

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**

**Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la  
Producción**

Evaluación del efecto del procesamiento en los niveles de aflatoxina M<sub>1</sub> en  
derivados lácteos

**PROYECTO INTEGRADOR**

Previo la obtención del Título de:

**Ingenieros en Alimentos**

Presentado por:

Evelyn Chumo Vergara

Alexander Tomalá Mantuano

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2022

## **DEDICATORIA**

Dedico el presente proyecto a Dios por guiarme con sabiduría, paciencia y fortaleza para realizar este gran logro. A mi madre Cristina Vergara, a mi hermana Paola Chumo y a mi novio Daniel Acuña por sus palabras de aliento, el apoyo, el sacrificio, la comprensión y amor incondicional que me han brindado a lo largo de toda mi vida y trayectoria universitaria, a quienes les debo mis logros y espero poder retribuirles todo lo que me han dado y mucho más. Gracias por creer en mis capacidades.

**Evelyn Chumo Vergara**

## **DEDICATORIA**

Con especial cariño, para Luisa de Jesús Mantuano y Gerónimo Javier Tomalá mis padres, quienes durante todos los años de mi vida me han dado ejemplo de valentía y superación.

Gracias por ser mi guía, apoyo y fortaleza incondicional; Por estar a mi lado y enseñarme a luchar por mis objetivos. Gracias por enseñarme valores que me han permitido alcanzar esta gran meta. Espero algún día poder retribuir todo su esfuerzo.

**Alexander Tomalá Mantuano**

## **AGRADECIMIENTOS**

Nuestro más sincero agradecimiento al tutor el PhD. Héctor Palacios por permitirnos formar parte de su investigación y por su valiosa guía, perseverancia y esfuerzo para lograr culminar este proyecto a pesar de las dificultades suscitadas. Al Ing. Luis Plaza por su colaboración incondicional y el uso del Laboratorio de Procesamientos de la FIMCP bajo su dirección para desarrollar parte del proyecto.

A todo el personal de los laboratorios de la carrera de Ingeniería de Alimentos, de Protal y de INIAP que colaboraron de manera directa e indirecta en la realización este proyecto.

¡A todos, Gracias!

## DECLARACIÓN EXPRESA

"Los derechos de titularidad y explotación, nos corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; *Evelyn Cristina Chumo Vergara* y *Alexander Javier Tomalá Mantuano* y damos nuestro consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual"



Evelyn Cristina Chumo  
Vergara



Alexander Javier Tomalá  
Mantuano

## **EVALUADORES**

**MSc. Galo Chuchuca Morán**  
PROFESOR DE LA MATERIA

**PhD. Héctor Palacios Cabrera.**  
PROFESOR TUTOR

## RESUMEN

La Aflatoxina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) es un potente carcinógeno y principal contaminante de la leche, proveniente del metabolismo hepático de la vaca al consumir balanceado contaminado de Aflatoxina B<sub>1</sub>, ambos muy termorresistente. En el último trimestre del 2021 el uso de balanceado para el aumento en la producción del sector lechero ha incrementado un 2.3%; por otro lado, al menos el 25% de la materia prima de este balanceado presenta contaminación. El presente proyecto busca evaluar el efecto del procesamiento sobre la cinética de la AFM<sub>1</sub> en productos lácteos populares utilizando métodos inmunocromatográficos para su determinación. Se elaboraron 6 productos lácteos: manjar de leche, leche en polvo, leche condensada, yogurt, queso y mantequilla cuya materia prima inicial se contaminó intencionalmente con 0.125 y 0.1 ppb de AFM<sub>1</sub>. Se recolectó por duplicado un total de 24 muestras cada una de 300g: 1) leche sin contaminar; 2) leche contaminada y; 3) producto terminado. La determinación de AFM<sub>1</sub> se realizó por ensayos rápidos inmunocromatográficos (ELISA) con sensibilidad de 0.5 y 0.05 ppb para AFM<sub>1</sub>. El estudio demostró que el procesamiento térmico tuvo reducciones significativas de AFM<sub>1</sub> en el manjar, leche en polvo y leche condensada del 30%, 60% y 23%, respectivamente, contrario a los resultados obtenidos en el procesamiento de coagulación en quesos donde la reducción fue del 23%. Sin embargo, la máxima reducción se dio en el yogurt cuya concentración de AFM<sub>1</sub> se redujo un 87%. Se observa efectos positivos del procesamiento en la reducción de AFM<sub>1</sub> en derivados lácteos; sin embargo, es necesario seguir profundizando su estudio.

**Palabras Clave:** AFM<sub>1</sub>, procesamiento, derivados lácteos, leche contaminada, concentraciones, inmunocromatografía ELISA.

## **ABSTRACT**

*Aflatoxin M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) is a potent carcinogen and main contaminant of milk, coming from the hepatic metabolism of the cow by consuming feed contaminated with Aflatoxin B<sub>1</sub>, both very heat-resistant. In the last quarter of 2021, the use of feed for the increase in the production of the dairy sector increased by 2.3%; on the other hand, at least 25% of the raw material of this feed presents contamination. The present project seeks to evaluate the effect of processing on the kinetics of AFM<sub>1</sub> in popular dairy products using immunochromatographic methods for its determination. Six dairy products were made: Sweetened condensed milk, milk powder, condensed milk, yogurt, cheese and butter whose initial raw material was intentionally contaminated with 0.125 and 0.1 ppb of AFM<sub>1</sub>. A total of 24 samples each one of 300g were collected in duplicate: 1) uncontaminated milk; 2) contaminated milk and 3) finished product. The determination of AFM<sub>1</sub> was performed by rapid immunochromatographic assays (ELISA) with sensitivity of 0.5 and 0.05 ppb for AFM<sub>1</sub>. The study showed that thermal processing had significant reductions of AFM<sub>1</sub> in the sweetened condensed milk, milk powder and condensed milk of 30%, 60% and 23%, respectively, contrary to the results obtained in the coagulation processing in cheeses where the reduction was 23%. However, the maximum reduction occurred in yogurt whose concentration of AFM<sub>1</sub> was reduced by 87%. Positive effects of processing are observed in the reduction of AFM<sub>1</sub> in dairy products; however, further studies are needed.*

**Keywords:** *AFM<sub>1</sub>, processing, dairy products, contaminated milk, concentrations, immunochromatography ELISA*

# ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	I
<i>ABSTRACT</i> .....	II
ÍNDICE GENERAL .....	III
ABREVIATURAS.....	V
SIMBOLOGÍA .....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS .....	VII
ÍNDICE DE TABLAS.....	VIII
CAPÍTULO 1.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Descripción del problema .....	2
1.2 Justificación del problema .....	4
1.3 Objetivos .....	5
1.3.1 Objetivo General .....	5
1.3.2 Objetivos Específicos.....	5
1.4 Marco teórico.....	5
1.4.1 Aflatoxinas .....	5
1.4.2 Aflatoxina M <sub>1</sub> .....	6
1.4.3 Estabilidad de la AFM <sub>1</sub> en leche y productos lácteos .....	7
1.4.4 Legislación sobre la Aflatoxina M <sub>1</sub> en leche y productos lácteos .....	9
1.4.5 Determinación de Aflatoxina M <sub>1</sub> en leche y productos lácteos .....	9
CAPÍTULO 2.....	12
2. METODOLOGÍA .....	12
2.1 Obtención de materia prima e insumos .....	12
2.2 Preparación de muestras de leche con AFM <sub>1</sub> .....	12
2.3 Elaboración de productos lácteos .....	13

2.4	Toma de muestras.....	14
2.5	Preparación de las muestras.....	15
2.6	Determinación de AFM <sub>1</sub> en leche y derivados lácteos .....	16
2.7	Análisis de datos .....	17
CAPÍTULO 3.....		18
3.	RESULTADOS Y ANÁLISIS .....	18
3.1	Resultados de los diferentes ensayos.....	18
3.2	Análisis de los resultados .....	23
CAPÍTULO 4.....		27
4.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	27
4.1	Conclusiones.....	27
4.2	Recomendaciones.....	27
BIBLIOGRAFÍA		
APÉNDICES		

## ABREVIATURAS

AF	Aflatoxinas
AFB <sub>1</sub>	Aflatoxina B <sub>1</sub>
AFB <sub>2</sub>	Aflatoxina B <sub>2</sub>
AFG <sub>1</sub>	Aflatoxina G <sub>1</sub>
AFG <sub>2</sub>	Aflatoxina G <sub>2</sub>
AFM <sub>1</sub>	Aflatoxina M <sub>1</sub>
AFQ <sub>1</sub>	Aflatoxina Q <sub>1</sub>
AFB <sub>2a</sub>	Aflatoxina B <sub>2a</sub>
AFP <sub>1</sub>	Aflatoxina P <sub>1</sub>
Aw	Actividad de agua
BIS	Bureau of Indian Standards
CYP450	Citocromo P450
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
FDA	Food and Drug Administration
IARC	International Agency for Research on Cancer
LMR	Límite Máximo de Residuos
LPM	Límites Máximos Permisibles
NaCl	Cloruro de Sodio
UE	Unión Europea
UHT	Ultra High Temperature
UV	Ultravioleta
TLC	Thin Layer Chromatography
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
FL	Fluorescencia
MS	Mass Spectrometry
LC	Liquid Chromatography
GC	Gas Chromatography
AOAC	Association of Official Analytical Chemist
UV-Vis	Ultraviolet-Visible

## SIMBOLOGÍA

%	Porcentaje
°C	Grados Centígrados
µg	Microgramo
g	Gramos
kg	Kilogramo
ppb	Partes por billón
µL	Microlitros
rpm	Revoluciones por minuto
v/v	Volumen por volumen
mL	Mililitros
m	Minutos
MTM	Millones de Toneladas Métricas

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Gráfico de conversión de la AFB1 a AFM1 .....	6
Figura 1.2 Gráfico del metabolismo hidroxilado de la AFB1 .....	7
Figura 2.1 Diagrama general de la elaboración de productos lácteos .....	14
Figura 3.1 Cinética de la AFM <sub>1</sub> durante los procesos de elaboración de productos lácteos .....	22

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Regulación de AFM <sub>1</sub> en la leche y productos lácteos en los diferentes países .....	11
Tabla 2.1 Ingredientes para el desarrollo de los productos lácteos.....	12
Tabla 2.2 Condiciones de procesamiento para los diferentes productos lácteos .....	15
Tabla 3.1 Determinación de presencia de AFM <sub>1</sub> en materia prima mediante Kit de ensayo ELISA con LD de 0.05 ppb .....	18
Tabla 3.2 Determinación de presencia de AFM <sub>1</sub> mediante kit de ensayo ELISA con LD de 0.5 ppb en muestras de productos lácteos .....	19
Tabla 3.3 Determinación de presencia de AFM <sub>1</sub> en productos lácteos con Kit de ensayo ELISA con LD de 0.05 ppb .....	21
Tabla 3.4 Estimación de la concentración de AFM <sub>1</sub> en productos lácteos con Kit de ensayo ELISA .....	22
Tabla 3.5 Pruebas de múltiples rangos para el porcentaje de reducción de AFM <sub>1</sub> por ensayo.....	23
Tabla 3.6 Diferencias significativas entre procesos y el porcentaje de reducción de AFM <sub>1</sub> .....	23

# CAPÍTULO 1

## 1. INTRODUCCIÓN

La leche es uno de los alimentos de mayor consumo a nivel mundial debido a que es rica en macro y micronutrientes esenciales que ayudan al crecimiento y la salud del ser humano, principalmente los niños, por ende, se busca que este alimento esté exento de contaminantes que puedan ser tóxicos, incluidas las micotoxinas (Sumon, *et al.*, 2021). Por otro lado, la leche es altamente susceptible a contaminaciones químicas y biológicas provenientes ya sea del suelo, de las prácticas agrícolas, durante su procesamiento e incluso su almacenamiento, lo que constituye un problema para la salud de la población (Reyna & Arteaga, 2022).

