

# **ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**

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

Detección de Aflatoxinas totales en bocaditos de frutos secos comerciales.

### **PROYECTO INTEGRADOR**

Previo la obtención del Título de:

#### **Ingenieras en Alimentos**

Presentado por:

Angie Mishell Granda Quichimbo

Ana María Loor López

Guayaquil – Ecuador

Año: 2023

## Dedicatoria

---

Este proyecto lo dedico primero a Dios por ser la guía y proveedor de todas las oportunidades que se han presentado a lo largo de mi carrera universitaria. Gracias a las bendiciones de mi familia que me llevan por el camino correcto para cumplir mis objetivos. A mi familia, mis padres Deysi y Néstor, mi hermano Roger quien es mi apoyo incondicional en cada momento, gracias a ellos he podido cumplir mis metas, son mi orientación y fortaleza. También a las personas que me apoyaron durante el desarrollo de este proyecto, por brindarme las oportunidades, recursos, palabras sabias para de esta manera poder completarlo con satisfacción. Todo al final del camino tiene su reconocimiento, espero saber retribuirlo con las personas que formaron parte de esta etapa. Gracias.

**Mishell Granda**

## Dedicatoria

---

Deseo dedicar este proyecto profesional a Dios, quien me orienta diariamente y me provee de sabiduría y fortaleza. Asimismo, extendiendo mi gratitud a mi familia, compuesta por mi madre Cecilia López, mi abuelita Vilma Aguilar y mis hermanas Doménica y Nicole Loor. Su apoyo ha sido esencial en mi vida, cada una de ustedes ha depositado fe y confianza en mis capacidades, y por ello aspiro a retribuir y compartir mis logros en el futuro. A su vez, deseo expresar mi gratitud a las personas maravillosas que Dios coloca en mi camino, brindándome sinceros deseos de éxito, consejos motivacionales, sus experiencias laborales y personales. Finalmente me complace compartir con ustedes que me llena de alegría afrontar los nuevos desafíos que se presentarán en el futuro y mis deseos de afrontarlos con determinación y voluntad. Gracias infinitas a todos.

**Ana Loor**

## Agradecimientos

---

Extendemos nuestra más sincera gratitud al MSc. Manuel Fiallos, nuestro tutor, por su inquebrantable paciencia, confianza y orientación a lo largo de todas las etapas de desarrollo de este proyecto integrador. Asimismo, expresamos nuestro agradecimiento al MSc. Carlos J., un destacado líder y fuente de inspiración para su equipo, quien contribuyó significativamente al facilitarnos la realización de nuestra investigación. Su apoyo técnico, provisión de kits, equipos e insumos de su empresa fue invaluable. También deseamos agradecer al MSc. Antonio Moncayo, nuestro profesor de la materia integradora. Por último, manifestamos nuestra gratitud hacia aquellas personas cuya asistencia fue fundamental para la culminación de este proyecto integrador.

**Mishell Granda.**

**Ana Loor.**

## Declaración Expresa

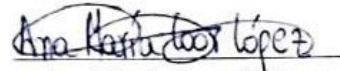
---

“Los derechos de titularidad y explotación, me(nos) corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; Angie Mishell Granda Quichimbo y Ana María Loor López 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”



Angie Mishell Granda

Quichimbo



Ana María Loor López

## **Evaluadores**

---

**Msc. Antonio Moncayo**

Profesor de materia

---

**Msc. Manuel Fiallos**

Profesor Tutor

## Resumen

Las aflatoxinas, toxinas producidas por hongos del género *Aspergillus*, en particular las especies *A. flavus* y *A. parasiticus*, son los principales generadores de estas sustancias. Estas toxinas tienen la capacidad de proliferar a lo largo de diversas etapas, incluyendo la precosecha, cosecha y postcosecha, y su desarrollo está asociado a prácticas inapropiadas en la gestión de las materias primas, así como a condiciones desfavorables durante el almacenamiento y la distribución. Esta situación plantea una preocupación relevante para la salud del consumidor debido a su vínculo con el desarrollo de cáncer de hígado. El presente trabajo busca determinar la importancia del estudio de las aflatoxinas totales y su incidencia en frutos secos comerciales existentes en el mercado nacional mediante la búsqueda bibliográfica académica y el análisis con el kit cuantitativo de detección rápida “ToxinFast” para contribuir con la seguridad alimentaria. Los resultados del análisis muestran que, de un total de 66 muestras, 42 presentan niveles de aflatoxinas entre 2 µg/kg a 3.87 µg/kg, mientras que en las otras 24 muestras no se detecta presencia alguna de estas sustancias tóxicas.

**Palabras claves:** Aflatoxinas, Cáncer, Flujo Lateral, Hongos, Kit detección rápida.

## Abstract

Aflatoxins, toxins produced by fungi of the genus *Aspergillus*, particularly the species *A. flavus* and *A. parasiticus*, are the main generators of these substances. These toxins have the ability to proliferate throughout various stages, including pre-harvest, harvest and post-harvest, and their development is associated with inappropriate practices in the management of raw materials, as well as unfavorable conditions during storage and distribution. This situation raises a relevant concern for the health of the consumer due to its link with the development of liver cancer. The present work seeks to determine the importance of the study of total aflatoxins and their incidence in commercial nuts existing in the national market through the academic bibliographic search and the analysis with the rapid detection quantitative kit "ToxinFast" to contribute to food safety. The results of the analysis show that out of a total of 66 samples, 42 present aflatoxin levels between 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  to 3.87  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , while in another 24 samples no presence of these toxic substances is detected.

Keywords: Aflatoxins, Cancer, Lateral Flow, Fungi, Rapid detection kit.



# Índice general

<b>Resumen</b> .....	I
<b>Abstract</b> .....	II
<b>Índice general</b> .....	III
<b>Abreviaturas</b> .....	V
<b>Simbología</b> .....	VI
<b>Índice de figuras</b> .....	VII
<b>Índice de tablas</b> .....	VIII
<b>1. Capítulo 1</b> .....	1
<b>1.1 Introducción</b> .....	1
<b>1.2 Descripción del problema</b> .....	3
<b>1.3 Justificación del problema</b> .....	4
<b>1.4 Objetivos</b> .....	7
<b>1.4.1 Objetivo general</b> .....	7
<b>1.4.2 Objetivos específicos</b> .....	7
<b>1.5 Marco teórico</b> .....	7
<b>2. Metodología</b> .....	18
<b>2.1 Fuente de datos y criterios de búsqueda</b> . ....	18
<b>2.2 Recolección de las muestras</b> . ....	19
<b>2.2.1 Método de análisis de la experimentación</b> . ....	19
<b>2.2.2 Materiales e insumos técnicos</b> .....	19
<b>2.2.3 Recursos para el análisis (kit, insumos)</b> .....	20
<b>2.2.4 Procedimiento de análisis de muestras</b> . ....	20
<b>2.3 Rediseño de laboratorio</b> .....	22

<b>3. RESULTADOS Y ANÁLISIS .....</b>	<b>24</b>
<b>3.1 Resultados del bibliometrix.....</b>	<b>24</b>
<b>3.1.1 Producción científica anual.....</b>	<b>25</b>
<b>3.1.2 Herramientas relevantes.....</b>	<b>26</b>
<b>3.1.3 Relación de palabras claves dentro de la investigación según el periodo de años observado.....</b>	<b>28</b>
<b>3.1.4 Relación de enfermedades ocasionadas por aflatoxinas en el mundo.....</b>	<b>29</b>
<b>3.2 Resultados experimentación.....</b>	<b>30</b>
<b>3.2.1 Resultados de los ensayos .....</b>	<b>31</b>
<b>3.2.2 Muestras encontradas por rango de aflatoxinas .....</b>	<b>36</b>
<b>3.2.3 Límites no detectables y detectables en muestras comerciales de snacks de frutos secos.....</b>	<b>37</b>
<b>3.2.4 Clasificación de las muestras comerciales de snacks de frutos secos según su tipo de composición.....</b>	<b>39</b>
<b>3.3 Resultados diseño del laboratorio.....</b>	<b>41</b>
<b>3.3.1 Lay out propuesto para el rediseño del laboratorio para análisis y detección de micotoxinas (aflatoxinas) en snacks/bocaditos de frutos secos comerciales.....</b>	<b>41</b>
<b>3.4 Costos.....</b>	<b>42</b>
<b>3.4.1 Equipos de detección.....</b>	<b>42</b>
<b>3.4.2 Insumos para el análisis .....</b>	<b>43</b>
<b>4.CAPÍTULO 4 .....</b>	<b>45</b>
<b>4.1 Conclusiones y recomendaciones .....</b>	<b>45</b>
<b>4.1.1 Conclusiones .....</b>	<b>45</b>
<b>4.1.2 Recomendaciones .....</b>	<b>46</b>

**Bibliografía**

**Apéndices**

## Abreviaturas

Aw	Actividad de agua
AFT	Aflatoxinas totales
AOAC	Association of Analytical Communities o Asociación Científica Dedicada a la Excelencia Analítica
IARC	Asociación internacional de investigación del cáncer
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay o Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima
ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography o Cromatografía líquida de alta resolución.
LORSA	Ley Orgánica del Régimen de la Soberanía Alimentaria.
MTL	Límites Máximos Tolerables.
HDPE	Polietileno de alta densidad (PEAD). En inglés: High Density Polyethylene.
LDPE	Polietileno de baja densidad (PEBD). En inglés: Low Density Polyethylene.
BOPP	Polipropileno biorientado (BOPP). En inglés: Bi-oriented polypropylene film.
RASFF	Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos.
ONU	Organización de las Naciones Unidas
BOPP	polipropileno biorientado. En inglés: Bi-oriented polypropylene film
N/D	No detectado

## SIMBOLOGÍA

%	Porcentaje
mg	Miligramo
ml	Mililitro
G	Gramos
L	Litro
kg	Kilogramo
°C	Grados celsius
µg	Microgramo
ng	Nanogramo
µL	Microlitro
ppm	Partes por millón
ppb	Partes por billón
UFC	Unidades formadoras de colonias

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> Estructuras químicas de aflatoxinas del grupo B1, B2, G1 y G2 .....	12
<b>Figura 2</b> Diagrama de ruta tecnológica y marco de investigación .....	18
<b>Figura 3</b> Diagrama de procedimiento para el análisis cuantitativo de aflatoxinas totales en snacks de frutos secos empleando kits de detección rápida .....	22
<b>Figura 4</b> Diagrama con la cantidad de resultados por filtro. ....	24
<b>Figura 5</b> Producción científica anual .....	25
<b>Figura 6</b> Herramientas relevantes .....	26
<b>Figura 7</b> Palabras clave de la investigación por periodo de año.....	28
<b>Figura 8</b> Relación de enfermedades ocasionadas por la presencia de aflatoxinas .....	29
<b>Figura 9</b> Rangos de resultado para aflatoxinas totales vs cantidad de muestra .....	37
<b>Figura 10</b> Límites detectables y no detectables de aflatoxinas partiendo de una sensibilidad del kit de 2 µg/kg.....	37
<b>Figura 11</b> Promedio de resultados según la clasificación de la composición de los snacks de frutos secos.....	39
<b>Figura 12</b> Lay out propuesto para el rediseño del laboratorio para análisis y detección de micotoxinas (aflatoxinas) en snacks de frutos secos comerciales .....	41
<b>Figura 13</b> Equipos de detección de aflatoxinas totales.....	42

## Índice de tablas

<b>Tabla 1</b> Clasificación de las principales micotoxinas y sus especies fúngicas predominantes .....	8
<b>Tabla 2</b> Clasificación de las principales micotoxinas, detalle de la especie fúngica predominante, alimentos más susceptibles, efectos dañinos ocasionados en la salud del consumidor y clasificación según la IARC .....	9
<b>Tabla 3</b> Clasificación de los parámetros principales de aflatoxinas B1 y aflatoxinas totales junto a la declaración del país regulador .....	14
<b>Tabla 4</b> Clasificación de los parámetros principales de aflatoxinas totales, declaración del límite máximo tolerable y la parte/sección del producto con base en el cual aplica el MLT declarado .....	14
<b>Tabla 5</b> Resultados aflatoxinas con su respectiva descripción .....	32
<b>Tabla 6</b> Clasificación de snacks de frutos secos según su composición junto al detalle del promedio de resultados obtenidos .....	40
<b>Tabla 7</b> Materiales por usar con su costo estimado y costo total de análisis .....	43
<b>Tabla 8</b> Clasificación de snacks de frutos secos declarando su composición 100%, resultado de detección y marca comercial .....	1
<b>Tabla 9</b> Clasificación de snacks de mix de frutos secos declarando su composición de mix, resultado de detección y marca comercial .....	1
<b>Tabla 10</b> Clasificación de snacks de frutos secos declarando su composición de mix de frutos secos con (frutas deshidratadas, yogurt, chocolate amargo y blanco, jaleas, entre otros tipos de aderezo), resultado de detección y marca comercial. ....	2

# Capítulo 1

## 1.1 Introducción

La seguridad alimentaria y la calidad de los productos comerciales son aspectos de máxima prioridad que deben ser constantemente considerados en la elaboración y distribución de productos alimenticios. Un área de gran preocupación en este ámbito alimenticio es la presencia de agentes aflatoxígenos (Aflatoxinas), los cuales constituyen una de las principales amenazas dentro del amplio espectro de peligros químicos potenciales (Bhardwaj et al., 2023). De acuerdo con los informes del Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos (RASFF), se ha observado un aumento del 20.9% en el número de notificaciones entre el 2009 y 2012, además, desde el año 2012 hasta el 20 de julio de 2023 se han notificado un total de 892 casos relacionados con la detección de aflatoxinas en frutos secos, productos derivados y semillas (CE, 2023).

Hoy en día, existen diversas técnicas que permiten monitorear y prevenir en cierta medida la contaminación de los alimentos, entre los cuales se incluyen proporcionar un correcto procesamiento y manipulación de los frutos secos, evitar almacenamientos prolongados debido a que facilita el intercambio de gases y humedad con el medio externo (Mir et al., 2022). Los métodos para la disminución de los niveles de aflatoxinas comprenden el descascarado y el escaldado, sin embargo, investigaciones constatan que el proceso de tostado disminuye significativamente el contenido de aflatoxinas en los pistachos, pero en el caso de las nueces, la presencia de aflatoxina persiste (*CODEX STAN 193-1995, 2019*, s. f.).

En la actualidad, se cuenta con una técnica inmunológica reconocida como "inmunocromatografía", la cual se fundamenta en la utilización de complejos inmunes para llevar a cabo la cuantificación de un analito específico, en este caso, las toxinas (Ortega et al., 2020).

Esta modalidad de análisis se caracteriza por su habilidad para generar resultados precisos sin requerir la incorporación de reactivos ni la utilización de instrumentación adicional en los laboratorios (Le et al., 2019). La representación convencional de esta técnica se encuentra en forma de tiras reactivas, en las cuales se observa el desplazamiento de la muestra, que debe contener el antígeno en cuestión y posteriormente éste se unirá al conjugado y transitará a través de la membrana de nitrocelulosa (Mühlhauser & Rivas, 2014).

Los frutos secos, clasificados como alimentos "saludables" y ampliamente consumidos en forma de snacks/bocaditos, son una fuente importante de energía, ácidos grasos esenciales, fibra, proteínas, vitaminas y minerales (Plaz Torres et al., 2020). No obstante, debido a su susceptibilidad a la contaminación por aflatoxinas, metabolitos fúngicos altamente tóxicos, su inocuidad y calidad pueden verse comprometidas (Zivoli, 2017). La presencia de metabolitos secundarios producidos por hongos representa una seria amenaza para los frutos secos, generando la formación de micotoxinas que resultan difíciles de eliminar por completo durante los posteriores procesos de transformación (Ayeni et al., 2021). Estas micotoxinas tienen efectos tóxicos tanto en seres humanos como en el ganado, y pueden desencadenar desde envenenamientos agudos hasta problemas críticos relacionados con inmunodeficiencia y cáncer (Keipińska-Pacelik & Biel, 2021).

