de Ingeniería Química*, 5- 79.
- INEN 9. (2012). Leche cruda. requisitos. *norma técnica ecuatoriana NTE INEN 9:2012*, 1-4.
- Kutscher, C. R. (1998). Determinación de Células Somáticas en Calostro Post-Parto de vacas de lechería mediante dos métodos de recuento. *Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias.*, 2-10.
- Lozic, A. (2013). Calibración de refractómetro Brix para la determinación del contenido de inmunoglobulina G en calostro bovino. *Universidad Austral de Chile Facultad de Ciencias Agrarias Escuela de Agronomía.*
- Mella, C. (20 de Julio de 2014). *Factores a considerar para el logro de una adecuada alimentación con calostro.* Obtenido de http://www.agronomia.uchile.cl/a8/doc/extension/circular_extensio_panimal/circular%20de%20extension/n%B0%2029/articulo2-2003.pdf
- NORMA INEN. (1984). Leche y Productos Lácteos. Muestreo. *NTE INEN 0004*, 3.
- Norma Técnica Ecuatoriana INEN 0013. (1984). Leche. Determinación de la acidez titulable. *NTE INEN 0013.*, 1- 3.
- Norma Técnica Ecuatoriana INEN 11. (1984). Leche. Determinación de la densidad relativa. *NTE INEN*, 2.
- NTE INEN 003. (1984). Leche. Productos lácteos. terminología. *Norma Técnica Ecuatoriana*, 1.
- ORGANISMO NACIONAL DE NORMALIZACIÓN DEL COFOCALEC. (2012). Proyecto de norma mexicana. proy-nmx-f-700-cofocalec-2012. sistema producto leche – alimento – lácteo – leche cruda de vaca – especificaciones fisicoquímicas, sanitarias y métodos de prueba. . 5.
- Ozores, M. I., & Aguado, N. C. (15 de Enero de 2015). *Laboratorio de Técnicas Instrumentales UVA.* Obtenido de Cromatografía de líquidos HPLC: <http://laboratoriotecnicasinstrumentales.es/analisis-quimicos/cromatografa-de-liquidos-hplc>
- Requelme, N., & Bonifaz, N. (2012). Caracterización de Sistemas de Producción Lechera de Ecuador. *La Granja, Revista de Ciencias de la Vida. Universidad Politécnica Salesiana*, 55-69.
- Revelli, G. R., Sbodio, O. A., & Tercero, E. J. (2004). Recuento de bacterias totales en leche cruda de tambos que caracterizan la zona noroeste de Santa Fe y sur de Santiago del Estero. *Revista Argentina de Microbiología* 36, 145-149.
- Riquelme, L. F. (2010). Desarrollo por Ultrafiltración de un Concentrado Proteico a partir de Lactosuro . *Universidad Nacional de Colombia. Programas Interfacultades. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 10-27.

- Rocha, G., Bouda, J., Medina, M., Nuñez, L., & Yabuta, A. (1998). Impacto de la administración y calidad del calostro sobre los niveles de inmuglobulinas séricas en becerros. *Vet. Méx.*, 29, 161-166.
- Rodríguez, I. V., Manzano, S., Arranz, C. L., Bafalluy, I. M., Pozo, J. F., Lama, M. P., . . . Gómez, R. M. (1999). INMUGLOBULINAS DE ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA. ACTUALIZACIÓN DE SUS INDICACIONES . *Farm Hosp* , 271 - 288.
- Salazar, J. A. (2007). Alimentación y manejo del calostro en el ganado de leche. *Agronomía Mesoamericana*, 271-281.
- Sanchez, F. (2007). Estudio y diseño de una planta de producción de membranas cerámicas decoste reducido. *Universidad Barcelona*.
- Sánchez, J., Elizondo, J. A., & Arroyo, G. (2012). Estado inmunológico de Terneras y Terneros de Lechería en la Region Huertar Norte de Costa Rica. Año I . *Agronomía Mesoamericana Vol 23. núm. 2.*, 321- 327.
- Schnettler, V. A. (1998). Composición química del calostro de vacas de lechería. *UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE. Facultad de Ciencias Veterinarias*, 1-71.
- Shearer, J., Mohammed, H., Brenneman, J., & Tran., T. (1992). Factors associated with concentrations of immunoglobulins in colostrum at the first milking post-calving. *Prevent. Vet. Med.* 14, 143-154.
- SICA. (5 de Mayo de 2014). *Análisis e Interpretación del III Censo Agropecuario*. Obtenido de www.agroecuador.com/HTML/Censo/Censo.htm
- Torres, J. E. (2001). Utilización del ultrafiltrado de suero pasteurizado del queso para el desarrollo de uan bebida isotónica. *Zamorano. Carrera de Agroalimentos*, 6-10.
- UNAM . (30 de Abril de 2015). *Alimentación de Bovinos* . Obtenido de Enciclopedia Bovina : http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/e_bovina/1AlimentaciondeBovinos.pdf
- UNAM. (2010). Glándula mamaria y secrecion láctea. *Enciclopedia Bovina Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 417-427.
- Universidad Nacional Autónoma de México. (2007). Técnicas Cromatográficas. *Facultad de Química. Química Analítica Instrumental II*, 1-3.
- Vaillant, F., Pérez, A., & Viquez, F. (2004). Microfiltración tangencial: una alternativa innovadorapara la transformación de frutas tropicales. *La Alimentación Latinoamericana*(252),, 38-46.
- Valdivia, F., Martínez, A., & Ortiz, M. (18 de Mayo de 2014). *El Calostro Bovino Hiperimmune en la Terapéutica de Infecciones Humanas Gastroentéricas*. Obtenido de <http://www.uaa.mx/investigacion/revista/archivo/revista14/Articulo%203.pdf>