Las micotoxinas son metabolitos carcinogénicos que se sintetizan durante el metabolismo secundario de hongos toxigénicos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, los cuales se encuentran extendidos sobre una amplia cantidad de cereales y piensos que son destinados a la alimentación de seres humanos y animales (Bervis, 2019). A nivel mundial se estima que el 25% de los cultivos como mínimo se encuentran contaminados con micotoxinas en base a los estudios estadísticos de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, 2022). Las Aflatoxinas son micotoxinas producidas principalmente por los hongos *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* y *A. niger* siendo la Aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), de entre 18 tipos existentes, el metabolito de mayor riesgo y toxicidad para la salud pública y el mayor contaminante natural en una gran variedad de alimentos de consumo humano como cereales, leguminosas, frutos secos, vinos, especias, leche y sus derivados debido al amplio rango de condiciones ambientales que poseen estos hongo para su crecimiento y producción de micotoxinas que oscila entre los 11 y 36°C (Cravero, Juncos, & Olmedo, 2020).

Una de las características de la AFB<sub>1</sub> es su alta solubilidad lipídica por lo que una vez ingerida por el ganado lechero es absorbida por el intestino y llega al hígado en donde pasa por un proceso de biotransformación en Aflatoxina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>), un metabolito altamente carcinogénico, teratogénico y mutagénico que luego es

segregado a la orina, heces y leche de la vaca (Puga-Torres, Salazar, Cachiguango, Cisneros, & Gómez-Bravo, 2020).

## 1.1 Descripción del problema

En los últimos años se ha evidenciado una creciente demanda de alimentos agrícolas debido al incremento poblacional y bovino a nivel mundial, y como consecuencia un aumento en la producción del sector agrícola para cumplir con dicha demanda; siendo el sector ganadero el principal consumidor de alimentos balanceados con una aportación del 40% del valor de la producción mundial del sector agrícola. De acuerdo con datos estadísticos la producción de alimento balanceado, esta ha presentado un aumento del 2.3% en el último trimestre del 2021 con 1.235 millones de toneladas métricas (MTM) (Alltech, 2022). Los principales ingredientes del balanceado son el salvado de maíz y de arroz que aportan un alto contenido vitamínico y proteico al ganado bovino y a su vez un incremento en la producción de leche, por lo que el uso de este alimento es cada vez más acogido por los productores lecheros. Sin embargo, la elaboración de balanceado a partir de cereales contaminados con aflatoxinas es el principal problema de los productores a nivel mundial, especialmente de aquellos en vías de desarrollo (Nishimwe, *et al.*, 2022; Gutiérrez, *et al.*, 2018).

Debido al alto grado de toxicidad que poseen las aflatoxinas sobre la salud humana y animal, y a su estabilidad química ante los diferentes tratamientos físicos, químicos o biológicos durante los procesamientos alimentarios, la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) de los EE. UU. ha fijado límites permisibles de aflatoxinas totales (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>) de 20 µg/kg en granos y cereales de consumo humano y animal al igual que la Oficina de Normas Indias (BIS por sus siglas en inglés) en India; mientras que la Unión Europea (UE) presenta valores más estrictos al respecto con 5 µg/kg para balanceado bovino y 20 µg/kg en piensos (FDA, 2019; Thakur, Singh, De, & Dey, 2022). Por otro lado, la leche al ser una de las principales fuentes de nutrientes en la dieta de personas y animales, también puede convertirse en un vehículo para contaminantes como la AFM<sub>1</sub>, que es el principal contaminante con efecto toxicológico presente en la leche y se forma por medio del metabolismo hidroxilado de la AFB<sub>1</sub> ingerida en el balanceado por el ganado lechero.

Estudios sobre la termorresistencia de este metabolito como el de Tarazona *et al.*, (2020) han evidenciado la estabilidad de la AFM<sub>1</sub> frente a procesos térmicos de pasteurización, evaporación y UHT de la leche en donde las concentraciones de AFM<sub>1</sub> se han visto inalteradas (Tarazona-Manrique, Andrade-Becera, & Vargas-Abella, 2020). Por otro lado, Cravero, (2019) en su estudio sobre la detoxificación de AFM<sub>1</sub> en queso, demostró que hubo una reducción significativa entre 0.44 y 1.5% de la toxina mediante el uso de agentes detoxificantes como el Cloruro de Sodio (NaCl) y temperaturas superiores a 85°C durante el procesamiento de la leche (Cravero C. , 2019).

Como antecedente se conoce que los niveles de AFM<sub>1</sub> que se transfieren a la leche oscilan entre el 0.5 y 3% del contenido inicial de AFB<sub>1</sub>, este remanente puede variar según el animal, el día de ordeño de leche, entre otros factores y en casos de ganado de alto rendimiento estos niveles pueden llegar hasta un 6,2% (Sumon, *et al.*, 2021; Reyna & Arteaga, 2022). Ante ello, legislaciones como la UE ha decretado un Límite Máximo de Residuos (LMR) de 0.05 µg/kg de AFM<sub>1</sub> en leche cruda, leche pasteurizada, leche ultra pasteurizada y leche fluida, mientras que en leches de fórmula infantil el LMR se ha establecido un valor inferior de 0.025 µg/kg puestos que los recién nacidos y niños son la población más susceptible a la exposición de alimentos contaminados; por otra parte, la FDA indica LMR hasta 0.5 µg/kg en leche y otros productos lácteos (Nishimwe, *et al.*, 2022; Quevedo, Cantú, & Trujillo, 2020).

En Ecuador el LMR de AFM<sub>1</sub> de acuerdo con la Normativa Técnica Ecuatoriana (NTE) INEN 009:2015, basada en el Codex Alimentarius, establece un valor de 0.5 µg/kg solo en leches crudas, al igual que el LMR permitido en países como Estados Unidos, Australia, México, Brasil (Quevedo, Cantú, & Trujillo, 2020; Puga Torres, 2022). Pese a que la AFM<sub>1</sub> tiene regulaciones en alrededor de más de 80 países, dichos valores no ofrecen una armonización internacional (Puga Torres, 2022; Quevedo, Cantú, & Trujillo, 2020). Por lo que es necesario realizar estudios más a fondo sobre la influencia del procesamiento térmico de la leche para la elaboración de derivados lácteos de primera necesidad que, en el tiempo actual, no cuentan con una regulación de límites permisibles de AFM<sub>1</sub>.

## 1.2 Justificación del problema

La contaminación de la leche y sus derivados con AFM<sub>1</sub> es un problema latente en todo el mundo debido a sus efectos carcinogénicos, mutagénicos y teratogénicos que la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC) la categoriza como un carcinógeno Tipo 1 (causante de cáncer en humanos); además de que no se dispone de información suficiente sobre su efecto en el ser humano por las dificultades legales, éticas y morales de realizar experimentaciones en base a la ingesta de alimentos contaminados (Jáuregui-Jiménez & Celis-Vielman, 2020). Hasta el momento solo se han realizado estudios sobre la prevalencia de AFM<sub>1</sub> en leche cruda, pasteurizada y UHT, formulas infantiles y quesos cuyos LMP varían desde 0.05 a 1 µg/kg según el país y sus condiciones ambientales; el producto y su preferencia de consumo; y la legislación a cargo (Quevedo, Cantú, & Trujillo, 2020). Sin embargo, existen productos como leches concentradas, leches fermentadas, cremas y precitados altamente consumidos a nivel mundial de los cuales no se ha encontrado registro de cómo afecta su procesamiento en la cinética de AFM<sub>1</sub> presente en la materia prima. Asimismo, no existen datos legislativos que regulen los LMR de la toxina en dichos productos, exceptuando países como Holanda cuyas normativas vigentes establecen valores de 0.2 y 0.02 µg/kg de AFM<sub>1</sub> en mantequillas y, Australia y Suiza que cuentan con límites de tolerancia de 0.25 µg/kg de AFM<sub>1</sub> en quesos (Quevedo, Cantú, & Trujillo, 2020).

Por lo precedido, el presente trabajo de investigación tiene como objetivo evaluar el efecto del procesamiento en la obtención de productos derivados de la leche, tales como queso, yogurt, leche en polvo, mantequilla, leche condensada y manjar de leche, sobre la cinética de la AFM<sub>1</sub> presente en la leche inicial. De esta manera se marcaría un punto de partida para que la industria láctea pueda evidenciar los efectos del procesamiento sobre la AFM<sub>1</sub> y tomar acciones innovadoras sobre el manejo de la leche contaminada, así como el desarrollo de estrategias de control por parte de legislaciones nacionales e internacionales para estos productos.

## 1.3 Objetivos

### 1.3.1 Objetivo General

Evaluar el efecto del procesamiento de seis derivados lácteos sobre los niveles de la Aflatoxina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) presente en la leche inicial.

### 1.3.2 Objetivos Específicos

- Elaborar seis tipos de derivados lácteos: leche en polvo, leche condensada, manjar de leche, yogurt, queso y mantequilla a partir de leche contaminada intencionalmente con estándares de AFM<sub>1</sub>.
- Evaluar el efecto que tuvo el procesamiento sobre la concentración de AFM<sub>1</sub> durante la obtención de los derivados lácteos mediante métodos de inmunocromatografía.
- Verificar si los resultados de AFM<sub>1</sub> obtenidos en el estudio están dentro de los límites permisibles de AFM<sub>1</sub> establecidos por las normativas nacionales.

## 1.4 Marco teórico

### 1.4.1 Aflatoxinas

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos de manera natural durante el metabolismo de hongos, se encuentran como contaminantes químicos en una gran variedad de cultivos de cereales, piensos y alimentos de consumo humano y animal. Las aflatoxinas (AF) son consideradas las micotoxinas más tóxicas producidas por hongos filamentosos del género *Aspergillus parasiticus*, *A. nomius* y *A. flavus*. Se encuentran distribuidas en todo el mundo y debido a sus efectos carcinogénicos, hepatogénicos, mutagénicos y teratogénicos representan un alto riesgo para la salud tanto en el ser humano como en animales, y existen alrededor de 18 tipos de aflatoxinas de las cuales cuatro son las principales: Aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub> (Vaz, Cabral, Rodrigues, & Venancio, 2020). El crecimiento de las aflatoxinas se ve favorecido en ambientes tropicales o de almacenamiento con humedades relativas, Aw y temperatura que oscilan entre 80-90%, 0.75-0.83 y 25-36°C, respectivamente. Aunque también se ha dado que ciertas estirpes de *A. flavus* crecen a temperaturas entre 6 y 45°C siendo su óptima a 37°C, asimismo se ha verificado que la temperatura de máxima producción de micotoxinas es a 30°C (Altamirano, 2019; Cravero C. , 2019).