Entre las micotoxinas de mayor interés en términos de seguridad e inocuidad alimentaria se encuentran las Aflatoxinas, Ocratoxinas, Tricotecenos, Fumonisinias, Zearalenonas y Patulina (Rao et al., 2021). Conscientes de los riesgos que estas micotoxinas representan para la salud pública y la integridad de la cadena alimentaria, es imperativo que los esfuerzos de control y prevención se intensifiquen a nivel nacional e internacional (Alshannaq & Yu, 2021). La colaboración entre los actores involucrados, así como la implementación de políticas y regulaciones efectivas, serán



fundamentales para asegurar la inocuidad de los productos alimenticios y salvaguardar la salud de los consumidores (Foerster et al., 2020).

## **1.2 Descripción del problema**

La Organización Mundial de la Salud (OMS) informa que las micotoxinas son un peligro frente a la salud del ser humano y del ganado, los efectos negativos se categorizan como agudo y crónico, intoxicación alimentaria y cáncer, respectivamente, causando la enfermedad denominada “Aflatoxicosis” (Organización Mundial de la Salud, 2018). Con el objetivo primordial de garantizar la seguridad alimentaria, resulta de suma importancia establecer una diligente vigilancia sobre la presencia y concentración de aflatoxina en los productos alimenticios (Salvador et al., 2022).

Los alimentos asociados a la aflatoxicosis son: almendras, nueces, pistachos, entre otros. En estudios a animales se ha analizado que puede llegar a producir carcinoma de hígado, necrosis aguda y cirrosis, se tiene la consideración de que en humanos sea semejante y no es transmisible (Nikita & Felicia, 2021). Entre los brotes más relevantes se destacan los siguientes: el primero ocurrió en India donde 397 personas fueron identificadas intoxicadas por aflatoxinas, 108 personas murieron; la causa fue el consumo de producto contaminado; el segundo fue en Kenia con 60% de mortalidad, por una ingesta muy elevada de aflatoxinas, llegando a un nivel de 38  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Sánchez, 2015).

La exposición a micotoxinas puede ocurrir tanto de forma directa como indirecta, estas son motivo de preocupación en el ámbito de la seguridad alimentaria, por esto es de vital importancia la: vigilancia constante, adopción de buenas prácticas agrícolas y de almacenamiento para reducir la exposición a las micotoxinas y salvaguardar la salud (Abbas et al., 2019). La vía directa implica

que los seres humanos ingieren alimentos contaminados con hongos, los cuales pueden haberse infectado antes, durante o después de la cosecha, mientras que la vía indirecta se refiere a que los animales han sido alimentados con productos contaminados con estas toxinas, y luego los seres humanos consumen los derivados de esos animales, como la carne y la leche (Suman, 2021).

### **1.3 Justificación del problema.**

La creciente tendencia de consumo a gran escala de snacks de frutos secos en la población ha generado preocupación debido a los riesgos asociados con la contaminación por aflatoxinas, estas son toxinas producidas por hongos del género *Aspergillus*, y se ha demostrado que tienen propiedades cancerígenas (Organización Mundial de la Salud, 2018). La presencia de aflatoxinas en productos alimentarios es un indicador crítico de calidad, dado que estas toxinas son conocidas por su toxicidad y potencial carcinogénico (Cachiguango, 2019).

Los resultados de un estudio que evalúa riesgos y consciencia del consumidor sobre micotoxinas revelaron que la prevalencia de riesgo de cáncer de hígado mostraba una tendencia de dos a seis veces mayor en niños que en adultos, y esto se asociaba con la ingesta promedio diaria de aflatoxinas en la dieta (Ezekiel et al., 2021). Como resultado, se vuelve crucial tomar medidas para proteger a los niños de la exposición a estas micotoxinas y garantizar que los alimentos que consumen cumplan con los límites seguros de aflatoxinas establecidos por las normativas regulatorias (Tinoco, 2016). Lamentablemente, se ha estimado que en América Latina alrededor de 500 millones de personas están expuestas anualmente a niveles de aflatoxinas que sobrepasan los valores permitidos según las normativas regulatorias (Renaud et al., 2022). Esta situación representa un importante problema de salud pública, ya que la exposición a aflatoxinas

puede tener graves consecuencias para la salud, incluyendo el desarrollo de enfermedades como el cáncer (Bogantes- Ledezma et al., 2004).

La ONU con la finalidad de lograr un futuro mejor y sostenible desarrolla los 12 objetivos de desarrollo sostenible, los cuales representan una acción frente a la pobreza, protección del planeta y mejora de las vidas de las personas (Moran, 2023). Este proyecto se relaciona con el objetivo número 3 que trata sobre la salud y bienestar con el objetivo de garantizar una vida sana y promover el bienestar de las personas debido a uno de sus objetivos específicos es reducir el número de enfermedades y muertes que hayan sido producidas por productos químicos peligrosos y por contaminación (Naciones Unidas, 2023).

En lo que respecta a leyes y normas nacionales, en la Constitución de la República del Ecuador en el artículo 13 de la sección 1, se establece que la población ecuatoriana tiene derecho a un acceso seguro y permanente a alimentos sanos, suficientes y adecuados, lo que motiva al Estado a promover la soberanía alimentaria (Constitución de la República del Ecuador, 2008.). La Ley Orgánica del Régimen de la Soberanía Alimentaria (LORSA) de la República del Ecuador establece en su capítulo 4, artículos 24 y 25, la responsabilidad del Estado ecuatoriano en la prevención y control de enfermedades animales y vegetales, para lograr este propósito, se promoverán prácticas y tecnologías de producción, así como un adecuado manejo, conservación y comercialización de alimentos seguros e inocuos (LORSA, 2010). A su vez en la sección 7 de la Constitución de la República del Ecuador se aborda el tema de la salud, donde el artículo 32 establece que la salud es un derecho garantizado por el Estado, esta concepción de salud abarca una interrelación con otros derechos fundamentales, entre los cuales se encuentran el derecho a la alimentación, al acceso al agua, a la educación y a la seguridad social, entre otros (Constitución de la República del Ecuador, 2008).

Previamente se ha detallado el efecto perjudicial que tienen las aflatoxinas en la salud humana, se debe tener presente que la contaminación por aflatoxinas está vinculada a las condiciones climáticas, especialmente a altas temperaturas y un clima húmedo, lo que favorecedor para el desarrollo de los hongos *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* (Nikita & Felicia, 2021). Estos hongos requieren un contenido de humedad en el ambiente que oscile entre el 94% y el 96%, junto con una temperatura que se sitúe en un rango de 10 a 40°C (Wirth et al., 2019). En el caso específico de Ecuador, el país presenta condiciones climáticas propicias para el desarrollo de estos microorganismos, pues la temperatura promedio en Ecuador se encuentra entre 24 y 25°C, con fluctuaciones que pueden llegar hasta 40°C (Varela & Ron, 2022).

Para abordar estos desafíos, es fundamental fortalecer las medidas de control y monitoreo de la presencia de aflatoxinas en los frutos secos que se comercializan y consumen en el país (Martínez et al., 2013). Asimismo, es relevante fomentar la concientización entre la población sobre los riesgos asociados con el consumo de productos contaminados con aflatoxinas y la importancia de seguir las pautas y regulaciones establecidas para garantizar la seguridad alimentaria (Sanchez, 2015).

Ante la preocupación por la contaminación de frutos secos con aflatoxinas y los potenciales efectos negativos en la salud de los consumidores, se hace necesaria la aplicación de métodos cuantitativos para evaluar la presencia de estas micotoxinas de forma rápida y precisa. En este contexto, el kit de detección rápida "ToxinFast" se convierte en una herramienta valiosa para realizar un análisis cuantitativo de la concentración de aflatoxinas totales en muestras de frutos secos. La utilización de este tipo de kit permite a los investigadores y autoridades de salud evaluar la seguridad de los productos frutos secos que se comercializan y consumen en el mercado. Al proporcionar resultados cuantitativos, se puede determinar si los niveles de aflatoxinas presentes

en los alimentos están dentro de los límites permitidos por las regulaciones y normativas establecidas para garantizar la seguridad alimentaria.

## **1.4 Objetivos**

### **1.4.1 Objetivo general**

Determinar la importancia del estudio de las aflatoxinas totales y su incidencia en frutos secos comerciales existentes en el mercado nacional mediante la búsqueda bibliográfica académica y el análisis con el kit cuantitativo de detección rápida “ToxinFast” para contribuir con la seguridad alimentaria.

### **1.4.2 Objetivos específicos**

1. Analizar el estado actual de conocimiento sobre la presencia de aflatoxinas en frutos secos mediante el uso de herramientas bibliométricas.
2. Identificar la presencia de aflatoxinas totales en frutos secos comerciales como almendras, nueces de la India, nueces de Nogal, maní, pistacho y macadamia mediante el método de detección rápida “lateral flow”.
3. Rediseñar el laboratorio del cliente empleando herramientas de diseño de plantas para la distribución apropiada de un área donde se identifique presencia de aflatoxinas en productos alimenticios comerciales.

## **1.5 Marco teórico**

Las micotoxinas son compuestos químicos tóxicos de origen fúngico que se producen de manera natural debido a la presencia de diversas especies de hongos filamentosos (Iqbal, 2021). Principalmente, los mohos que tienen la capacidad de producir estas toxinas pertenecen a los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, por eso desde la perspectiva de la seguridad e

inocuidad alimentaria, las micotoxinas que han generado mayor interés de estudio se clasifican en distintos grupos, tales como las Aflatoxinas (B1, B2, G1, G2, M1 y M2), Fumonisin (Zearalenona, Nivalenol, Deoxinivalenol, T2, F1 y F2), Ocratoxina A y Patulina (Rao et al., 2021). La tabla 1 proporciona una clasificación de estas micotoxinas y los géneros predominantes.

**Tabla 1**

*Clasificación de las principales micotoxinas y sus especies fúngicas predominantes*

Micotoxinas	Especies fúngicas predominantes
Aflatoxina	<i>Aspergillus aflatoxiformans</i>
	<i>Aspergillus flavus</i>
	<i>Aspergillus parasiticus</i>
Ocratoxina A	<i>Aspergillus carbonarius</i>
	<i>Aspergillus ochraceus</i>
	<i>Aspergillus steynii</i>
	<i>Aspergillus westerdijkiae</i>
Fumonisin	<i>Aspergillus niger</i>
	<i>Fusarium oxysporum</i>
	<i>Fusarium proliferatum</i>
Zearalenona	<i>Fusarium culmorum</i>
	<i>Fusarium crookwellense</i>
	<i>Fusarium graminearum</i>
Deoxinivalenol	<i>Fusarium culmorum</i>
	<i>Fusarium graminearum</i>

*Nota.* Datos tomados de (Kępińska-Pacelik & Biel, 2021).

Los hongos productores de micotoxinas tienen la capacidad de desarrollarse en diversos grupos de alimentos, entre los cuales se destacan cereales, semillas oleaginosas y frutos secos (Chulze et al., 2021). Los cereales susceptibles a la contaminación incluyen maíz, arroz, trigo y cebada (Kumar et al., 2022). En el grupo de semillas oleaginosas se encuentran el maní, la soya y las semillas de girasol (Einolghozati et al., 2021). Los frutos secos más propensos a la presencia de micotoxinas son las almendras, nueces y pistachos (Suman, 2021).

Es importante reconocer la relevancia de esta problemática en términos de seguridad alimentaria y salud pública debido a que la presencia de micotoxinas en alimentos representa un riesgo significativo para la salud de los consumidores, ya que estas toxinas pueden tener efectos tóxicos y carcinogénicos (Kujbida et al., 2019). Por este motivo en la tabla 2 se proporciona una detallada clasificación de los principales grupos de micotoxinas, junto con información relevante sobre la especie fúngica predominante, los alimentos más susceptibles a su desarrollo, una breve explicación de los efectos dañinos ocasionados en la salud del consumidor y su clasificación según la Asociación Internacional de Investigación del Cáncer (IARC) (Taniwaki et al., 2018a).

**Tabla 2**

*Clasificación de las principales micotoxinas, detalle de la especie fúngica predominante, alimentos más susceptibles, efectos dañinos ocasionados en la salud del consumidor y clasificación según la IARC*

	Fuentes fúngicas predominantes	Target alimenticio (alimento objetivo)	Efectos asociados a la salud en humanos	Clasificación según la IARC
Micotoxinas				

Aflatoxinas (B1, B2, G1, G2)	<i>Aspergillus flavus Aspergillus parasiticus</i>	Maíz, maní, semillas oleaginosas, nueces de árbol	Cancerígeno, hepatotóxico e inmunosupresor	Grupo 1B
Deoxinivalen ol/ vomitoxina	<i>Fusarium culmorum Fusarium graminearum Fusarium moniliforme</i>	Trigo, maíz, cebada.	Vómitos, náuseas, diarrea, toxicosis y trastornos reproductivos.	Grupo 3
Fumonisina	<i>Fusarium proliferatum Fusarium verticillioides</i>	Maíz, arroz, sorgo	Nefrotóxico, cancerígeno e inmunosupresor	Grupo 2 B
Ocratoxina A	<i>Aspergillus carbonarius Aspergillus niger Penicillium verrucosum</i>	Trigo, maíz, cebada, café, avena.	Genotóxico, cancerígeno e inmunosupresor	Grupo 2 B



Zearalenon	<i>Fusarium</i>	Maíz, sorgo, trigo.	Cancerígeno, Trastorno reproductivo.	Grupo 3
	<i>culmorum</i>			
Patulina	<i>Fusarium</i>	Cereales, manzana, aceitunas, uvas, melocotón.	Trastornos neurológicos y gastrointestinales.	Grupo 3
	<i>graminearum</i>			
	<i>Byssochlamys</i>			
	<i>Penicillium</i>			
	<i>expansum</i>			

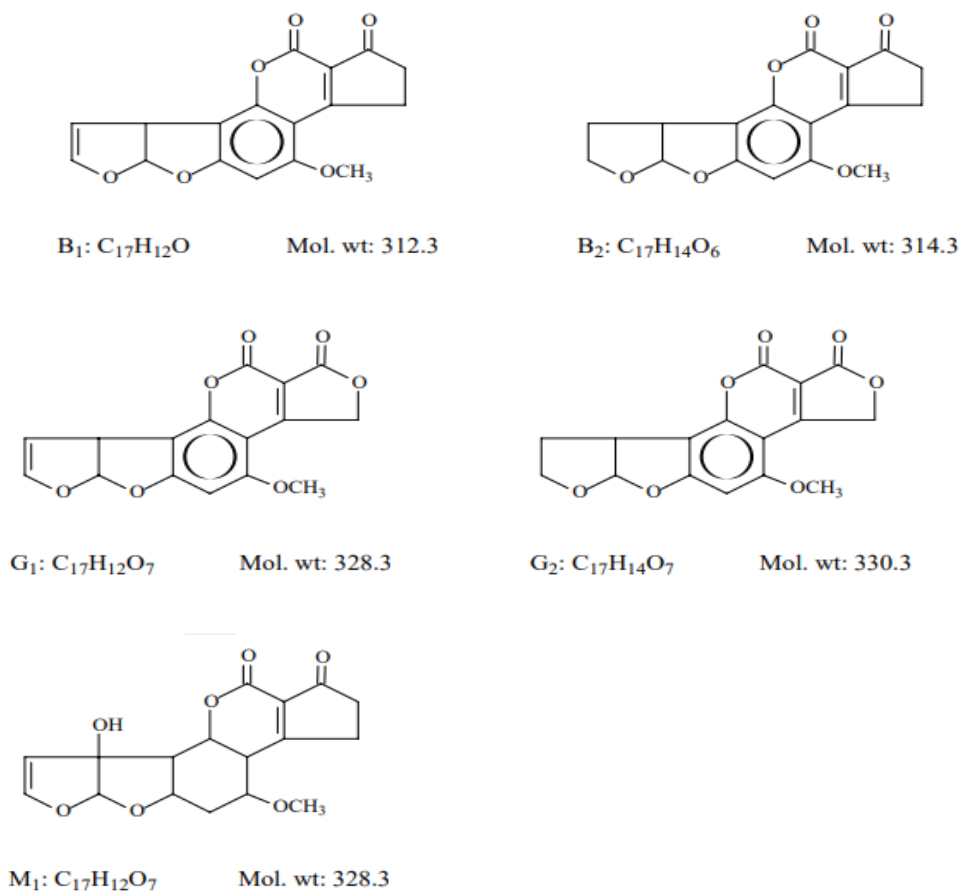
*Nota.* Datos tomados de Channaiah, (2019).