- Vasek, O. M., Cabrera, R., Coronel, G. J., Giori, G. S., & Fusco, A. J. (2004). ANALISIS DE RIESGOS EN LA ELABORACION DE QUESO ARTESANAL. *FACENA*, 13-22.
- WingChing, R., & Mora, E. (2013). COMPOSICIÓN DE LA LECHE ENTERA CRUDA DE BOVINOS ANTES Y DESPUÉS DEL FILTRADO. *AGRONOMÍA MESOAMERICANA* 24(1), 203-207.
- Xiao-yu, K., Yan-jun, T., Dan-dan, L., Nan-nan, Z., Jin-dou, J., & Ning., L. (2012). HPLC Analysis of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in Bovine Milk with C4 and C18 Column. *Journal of Northeast Agricultural University. ScienceDirect.*, 76-82.

ANEXOS

ANEXOS 1: Preparación de frascos de frascos para muestreo.

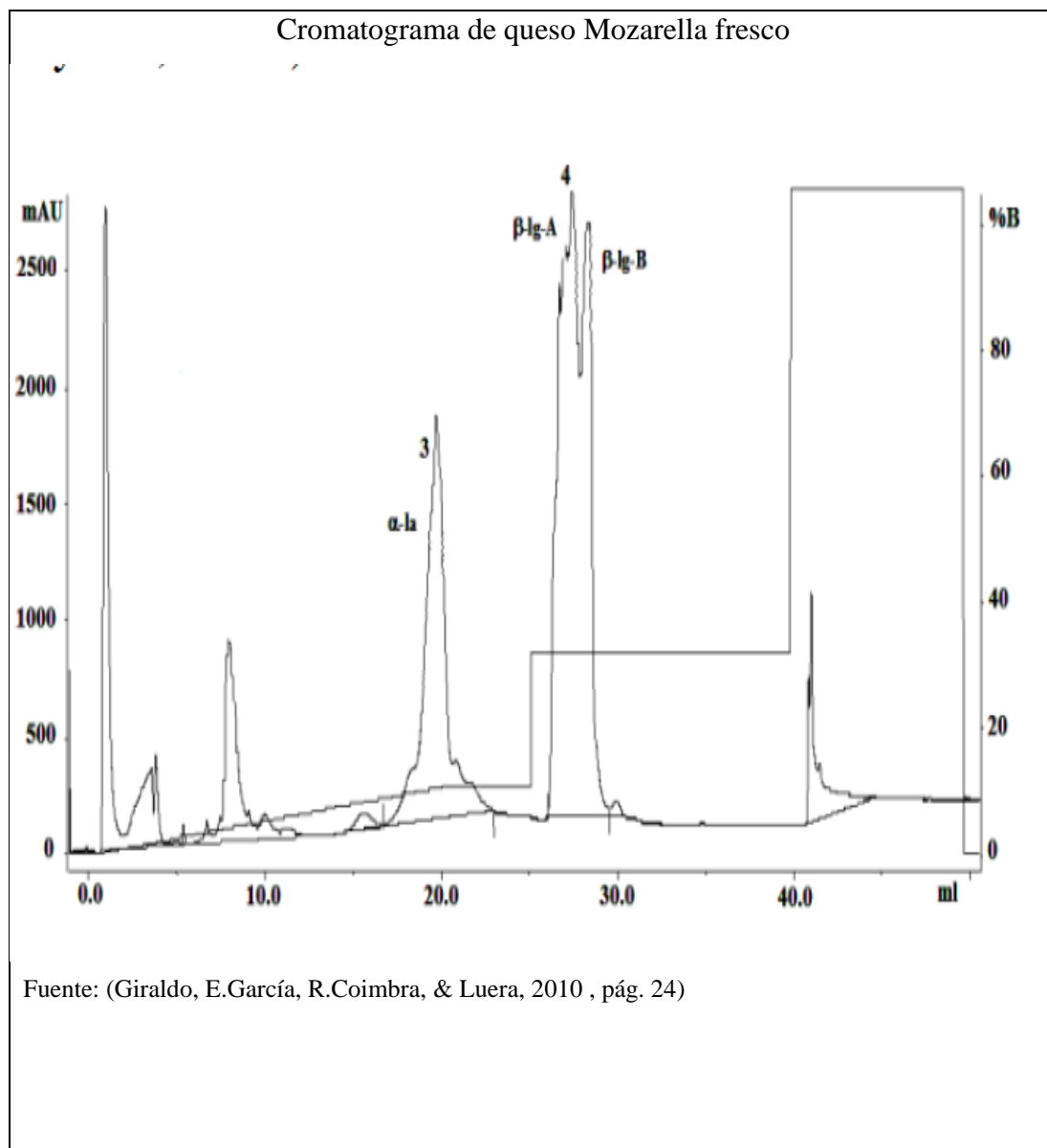
(NORMA INEN, 1984, pág. 3).