Las aflatoxinas químicamente pertenecen a una familia de compuestos difuranocumarinas los cuales poseen un resto dihidrofurofurano fusionado, la aflatoxina B<sub>1</sub> es caracterizada por presentar una unión entre el anillo lactona y el anillo ciclopentenona en la estructura de la cumarina, así como por su alta emisión de fluorescencia cuando es expuesta a luz UV; la Aflatoxina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) es el metabolito principal de la hidroxilación de la AFB<sub>1</sub> (Marchese, *et al.*, 2018). De acuerdo con lo ya mencionado por la IARC la AFB<sub>1</sub> es el carcinógeno natural más potente por lo que se considera de clase 1, al igual que su degradación a AFM<sub>1</sub> a pesar de tener un efecto menos potente que su antecesor, ambas toxinas están relacionados con el desarrollo cáncer de hígado entre otras enfermedades en personas y animales expuestos a alimentos contaminados (Vaz, Cabral, Rodrigues, & Venancio, 2020).

#### 1.4.2 Aflatoxina M<sub>1</sub>

Se conoce que la AFM<sub>1</sub> es secretada en la leche por la glándula mamaria de los mamíferos durante el ordeño y solo del 0,3 % al 6,2 % del total de AFB<sub>1</sub> ingerido a través de alimento contaminado dentro un tiempo de 12 a 24 horas se convierte en AFM<sub>1</sub>, también conocida como toxina de la leche, ver Figura 1.1 (Marchese, *et al.*, 2018; Tarazona-Manrique, Andrade-Becera, & Vargas-Abella, 2020).

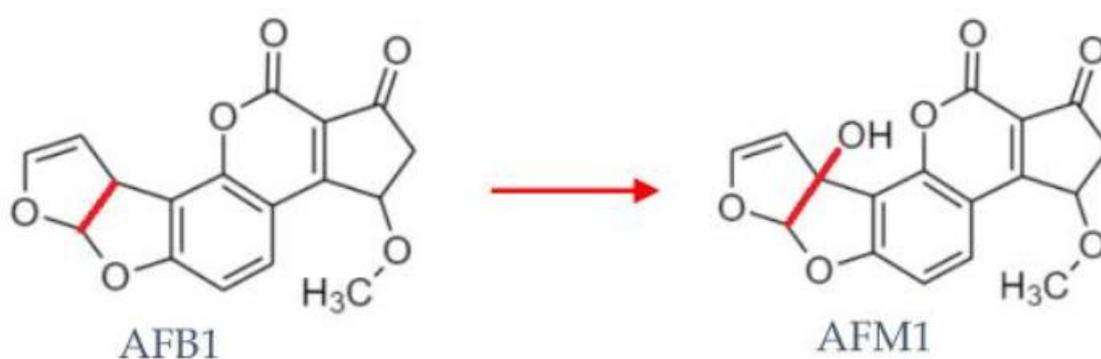


Figura 1.1 Gráfico de conversión de la AFB<sub>1</sub> a AFM<sub>1</sub> [Vaz, Cabral, Rodrigues, & Venancio, 2020]

La conversión de AFB<sub>1</sub> a AFM<sub>1</sub> se inicia en el hígado del bovino en donde las enzimas Citocromo P450 (CYP450), particularmente las CYP1A1, CYP1A2, CYP2A6 y CYP3A4, inician la transformación de la AFB<sub>1</sub> mediante hidrólisis enzimática, producto de esta degradación se obtienen cuatro metabolitos: Aflatoxina Q<sub>1</sub> (AFQ<sub>1</sub>), AFB<sub>2a</sub>, AFP<sub>1</sub> y AFM<sub>1</sub>, siendo esta última la de mayor preocupación para la industria de lácteos por su alta toxicidad, termorresistencia, alta insolubilidad en agua y baja en solvente orgánicos polares que dificultan su degradación durante el procesamiento de alimentos; mientras que los otros tres metabolitos son resultado de la detoxificación de la AFB<sub>1</sub> en el hígado, ver Figura 1.2 (Marchese, *et al.*, 2018).

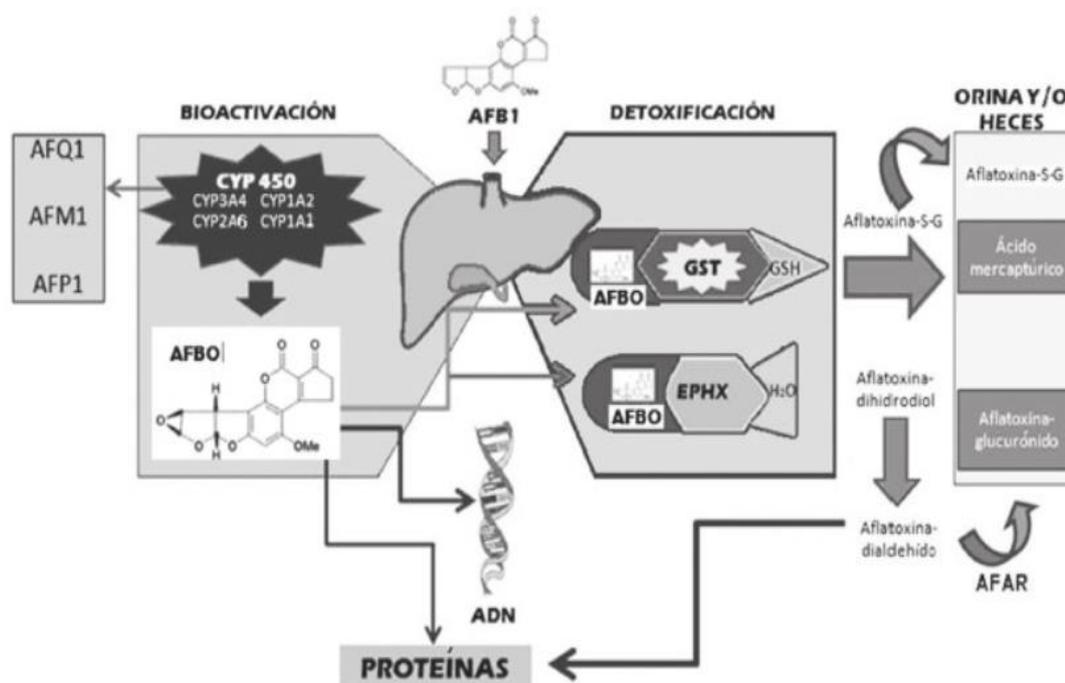


Figura 1.2 Gráfico del metabolismo hidroxilado de la AFB<sub>1</sub> [Carreño, A., Hurtado, J., & Navas, M. 2014]

### 1.4.3 Estabilidad de la AFM<sub>1</sub> en leche y productos lácteos

Estudios de varios autores concuerdan que la AFM<sub>1</sub> posee una estabilidad térmica muy alta por encima de los 250°C y resisten pH de 3 a 10, por lo que difícilmente se degrada durante el procesamiento de la leche a sus derivados, representando un gran problema para la industria lechera que busca la reducción de contaminantes durante el procesamiento de derivados lácteos, puesto que tratamientos térmicos convencionales como la termalización, pasteurización y ultra pasteurización cuyas

temperaturas varían entre los 60 y 135°C, no presentan efectos de reducción significativos sobre la cinética de la AFM<sub>1</sub> (Tarazona-Manrique, Andrade-Becera, & Vargas-Abella, 2020; Quevedo, Cantú, & Trujillo, 2020; Marchese, et al., 2018; Csapó, Albert, & Sipos, 2020).

Asimismo, se han encontrado estudios que demuestran una mayor concentración de esta toxina en la elaboración de quesos y yogurt debido a que la AFM<sub>1</sub> además de ser estable térmicamente posee gran afinidad con las proteínas de la leche, particularmente con la caseína la cual aumenta su hidrofobicidad durante la coagulación enzimática y/o ácida para la fabricación de dichos productos; y como consecuencia la AFM<sub>1</sub> se fusiona a la caseína aumentando su concentración (Cravero, Juncos, & Olmedo, 2020; Vallejos, 2016; Csapó, Albert, & Sipos, 2020; Cravero C. , 2019). Por otro lado, Omar, (2016) en su investigación sobre productos concentrados como la leche en polvo y leche condensada presentan una mayor incidencia de AFM<sub>1</sub> en derivados lácteos, como es el caso de países como Jordania donde la concentración de AFM<sub>1</sub> es superior a los LMP de la Unión Europea para fórmulas infantiles en el 85% de las muestras analizadas (Omar, 2016), o Indonesia donde se analizó el nivel de AFM<sub>1</sub> en muestras de fórmulas infantiles y se encuentro que el 55% estuvo en un rango de concentración mayor de 0,05 y 2 µg/kg, mientras que para la leche condensada el valor de AFM<sub>1</sub> estaba entre 0,02 y 5 µg/kg en el 43% de las muestras analizadas (Wijaya, Wardayanie, Widjajanti, & Silitonga, 2018).

Paralelamente, Cravero, (2019) también menciona en su trabajo de investigación sobre antecedentes en la estabilidad de AFM<sub>1</sub> de una pequeña reducción de AFM<sub>1</sub> del 12 al 32% en tratamientos térmicos a temperaturas entre los 71 y 120°C durante 30 minutos, mientras que, en procesos de UHT, pasteurización, secado por aspersion y evaporación se ha obtenido reducciones de hasta 86% de AFM<sub>1</sub> (Cravero C. , 2019). En síntesis, la reducción de la AFM<sub>1</sub> en productos lácteos dependerá del proceso, temperatura y tiempo a los que se exponga la leche contaminada; sin embargo, la termoestabilidad de esta aflatoxina durante el tratamiento térmico hoy en día sigue siendo un problema latente.

#### **1.4.4 Legislación sobre la Aflatoxina M<sub>1</sub> en leche y productos lácteos**

A nivel internacional existen varias regulaciones sobre los Límites Máximos Residuales (LMR) de la AFM<sub>1</sub> tanto en leche cruda, fluida, fórmulas infantiles y en productos lácteos, las cuales varían de 0 a 1 µg/kg según el producto y el país en cuestión, ver Tabla 1.1. Sin embargo, aun existiendo la regulación de esta toxina en aproximadamente 80 países, los LMR de estos valores no establecen un estándar internacional al respecto (Puga-Torres, Salazar, Cachiguango, Cisneros, & Gómez-Bravo, 2020; Quevedo, Cantú, & Trujillo, 2020).

En Ecuador los LMR requeridos para la AFM<sub>1</sub> están regulados por la Normativa Técnica Ecuatoriana (NTE) INEN 009:2015, basada en el Codex Alimentario y FAO de EE. UU., donde se establece un LMR de 0.50 µg/kg de la toxina en leche cruda, el cual supera al establecido por la Unión Europea (UE) de 0.05 µg/kg en leche y 0.025 µg/kg para fórmulas infantiles (Vallejos, 2016) . No obstante, no se cuenta con datos regulados de LMR para los diferentes derivados lácteos que se expenden en el país.