Las aflatoxinas constituyen un grupo de toxinas compuestas por 20 estructuras policíclicas, pertenecientes al grupo de los compuestos furanocumarina (Tahir et al., 2018). En el contexto de los frutos secos, las aflatoxinas de mayor interés son aquellas pertenecientes al grupo B1, B2, G1 y G2, su designación alfabética se basa en la fluorescencia que emiten bajo luz ultravioleta, donde la letra "B" corresponde a "Blue" (azul) y la "G" a "Green" (verde) (Taniwaki et al., 2018a). Por otra parte, la nomenclatura numérica obedece a la presencia o ausencia de un doble enlace en su isómero estructural, siendo el número "1" para aquellas con doble enlace y el número "2" para aquellas sin él (Dodd et al., 2017). Dentro del grupo de aflatoxinas, su orden de toxicidad es el siguiente: B1 > G1 > B2 > G2, estas toxinas pueden presentar efectos altamente perjudiciales para la salud humana y animal, por lo que resulta fundamental establecer medidas de control y prevención para reducir su presencia en los alimentos (Tahir et al., 2018). En la figura 1 se observan las estructuras químicas correspondientes a la clasificación de aflatoxinas, lo cual

proporciona una visualización clara y concisa de estas toxinas y sus características químicas (Mir et al., 2022).

### Figura 1

Estructuras químicas de aflatoxinas del grupo B1, B2, G1 y G2



*Nota.* Datos tomados de (Mir et al., 2022).

Los mohos del género *Aspergillus*, especialmente las especies *A. flavus* y *A. parasiticus*, son los principales productores de aflatoxinas (Taniwaki et al., 2018a). Estos microorganismos tienen la capacidad de desarrollarse en diferentes etapas, desde el cultivo de la materia prima hasta la pre cosecha, cosecha y postcosecha, este desarrollo indeseado está vinculado a prácticas inadecuadas en el manejo de las materias primas, así como a condiciones desfavorables de

almacenamiento y distribución (Carballo et al., 2019). Dada su relevancia, es esencial implementar medidas efectivas de control en todas las etapas de la cadena alimentaria para reducir la presencia de aflatoxinas en los alimentos garantizando la inocuidad y seguridad alimentaria (Pickova et al., 2021). Los frutos secos, como nueces, pistachos y almendras, son particularmente susceptibles a la producción de estas toxinas, estos alimentos son consumidos en gran proporción debido a su alta calidad nutricional y atractivo sabor (Emadi et al., 2022). Sin embargo, la presencia de aflatoxinas en los frutos secos plantea un riesgo significativo para la salud pública, por este motivo las entidades reguladoras de diversos países a nivel mundial mediante rigurosas investigaciones científicas y evaluaciones de riesgo han establecido Límites Máximos Tolerables (MTL) para la presencia de aflatoxinas en productos alimenticios (Alshannaq & Yu, 2021).

Los Límites Máximos Tolerables se definen como valores límite que indican la cantidad máxima de aflatoxinas permitida en los alimentos y su nivel de toxicidad específico para las aflatoxinas en cada caso, estos límites son establecidos de manera que el nivel de contaminación no represente un riesgo significativo para la salud pública salvaguardando así la seguridad alimentaria (Taniwaki et al., 2019). Se detalla a continuación los MTL en la tabla 3 (Naeem et al., 2022) mientras que en la tabla 4 se detallan los MLT de los frutos secos con base a lo declarado en el Codex Alimentarius (*CODEX STAN 193-1995, 2019*).

**Tabla 3**

*Clasificación de los parámetros principales de aflatoxinas B1 y aflatoxinas totales junto a la declaración del país regulador*

Parámetros MLT de Aflatoxinas B1	Parámetros MLT de Aflatoxinas Totales	País Regulador
2 µg/Kg	4 µg/Kg	Unión Europea.
5 µg/Kg	10 µg/Kg	Australia, Nueva Zelanda, Canadá, Turquía y Estados Unidos.
5 µg/Kg	15 µg/Kg	Irán.

*Nota.* Datos tomados de (Naeem et al., 2022).

**Tabla 4**

*Clasificación de los parámetros principales de aflatoxinas totales, declaración del límite máximo tolerable y la parte/sección del producto con base en el cual aplica el MLT declarado*

Producto	Parámetros MLT de Aflatoxinas Totales	Parte/sección del producto sobre el cual aplica el MLT
Almendras		
Avellanas		Aplica para todo el producto
Nueces de Brazil	10 µg/Kg	de consumo humano después
Pistachos		de eliminar la cáscara.
Almendras		
Avellanas	15 µg/Kg	Aplica para todo el producto
Nueces de Brazil		con procesos de elaboración

---

*Nota.* Datos tomados de Codex Alimentarius (*CODEX STAN 193-1995, 2019*).

La AOAC International (Association of Official Analytical Chemists) es una organización reconocida mundialmente que establece métodos estandarizados para el análisis de alimentos y otros productos. El método AOAC 999.07 es un procedimiento analítico utilizado para la detección de aflatoxina B1 y aflatoxinas totales en alimentos específicos (AOAC INTERNATIONAL, 2000). Entre otros métodos está el método de HPLC es conocido por su versatilidad, ya que permite la separación de mezclas complejas y la identificación de sustancias individuales presentes en una muestra basándose en el uso de dos fases, una estacionaria y una móvil (Saffari et al., 2021). La muestra por analizar se inyecta en la fase móvil, y a medida que la muestra fluye a través de la columna, ocurre una migración diferencial de las sustancias presentes en función de sus interacciones con ambas fases ((Miranda & Martín, 2013).

Por otro lado, el método ELISA, o ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas, se emplea para obtener valores numéricos que corresponden a la cantidad de un antígeno específico presente en una muestra (Vita et al., 2022). Este método se basa en la interacción de anticuerpos específicos con las micotoxinas presentes en la muestra, y esta interacción es detectada mediante una enzima que produce una señal medible (Devices, 2023). Este método presenta 4 tipos:

- ELISA directo: el antígeno se encuentra unido al pocillo y luego se añade el anticuerpo específico conjugado por una enzima (Devices, 2023).
- ELISA indirecto: un antígeno es unido al fondo del pocillo para luego añadir un anticuerpo específico, y este anticuerpo se une a uno segundo que está conjugado con una enzima (Li et al., 2016)

- ELISA competitivo: en el fondo del pocillo se encuentra un antígeno de referencia, luego se añade la muestra con el anticuerpo, de manera que si el antígeno está presente en la muestra empieza una competencia con el antígeno de referencia (Ortega et al., 2020).
- ELISA tipo sánduche: este usa dos anticuerpos específicos para el antígeno que se busca identificar, un anticuerpo se encuentra fijado en el pocillo, aquí entra el antígeno en caso de encontrarse y luego ingresa un segundo anticuerpo ligado a una enzima que aporta coloración a la solución (Devices, 2023).

Además de los métodos previamente mencionados, existe una técnica inmunológica conocida como "inmunocromatografía", que se basa en el uso de complejos inmunes para la cuantificación de un analito específico, en este caso, las toxinas (Ortega et al., 2020). Esta técnica presenta tres ventajas clave: rapidez, confiabilidad y simplicidad en la obtención de resultados cuantitativos y cualitativos en los laboratorios de análisis, la inmunocromatografía se destaca por su capacidad para proporcionar resultados precisos sin la necesidad de utilizar reactivos ni instrumentos de laboratorio adicionales (Le et al., 2019). La presentación típica de esta técnica se encuentra en tiras reactivas, en las cuales se observa la migración de la muestra, la misma que debe contener el antígeno en cuestión, el cual se unirá posteriormente al conjugado y viajará a través de la membrana de nitrocelulosa (Mühlhauser & Rivas, 2014).

El kit ToxinFast utiliza la técnica inmunocromatográfica de flujo lateral, lo que permite obtener lecturas cualitativas al detectar visualmente la presencia o ausencia de aflatoxinas ofreciendo a su vez la posibilidad de realizar lecturas cuantitativas mediante un equipo lector/cuantificador, lo que simplifica el análisis y agiliza los resultados, que pueden obtenerse en solo un minuto. Este ensayo ha sido validado con diversas matrices alimenticias, como trigo, maíz, harina de maní y alimento

para ganado, entre otras, obteniendo un rango de detección para concentraciones de aflatoxinas que van desde 0 a 30 ug/kg y de 20 a 50 ug/kg (Meizheng, 2022).

Se ha abordado exhaustivamente el tema de las toxinas, los riesgos inherentes a las aflatoxinas, así como la seguridad y la inocuidad alimentaria. No obstante, resulta de carácter importante destacar que la realización de estos análisis debe llevarse a cabo en un laboratorio debidamente estructurado, con una disposición adecuada de sus distintas áreas para asegurar una fluidez óptima en los desplazamientos del personal, los materiales y los productos (Luber, 2011). En virtud de esta consideración, uno de los objetivos planteados es la reestructuración del laboratorio con el propósito de garantizar la implementación de procesos que se ajusten a los principios fundamentales de higiene alimentaria.

# CAPÍTULO 2

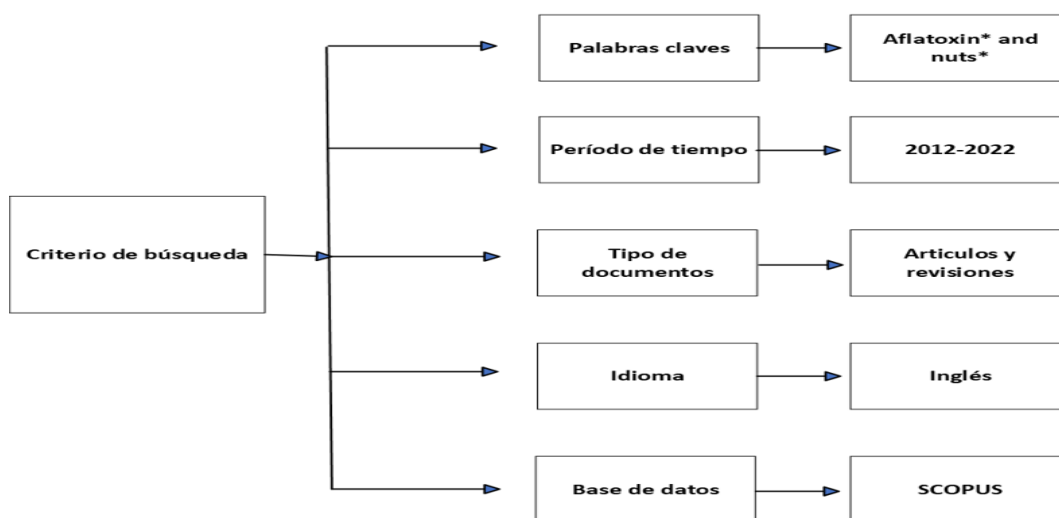
## Metodología

### 2.1 Fuente de datos y criterios de búsqueda.

La búsqueda bibliográfica se realizó en la base científica de SCOPUS. Las palabras claves fueron “aflatoxin\*” y “nuts\*”; operador lógico “and”, se obtuvieron 812 resultados. El operador "\*" permite encontrar palabras que inicie con las letras precedentes al mismo, incluyendo plurales. Posteriormente, se delimitó el tiempo desde 2012 a 2022 obteniendo 441 documentos, el siguiente filtro fue el tipo de documentos seleccionando artículos y revisiones, se obtuvieron 397 resultados y por último restricción para el idioma filtrando solo los que están escritos en inglés, para lo cual se obtuvieron 389 resultados. Para el análisis bibliométrico se utilizó el paquete estadístico Bibliometrix y la extensión biblioshiny, el cual permite la recopilación y mapeo de datos. En la figura 2 se presenta la ruta tecnológica de la búsqueda de información.

**Figura 2**

*Diagrama de ruta tecnológica y marco de investigación*



*Nota.* Datos adaptados de (Chen et al., 2023).



## **2.2 Recolección de las muestras.**

Se analizaron 66 productos comerciales, siendo mezclas de frutos secos de: almendras, nueces, nueces de Nogal, nueces de la India, macadamia, maní y pistachos. Estos productos terminados venían en presentaciones saladas, dulces, cubiertas de chocolate y con mezcla de frutas deshidratadas. El contenido neto ronda los 30 g hasta los 400 g. Se analizaron muestras de producto terminado nacionales y extranjeras provenientes de los siguientes países: Colombia, Perú, Alemania y Estados Unidos. En lo que respecta al empaque de los productos terminados estos fueron fundas zipper con fuelle, láminas y envases tipo reposteros elaborados de: polietileno de alta densidad (PEAD o HDPE por sus siglas en inglés), polietileno de baja densidad (PEBD o LDPE por sus siglas en inglés) y polipropileno biorientado (BOPP por sus siglas en inglés). Estas muestras fueron adquiridas en las principales cadenas de supermercados de Guayaquil y Machala: Mi comisariato, Supermaxi, Tía, y Tuti.

### **2.2.1 Método de análisis de la experimentación.**

Para realizar el análisis a los bocaditos o snacks de frutos secos se trabajó con un kit inmunocromatográfico denominado ToxinFast, que puede detectar 6 tipos de micotoxinas en una amplia gama de cereales, granos y frutos secos.

### **2.2.2 Materiales e insumos técnicos.**

Dentro del análisis a realizar se necesitó de un equipo de detección de micotoxinas que analice aflatoxinas en producto terminado. Para lo cual se trabajó con el equipo de la marca Meizheng. Además, se utilizaron insumos para la preparación y manejo de las muestras.

### **2.2.3 Recursos para el análisis (kit, insumos)**

El equipo de detección de aflatoxinas incluye un equipo de incubación el cual está a 30°C, y un equipo lector que proporciona el resultado cuantitativo correspondiente al análisis. El kit incluye las tirillas, micropocillos y solución buffer para el análisis.