- Lavado de frascos con detergente y agua caliente.
- Limpieza con alcohol etílico al 70% (v/v).
- Exposición al vapor a 120°C, en autoclave, durante 20 min. Después de esta operación, el instrumental podrá guardarse si se mantienen condiciones estériles.
- Colocar en la estufa durante 2 horas.

Preparación de azidiol

- Disolver 1.5 g de Clorafenicol con 10ml de etanol en un vaso de precipitación de 250 ml.
- Disolver tres pastillas de cloranfenicol de 500mg en 10 ml de etanol por unos 3 minutos filtrar.
- Colocar en el vaso de 1000 ml 600 ml de agua purificada, 36 g de Azida de sodio PA y 45 g de Citrato de Sodio PA y el filtrado de la pastilla de cloranfenicol.
- Homogenizar con la ayuda de agitador magnético hasta la completa disolución usar calor hasta 50 °C.
- Dejar enfriar
- Completar el litro de solución con agua purificada.
- Adicionar 350 mg de azul de BromoFenol.
- Etiquetar.
- Mantener en refrigeración.

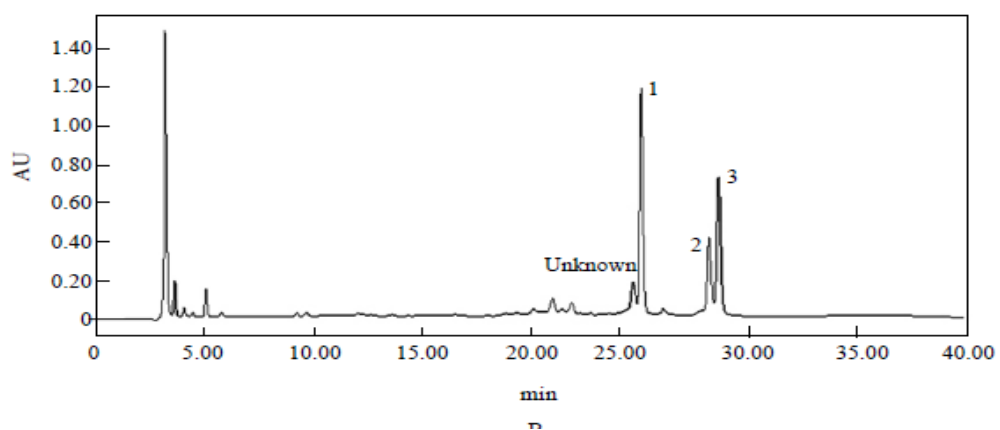
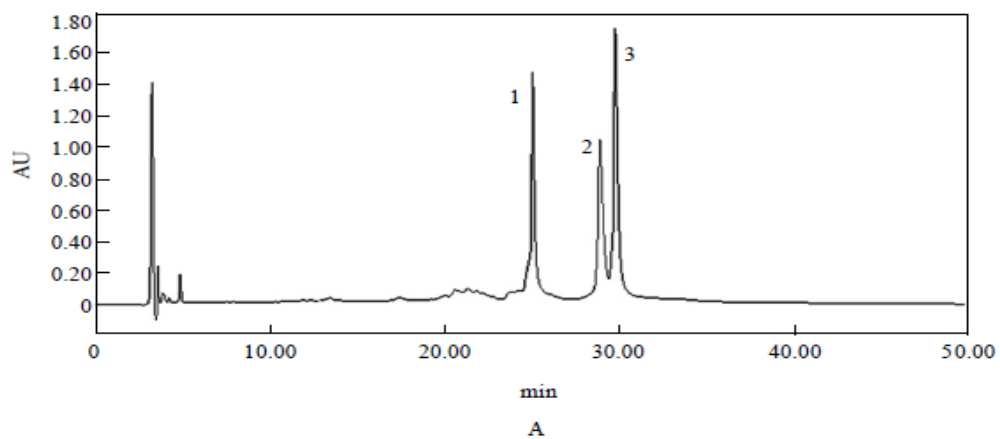
ANEXOS 2. Cromatogramas HPLC queso mozzarella fresco.



Fuente: (Giraldo, E.García, R.Coimbra, & Luera, 2010 , pág. 24)

ANEXOS 3. Cromatogramas HPLC proteínas lácteas.

Cromatograma detección de leche bovina con columnas C 18 (A) y C4 (B).



Cromatograma de detección de leche bovina con Shiseido Proteonavi columna C4 (250 mm×4.6 mm×5 μm) en A y Shiseido CAPCELL PAK SG 300 columna C18 (250 mm×4.6 mm×5 μm) en B. Pico 1 α-lactalbumin; Pico 2 β-lactoglobulin B; Pico 3 β-lactoglobulin A.

Fuente: (Xiao-yu, y otros, 2012, pág. 80)