#### **1.4.5 Determinación de Aflatoxina M<sub>1</sub> en leche y productos lácteos**

##### **1.4.5.1 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)**

La cromatografía en capa fina (TLC), la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-FL) con detección de fluorescencia o la espectrometría de masas (MS) se han utilizado ampliamente en laboratorios para el análisis de aflatoxinas totales, siendo TLC el primer método estándar de la AOAC utilizado para el análisis de AFM<sub>1</sub> (Maggira, Ioannidou, Sakaridis, & Samouris, 2021). Durante la última década, ha sido reemplazada por otras técnicas cromatográficas, como la cromatografía líquida (LC), la cromatografía de gases (GC), la espectrometría de masas (MS/MS), y de Luz Ultravioleta Visible (UV-Vis). El método de HPLC-FL mediante derivatización post-columna es el método de referencia para la determinación cualitativa y cuantitativa de micotoxinas más utilizado para la determinación de AFM<sub>1</sub> en leche, puesto que el detector de fluorescencia que poseen es excelente para detectar los máximos de emisión y excitación de cada toxina dándole así la habilidad de detectar varios componentes en una misma muestra (Csapó, Albert, & Sipos, 2020).

La cromatografía es un método analítico basado en la extracción, purificación y posterior cuantificación del analito de interés. Su principio se basa en la separación física de los constituyentes de una muestra en función de su afinidad entre dos fases: una fase estacionaria ubicada en una columna de inmunoafinidad con anticuerpos específicos; y una fase móvil formada por una mezcla de solventes la cual fluirá a través de la fase estacionaria. Una vez que la fase móvil pasa a través de la columna, los anticuerpos se quedan con el antígeno (AFM<sub>1</sub>) de la muestra formándose el complejo antígeno-anticuerpo. Posteriormente se realiza el lavado de la columna para extraer la AFM<sub>1</sub> con una dilución de metanol: acetonitrilo. Finalmente, la cantidad liberada de AFM<sub>1</sub> (eluido) se somete a HPLC el cual está vinculado a un detector de fluorescencia para su cuantificación (Vallejos, 2016).

#### **1.4.5.2 Ensayo inmunocromatográfico ligado a enzimas (ELISA)**

El ensayo Inmunocromatográfico es un método rápido utilizado principalmente para los controles de detección de Aflatoxinas debido a que proporciona respuestas específicas y rápidas con reproducibilidad a gran escala. Es especialmente popular en los análisis de rutina porque es un método rápido y de bajo costo que requiere volúmenes de muestra muy pequeños y de fácil aplicación comparado con otros métodos cualitativos como HPLC (Imtiaz & Waqar, 2019). Este tipo de análisis se clasifica en dos tipos: a) Competitivo directo, en donde los pocillos contienen un el anticuerpo específico para la toxina la cual competirá con un analito marcado con enzima para unirse a un número limitado de anticuerpos y, b) Competitivo indirecto, un complejo conjugado-proteína ingresa al pocillo en donde competirá con la toxina por unirse a los anticuerpos presentes en la solución (Vaz, Cabral, Rodrigues, & Venancio, 2020).

Aunque este método tiene la ventaja de una alta especificidad y sensibilidad, la precisión del método depende de la naturaleza de las micotoxinas y el proceso de preparación de la muestra, además una extracción de la toxina puede mejorar la precisión y la reproducibilidad del método. Sin embargo, pueden dar resultados falsos negativos o falsos positivos debido a la "interferencia de la matriz", que es común en la realización de pruebas, lo que lleva a una sobreestimación o subestimación de las concentraciones de Aflatoxinas en la muestra (Maggira, Ioannidou, Sakaridis, & Samouris, 2021).

**Tabla 1.1 Regulación de AFM<sub>1</sub> en la leche y productos lácteos en los diferentes países [Vaz, Cabral, Rodrigues, & Venancio, 2020]**

País	Leche (ug/kg)	Derivados lácteos (ug/kg)
<b>EE. UU.</b>	0.50	0.50
<b>Unión Europea</b>	0.05	0.05 0.025 (fórmulas infantiles)
<b>Canadá</b>	0.5	-
<b>Ecuador</b>	0.5	-
<b>México</b>	0.5	0.5
<b>Chile</b>	-	0.05
<b>Austria</b>	0.05, 0.01 (leche infantil pasteurizada)	0.02(mantequilla) 0.25 (queso) 0.40 (leche en polvo)
<b>Francia</b>	0.05, 0.03 (niños <3 años)	-
<b>Suiza</b>	0.05	0.025 (suero de leche y derivados) 0.25 (queso) 0.10 (mantequilla)
<b>Bulgaria</b>	0.50	0.10 (leche en polvo)
<b>Brasil</b>	-	0.50 (leche fluida) 5.0 (leche en polvo) 2,5 (quesos)
<b>República Checa</b>	0.05	-
<b>Rumania</b>	0	0
<b>Argentina</b>	0.05	0.50 (productos lácteos)
<b>Honduras</b>	0.05	0.25 (queso)
<b>Turquía</b>	0.05	0.25 (queso)
<b>Egipto</b>	0	0
<b>Irán</b>	0.50	-
<b>Nigeria</b>	1	-

# CAPÍTULO 2

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1 Obtención de materia prima e insumos

La azúcar blanca, el bicarbonato de sodio, la maicena, leche deslactosada y crema de leche para la elaboración de los derivados lácteos se adquirieron en un supermercado de la ciudad de Guayaquil. La glucosa, proviene de la casa comercial de químicos e insumos “Laboratorio Cevallos” ubicado en el centro de la ciudad de Guayaquil. Por último, la maltodextrina, suero de leche y los cultivos iniciadores para el yogurt y el queso, “YOFLEX®” y “CUAJO CHY-MAX” respectivamente, ambos de la marca CHR. HANSEN, fueron proporcionados por la Escuela Superior Politécnica del Litoral ubicada en el Km 30.5 vía Perimetral de la ciudad de Guayaquil. La leche cruda se compró a un productor lechero independiente cuya hacienda está ubicada en la vía Daule.

**Tabla 2.1 Materia prima e ingredientes para el desarrollo de los productos lácteos**  
[Elaboración propia]

Materia pima	Producto	Ingredientes
Leche deslactosada UHT	Manjar de leche	Glucosa
		Bicarbonato de Sodio
		Azúcar blanca
		Maicena
	Leche condensada	Azúcar blanca
Leche Cruda	Leche en polvo	Maltodextrina
	Queso	Cuajo CHY-MAX
	Yogurt	Cultivo YOFLEX®
Crema de Leche pasteurizada	Mantequilla	–

### 2.2 Preparación de muestras de leche con AFM<sub>1</sub>

Para la preparación de las muestras a partir leche deslactosada, leche cruda y crema de leche se empleó una contaminación artificial de AFM<sub>1</sub> por debajo de los LMP indicados en la NTE INEN 009 para leche (INEN 009, 2015). La disolución estándar

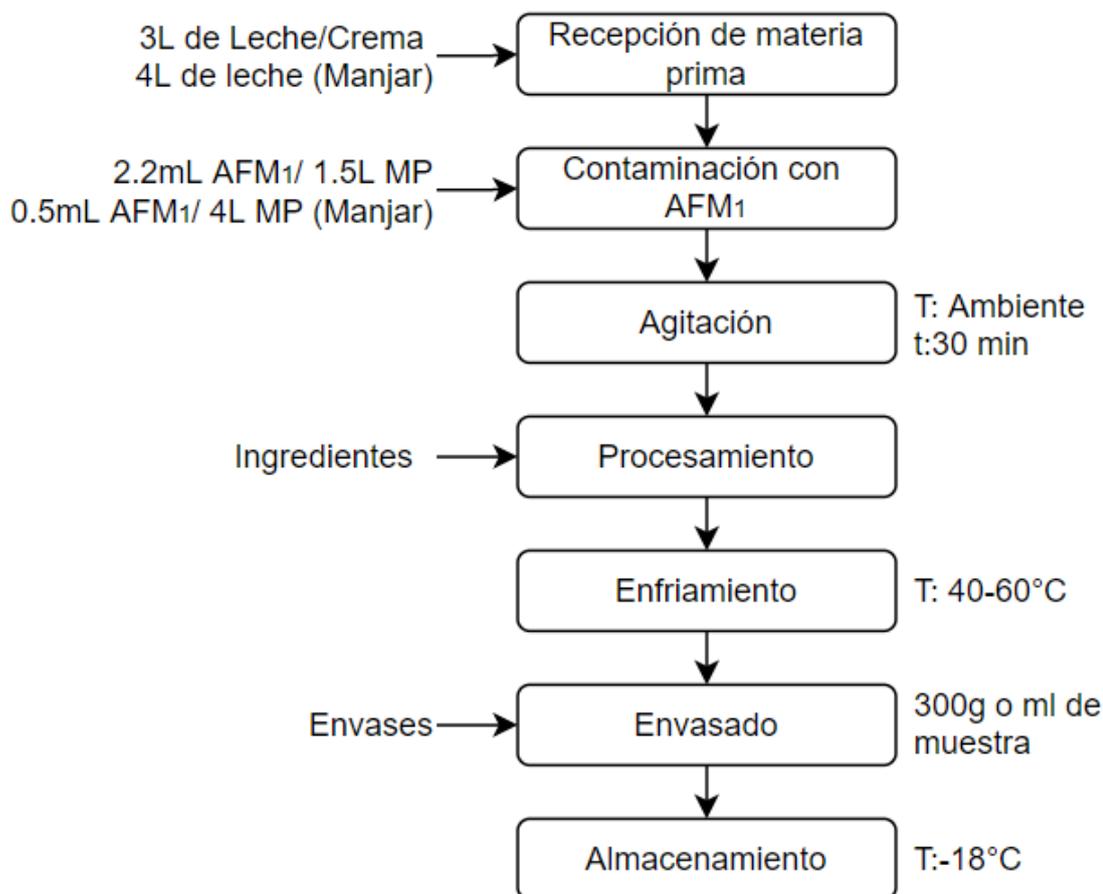
de AFM<sub>1</sub> que se utilizó para la contaminación de las muestras de leche deslactosada para la producción de manjar fue TAS-M15DA2-2 de 1.0 µg/mL de AFM<sub>1</sub> en 2.0 de Acetonitrilo, la cual fue adquirida en el laboratorio Trilogy Analytical ubicado en EE. UU., mientras que es estándar de AFM<sub>1</sub> que se utilizó en las muestras leche para la producción de leche condensada, leche en polvo, queso y yogurt fue el patrón de leche contaminada “Tumbaco” con una concentración de 0,10 µg/mL de AFM<sub>1</sub>. Finalmente, el estándar de AFM<sub>1</sub> utilizada en la muestra de crema de leche para la producción de mantequilla fue el patrón de leche contaminada “Puerto Quito” con una concentración menor a 0.05 µg/mL de AFM<sub>1</sub>. Estos estándares fueron proporcionados por el tutor del presente proyecto.