Dentro de los demás insumos utilizados para el análisis están:

- Fundas estériles
- Agua destilada
- Etanol 90%
- Puntas de laboratorio 100 y 1000 µL
- Pipeta de 50 a 200 µL
- Pipeta de 100 a 1000 µL
- Tubos de ensayo pequeños
- Stomacher
- Gradilla
- Probeta
- Vaso de precipitación
- Balanza

### **2.2.4 Procedimiento de análisis de muestras.**

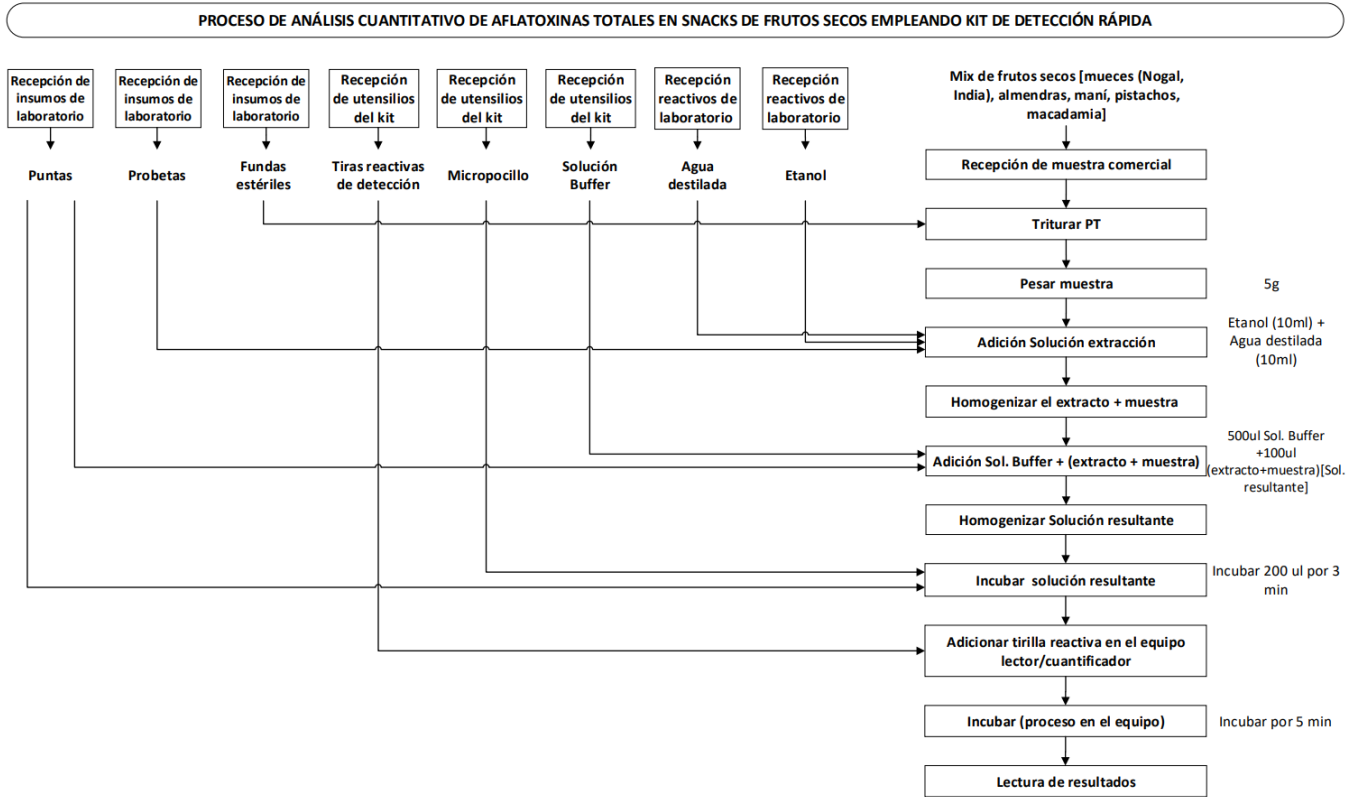
En la figura 3 se visualiza el procedimiento para el análisis cuantitativo de aflatoxinas totales en snacks de frutos secos empleando el kit de detección rápida denominado ToxinFast, para el proceso de detección se utilizaron puntas, buretas, fundas estériles, tiras reactivas, micropocillos,

solución buffer, agua destilada, etanol y las muestras de productos comerciales (snacks de frutos secos).

El proceso consta de 11 etapas: recepción de insumos de laboratorio, utensilios del kit, reactivos y la muestra comercial del producto terminado, trituración de los frutos secos comerciales, se procedió a pesar la muestra (5g), a esto se le adicionó una solución de extracción que implicó añadir 10 ml de etanol más 10 ml de agua destilada, se realizó la primera homogenización (extracto más muestra de 5g), se continuó extrayendo 100  $\mu$ L de la solución homogenizada y se adicionó 500  $\mu$ L de solución buffer, se procedió a realizar la segunda homogenización, se utilizaron los micropocillos para incubar por primera vez 200  $\mu$ L de solución resultante por 3 minutos, se adicionaron las tiras específicas para aflatoxinas en los micropocillos donde estas tiras absorben la solución, se realizó la segunda incubación por 5 minutos, finalmente se retiró la almohadilla absorbente y se procedió con la lectura de resultados para lo cual fue necesario que se adicionen las tiras reactivas dentro del casete y este dentro del equipo lector presionando la palabra “prueba” para la obtención de resultados después de 1 minuto de lectura.

**Figura 3**

*Diagrama de procedimiento para el análisis cuantitativo de aflatoxinas totales en snacks de frutos secos empleando kits de detección rápida*



*Nota.* Datos de autoría propios.

### 2.3 Rediseño de laboratorio

El proceso de rediseño tuvo su inicio mediante la meticulosa identificación de las áreas requeridas, seguido por un minucioso análisis del espacio disponible, teniendo en consideración de manera primordial los principios de diseño higiénico en las instalaciones. Para tal propósito, se procedió a delinear distintas áreas funcionales que incluyen: recepción, almacenamiento, preparación de medios, lavado, detección de micotoxinas (aflatoxinas), siembra, incubación y servicios higiénicos. La propuesta de redistribución de estas áreas vitales dentro del laboratorio se llevó a

cabo de manera hábil y precisa a través de la aplicación denominada Lucid, lo que garantizó una distribución eficiente y óptima para el adecuado desempeño de las actividades en el entorno laboral.

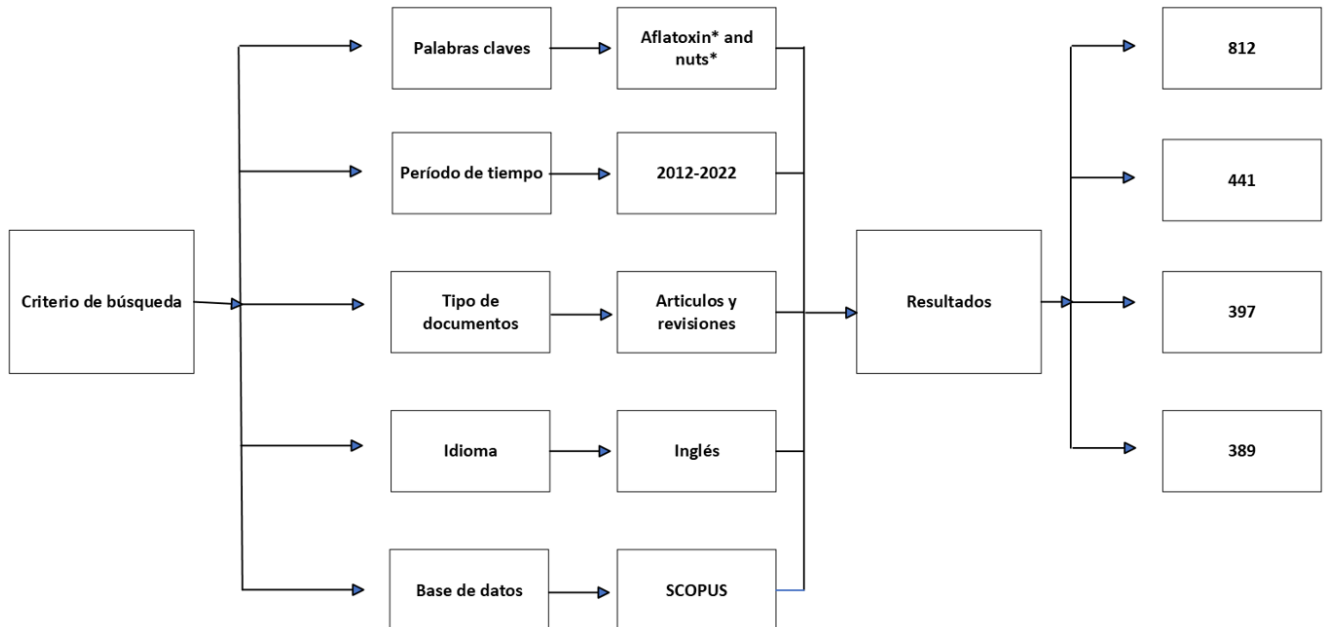
# CAPÍTULO 3

## RESULTADOS Y ANÁLISIS

### 3.1 Resultados del bibliometrix.

**Figura 4**

*Diagrama con la cantidad de resultados por filtro.*



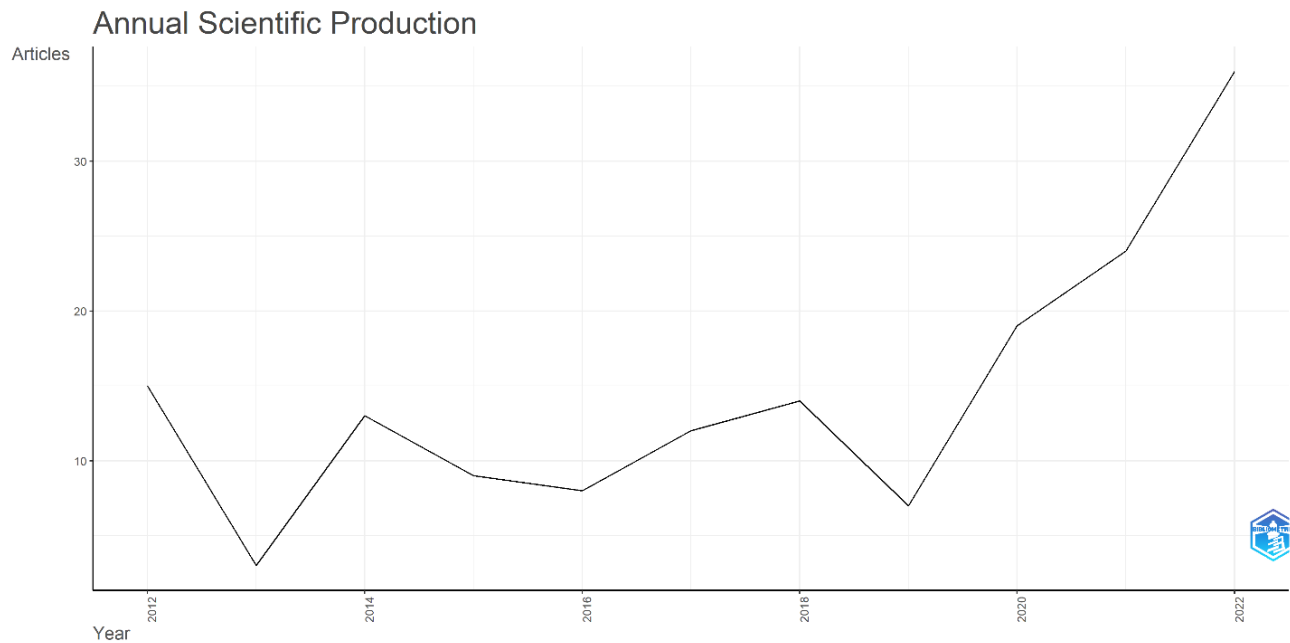
*Nota.* Datos de autoría propios.

En la figura 4, se presenta una sección adicional en comparación con el Diagrama de la figura 2. Esta sección proporciona información sobre la cantidad de documentos resultantes después de la aplicación de diferentes filtros. Específicamente, al emplear el filtro de palabras clave "aflatoxin\* and nuts\*", se generaron 812 resultados. La incorporación del siguiente filtro, relacionado con el período de tiempo, redujo el número de resultados a 441. Finalmente, al aplicar los dos últimos filtros restantes, se obtuvo un total de 389 documentos.

### 3.1.1 Producción científica anual.

**Figura 5**

*Producción científica anual*



*Nota.* Datos de autoría propios.

La producción científica anual es el resultado del conocimiento generado y tiene como objetivo divulgar investigaciones y análisis científicos sobre temas de estudios específicos (Leon-Vasquez et al., 2021). La figura 5 muestra la producción científica anual relacionada con aflatoxinas y frutos secos a lo largo de los años. Se observa que desde 2012 hasta 2013, la cantidad de documentos generados fue disminuyendo, desde 2013 hasta el 2014 los documentos van aumentado seguido de un ligero decrecimiento hasta 2016. A partir de entonces, se evidencia un crecimiento exponencial hasta 2018, pero en 2019 se observa una disminución en las fuentes científicas. Hasta la fecha actual, la documentación científica ha tenido un gran impacto, con un crecimiento exponencial significativo.

Estas tendencias en la producción científica proporcionan información valiosa sobre el interés y la relevancia de la investigación en el área de aflatoxinas y frutos secos, dentro de los cuales se destacan los siguientes ejemplos: la utilización de bacterias de ácido láctico para inhibir el crecimiento y producción de micotoxinas de los géneros *Aspergillus flavus* y *carbonarius*, transformándolas en derivados no tóxicos (Ben Taheur et al., 2019). La ozonización, como técnica vanguardista, posibilita la disminución de las aflatoxinas al degradar dicha toxina presente en los frutos secos, manteniendo intacta tanto la integridad nutricional como la calidad física del alimento, su dosificación óptima recomendada se establece en 5 ppm (Atakan & Caner, 2021).

Finalmente, se destaca la capacidad de desinfección del hipoclorito de sodio a 250 mg/L durante un lapso de 8.5 minutos y ácido peracético a 140 mg/L durante 15 minutos destaca en su eficacia contra *Aspergillus* observando una disminución inferior a 2 log UFC/g en las muestras de frutos secos analizados (Ribeiro et al., 2020).

### **3.1.2 Herramientas relevantes.**

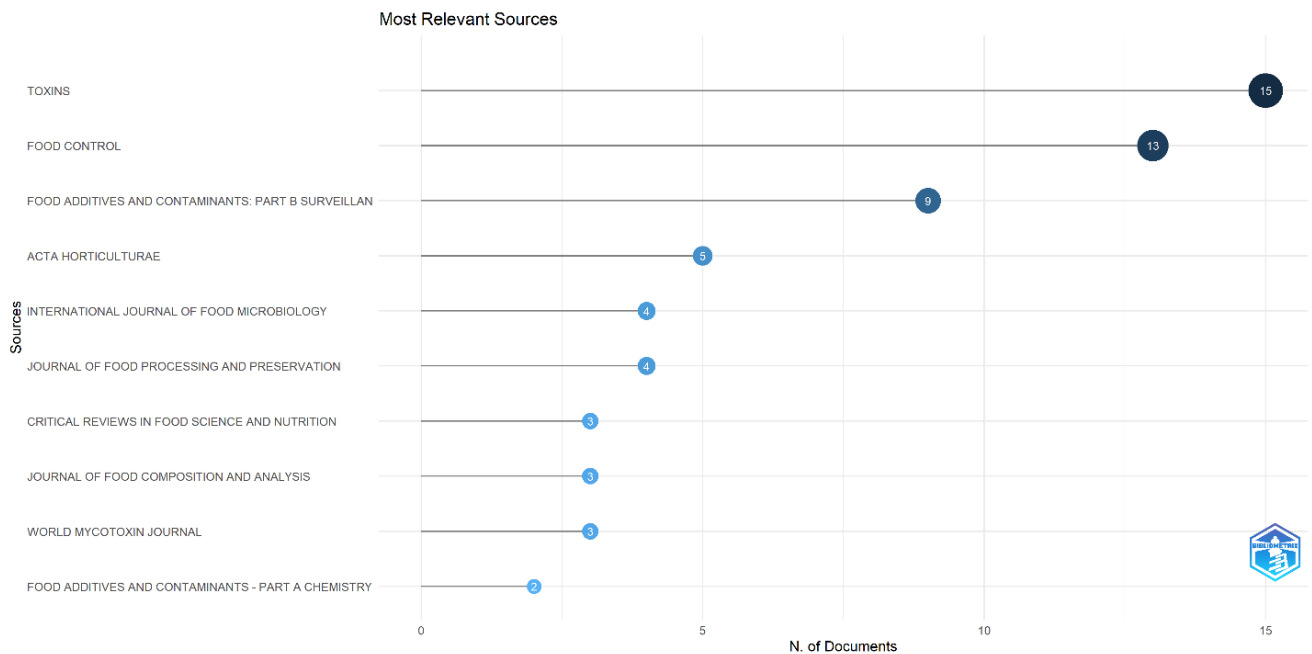
Dentro de la investigación, se emplearon herramientas fundamentales como el análisis de palabras repetidas y el acceso a revistas científicas. Entre las palabras comunes con mayor relevancia que se pueden observar en la figura 6 se destacaron "toxinas" y "control de alimentos". Asimismo, se identificaron revistas científicas relevantes en la base de datos Scopus, tales como "Acta Horticulturae", "International Journal of Food Microbiology" y "Journal of Food Processing and Conservation". Estas publicaciones desempeñan un papel crucial en la recopilación de datos científicos para el avance del conocimiento en el campo. Aplicando las herramientas anteriormente declaradas y las revistas científicas, se hallaron diferentes estudios relevantes. En un estudio sobre la contaminación cruzada entre granos se evaluaron granos con distintos niveles de contaminación:



alta, moderada y ausente mediante la medición de los niveles de aflatoxinas; los resultados revelaron que incluso en el grupo sin evidencia inicial de contaminación, se encontraron indicios de aflatoxinas, sugiriendo una posible contaminación cruzada durante las etapas de mezclado y manipulación (Toyofuku et al., 2020). También se identificó un estudio el cual se enfocó en investigar el impacto del vapor ultra sobrecalentado en la mitigación de aflatoxinas en productos de maní, fue ejecutado a dos temperaturas 300 y 400°C, se observó que la aplicación de la temperatura más elevada resultó en un efecto más pronunciado, logrando una reducción que superó el 83% del contenido total de aflatoxinas (Pukkasorn et al., 2018). Este resultado resalta la eficacia potencial del vapor ultra sobrecalentado como una estrategia viable para la reducción significativa de la contaminación por aflatoxinas, sin embargo, las altas temperaturas pueden causar efectos negativos en las cualidades organolépticas y nutricionales de los productos (Martínez et al., 2013).

## Figura 6

### *Herramientas relevantes*

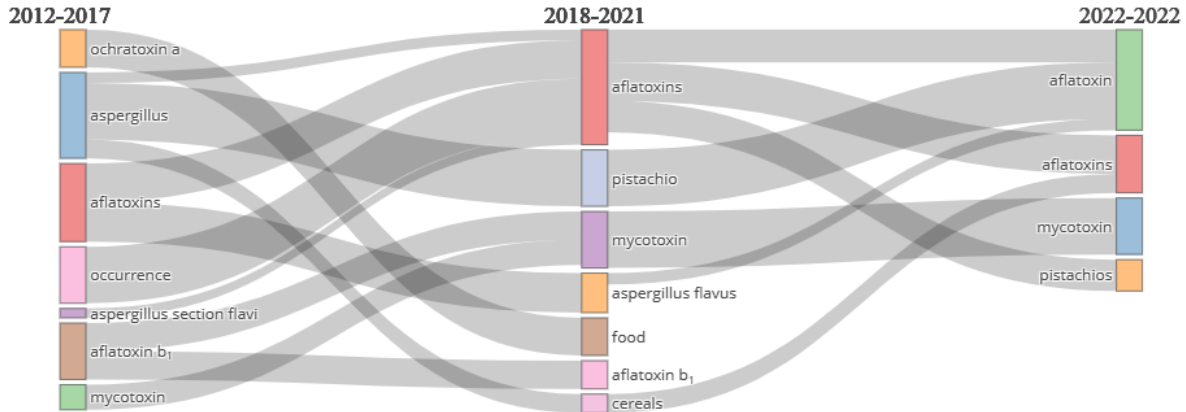


*Nota.* Datos de autoría propios.

### 3.1.3 Relación de palabras claves dentro de la investigación según el periodo de años observado.

**Figura 7**

*Palabras clave de la investigación por periodo de año*



*Nota.* Datos de autoría propios.

La figura 7 muestra las palabras resaltadas en tres periodos distintos, representando aquellas que destacaron más en las revisiones científicas de la base de datos para cada período respectivo. El primer periodo abarca desde 2012 hasta 2017, con palabras clave como "ochratoxina A", "aspergillus", "aflatoxinas", "ocurrencia", "aspergillus sección flavi", "aflatoxina B1" y "micotoxinas". En el segundo periodo, comprendido entre 2018 y 2021, se mantuvieron las palabras "aflatoxinas", "micotoxinas" y "aflatoxina B1", mientras que otras fueron eliminadas y se incorporaron nuevas, tales como "pistacho", "*Aspergillus flavus*", "alimentos" y "cereales". Por último, para el año 2022, se trabajaron palabras clave como "aflatoxina/s", "micotoxinas" y "pistachos". Estos hallazgos brindan un panorama evolutivo de las tendencias investigativas en el campo de estudio, destacando las temáticas más relevantes en cada periodo. Basándonos en la identificación de los términos más recurrentes, como "micotoxinas", se logró acceder a fuentes bibliográficas pertinentes que abordan la temática de los hongos pertenecientes al género

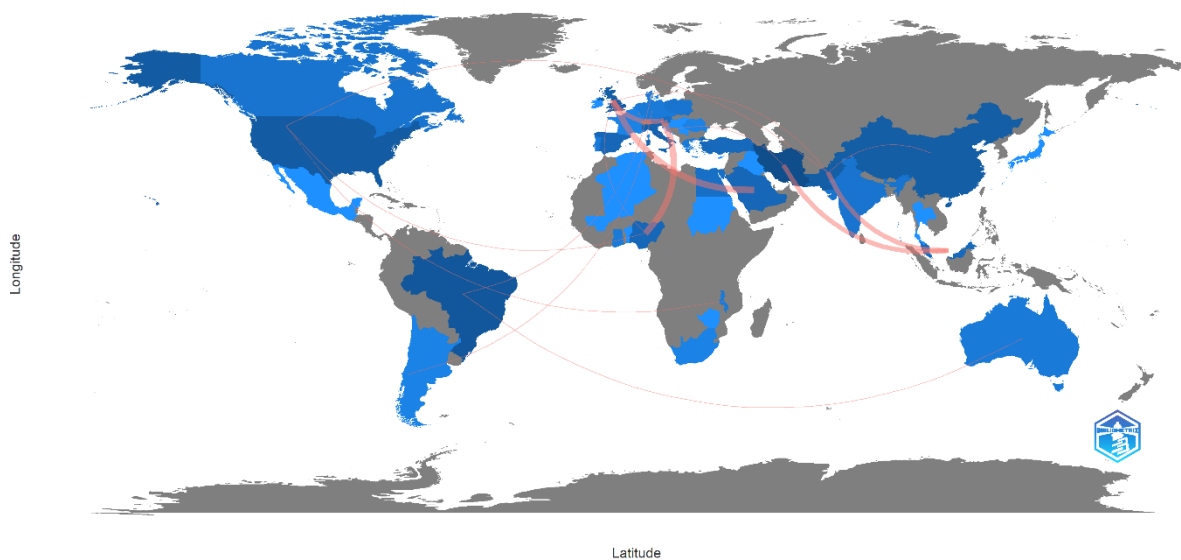
*Aspergillus* y las condiciones propicias para su desarrollo (Taniwaki et al., 2018) En el contexto de 2022, un estudio de alta relevancia abordó la intersección de las aflatoxinas y los pistachos para contrarrestar la presencia de aflatoxina B1 y mitigar el crecimiento de *Aspergillus flavus* en los pistachos, se implementaron tratamientos empleando *Bacillus subtilis* con propiedades aislantes, lo cual contribuyó eficazmente a la degradación de aflatoxinas y a la reducción del desarrollo del hongo en los pistachos (Farzaneh et al., 2016).

### 3.1.4 Relación de enfermedades ocasionadas por aflatoxinas en el mundo.

#### Figura 8

*Relación de enfermedades ocasionadas por la presencia de aflatoxinas*

Country Collaboration Map



*Nota.* Datos de autoría propios.

La figura 8 presenta una revisión de las enfermedades relacionadas con la exposición a aflatoxinas en diversos países alrededor del mundo. El consumo de productos contaminados con aflatoxina B1 representa un factor significativo en el desarrollo de carcinoma hepatocelular en seres humanos (Macri et al., 2021a). En el estudio sobre riesgos y beneficios del consumo de frutos

secos en Italia, se encontró que la aproximación de 1 ng de aflatoxina B1 por kg de peso corporal por día de ingesta representa un futuro caso de cáncer de hígado (Eneroth et al., 2017).

El siguiente estudio realizado en Italia se enfoca en pacientes con enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), la dieta recomendada para estos pacientes es la mediterránea, la cual incluye frutos secos; si los frutos secos están contaminados con aflatoxinas, los pacientes con NAFLD tienen un mayor riesgo de desarrollar carcinoma hepatocelular, hasta siete veces más en comparación con la población general (Plaz Torres et al., 2020). En Taiwán, estudios han demostrado que el consumo de maní y productos derivados con niveles de aflatoxinas superiores a 15 µg/kg puede representar un riesgo para la salud debido a la exposición a sustancias altamente genotóxicas y cancerígenas, se ha evidenciado la potencial toxicidad de estos productos contaminados y se sigue investigando la relación directa entre la presencia de aflatoxinas y la incidencia de cáncer de hígado en el país (Ingenbleek et al., 2019).

En China, se llevó a cabo un estudio para evaluar la calidad microbiológica y el riesgo de aflatoxinas en nueces y cacahuètes, los resultados revelaron concentraciones de aflatoxinas en el rango de 0.1 - 6.8 ng/kg y 29.0 - 33.78 ng/kg, lo que alertó a las autoridades sobre la necesidad de mitigar estos valores con el fin de prevenir el cáncer primario de hígado (Adetunji et al., 2018). Finalmente, en Costa Rica, se han implementado programas nacionales de vigilancia de micotoxinas como medida preventiva, ya que la exposición a aflatoxinas que supere los límites máximos tolerables conlleva un mayor riesgo de cáncer de hígado, retraso en el crecimiento, daño hepático, embriotoxicidad e inmunosupresión (Granados-Chinchilla et al., 2017).

### **3.2 Resultados experimentación.**

De acuerdo con las directrices establecidas en el Codex Alimentarius para la determinación de aflatoxinas totales, se ha estipulado un límite de 4 µg/Kg en la Unión Europea, mientras que en

los Estados Unidos este límite se sitúa en 10  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  (Naeem et al., 2022). Es importante destacar que los análisis llevados a cabo mediante el empleo del kit ToxinFast, instrumento utilizado en el proceso de investigación, exhiben una notable sensibilidad de 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Cabe mencionar que el rango de detección aplicado a las 66 muestras analizadas abarca desde 0 hasta 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Meizheng, 2022). La selección de estos valores específicos será esencial para la realización de una comparativa exhaustiva entre los resultados obtenidos a raíz de la experimentación, lo cual constituye un elemento fundamental en el proceso de análisis y evaluación de los datos recopilados en el presente estudio.

### **3.2.1 Resultados de los ensayos**

La Tabla 5 presenta una detallada descripción de las 66 muestras sometidas a análisis. En esta tabla, se destacan predominantemente los nombres de los frutos secos contenidos en las muestras, mientras que los restantes ingredientes, tales como frutas deshidratadas y aderezos, han sido categorizados bajo la denominación genérica de "otros". Los resultados correspondientes a las aflatoxinas totales en las diversas matrices alimentarias de frutos secos se encuentran expresados en  $\mu\text{g}/\text{kg}$  o partes por billón (ppb), siendo ambas unidades equivalentes en este contexto.

Al evaluar los datos, y considerando los límites normativos establecidos para la Unión Europea y los Estados Unidos, se puede observar de manera general que todos los resultados obtenidos de las muestras analizadas se encuentran en conformidad con las regulaciones vigentes ya que no superan el límite tolerable. Es relevante destacar que las regulaciones a las que un fabricante debe regirse dependen de la región a la que pretenda exportar su producto. En caso de comercialización en Ecuador, la elección de la normativa aplicable queda a discreción del

fabricante. Asimismo, se identificaron casos en los que las aflatoxinas no fueron detectadas en las muestras, y dicha ausencia se refleja en la tabla mediante la etiqueta "N/D" (No Detectado).

**Tabla 5**

*Resultados aflatoxinas con su respectiva descripción*

Descripción del nombre	Resultado (µg/kg)	Descripción del nombre	Resultado (µg/kg)	Descripción del nombre	Resultado (µg/kg)	Descripción del nombre	Resultado (µg/kg)
Nueces, almendras y otros	2.51	Pistachos con cáscara tostado salado	N/D	Nuez de macadami a natural	N/D	Almendras, sal, sabor a humo	N/D
Frutos secos. Maní, otros	2.5	Almendras con sal de mar	2.08	Nueces de la India sin cáscara	2.08	Arándanos deshidratados, nueces pecanas	N/D
Almendras tostada y salada	2.4	Macadami con sal sin flúor	N/D	Maní, almendras, nueces y otros	2.08	Pasas, almendras, nueces	2.23
Almendras peladas	2.34	Nueces de nogal con	N/D	Macadami a saladita	2.21	Mezcla de frutos	2,11

---

		azúcar				secos y	
		morena y				frutas	
		canela				deshidrata	
						das	
Mix de		Nuez de la		Mezcla de			
nuez,		India		maní sin			
almendra,	2.58	Cashew	N/D	sal, maní	2.61	Pistacho	2,09
maní y		Tostada		crocante			
otro		salada		picante y			
				otros			
				Mezcla de			
Nueces,		Maní		maní			
almendras	2.13	salado	2.19	salados,	N/D	Maní	2,37
y otros				almendras			
				y otros			
				Mezcla de			
Frutas				maní		Mezcla de	
secas y		Maní con		salado,		frutos	
frutos	2.25	pasas	2.35	maní	2.31	secos y	2,14
secos				recubierto		otros	
				con			
				chocolate			
				y otros			

---

				Mezcla de maní salado, maní recubierto con chocolate y otros	N/D	Mix de maní salado, maní garrapiñado y maní con ajonjolí	
Almendras peladas	2.17	Mezcla de frutos secos	2.1	Almendras, nuez de la india, Cashew, maní, nueces, sal	N/D	Maní	2,22
Nueces de nogal peladas	2.16	Mezcla de maíz chulpi y otros	2.3	Almendras tostadas saladas	N/D	Mezcla maní, pasas, almendras y otros	2,53
Maní recubierto estilo japonés	2.15	Maní recubierto estilo japonés y horneado	2.5	Choco nuts mix	2,09	Nueces peladas, almendras,	2,76
Barra de cereal con trozos de arándanos y nueces	N/D	Nueces	N/D				N/D



						arándanos y pasas	
Barras de granola	N/D	Maní	2,43	Almendra, Cashew, arándano	N/D	Nueces peladas	N/D
Almendras	2,01	Nuez de Brazil	2,10	Mezcla de maní sin sal, maní crocante picante y otros	2,22	Maní y nueces de la india	N/D
Maní, nueces, almendras y pasas	N/D	Pistacho con cáscara tostado salado	N/D	Nueces	N/D	Bocaditos de coco, almendras y otros	2,02
Maní, habas, garbanzo	2,17	Mezcla de frutos secos y otros	N/D	Maní	3,87	Almendra s, pasas, ajonjolí, coco rallado	2,42
Nueces peladas, almendras, maní	2,16	Fusión de nuez pecana y canela.	N/D	Maní	2,15	Bocaditos de almendras	N/D

tostado y				, cashews
pasas				y otros
Maní	3,68	Almendras	2,28	

*Nota.* Datos de autoría propios.