La contaminación de las muestras se realizó añadiendo 2.2mL de estándar de AFM<sub>1</sub> por cada 1.5mL de materia prima y se mezcló por un tiempo de 30 minutos para garantizar la homogenización.

### **2.3 Elaboración de productos lácteos**

La elaboración de los productos lácteos a partir de la leche contaminada con AFM<sub>1</sub> se realizó en el Laboratorio de Desarrollo y Proceso de Alimentos de la ESPOL ubicada en el Km 30.5 vía Perimetral. La toma de muestras (300g) de cada producto se realizó por duplicado para una mejor reproducibilidad de los resultados. Para elaborar cada producto se utilizó 3L de materia prima y 4.4mL de los estándares de AFM<sub>1</sub> “Tumbaco” o “Puerto Quito”, a excepción del manjar de leche que se elaboró a partir de 4L de materia prima y 0.5mL del estándar de AFM<sub>1</sub> “TAS-M M15DA2-2”, ver figura 2.1.

El procesamiento de los productos lácteos se llevó a cabo siguiendo las metodologías estándar para leches concentradas, fermentadas y quesos, establecidas por Walstra *et al.*, (2006) en su texto *Dairy Science and Technology*, con ciertas modificaciones de acuerdo con las limitaciones de las instalaciones y equipos del laboratorio de la institución, y de la materia prima (ver Tabla 2.2) (Walstra, Wouters, & Geurts, 2006).



**Figura 2.1 Diagrama general de la elaboración de productos lácteos [Elaboración propia]**

## 2.4 Toma de muestras

El muestreo y preparación de las muestras es de suma importancia para determinar las AFM<sub>1</sub>. Se recolectaron 3 muestras por duplicado de cada uno de los productos elaborados en el laboratorio de Desarrollo y Procesos de la ESPOL. Por cada lote de producto se recolectaron muestras de 300g (o mL) cada una de acuerdo con la metodología planteada en el Reglamento de la Comisión Europea 401/2006 (Comisión Europea, 2006), las muestras corresponden a: 1) Muestra de leche sin contaminar; 2) Muestra de leche contaminada con AFM<sub>1</sub> y; 3) Muestra del producto terminado. Donde se obtuvo un total de 24 muestras, que luego se colocaron en frascos plásticos asépticos con su respectivo rotulo de identificación y toda la información necesaria para el análisis. Las muestras se almacenaron en congelación a -18°C hasta su posterior análisis.

**Tabla 2.2 Condiciones de procesamiento para los diferentes productos lácteos  
[Elaboración propia]**

<b>Producto</b>	<b>Condiciones de procesamiento</b>	<b>Equipos</b>
Manjar de leche	Temperatura de cocción: 90°C Tiempo de elaboración: 2 horas °Brix: 70	Marmita abierta Balanza Refractómetro Termómetro
Leche condensada	Temperatura de cocción: 70°C Tiempo de elaboración: 1 hora °Brix: 50	Marmita abierta Balanza Refractómetro Termómetro
Leche en polvo	Temperatura evap.: 200°C Flujo de leche: 7 ml/s	Recipiente de acero Spray Dryer
Yogurt	Tiempo y temperatura de pasteurización: 30 minutos a 65°C Temperatura de inóculo: 45°C Tiempo de fermentación: 24 horas	Recipiente de acero Balanza Termómetro
Queso	Tiempo y temperatura de pasteurización: 30 minutos a 65°C Temperatura de inóculo: 35°C Tiempo de cuajo: 45 minutos Tiempo y temperatura de prensado: 24h a 7°C	Recipientes de acero Balanza Liencillo Moldes Termómetro
Mantequilla	Temperatura: Ambiente Tiempo de batido: 10 minutos	Recipiente de acero Batidora mecánica

## 2.5 Preparación de las muestras

La preparación de las muestras se llevó a cabo mediante el método de Murshed, 2020 para leches líquidas, leche en polvo, quesos y yogurt con ciertas modificaciones. Las muestras se descongelaron en baño maría a 40°C para luego ser homogenizadas mediante agitación manual por 3 minutos y su posterior centrifugación. En el caso de las muestras de leche concentradas y leche en polvo se tomó 1 g de muestra y se diluyó en 5 mL de agua destilada precalentada a 50°C, luego se agitaron en el agitador CLASSIC Agitator Vortex por 3 minutos a 20 rpm para garantizar la homogenización. Una vez mezcladas las muestras y hayan enfriado a 20-25°C, se tomó 5 mL en un tubo y se agregó 30 mL con metanol para luego centrifugarse por 10 min a 5000 rpm, 4 mL del sobrenadante fueron colocados

en un tubo y se evaporó el metanol por corriente de aire. Para las muestras de queso, yogurt y mantequilla, se tomó 5 g en tubos y se añadió 20 mL de metanol, se agitaron por 5 minutos en el agitador CLASSIC Agitator Vortex a velocidad máxima, y se llevaron a centrifugación por 10 min a 5000 rpm. Se retiró la capa superficial de grasa con una espátula y se tomó 4 mL del sobrenadante al cual se le evaporó el metanol por corriente de aire (Murshed, 2020).

A las muestras evaporadas se les añadió 3 mL de agua destilada y agitó en el Vortex por 1 minuto a máxima velocidad. Se tomó 200  $\mu$ L para su análisis.

## **2.6 Determinación de AFM<sub>1</sub> en leche y derivados lácteos**

Se analizó un total de 24 muestras a las cuales se determinó la concentración inicial y final de AFM<sub>1</sub> utilizando metodología reacción antígeno–anticuerpo, es decir, ensayos de inmunocromatografía (ELISA) (Omar, 2016). Los Kits de ensayo rápido ELISA utilizados en este estudio fueron de la marca RINGBIO y AFLASENSOR QUANTI con sensibilidades de 0.05 y 0.5 ppb, respectivamente. Ambas pruebas constan de dos componentes: un micro pocillo con el anticuerpo unido a partículas de oro y una tirilla reactiva con membranas con líneas de captura específicas.

La determinación de AFM<sub>1</sub> en cada muestra se realizó siguiendo las instrucciones de cada fabricante. Para el kit ensayo (RINGBIO) con sensibilidad de 0.05 ppb se tomó 200  $\mu$ L de muestras con micropipeta y se colocó en un pocillo, se pipeteó de 5 a 10 veces la muestra dentro del pocillo para asegurar la homogenización y se dejó incubar a temperatura ambiente por 7 minutos. Pasado este tiempo se introdujo la tira en el pocillo con la muestra y se dejó actuar por 7 minutos a temperatura ambiente. La interpretación de los resultados se llevó a cabo de acuerdo con la guía del fabricante. De manera similar se desarrolló la detección de AFM<sub>1</sub> con el kit de ensayo (AFLASENSOR QUANTI) de sensibilidad 0.5 ppb en donde se tomó 200  $\mu$ L y se colocó en el pocillo el cual se llevó a baño maría a 40°C por 3 minutos, luego se colocó la tira en el pocillo con la muestra y se dejó en incubación por 7 minutos a la misma temperatura. La interpretación de los resultados se llevó a cabo de acuerdo con la guía del fabricante.

Para muestras de producto terminado que presentaron valores positivos a 0.05 ppb se les realizó diluciones con las siguientes relaciones: 10:1, 8:1, 6:1, 5:2, 3:1 para estimar valores aproximados de concentración de AFM<sub>1</sub> final posterior a cada procesamiento.

## **2.7 Análisis de datos**

Los resultados obtenidos de la concentración de AFM<sub>1</sub> se sometieron a análisis de ANOVA simple de 6 niveles y 12 observaciones. Para verificar si existe diferencias significativas entre los tratamientos respecto a la concentración de AFM<sub>1</sub> se realizó una prueba múltiple de rangos con un nivel de significancia del 0.05%.

# CAPÍTULO 3

## 3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

### 3.1 Resultados de los diferentes ensayos

Se preparó un total de seis derivados lácteos a partir de leche contaminada intencionalmente con AFM<sub>1</sub>, las muestras tanto de las leches iniciales como de cada producto se analizaron por duplicado para la determinación de la concentración de AFM<sub>1</sub> mediante Kits de ensayo de inmunocromatografía (ELISA) con límites de detección (LD) de 0.05 ppb y 0.5 ppb.

**Tabla 3.1 Determinación de presencia de AFM<sub>1</sub> en materia prima (leche inicial y crema de leche inicial; leche y crema de leche contaminada) mediante Kit de ensayo ELISA con LD de 0.05 ppb [Elaboración propia]**

Materia prima	Ensayos	Muestras			
		MPSC-R1	MPSC-R2	MPC-R1	MPC-R2
Leche deslactosada	Manjar de leche	-	-	+	+
	Leche condensada	-	-	+	+
	Leche en polvo	-	-	+	+
Leche cruda	Yogurt	+	+	+	+
	Queso	+	+	+	+
Crema de leche	Mantequilla	-	-	-	-

Nota: "+" presencia de AFM<sub>1</sub> >0.05 ppb; "-" ausencia o presencia de AFM<sub>1</sub> < 0.05 ppb; MPSC-R1: Materia prima sin contaminar Replica 1, MPSC-R2: Materia prima sin contaminar Replica 2; MPC-R1: Materia prima contaminada Replica 1; MPC-R2: Materia prima contaminada Replica 2.

La tabla 3.1 muestra el resultado del análisis de la leche utilizada para la elaboración de los ensayos, la leche deslactosada UHT utilizada para la elaboración de manjar, leche condensada y leche en polvo no presentó contaminación o su valor inicial se encuentra por debajo del LD 0.05 ppb. La crema de leche utilizada para la obtención de mantequilla tampoco presentó una contaminación o su valor se encontraba por

debajo de 0.05 ppb. Por otro lado, la leche entera utilizada para la elaboración de yogurt y queso presentó una contaminación inicial que superó el LD de 0.05 ppb, pero inferior a los 0.5 ppb.

Tras la contaminación controlada de la leche con AFM<sub>1</sub> en las concentraciones definidas, el análisis con el Kits de ensayo de inmunocromatografía (ELISA) dio positivo para todas las pruebas, excepto para la crema de leche debido a la baja concentración del patrón utilizado, quedando por debajo de 0.05 ppb.

**Tabla 3.2 Determinación de presencia de AFM<sub>1</sub> mediante kit de ensayo ELISA con LD de 0.5 ppb en muestras de productos lácteos elaborados en el laboratorio de Desarrollo y Proceso de alimentos (ESPOL) [Elaboración propia]**

Ensayos	Sensibilidad 0.5 ppb			
	Replicas			
	L1-R1	L2-R1	L1-R2	L2-R2
Manjar	-	-	-	-
Leche en polvo	-	-	-	-
Leche condensada	-	-	-	-
Yogurt	-	-	-	-
Queso	-	-	-	-
Mantequilla	-	-	-	-

Nota: “+” presencia de AFM<sub>1</sub> >0.5 ppb; “-” ausencia o presencia de AFM<sub>1</sub> < 0.5 ppb; L1-R1: Lote 1- Replica 1; Lote 1- Replica 2; L2-R1: Lote 2- Replica 1; Lote 2- Replica 2

En la tabla 3.2 se observa los resultados de la prueba rápida de inmunocromatografía (ELISA) de los productos elaborados por varios procesos tecnológicos. Los ensayos de todos los productos elaborados resultaron negativos, lo que es indicativo que la AFM<sub>1</sub> se encuentra por debajo del LD de 0.5 ppb.

Los resultados presentados en las tablas 3.1 y 3.2 evidencian que la concentración de AFM<sub>1</sub> en la leche, crema de leche y en los productos elaborados están en el rango <0.05, 0.05 y 0.5 ppb; sin embargo, estos resultados no esclarecen si hubo, durante el proceso de elaboración de los productos, un aumento o disminución de la AFM<sub>1</sub>, por lo que se procedió a realizar un posterior análisis con el kit de inmunocromatografía (ELISA) con LD de 0.05 ppb para confirmar: a) si la muestra

inicial para la elaboración de mantequilla realmente tenía AFM<sub>1</sub>; b) si hubo una reducción de AFM<sub>1</sub> durante el proceso de los diferentes productos elaborados y; c) si hubo un aumento en la concentración de los productos elaborados.

Todos los ensayos fueron analizados con la prueba de inmunocromatografía (ELISA) con LD de 0.05 ppb, donde todos dieron positivo a excepción del yogurt y mantequilla. Las pruebas con resultados positivos fueron sometidas a diluciones para estimar su concentración final. Para la preparación de las diluciones se pesó los gramos de muestra de cada producto en balanza analítica y añadió los mililitros de agua destilada establecidos (ver nota de tabla 3.3), posteriormente se utilizó las fórmulas de concentraciones y de factor de dilución (FD) para tener una estimación de los valores de concentraciones de AFM<sub>1</sub> en el rango de 0.05 y 0.5 ppb, ver ecuaciones 3.1 y 3.2.

Los resultados de estos cálculos se pueden visualizar con mayor detalle en los apéndices A y B.

$$C_1V_1 = C_2V_2 \quad (3.1)$$

$$FD = \frac{V_2}{V_1} \quad (3.2)$$

Donde:

C<sub>1</sub>= Concentración inicial de la AFM<sub>1</sub>

V<sub>1</sub>= Volumen inicial del soluto

C<sub>2</sub>= Concentración final la AFM<sub>1</sub>

V<sub>2</sub>= Volumen del soluto + disolvente

FD= Factor de dilución

Formula general:

- Límite superior

$$C_1 = 0.06FD_n * FD_{n-1} * \dots \quad (3.3)$$

- Límite inferior

$$C_1 = 0.05FD_n * FD_{n-1} * \dots \quad (3.4)$$

Donde:

n= número de la última dilución positiva (+)

**Tabla 3.3 Determinación de presencia de AFM<sub>1</sub> en productos lácteos con Kit de ensayo ELISA con LD de 0.05 ppb [Elaboración propia]**

Sensibilidad 0.05 ppb																																
Ensayo	Diluciones																															
	Sin Dilución				10:1				8:1				6:1				5:2				5:1				3:1							
	L1	L2	L1	L2	L1	L2	L1	L2	L1	L2	L1	L2	L1	L2	L1	L2	L1	L2	L1	L2	L1	L2	L1	L2	L1	L2	L1	L2				
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	R1	R1	R2	R2	R1	R1	R2	R2	R1	R1	R2	R2	R1	R1	R2	R2	R1	R1	R2	R2	R1	R1	R2	R2	R1	R1	R2	R2	R1	R1	R2	R2
Manjar	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leche en polvo	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-									-	-	-	-								
Leche condensada	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-								
Yogurt	-	-	-	-																												
Queso	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Mantequilla	-	-	-	-																												

Nota: 10:1, 10 representa los g de producto y 1 representa un g de agua (las otras diluciones siguen el mismo patrón); "L1-R1" Lote 1-Replica 1; "L2-R2" Lote 2-Replica 2"; "+" presencia de AFM<sub>1</sub> >0.5 ppb; "-" ausencia o presencia de AFM<sub>1</sub> < 0.5 ppb

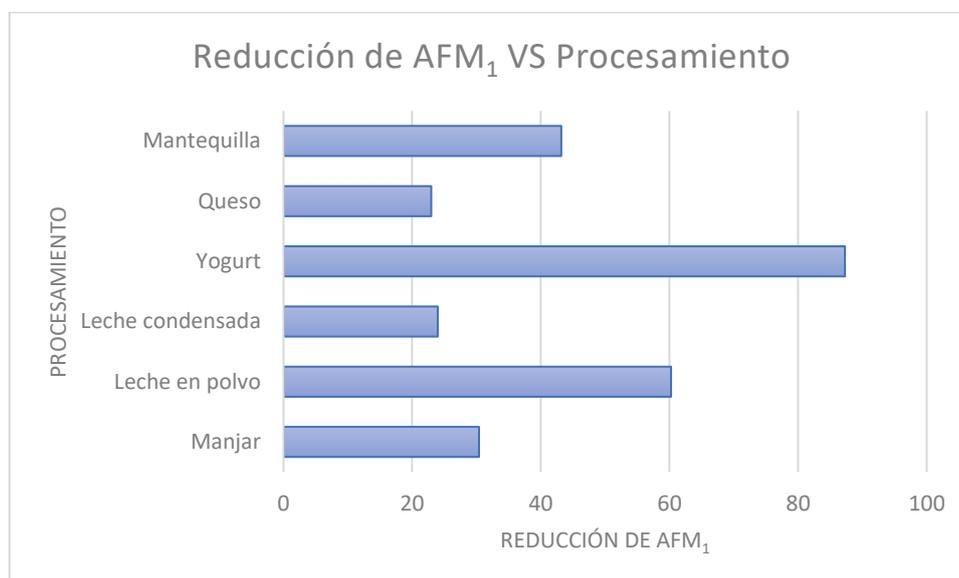
Los valores del rango estimado de los productos presentados en la tabla 3.4 fueron cálculos a través de las ecuaciones 3.3 y 3.4 (ver apéndices A y B).

**Tabla 3.4 Estimación de la concentración de AFM<sub>1</sub> en productos lácteos con Kit de ensayo ELISA [Elaboración propia]**

ESTIMACIÓN DE CONCENTRACION						
Ensayos	Rango estimado		Media	C.I	%Reducción de AFM <sub>1</sub>	
Manjar	0.073	<AFM1<	0.101	0.087	0.125	30.3913
Leche en polvo	0.055	<AFM1<	0.0616	0.0583	0.1467	60.25
Leche condensada	0.102	<AFM1<	0.121	0.1115	0.1467	23.97727
Yogurt	0	<AFM1<	0.05	0.025	0.1967	87.28814
Queso	0.122	<AFM1<	0.181	0.1515	0.1967	22.9661
Mantequilla	0	<AFM1<	0.05	0.025	0.044	43.18182

Nota: C.I, Concentración inicial en materia prima

El mayor porcentaje de reducción de AFM<sub>1</sub> durante el proceso fue el yogurt con 87%, mientras que la menor reducción se dio en el queso con aproximadamente 23%. Esto se puede observar de forma clara en la tabla 3.4 y figura 3.1.



**Figura 3.1 Cinética de la AFM<sub>1</sub> durante los procesos de elaboración de productos lácteos [Elaboración Propia]**

En base a los resultados obtenidos en la tabla 3.4, el análisis estadístico de prueba de rangos múltiples de las tablas 3.5 y 3.6 evidencian que existe diferencia

significativa entre los procesos de concentración, acidificación, separación y coagulación con relación a la reducción de AFM<sub>1</sub>.

**Tabla 3.5 Pruebas de rangos múltiples para el porcentaje de reducción de AFM<sub>1</sub> por ensayo [Elaboración propia]**

Principio de procesamiento	Ensayos	Casos	Media	Grupos homogéneos
Coagulación	Queso	2	22,9661	X
Concentración	Leche condensada	2	23,977	X
Concentración	Manjar	2	30,3913	X
Separación	Mantequilla	2	43,1818	X
Concentración	Leche en polvo	2	60,25	X
Acidificación	Yogurt	2	87,2881	X

**Tabla 3.6 Diferencias significativas entre procesos y el porcentaje de reducción de AFM<sub>1</sub> [Elaboración Propia]**

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- límites
Leche en polvo – Leche condensada	*	36,273	0
Leche en polvo – Manjar	*	29,8587	0
Leche en polvo – Mantequilla	*	17,0682	0
Leche en polvo – Queso	*	37,2839	0
Leche en polvo – Yogurt	*	-27,0381	0
Leche condensada – Manjar	*	-6,4143	0
Leche condensada – Mantequilla	*	-19,2048	0
Leche condensada – Queso	*	1,0109	0
Leche condensada – Yogurt	*	-63,3111	0
Manjar – Mantequilla	*	-12,7905	0
Manjar – Queso	*	7,4252	0
Manjar – Yogurt	*	-56,8968	0
Mantequilla – Queso	*	20,2157	0
Mantequilla – Yogurt	*	-44,1063	0
Queso – Yogurt	*	-64,322	0

Nota: \* indica una diferencia significativa

### 3.2 Análisis de los resultados

Los productos concentrados y azucarados como el manjar, leche en polvo y leche condensada mostraron una reducción significativa en relación con el contenido inicial

de AFM<sub>1</sub> en la materia prima utilizada. La AFM<sub>1</sub> posee una alta estabilidad al calor en el procesamiento; sin embargo, en la tabla 3.4, se estimó una reducción media posterior al procesamiento de 30.39, 60.25 y 23.97% en el manjar, leche en polvo y leche condensada, respectivamente. Dicha reducción pudo ser efecto de factores como la temperatura y tiempos o una combinación de estos que aportaron a su reducción, lo cual coincide con las investigaciones de Cravero, (2019) donde menciona que con temperaturas superiores a 120°C y 15 min de calentamiento, se ha obtenido hasta un 12,21% de reducción de la AFM<sub>1</sub> (Cravero C. , 2019).

En la leche en polvo se obtuvo un porcentaje de reducción de 60%, resultados similares fueron obtenidos por Csapó *et al*, (2020) en su estudio de estabilidad de AFM<sub>1</sub> en el secado por aspersión de la leche encontrando valores de reducción entre el 40 y 60% (Csapó, Albert, & Sipos, 2020). En el caso del yogurt el cual fue elaborado con cepas de *Lactobacillus delbrueckii ssp.* y *L. bulgaricus* y a una temperatura de incubación de 45°C llegó a un pH de 4, se evidenció una concentración media de 0.025 ppb de AFM<sub>1</sub> lo que representa una reducción del 87,29% en relación con el contenido en la leche que fue de 0.1967 ppb; sin embargo, valores de reducción menores fueron presentados por Rahimirad *et al*, (2014), en su estudio de concentración de AFM<sub>1</sub> en derivados lácteos, donde el yogurt tuvo un porcentaje de reducción del 34% en comparación con la leche original, además informó que la presencia de bacterias ácido lácticas pueden destruir la AFM<sub>1</sub> durante su metabolismo, especialmente el *Bacillus acidofillus* y *L. rhamnosus* los cuales degradaron la AFM<sub>1</sub> en un 18,5 y 49,6%, respectivamente (Rahimirad, Maalekinejad, Ostadi, Yaganeh, & Fahimi, 2014), asimismo, el estudio de Elsanhoty *et al.*, (2014) respaldan la utilización de cepas de LAB y bifidobacterias en la reducción del contenido de AFM<sub>1</sub> en la leche (Elsanhoty, Salam, Ramadan, & Badr, 2014). Finalmente, Csapó *et al*, (2020) demostraron que al reducir el pH de 4.6 a 4, el nivel de AFM<sub>1</sub> decrece significativamente y su efecto es mucho mejor con un mayor tiempo de almacenamiento (Csapó, Albert, & Sipos, 2020).