### 3.2.2 Muestras analizadas por rango de aflatoxinas

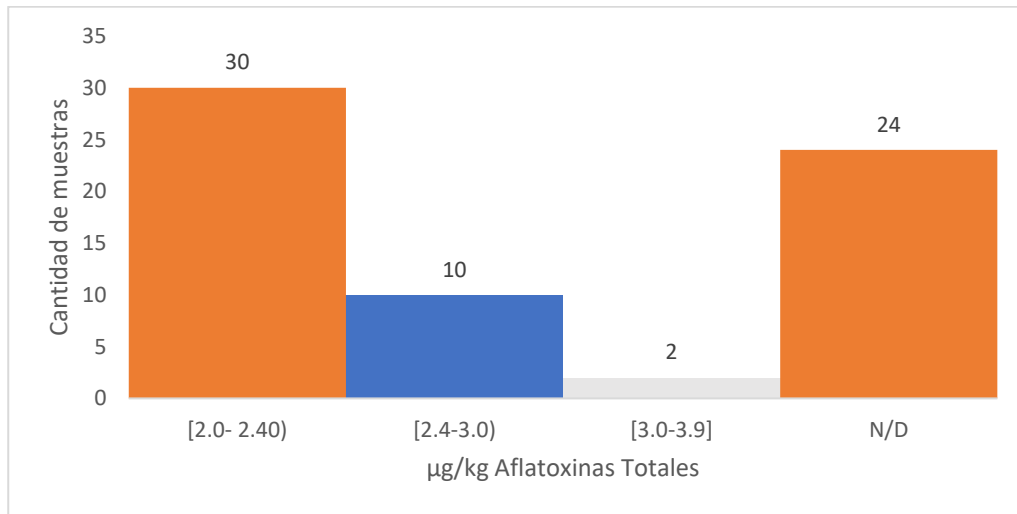
En la figura 9 se presenta un histograma con base en la segmentación de las concentraciones de aflatoxinas en cuatro rangos predefinidos: 2.0 a 2.4, 2.4 a 3.0, 3.0 a 3.9 y N/D (No Detectado). A través de esta representación gráfica, se puede apreciar que, en el primer intervalo, comprendido entre 2.0 y 2.4, se encuentran ubicadas un total de 30 muestras, lo cual constituye el 45.5% del conjunto total de muestras analizadas. En el intervalo subsiguiente, que abarca desde 2.4 hasta 3.0, se han identificado 10 muestras (15% del total). En el tercer rango, limitado entre 3.0 y 3.9, únicamente se han hallado 2 muestras (3%). Finalmente, en el último intervalo, correspondiente a las muestras en las cuales no se detectaron aflatoxinas (N/D), se han contabilizado 24 muestras (36% del total de muestras). Los hallazgos de este estudio resaltan la necesidad imperante de una vigilancia constante y una implementación rigurosa de medidas de control destinadas a minimizar la exposición a estas toxinas indeseadas, particularmente en productos de consumo humano.

En varias partes del mundo se han encontrado muestras contaminadas, en un estudio que evaluó 183 muestras provenientes de Grecia para la presencia de aflatoxinas, ocratoxinas y fumonisinas mediante un ensayo Elisa, hallaron que el 48.1% de frutos secos estaban contaminados por aflatoxinas y de estos el 33,3% superaba los 4 ppb establecidos por la Unión Europea (Batrinou et al., 2020). Otro caso es el de una investigación de un total de 64 muestras analizadas, 60 presentaron niveles detectables de aflatoxinas, se identificó que tres muestras

pertenecientes a una mezcla de frutas y frutos secos exhibieron concentraciones que superaron el umbral de 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , considerando el límite establecido por las normativas vigentes en los Estados Unidos (Macri et al., 2021). En una investigación que evalúa tres intervalos temporales distintos. Al inicio del estudio (tiempo 0), las muestras tenían niveles seguros de aflatoxinas, por debajo de 15  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; al examinar muestras almacenadas durante 3 y 6 meses a temperaturas ambiente y 45°C, se detectó un aumento en los niveles de aflatoxinas, mientras las muestras refrigeradas durante 6 meses mantuvieron seguros los niveles de aflatoxinas (Alsuhaibani, 2018).

**Figura 9**

*Rangos de resultado para aflatoxinas totales vs cantidad de muestra*

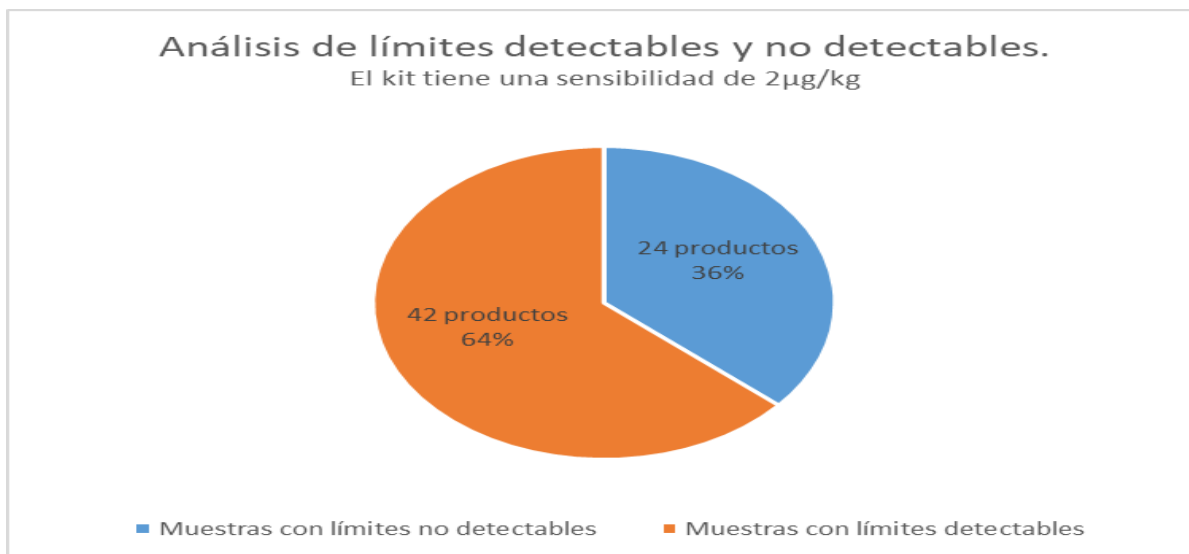


*Nota.* Datos de autoría propios.

**3.2.3 Límites no detectables y detectables en muestras comerciales de snacks de frutos secos.**

**Figura 10**

*Límites detectables y no detectables de aflatoxinas partiendo de una sensibilidad del kit de 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$*



*Nota.* Datos de autoría propios.

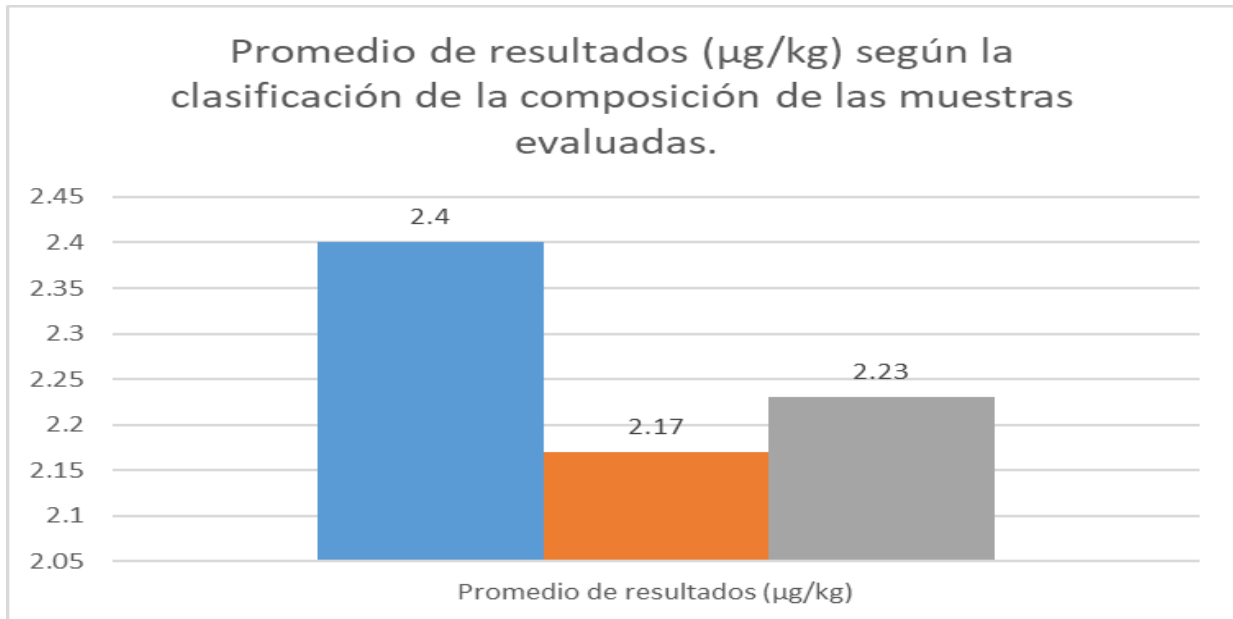
En el gráfico 5 se observa que 42 muestras obtuvieron niveles detectables de aflatoxinas totales, este valor representa el 64% del total de muestras analizadas, mientras que 24 productos de snacks de frutos secos obtuvieron resultados no detectables de aflatoxinas totales con un valor de 36%. A continuación, se presentan ejemplos de situaciones de contaminación de frutos secos debido a la presencia de aflatoxinas. Un caso ilustrativo es el siguiente: los pistachos desempeñan un papel económico significativo en el comercio de frutos secos, siendo propensos a un crecimiento óptimo de *Aspergillus flavus* en condiciones con temperaturas entre 25 y 35 °C, junto con una actividad de agua ( $A_w$ ) de 0.98 (Baazeem et al., 2021). Por otro lado, se encuentran las prácticas inadecuadas de almacenamiento que se encargan de promover la proliferación de insectos y plagas, lo que desencadena en deterioros de los granos y, en consecuencia, favorece la contaminación por hongos toxigénicos (Ayeni et al., 2021).

### 3.2.4 Clasificación de las muestras comerciales de snacks de frutos secos según su tipo de composición.

Finalmente, en la tabla 6 y en la figura 11 se observan las clasificaciones de los snacks de frutos secos, dónde se declaran tres grupos: 100% de frutos secos, mix de frutos secos y mix de frutos secos que contienen en su composición frutas deshidratadas, chocolate amargo, chocolate blanco, jaleas, entre otros aderezos. Se declara a su vez el promedio de los resultados obtenidos utilizando el kit ToxinFast dónde la primera clasificación tuvo un promedio de 2.40  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , la segunda clasificación tuvo un promedio de 2.17  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y finalmente la última clasificación tuvo un valor de 2.23  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

**Figura 11**

*Promedio de resultados según la clasificación de la composición de los snacks de frutos secos*



*Nota.* Datos de autoría propios.

**Tabla 6**

*Clasificación de snacks de frutos secos según su composición junto al detalle del promedio de resultados obtenidos*

Composición de snacks de frutos secos	Promedio de resultados
100% frutos secos	2.40
Mix de frutos secos	2.17
Mix de snacks de frutos secos con: frutas deshidratadas, yogurt, chocolate amargo y blanco, jaleas, entre otros tipos de aderezo.	2.23

*Nota.* Datos de autoría propios.

Con el fin de prevenir la contaminación por aflatoxinas, se aconseja conservar los frutos secos a 4 °C en envases de polietileno, dado que el almacenamiento a temperatura ambiente (25 °C) por más de 8 días incrementa sustancialmente el riesgo de contaminación por aflatoxina (Afshari et al., 2022). El estudio posterior analiza la conservación de diversas variedades de frutos secos (almendras, avellanas, nueces, nueces de la India y pistachos) durante 3 a 6 meses a temperaturas: ambiente (25°C), elevada (45°C) y refrigeración (4°C), los resultados muestran que refrigerar nueces, nueces de la India y pistachos durante 6 meses mantiene límites seguros de presencia de aflatoxina, no obstante, a 4°C por 3 meses, las almendras y avellanas exceden dichos límites (Alsuhaibani, 2018). En consecuencia, se concluye que el almacenamiento refrigerado impide el aumento de niveles de aflatoxinas en ciertos frutos secos. Dentro de las alternativas físicas accesibles para mitigar la exposición a micotoxinas, se incluyen la clasificación manual y las técnicas de limpieza o lavado, no obstante, es frecuente que los cultivos alimentarios de frutos secos sean almacenados antes de implementar dichas medidas, lo cual puede favorecer una

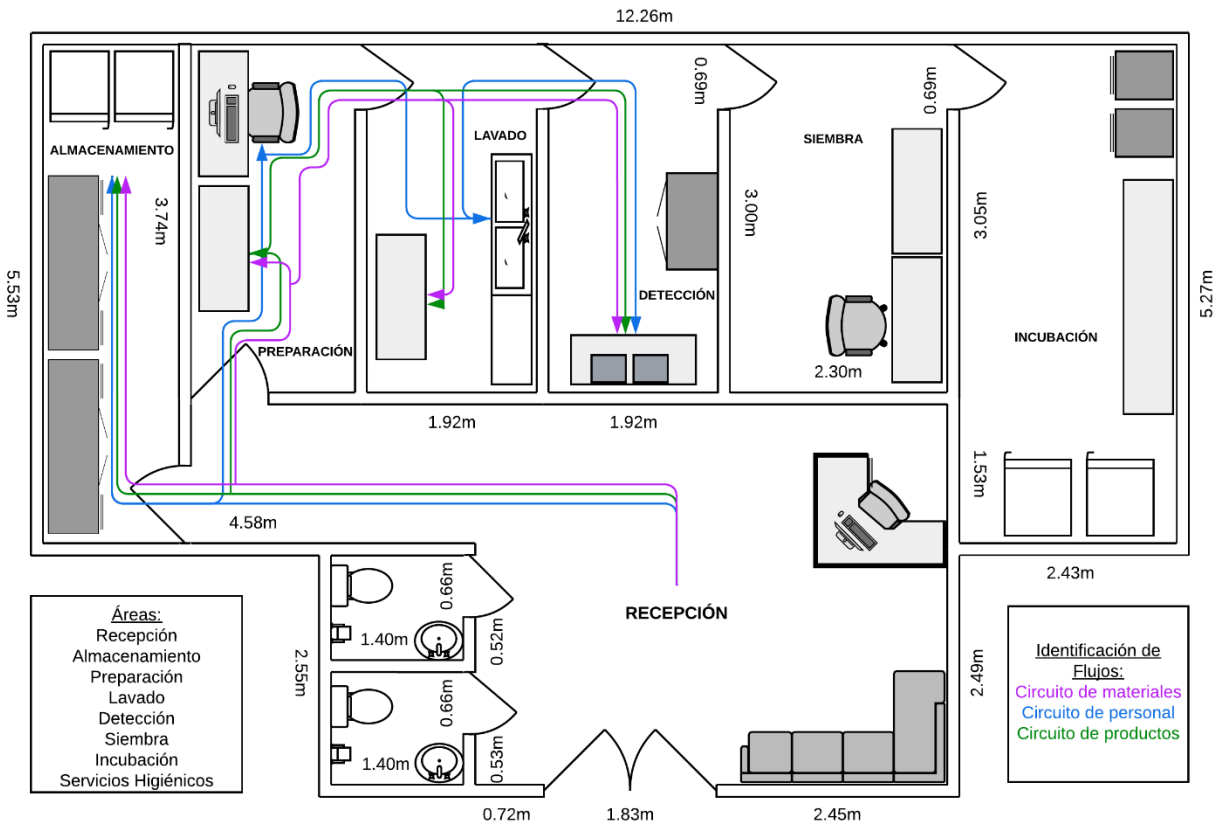
acumulación notable de micotoxinas generando consecuentes perjuicios en las etapas posteriores del proceso (Ayeni et al., 2021).

### 3.3 Resultados diseño del laboratorio

#### 3.3.1 Lay out propuesto para el rediseño del laboratorio para análisis y detección de micotoxinas (aflatoxinas) en snacks/bocaditos de frutos secos comerciales.

**Figura 12**

*Lay out propuesto para el rediseño del laboratorio para análisis y detección de micotoxinas (aflatoxinas) en snacks de frutos secos comerciales*



*Nota.* Datos de autoría propios.

La figura 12 exhibe una propuesta de reestructuración del laboratorio, que consta de diversas áreas funcionales: recepción, almacenamiento, preparación, lavado, detección, siembra,

incubación y servicios sanitarios. Además, el diagrama ilustra tres trayectorias distintas, representativas a los diferentes circuitos. El trazado de tonalidad púrpura corresponde al circuito de materiales, el de tono celeste caracteriza el circuito de personal y, por último, el flujo de matiz verde se asigna al circuito de productos.

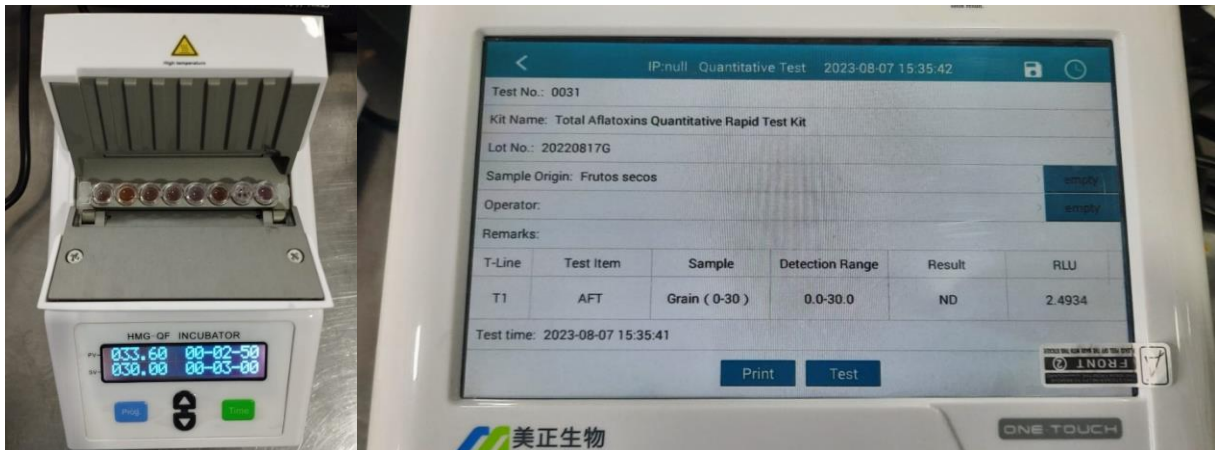
### 3.4 Costos

#### 3.4.1 Equipos de detección

En la figura 13 se puede visualizar el conjunto de dos equipos marca Meizheng que consta de un equipo de incubación y un lector de aflatoxinas en  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , estos dos tienen un valor de 3000 a 3500 dólares (conjunto). Esta sería una inversión inicial que debería realizar el laboratorio para poder hacer corridas de forma continua.

**Figura 13**

*Equipos de detección de aflatoxinas totales*



*Nota.* Datos de autoría propios.



### 3.4.2 Insumos para el análisis

**Tabla 7** *Materiales por usar con su costo estimado y costo total de análisis*

Material/Insumo	Cantidad por paquete	Costo (dólares)	Costo unitario	Cantidad que se usa por muestra	Costo de insumo por muestra
Fundas estériles	500 unidades	145-150	0.29– 0.30	1 un	0.295
Agua destilada	20 litros	9-11	0.45 – 0.55	10 ml	0.005
Alcohol 90%	1 litro	3-5	4	10 ml	0.04
Puntas de laboratorio 1000 µl	500 unidades	6-8	0.012 – 0.016	1 un	0.014
Puntas de laboratorio 200 µl	700 unidades	42-45	0.06	2 un	0.012
Kit de tirillas y pocillos para aflatoxinas	8 unidades	40-46	5.38	1 un	5.38
<b>TOTAL</b>					<b>5.74</b>

*Nota.* Datos de autoría propios.

La Tabla 7 proporciona un desglose exhaustivo de los materiales e insumos esenciales para llevar a cabo el análisis de aflatoxinas. Esta tabla también abarca los rangos de precios, la cantidad por presentación y la cantidad requerida para cada análisis. El cálculo del costo individual de cada insumo se realizó mediante el promedio del rango de precios, y luego se multiplicó por la cantidad necesaria para el análisis correspondiente. La suma de estos cálculos resultó en un valor

aproximado de 5.74 dólares, representando el costo por análisis de aflatoxinas. Es importante resaltar que el precio de venta del análisis estará sujeto al porcentaje de ganancia determinado por la empresa en su respectiva área.

## CAPÍTULO 4

### 4.1 Conclusiones y recomendaciones

#### 4.1.1 Conclusiones

Las micotoxinas son compuestos químicos de naturaleza tóxica generados de forma natural por hongos. Desde 2012 hasta el 20 de julio de 2023, el Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos (RASFF) ha registrado un total de 892 casos de alertas relacionados con la detección de aflatoxinas. Resulta fundamental reconocer la significativa importancia de esta problemática en el ámbito de la seguridad alimentaria y la salud pública, dado que la presencia de aflatoxinas en los alimentos constituye un riesgo notable para la salud de los consumidores, particularmente en lo que respecta a cuestiones médicas asociadas con el cáncer, en especial el cáncer hepático.

En el marco de los resultados derivados del análisis de las 66 muestras sometidas a experimentación, se evidenció que las muestras exhiben niveles detectables de aflatoxinas totales superiores a 2 µg/kg, los cuales se determinaron aprovechando la sensibilidad inherente del equipo lector. A partir de estos descubrimientos, es posible inferir que un total de 42 productos de índole comercial registraron niveles detectables de aflatoxinas totales, representando así el 64% del conjunto global de muestras evaluadas. En contraste, se observó que 24 productos relacionados con snacks de frutos secos arrojaron resultados que no indicaban la detección de aflatoxinas totales, representando el 36% del total de muestras. Este resultado resalta la eficacia de las prácticas idóneas de manipulación, procesamiento y almacenamiento, así como de las técnicas de descascarado, tostado y escaldado, en la notable reducción de los niveles de aflatoxinas totales. Una consideración adicional radica en el análisis del producto final a través de la

inmunocromatografía, lo cual podría contribuir a preservar la integridad física de los colaboradores involucrados en el proceso.

El rediseño propuesto para la reestructuración del laboratorio para la detección de aflatoxinas totales consta de diversas áreas funcionales: recepción, almacenamiento, preparación, lavado, detección, siembra, incubación y servicios sanitarios. Se plantea este diseño proporcionado en el diagrama de lay out debido a que cumplen con los principios higiénicos sanitarios para un correcto funcionamiento del laboratorio para la detección de aflatoxinas totales.

#### **4.1.2 Recomendaciones**

Es aconsejable que en futuras investigaciones enfocadas en la detección de aflatoxinas en snacks o bocadillos elaborados a partir de frutos secos comerciales se incluya una caracterización exhaustiva con el fin de determinar tanto cualitativa como cuantitativamente la presencia de aflatoxinas específicas en cada uno de los productos. Esta medida resulta de suma relevancia debido al nivel de toxicidad variante que presenta cada tipo de micotoxina, en función de la matriz de fruto seco en particular.

Al utilizar la plataforma Scopus para realizar búsquedas, es posible emplear diversos operadores lógicos con el fin de mejorar la precisión y el filtrado de la información deseada. Uno de estos operadores es el asterisco (\*), el cual desempeña la función de identificar el plural de una palabra clave específica. Por otro lado, el uso de comillas (“”) resulta útil para buscar documentos que contengan exactamente dos palabras en conjunto, tanto como una frase unitaria como por separado, permitiendo así un mayor control en la obtención de resultados pertinentes. encontrar palabras que inicie con las letras precedentes al mismo

Durante la fase experimental y la subsiguiente ejecución de análisis, se empleó alcohol de tipo industrial con una concentración del 90%. Este tipo de alcohol, al presentar una mayor pureza y concentración fue seleccionado como insumo para la experimentación. Sin embargo, en caso de considerar la posibilidad de utilizar alcohol con una concentración del 70%, se recomienda desechar esta alternativa. Esto se debe a que el alcohol de laboratorio de este grado ha sido desnaturalizado, lo que resulta en una menor concentración de alcohol debida a la inclusión de agua destilada como parte de su composición. La realización de análisis utilizando alcohol de 70% conllevaría a resultados variantes, lo que a su vez originaría datos inconsistentes y no fidedignos.

Es aconsejable evitar ciertos errores durante el proceso de pipeteo. En primer lugar, se debe evitar el uso de la misma punta de pipeta para cada una de las muestras que serán analizadas, ya que esta práctica podría resultar en una contaminación cruzada entre las muestras. Asimismo, es crucial respetar los ángulos de pipeteo adecuados: se debe aspirar con un ángulo de  $90^\circ$  y dispensar con un ángulo de  $45^\circ$ . Adicionalmente, para lograr un pipeteo efectivo, se recomienda llevar a cabo el proceso de manera pausada y delicada. Al aspirar la muestra, es recomendable mantener la pipeta en posición vertical. Al sumergir la punta en la muestra, se debe ejercer una presión ligera. Finalmente, al dispensar el líquido, se debe inclinar la pipeta a  $45^\circ$  y permitir que el líquido fluya a lo largo de la pared lateral de los frascos en los cuales se han colocado los  $\mu\text{L}$  correspondientes a cada muestra, cumpliendo con las buenas prácticas de manipulación y precisión en el proceso de pipeteo.

La lectura de los resultados de aflatoxinas en el equipo debe realizarse de manera inmediata después de la segunda incubación. Cualquier retraso en este procedimiento podría potencialmente introducir irregularidades en los resultados. Esto se debe a que prolongar el tiempo durante el cual

la tira permanece en el pocillo para su lectura podría influir en la precisión de los resultados, ya que una lectura prolongada podría llevar a interpretaciones alteradas de los mismos.

## Referencias Bibliográficas.

- Abbas, M., Naz, S. A., Shafique, M., Jabeen, N., & Abbas, S. (2019). Fungal contamination in dried fruits and nuts: A possible source of mycoses and mycotoxicoses. *Pakistan Journal of Botany*, *51*(4).  
[https://doi.org/10.30848/PJB2019-4\(31\)](https://doi.org/10.30848/PJB2019-4(31))
- Adetunji, M. C., Aliko, O. P., Awa, N. P., Atanda, O. O., & Mwanza, M. (2018). Microbiological Quality and Risk Assessment for Aflatoxins in Groundnuts and Roasted Cashew Nuts Meant for Human Consumption. *Journal of Toxicology*, *2018*, e1308748. <https://doi.org/10.1155/2018/1308748>
- Afshari, H., Mohammadi-Moghadam, M., Rezaee-Ahvanouyi, A., Ziaolhagh, S. H., Fani, S. R., & Aldaghi, M. (2022). Effect of Packaging and Storage Temperature on the Population of *Aspergillus* section *Flavi* and Aflatoxin Production in Fresh Pistachios. *Journal of Nuts*, *13*(3), 227-237.  
<https://doi.org/10.22034/jon.2022.1957698.1168>
- Alshannaq, A., & Yu, J.-H. (2021). Analysis of E.U. Rapid Alert System (RASFF) Notifications for Aflatoxins in Exported U.S. Food and Feed Products for 2010–2019. *Toxins*, *13*(2), Article 2.  
<https://doi.org/10.3390/toxins13020090>
- Alsuhaibani, A. M. A. (2018). Effects of storage periods and temperature on mold prevalence and aflatoxin contamination in nuts. *Pakistan Journal of Nutrition*, *17*(5), 219-227.  
<https://doi.org/10.3923/pjn.2018.219.227>
- Atakan, O., & Caner, C. (2021). Evaluation of different ozonation on aflatoxin degradation and physicochemical characteristics of hazelnuts. *Journal of Food Processing and Preservation*, *45*(3), e15276. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15276>
- Ayeni, K. I., Atanda, O. O., Krska, R., & Ezekiel, C. N. (2021). Present status and future perspectives of grain drying and storage practices as a means to reduce mycotoxin exposure in Nigeria. *Food Control*, *126*, 108074. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108074>

- Baazeem, A., Garcia-Cela, E., Medina, A., & Magan, N. (2021). Interacting Abiotic Factors Affect Growth and Aflatoxin B1 Production Profiles of *Aspergillus flavus* Strains on Pistachio-Based Matrices and Pistachio Nuts. *Frontiers in Microbiology*, *11*.  
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.624007>
- Batrinou, A., Houhoula, D., & Papageorgiou, E. (2020). Rapid detection of mycotoxins on foods and beverages with enzyme-linked immunosorbent assay. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, *12*(1), 40-49. <https://doi.org/10.15586/QAS2019.654>
- Ben Taheur, F., Mansour, C., Kouidhi, B., & Chaieb, K. (2019). Use of lactic acid bacteria for the inhibition of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus carbonarius* growth and mycotoxin production. *Toxicon*, *166*, 15-23. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.05.004>
- Bhardwaj, K., Meneely, J. P., Haughey, S. A., Dean, M., Wall, P., Zhang, G., Baker, B., & Elliott, C. T. (2023). Risk assessments for the dietary intake aflatoxins in food: A systematic review (2016–2022). *Food Control*, *149*, 109687. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.109687>
- Bogantes- Ledezma, P., Bogantes-Ledezma, D., & Bogantes- Ledezma, S. (2004). Aflatoxinas. *Acta Médica Costarricense*, *46*(4), 174-178.
- Cachiguango, A. (2019). *Determinación de aflatoxina m1 en leche cruda de vacas de Cayambe, Pedro Moncayo y Rumiñahui en época lluviosa y seca*.
- Carballo, D., Tolosa, J., Ferrer, E., & Berrada, H. (2019). Dietary exposure assessment to mycotoxins through total diet studies. A review. *Food and Chemical Toxicology*, *128*, 8-20.  
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.03.033>
- CE. (2023). *RASFF-Food and feed safety alerts portal*. <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/search?event=SearchForm&cleanSearch=1&searchQueries=eyJkYXRlIjp7InNOYXJ0UmFuZ2UiOiIyMDEyLTAxLTAxVDA1OjAwOjAwLjAwMFoiLCJlbmRSYW5nZSI6bnVsbH0sIm5vdGlmYWVhdGlvbiNOYXR1cyI6eyJub3RpZmljYXRpb25TdGF0dXMiOltbMV1dfSwicHJvZHVjdCI6eyJwcm9>



kdWNOQ2F0ZWdvcnkiOltbMTg0MjddXX0sInJpc2siOnsiaGF6YXJkQ2F0ZWdvcnkiOltbMjE4MdBdXX19

Channaiah, L. (2019). An Overview of Mycotoxicosis and Human's Health Concerns: A Mini-Review. *Novel*

*Techniques in Nutrition & Food Science*, 4. <https://doi.org/10.31031/NTNF.2019.04.000576>

Chen, Z., Shen, Z., Hua, Z., & Li, X. (2023). Global development and future trends of artificial sweetener

research based on bibliometrics. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 263, 115221.

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.115221>

Chulze, S. N., Torres, A. M., Torres, O., & Mallmann, C. (2021). Foreword – special issue Mycotoxins in

Latin America. *World Mycotoxin Journal*, 14(3), 241-245.

<https://doi.org/10.3920/WMJ2021.X003>

CODEX STAN 193-1995, 2019. (s. f.). Recuperado 19 de agosto de 2023, de

[https://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/livestockgov/documents/CXS\\_193s.pdf](https://www.fao.org/fileadmin/user_upload/livestockgov/documents/CXS_193s.pdf)

Constitucion\_2008\_reformas.pdf. (s. f.). Recuperado 5 de agosto de 2023, de

[http://bivicce.corteconstitucional.gob.ec/site/image/common/libros/constituciones/Constitucion\\_2008\\_reformas.pdf](http://bivicce.corteconstitucional.gob.ec/site/image/common/libros/constituciones/Constitucion_2008_reformas.pdf)

Devices, M. (2023). *Enzyme-linked-immunosorbent-assay-elisa*.

Dodd, C. E., Aldsworth, T. G., & Stein, R. A. (2017). *Foodborne Diseases*. Academic Press.