El queso fue obtenido por la precipitación de la caseína cuando la leche llega a su punto isoeléctrico de 4.6 mediante la fermentación láctica, la leche contaminada con AFM<sub>1</sub> se procesó con renina a una temperatura de 35±2°C, posteriormente se prensó

por 24 horas en refrigeración a 7°C. Se estimó que el queso tuvo una concentración media final de AFM<sub>1</sub> igual a 0.1515 ppb lo que indica una reducción del 22.96% de la concentración inicial en la materia prima utilizada. No obstante, en otro trabajo llevado a cabo por Krstović *et al.*, (2018), encontró que quesos elaborados a partir de leche con concentraciones de AFM<sub>1</sub> por debajo de 0.05 ppb presentaron una concentración en un factor de 10 veces mayor a la concentración inicial de la leche, por lo que la carga inicial de AFM<sub>1</sub> en leche va a influenciar la tasa de transferencia (Krstovic, Popovic, Kasalica, Jevtic, & Jajic, 2018). Estos estudios indican que las variables como temperatura de fermentación, pH de la solución salina y el tiempo de prensado fueron los factores más significativos para la reducción de AFM<sub>1</sub> en el queso (Jiménez, *et al.*, 2021).

Químicamente la AFM<sub>1</sub> tiene mayor afinidad por la unión a la caseína que el suero, lo que genera un aumento de la tasa de transferencia desde la leche contaminada de origen, por lo que los procesos físicos como el prensado no garantizan la reducción de AFM<sub>1</sub>, sin embargo, la combinación de técnicas de acidificación y temperatura pueden contribuir a su disminución de hasta el 99% en relación a la leche de origen debido al proceso de desnaturalización proteica, eliminando los puntos específicos de unión entre la AFM<sub>1</sub> y la caseína (Mohammadi, *et al.*, 2022).

El proceso de obtención de mantequilla se basa en la transformación de la emulsión grasa: agua a un agua: grasa mediante proceso físico del batido. Posterior al procesamiento se estimó una concentración final menor a 0.05 ppb, este efecto pudo darse por varios factores: a) la baja sensibilidad del método para la detección de AFM<sub>1</sub> por debajo de 0.05ppb, b) la propiedad lipofílica de la AFM<sub>1</sub> lo cual evita que se una de manera efectiva a los glóbulos grasos y, c) el contenido de sal ya que existe una relación inversa entre la AFM<sub>1</sub> y la salazón (Motawee & McMahon, 2009), resultados similares fueron encontrados por Hassan *et al.*, (2018) en su investigación, donde el 67 % de las muestras de mantequilla contaminadas con AFM<sub>1</sub>, ninguna se encontró por encima de los 0.05 ppb (Hassan, *et al.*, 2018). De igual manera en Turquía, Öztürk & Altinci, (2019) muestran que el 29,6% de la mantequilla contaminada con AFM<sub>1</sub>, no superaban concentraciones por encima de 0.05 ppb (Öztürk & Altinci, 2019).

Todos estos datos obtenidos sobre la presencia de AFM<sub>1</sub> en la leche y los productos lácteos en diversos países si bien en muchos de ellos no han superado los LPM, la incidencia de contaminación con AFM<sub>1</sub> es un riesgo potencial para la salud pública. Por lo que se debe seguir realizando investigaciones sobre la aplicación de diversas técnicas durante el procesamiento con el fin de eliminar o en su defecto reducir los niveles de AFM<sub>1</sub> por consiguiente la reducción de los problemas en la salud.

# CAPÍTULO 4

## 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 4.1 Conclusiones

Fueron procesados seis productos lácteos (manjar de leche, leche condensada, leche en polvo, queso, yogurt y mantequilla) en el laboratorio de Desarrollo y Proceso de Alimentos de la ESPOL y se confirmó en los mismos que había contaminación inicial de AFM<sub>1</sub> en el rango de 0.05 a 0.1 ppb con excepción de la mantequilla cuya contaminación inicial estuvo por debajo de los límites de detección (0.05 ppb).

Se evidenció que el procesamiento tiene un efecto de reducción significativo en la actividad de la AFM<sub>1</sub>, obteniéndose una reducción del 87% para el yogurt, 60% para la leche en polvo, 43% para la mantequilla, 30% para el manjar, 24% para la leche condensada y 23% para el queso.

De acuerdo con la prueba de rangos múltiples se demostró que todos los procesos difieren entre sí, es decir que cada condición específica de procesamiento tuvo un efecto único sobre la cinética de AFM<sub>1</sub>.

Finalmente, se verificó que ninguno de los productos procesados superó los límites establecidos por las normativas nacionales de la INEN 009:2015 que es de 0.5 ppb, sin embargo, los resultados obtenidos desde el inicio del proceso si superan los límites establecidos por las normativas internacionales de la Unión Europea que es de 0.05 ppb.

### 4.2 Recomendaciones

Es necesario validar métodos analíticos como el HPLC que permita tener información precisa de los cambios en la cinética de la AFM<sub>1</sub> durante los procesos tecnológicos empleados para la fabricación de productos lácteos en el país.

Invertir en investigación para poder estandarizar los valores de AFM<sub>1</sub> en los derivados lácteos de tal manera que se pueda establecer límites máximos permitidos

más estrictos en la materia prima a fin de asegurar la calidad de los productos y confianza del consumidor.

Se debe hacer otros estudios procesando otros productos lácteos acidificados para confirmar si el pH es realmente un factor determinante en la reducción de AFM<sub>1</sub>.

# BIBLIOGRAFÍA

- Action Levels for Aflatoxins in Animals Food, Compliance Policy Guide. Accedido el 17 de junio, 2022, desde <https://www.fda.gov/media/121202/download>
- Altamirano, R. (2019). *Aflatoxinas AFM<sub>1</sub> en Leche de Consumo: Aspectos Toxicológicos y Metodológicos de Evaluación Pericial*. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina: Creative Commons.
- Bervis, N. (2019). *Investigación de aflatoxinas en leche y en productos destinados a la alimentación animal*. Universidad de Zaragoza, Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Zaragoza: Servicio de Publicaciones.
- Carreño, A., Hurtado, J. J., Navas, M. (2014). Exposición a aflatoxina: un problema de salud pública. *Iatreia*, 27(1), 42-52.
- Cravero, C. (2019). *Estabilidad de la aflatoxina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) en leche y su reducción en el proceso de elaboración del queso ricotta*. Universidad Católica de Córdoba, Facultad de ciencias Químicas. Córdoba, Argentina: Biblioteca Digital.
- Cravero, C., Juncos, N., & Olmedo, R. (2020). Aflatoxina M<sub>1</sub> en quesos y su importancia en la actualidad. *Nexo Agropecuario*, 8(1), 37-42.
- Csapó, J., Albert, C., & Sipos, P. (2020). The aflatoxin content of milk and dairy products as well as breast milk and the possibilities of detoxification. *Acta Universitatis Sapientiae, Alimentaria*, 13(1), 99-117. doi:<https://doi.org/10.2478/ausal-2020-0006>
- Elsanhoty, R., Salam, S., Ramadan, M., & Badr, F. (2014). Detoxification of aflatoxin M<sub>1</sub> in yoghurt using probiotics and lactic acid bacteria. *Elsevier*, 43, 129-134. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.03.002>
- Gutiérrez, F., Estrella, A., Irazábal, E., Quimiz, V., Portilla, A., & Bonifaz, N. (2018). Mejoramiento de la eficiencia de la proteína de los pastos en bovinos de leche utilizando cuatro formulaciones de balanceados. *LA GRANJA. Revista de Ciencias de la Vida*, 28(2), 116-123. doi:<http://doi.org/10.17163/lgr.n28.2018.09>
- Hassan, Z., Al-Thani, A., Almeer, F., Balmas, V., Migheli, Q., & Jaouna, S. (2018). Evidence of low levels of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and dairy products marketed in Qatar. *Food Control*, 92, 25-29. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.04.038>

Imtiaz, N., & Waqar, A. (2019). Comparison of some ELISA kits for Aflatoxin M<sub>1</sub> quantification. *Journal of AOAC International*, 102(2), 677-679. doi:<https://doi.org/10.5740/jaoacint.18-0185>

INEN 009. (2015). Leche Cruda. Requisitos. Quito, Ecuador.

Inocuidad y calidad de los alimentos: Micotoxinas. Accedido el 14 de julio, 2022, desde <https://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/mycotoxins/es/>

Jáuregui-Jiménez, R., & Celis-Vielman, E. (2020). Origen y presencia de aflatoxinas M<sub>1</sub> en leche bovina de fincas tradicionales, Chiquimula, Guatemala. *Revista Ciencia Multidisciplinaria CUNORI*, 4(2), 47-59. doi:<https://doi.org/10.36314/cunori.v4i2.127>

Jiménez, C., Alatorre, S., Tello, S., Gómez, L., Rodríguez, G., García, M., & Cruz, A. (2021). Analysis of aflatoxin M<sub>1</sub> contamination in milk and cheese produced in Mexico: a review. *Wageningen Academic Publishers*, 14(3), 269-285. doi:<https://doi.org/10.3920/WMJ2020.2668>

Krstovic, S., Popovic, A., Kasalica, A., Jevtic, M., & Jajic, I. (2018). Aflatoxin M<sub>1</sub> transfer from milk into cheese and whey during the production of hard cheese. *Scienco*, 67(3-4), 215-220. doi:<https://doi.org/10.1515/contagri-2018-0031>

Landeros, P., Noa, M., López, Y., González, D. G., Noa, E., Real, M., Medina, M. S. (2012). Niveles de Aflatoxina M<sub>1</sub> en leche cruda y pasteurizada comercializada en la zona metropolitana de Guadalajara, México. *Revista de Salud Animal*, 34(1), 40-45.

Las Perspectivas del Sector Agroalimentario de Alltech para 2022 presentan los resultados de su encuesta global sobre la producción del alimento balanceado. Accedido el 12 de Junio, 2022, desde <https://www.porcicultura.com/destacado/las-perspectivas-del-sector-agroalimentario-de-alltech-para-2022-presentan-los-resultados-de-su-encuesta-global-sobre-la-produccion-de-alimento-balanceado>

Maggira, M., Ioannidou, M., Sakaridis, I., & Samouris, G. (2021). Determination of aflatoxin M<sub>1</sub> in raw milk using an HPLC-FL method in comparison with commercial ELISA kits-application in raw milk samples from various regions of Greece. *Veterinary Sciences*, 8(3), 46. doi:<https://doi.org/10.3390/vetsci8030046>

Marchese, S., Polo, A., Ariano, A., Velotto, S., Costantini, S., & Severino, L. (2018). Aflatoxin B<sub>1</sub> and M<sub>1</sub>: Biological properties and their Involvement in cancer development. *Toxins*, 10(6), 214. doi:<https://doi.org/10.3390/toxins10060214>

Mohammadi, S., Keshavarzi, M., Kazemi, A., Rahmdel, S., Nouri, M., Rastegar, A., & Ghaffarian, A. (2022). Aflatoxin M<sub>1</sub> contamination in cheese of six countries in the

West Asia region: a systematic review and meta-analysis. *International Journal Of Dairy Technology*, 75(3), 653-667. doi:<https://doi.org/10.1111/1471-0307.12866>

Motawee, M., & McMahon, D. (2009). Fate of aflatoxin M<sub>1</sub> during manufacture and storage of feta cheese. *IFT*, 74(5), 42-45. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01158.x>

Murshed, S. (2020). Evaluation and assessment of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and milk products in Yemen using High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Food Quality*, 1-8. doi:<https://doi.org/10.1155/2020/8839060>

Nishimwe, k., Bowers, E., Ayabagabo, J., Habimana, R., Mutiga, S., & Maier, D. (2022). Preliminary sampling of aflatoxin M<sub>1</sub> contamination in raw milk from dairy farms using feed ingredients from Rwanda. *Springer Link*, 38, 107-115. doi:<https://doi.org/10.1007/s12550-022-00454-2>

Omar, S. (2016). Aflatoxin M<sub>1</sub> levels in raw milk, pasteurised milk and infant formula. *Italian Journal of Food Safety*, 5(3), 158-160. doi:<https://doi.org/10.4081/ijfs.2016.5788>

Öztürk, S., & Altinci, A. (2019). Incidence of aflatoxin M<sub>1</sub> contamination in milk, white cheese, kashar and butter from Sakarya, Turkey. *Food Science and Technology*, 39(1), 190-194. doi:<https://doi.org/10.1590/fst.40817>

Puga Torres, B. (2022). *Presencia de aflatoxina M<sub>1</sub>, Zearalenona y sus factores de riesgo en leche de vaca en diferentes provincias de Ecuador*. Universidad Nacional Agraria La Molina, Ciencia Animal. Lima: Repositorio de la UNALM. doi:<https://hdl.handle.net/20.500.12996/5322>

Puga-Torres, B., Salazar, D., Cachiguango, M., Cisneros, G., & Gómez-Bravo, C. (2020). Determination of aflatoxin M<sub>1</sub> in raw milk from different provinces of Ecuador. *Toxins*, 12(8), 498. doi:<https://doi.org/10.3390/toxins12080498>

Quevedo, P., Cantú, P., & Trujillo, A. (2020). Exposición a las aflatoxinas M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) por leche y productos lácteos. *Bienestar y salud social* (Primera Edición ed., pp. 323-329). Monterrey, Nuevo León, México: Editorial Universitaria UANL.

Reglamento (CE) N° 401/2006 de la Comisión Europea. Accedido el 3 de agosto, 2022, desde

<https://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:070:0012:0034:ES:PDF>

- Reyna, S., & Arteaga, J. (2022). Riesgos de contaminación química en leche y sus derivados. *La Granja: Revista de Ciencias de la Vida*, 36(2), 122-134. doi:<https://doi.org/10.17163/lgr.n36.2022.10>
- Rahimirad, A., Maalekinejad, H., Ostadi, A., Yaganeh, S., & Fahimi, S. (2014). Aflatoxin M<sub>1</sub> concentration in various dairy products: evidence for biologically reduced amount of AFM<sub>1</sub> in yoghurt. *PubMED central*, 43(8), 1139-1144.
- Sumon, A. H., Islam, F., Mohanto, N. C., Kathak, R. R., Molla, N. H., Rana, S., Ali, N. (2021). The presence of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and milk products in Bangladesh. *Toxins*, 13(7), 440. doi:<https://doi.org/10.3390/toxins13070440>
- Tarazona-Manrique, L., Andrade-Becera, R., & Vargas-Abella, J. (2020). Detección de aflatoxina M<sub>1</sub> en muestras de leche cruda de vacas en tanques de enfriamiento en Boyacá (Colombia). *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 67(3), 219-229. doi:<https://doi.org/10.15446/rfmvz.v67n3.93929>
- Thakur, S., Singh, R., De, P., & Dey, A. (2022). Aflatoxins in feeds: Issues and concerns with safe food production. *Indian Journal of Animal Health*, 1-13. doi:<https://doi.org/10.36062/ijah.2022.14421>
- Vallejos, G. (2016). *Determinación de Aflatoxina M<sub>1</sub> en quesillos artesanales comercializados en los mercados de la ciudad de Cuenca mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)*. Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Químicas. Cuenca: Repositorio de la UC. doi:<http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/25252>
- Vaz, A., Cabral, A., Rodrigues, P., & Venancio, A. (2020). Detection methods for aflatoxin M<sub>1</sub> in dairy products. *Microorganisms*, 8(2), 246. doi:<https://doi.org/10.3390/microorganisms8020246>
- Walstra, P., Wouters, J., & Geurts, T. (2006). Concentrated milks. In P. Walstra, J. Wouters, & T. Geurts, *Dairy Science and Technology* (Segunda ed., pp. 497-512). Wageningen: CRC Press.
- Wijaya, H., Wardayanie, N., Widjajanti, R., & Silitonga, R. (2018). Detection of aflatoxin M<sub>1</sub> in powdered milk and sweetened condensed milk products in several cities in Java with HPLC-fluorescence method. *IOPScience*, 102, 1-7. doi:10.1088/1755-1315/102/1/012028

# APÉNDICES

## APÉNDICE A

**Matriz de cálculos para la concentración inicial de AFM<sub>1</sub> en muestras de manjar, leche en polvo y leche condensada**  
**[Elaboración propia]**

DILUCIÓN	L. SUP	MANJAR					L. POLVO					L. COND				
		C1	V1	C2	V2	FACTOR DE DILUCIÓN	C1	V1	C2	V2	FACTOR DE DILUCION	C1	V1	C2	V2	FACTOR DE DILUCIÓN
1	CI	0.101	1	0.101	1	1	0.0618	1	0.0618	1	1	0.121	1	0.121	1	1
2	10:1	0.101	10	0.091818	11	1.1	0.0618	10	0.056181	11	1.1	0.121	10	0.11	11	1.1
3	8:1	0.091818	8	0.081616	9	1.125	0.056181	8	0.049939	9	1.125	0.11	8	0.097777	9	1.125
4	6:1	0.081616	6	0.069956	7	1.166666	0.049939	6	0.042805	7	1.166666	0.097777	6	0.083809	7	1.166666
5	5:2	0.069956	5	0.049969	7	1.4	0.042805	5	0.030575	7	1.4	0.083809	5	0.059863	7	1.4
6	5:1	0.049969	5	0.041640	6	1.2	0.030575	5	0.025479	6	1.2	0.059863	5	0.049886	6	1.2
7	3:1	0.04164	3	0.031230	4	1.333333	0.025479	2	0.016986	3	1.5	0.049886	2	0.033257	3	1.5
DILUCIÓN	L. INF	C1	V1	C2	V2	FACTOR DE DILUCIÓN	C1	V1	C2	V2	FACTOR DE DILUCIÓN	C1	V1	C2	V2	FACTOR DE DILUCIÓN
1	CI	0.073	1	0.073	1	1	0.055	1	0.055	1	1	0.102	1	0.102	1	1
2	10:1	0.073	10	0.066363	11	1.1	0.055	10	0.05	11	1.1	0.102	10	0.092727	11	1.1
3	8:1	0.066363	8	0.058989	9	1.125	0.05	8	0.044444	9	1.125	0.092727	8	0.082424	9	1.125
4	6:1	0.058989	6	0.050562	7	1.166666	0.044444	6	0.038095	7	1.166666	0.082424	6	0.070649	7	1.166666
5	5:2	0.050562	5	0.036116	7	1.4	0.038095	5	0.027210	7	1.4	0.070649	5	0.050463	7	1.4
6	5:1	0.036116	5	0.030096	6	1.2	0.027210	5	0.022675	6	1.2	0.050463	5	0.042053	6	1.2
7	3:1	0.030096	3	0.022572	4	1.333333	0.022675	2	0.015117	3	1.5	0.042053	2	0.028035	3	1.5

## APÉNDICE B

**Matriz de cálculos para la concentración inicial de AFM<sub>1</sub> en muestras de yogurt, queso y mantequilla [Elaboración propia]**

DILUCIÓN	L. SUP	YOGURT					QUESO					MANTEQUILLA				
		C1	V1	C2	V2	FACTOR DE DILUCIÓN	C1	V1	C2	V2	FACTOR DE DILUCIÓN	C1	V1	C2	V2	FACTOR DE DILUCIÓN
1	CI	0.05	1	0.05	1	1	0.181	1	0.181	1	1	0.05	1	0.05	1	1
2	10:1	0.05	10	0.045454	11	1.1	0.181	10	0.164545	11	1.1	0.05	10	0.0454545	11	1.1
3	8:1	0.045454	8	0.040404	9	1.125	0.1645454	8	0.146262	9	1.125	0.04545455	8	0.0404040	9	1.125
4	6:1	0.040404	6	0.034632	7	1.16666667	0.1462626	6	0.125367	7	1.1666666	0.04040404	6	0.0346320	7	1.166666
5	5:2	0.034632	5	0.024737	7	1.4	0.1253679	5	0.089548	7	1.4	0.03463203	5	0.0247371	7	1.4
6	5:1	0.024737	5	0.020614	6	1.2	0.0895485	5	0.074623	6	1.2	0.02473717	5	0.0206143	6	1.2
7	3:1	0.020614	2	0.013742	3	1.5	0.0746237	2	0.049749	3	1.5	0.02061431	2	0.0137428	3	1.5
DILUCIÓN	L. INF	C1	V1	C2	V2	FACTOR DE DILUCIÓN	C1	V1	C2	V2	FACTOR DE DILUCIÓN	C1	V1	C2	V2	FACTOR DE DILUCIÓN
1	CI	0	1	0	1	1	0.122	1	0.122	1	1	0	1	0	1	1
2	10:1	0	10	0	11	1.1	0.122	10	0.110909	11	1.1	0	10	0	11	1.1
3	8:1	0	8	0	9	1.125	0.1109090	8	0.098585	9	1.125	0	8	0	9	1.125
4	6:1	0	6	0	7	1.16666667	0.0985858	6	0.084502	7	1.1666666	0	6	0	7	1.166666
5	5:2	0	5	0	7	1.4	0.0845021	5	0.060358	7	1.4	0	5	0	7	1.4
6	5:1	0	5	0	6	1.2	0.0603586	5	0.050298	6	1.2	0	5	0	6	1.2
7	3:1	0	2	0	3	1.5	0.0502989	2	0.033532	3	1.5	0	2	0	3	1.5