Einolghozati, M., Talebi-Ghane, E., Ranjbar, A., & Mehri, F. (2021). Concentration of aflatoxins in edible

vegetable oils: A systematic meta-analysis review. *European Food Research and Technology*,

247(12), 2887-2897. <https://doi.org/10.1007/s00217-021-03844-5>

Emadi, A., Jayedi, A., Mirmohammadkhani, M., & Abdolshahi, A. (2022). Aflatoxin reduction in nuts by

roasting, irradiation and fumigation: A systematic review and meta-analysis. *Critical Reviews in*

*Food Science and Nutrition*, 62(18), 5056-5066.

<https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1881436>

- Eneroth, H., Wallin, S., Leander, K., Nilsson Sommar, J., & Åkesson, A. (2017). Risks and Benefits of Increased Nut Consumption: Cardiovascular Health Benefits Outweigh the Burden of Carcinogenic Effects Attributed to Aflatoxin B1 Exposure. *Nutrients*, 9(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/nu9121355>
- Ezekiel, C. N., Ayeni, K. I., Akinyemi, M. O., Sulyok, M., Oyedele, O. A., Babalola, D. A., Ogara, I. M., & Krska, R. (2021). Dietary Risk Assessment and Consumer Awareness of Mycotoxins among Household Consumers of Cereals, Nuts and Legumes in North-Central Nigeria. *Toxins*, 13(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/toxins13090635>
- Farzaneh, M., Shi, Z.-Q., Ahmadzadeh, M., Hu, L.-B., & Ghassempour, A. (2016). Inhibition of the *Aspergillus flavus* Growth and Aflatoxin B1 Contamination on Pistachio Nut by Fengycin and Surfactin-Producing *Bacillus subtilis* UTBSP1. *The Plant Pathology Journal*, 32(3), 209-215. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.11.2015.0250>
- Foerster, C., Muñoz, K., Delgado-Rivera, L., Rivera, A., Cortés, S., Müller, A., Arriagada, G., Ferreccio, C., & Rios, G. (2020). Occurrence of relevant mycotoxins in food commodities consumed in Chile. *Mycotoxin Research*, 36(1), 63-72. <https://doi.org/10.1007/s12550-019-00369-5>
- Granados-Chinchilla, F., Molina, A., Chavarría, G., Alfaro-Cascante, M., Bogantes-Ledezma, D., & Murillo-Williams, A. (2017). Aflatoxins occurrence through the food chain in Costa Rica: Applying the One Health approach to mycotoxin surveillance. *Food Control*, 82, 217-226. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.06.023>
- Ingenbleek, L., Sulyok, M., Adegboye, A., Hossou, S. E., Koné, A. Z., Oyedele, A. D., K. J. Kisito, C. S., Koreissi Dembélé, Y., Eyangoh, S., Verger, P., Leblanc, J.-C., Le Bizec, B., & Krska, R. (2019). Regional Sub-Saharan Africa Total Diet Study in Benin, Cameroon, Mali and Nigeria Reveals the Presence of 164 Mycotoxins and Other Secondary Metabolites in Foods. *Toxins*, 11(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/toxins11010054>

- Iqbal, S. Z. (2021). Mycotoxins in food, recent development in food analysis and future challenges; a review. *Current Opinion in Food Science*, 42, 237-247. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.07.003>
- Kępińska-Pacelik, J., & Biel, W. (2021). Alimentary Risk of Mycotoxins for Humans and Animals. *Toxins*, 13(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/toxins13110822>
- Kujbida, P., Maia, P. P., Araújo, A. N. de, Mendes, L. D., Oliveira, M. L. de, Silva-Rocha, W. P., Brito, G. Q. de, Chaves, G. M., & Martins, I. (2019). Risk assessment of the occurrence of aflatoxin and fungi in peanuts and cashew nuts. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55, e18135. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902019000118135>
- Kumar, P., Gupta, A., Mahato, D. K., Pandhi, S., Pandey, A. K., Kargwal, R., Mishra, S., Suhag, R., Sharma, N., Saurabh, V., Paul, V., Kumar, M., Selvakumar, R., Gamlath, S., Kamle, M., Enshasy, H. A. E., Mokhtar, J. A., & Harakeh, S. (2022). Aflatoxins in Cereals and Cereal-Based Products: Occurrence, Toxicity, Impact on Human Health, and Their Detoxification and Management Strategies. *Toxins*, 14(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/toxins14100687>
- Le, Q.-N., Roman, B., Driksna, D., Gilbert, L., Gonzales, K., Klein, F., Donofrio, R., Shephard, G., Trucksess, M., & Ziemer, W. (2019). Reveal Q+ MAX® for Detection of Total Aflatoxin in Corn, Almonds, Pistachios, Walnuts, and Peanuts. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 102(2), 525-531. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.18-0298>
- Leon-Vasquez, R. A. J., Limaymanta, C. H., Leon-Vasquez, R. A. J., & Limaymanta, C. H. (2021). Micotoxinas en el análisis de los alimentos: Un estudio con indicadores bibliométricos y mapas de visualización. *Revista Cubana de Información en Ciencias de la Salud*, 32(4). [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S2307-21132021000400011&lng=es&nrm=iso&tlng=pt](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S2307-21132021000400011&lng=es&nrm=iso&tlng=pt)

- Li, P., Zhou, Q., Wang, T., Zhou, H., Zhang, W., Ding, X., Zhang, Z., Chang, P.-K., & Zhang, Q. (2016). Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method Specific for the Detection of G-Group Aflatoxins. *Toxins*, 8(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/toxins8010005>
- LORSA.pdf. (s. f.). Recuperado 5 de agosto de 2023, de <https://www.soberaniaalimentaria.gob.ec/pacha/wp-content/uploads/2011/04/LORSA.pdf>
- Luber, P. (2011). The Codex Alimentarius guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Food Control*, 22(9), 1482-1483. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.07.013>
- Macri, A. M., Pop, I., Simeanu, D., Toma, D., Sandu, I., Pavel, L. L., & Mintas, O. S. (2021a). The Occurrence of Aflatoxins in Nuts and Dry Nuts Packed in Four Different Plastic Packaging from the Romanian Market. *Microorganisms*, 9(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010061>
- Macri, A. M., Pop, I., Simeanu, D., Toma, D., Sandu, I., Pavel, L. L., & Mintas, O. S. (2021b). The Occurrence of Aflatoxins in Nuts and Dry Nuts Packed in Four Different Plastic Packaging from the Romanian Market. *Microorganisms*, 9(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010061>
- Martínez, M. M., Vargas del Río, L. M., & Gómez Quintero, V. M. (2013). AFLATOXINAS: INCIDENCIA, IMPACTOS EN LA SALUD, CONTROL Y PREVENCIÓN. *Biosalud*, 12(2), 89-109.
- Meizheng. (2022). Aflatoxin B1 Quantitative Rapid Lateral Flow Test Kit. *Meizheng*. <https://mzfoodtest.com/product/aflatoxin-b1-quantitative-rapid-lateral-flow-test-kit/>
- Mir, S. A., Shah, M. A., Mir, M. M., Sidiq, T., Sunooj, K. V., Siddiqui, M. W., Marszałek, K., & Mousavi Khaneghah, A. (2022). Recent developments for controlling microbial contamination of nuts. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-13. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2038077>

- Miranda, A., & Martín, O. (2013). *Cromatografía Líquida (HPLC)*.
- Moran, M. (2023). La Agenda para el Desarrollo Sostenible. *Desarrollo Sostenible*.  
<https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/development-agenda/>
- Mühlhauser, M., & Rivas, L. (2014). Laboratorio de microbiología: Conocimientos básicos para un clínico. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 25(3), 569-579. [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(14\)70072-0](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(14)70072-0)
- Naciones Unidas. (2023). Salud. *Desarrollo Sostenible*.  
<https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/health/>
- Naeem, I., Ismail, A., Rehman, A. U., Ismail, Z., Saima, S., Naz, A., Faraz, A., de Oliveira, C. A. F., Benkerroum, N., Aslam, M. Z., & Aslam, R. (2022). Prevalence of Aflatoxins in Selected Dry Fruits, Impact of Storage Conditions on Contamination Levels and Associated Health Risks on Pakistani Consumers. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(6), Article 6.  
<https://doi.org/10.3390/ijerph19063404>
- Nikita, S., & Felicia, W. (2021). *Estimation of Tolerable Daily Intake (TDI) for Immunological Effects of Aflatoxin—Saha Turna—2022—Risk Analysis—Wiley Online Library*.  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/risa.13770>
- Organización Mundial de la Salud. (2018). *Micotoxinas*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/mycotoxins>
- Ortega, S. F., Siciliano, I., Prencipe, S., Gullino, M. L., & Spadaro, D. (2020). Development of PCR, LAMP and qPCR Assays for the Detection of Aflatoxigenic Strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* in Hazelnut. *Toxins*, 12(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/toxins12120757>
- Pickova, D., Ostry, V., & Malir, F. (2021). A Recent Overview of Producers and Important Dietary Sources of Aflatoxins. *Toxins*, 13(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/toxins13030186>

- Plaz Torres, M. C., Bodini, G., Furnari, M., Marabotto, E., Zentilin, P., & Giannini, E. G. (2020). Nuts and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Are Nuts Safe for Patients with Fatty Liver Disease? *Nutrients*, 12(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/nu12113363>
- Pukkasorn, P., Ratphitagsanti, W., & Haruthaitanasan, V. (2018). Effect of ultra-superheated steam on aflatoxin reduction and roasted peanut properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(8), 2935-2941. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8788>
- Rao, V., Rao, L., Ahiduzzaman, M., & Islam, A. K. M. A. (2021). *Nuts and Nut Products in Human Health and Nutrition*. BoD – Books on Demand.
- Renaud, J. B., Walsh, J. P., & Sumarah, M. W. (2022). Optimization of Aflatoxin B1-Lysine Analysis for Public Health Exposure Studies. *Toxins*, 14(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/toxins14100672>
- Ribeiro, M. S. S., Freitas-Silva, O., Castro, I. M., Teixeira, A., Marques-da-Silva, S. H., Sales-Moraes, A. C. S., Abreu, L. F., & Sousa, C. L. (2020). Efficacy of sodium hypochlorite and peracetic acid against *Aspergillus nomius* in Brazil nuts. *Food Microbiology*, 90, 103449. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103449>
- Saffari, E., Madani, M., Karbasizade, V., & Shakib, P. (2021). Detection of fungal and bacterial contamination of hazelnut and determination of aflatoxin B by HPLC method in Isfahan, Iran. *Current Medical Mycology*, 7(4), 1. <https://doi.org/10.18502/cmm.7.4.8404>
- Salvador, J.-P., Vasylieva, N., Gonzalez-Garcia, I., Jin, M., Caster, R., Siegel, J. B., & Hammock, B. D. (2022). Nanobody-Based Lateral Flow Immunoassay for the Rapid Detection of Aflatoxin B1 in Almond Milk. *ACS Food Science & Technology*, 2(8), 1276-1282. <https://doi.org/10.1021/acsfoodscitech.2c00118>
- Sanchez, J. D. (2015, mayo 5). *OPAS/OMS | Peligros químicos*. Pan American Health Organization / World Health Organization.

[https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=10849:2015-peligros-quimicos&Itemid=0&lang=pt#gsc.tab=0](https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10849:2015-peligros-quimicos&Itemid=0&lang=pt#gsc.tab=0)

Suman, M. (2021). Last decade studies on mycotoxins' fate during food processing: An overview. *Current Opinion in Food Science*, 41, 70-80. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.02.015>

Tahir, N. I., Hussain, S., Javed, M., Rehman, H., Shahzady, T. G., Parveen, B., & Ali, K. G. (2018). Nature of aflatoxins: Their extraction, analysis, and control. *Journal of Food Safety*, 38(6), e12561. <https://doi.org/10.1111/jfs.12561>

Taniwaki, M. H., Pitt, J. I., Copetti, M. V., Teixeira, A. A., & Iamanaka, B. T. (2019). Understanding Mycotoxin Contamination Across the Food Chain in Brazil: Challenges and Opportunities. *Toxins*, 11(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/toxins11070411>

Taniwaki, M. H., Pitt, J. I., & Magan, N. (2018a). Aspergillus species and mycotoxins: Occurrence and importance in major food commodities. *Current Opinion in Food Science*, 23, 38-43. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.05.008>

Taniwaki, M. H., Pitt, J. I., & Magan, N. (2018b). Aspergillus species and mycotoxins: Occurrence and importance in major food commodities. *Current Opinion in Food Science*, 23, 38-43. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.05.008>

Tinoco, M. (2016). Estudio de la presencia de aflatoxinas en cereales para niños, expendidos en el mercado El Arenal de la ciudad de Cuenca. *Revista de la Facultad de Ciencias Químicas*, 7-12.

Toyofuku, N., Mahoney, N., & Haff, R. P. (2020). Aflatoxin cross-contamination during mixing of shelled almonds. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(2), e14330. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14330>

Varela, L., & Ron, A. (2022). *Geografía y clima*.

<https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/GeografiaClima/>

Vita, V., Franchino, C., Iammarino, M., & De Pace, R. (2022). Aflatoxins contamination in nuts for direct human consumption: Analytical findings from three years of official control in Italy. *International Journal of Food Science & Technology*, 57(12), 7496-7504. <https://doi.org/10.1111/ijfs.15723>

Wirth, A., Pacheco, F., Toma, N., Valiati, V., Tutikian, V., Gomes, L., Wirth, A., Pacheco, F., Toma, N., Valiati, V., Tutikian, V., & Gomes, L. (2019). Análisis sobre el crecimiento de hongos en diferentes revestimientos aplicados a sistemas ligeros. *Revista ingeniería de construcción*, 34(1), 5-14. <https://doi.org/10.4067/S0718-50732019000100005>

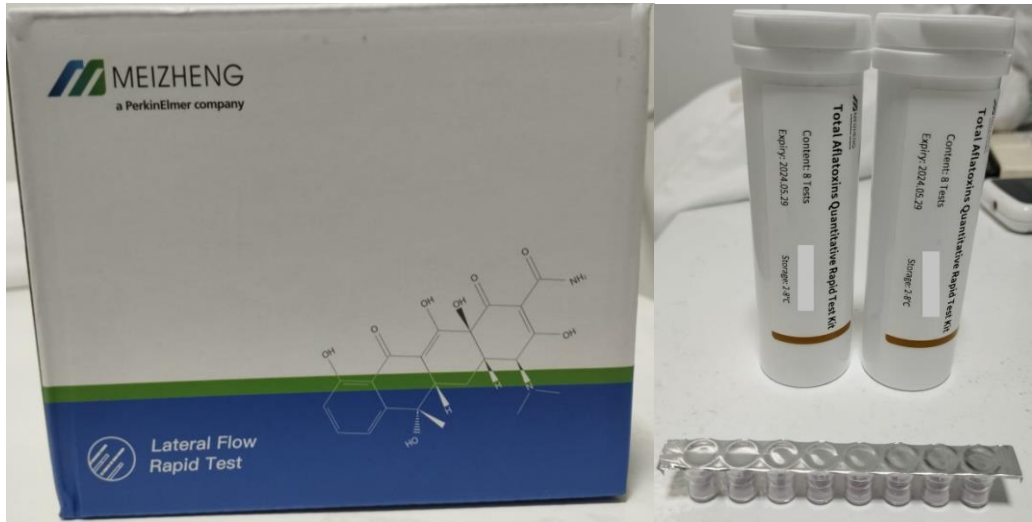
Zivoli, R. (2017). Almonds: A Source of Healthy Molecules or a Risk of Aflatoxins Human Exposure? *Current Nutrition & Food Science*, 13(4), 255-259. <https://doi.org/10.2174/1573401313666170802144257>



# Apéndice

## Apéndice A: Referencias fotográficas del procedimiento de análisis de aflatoxinas con el kit “ToxinFast”

*Kit de detección de aflatoxinas totales, tiras reactivas y micropocillos*



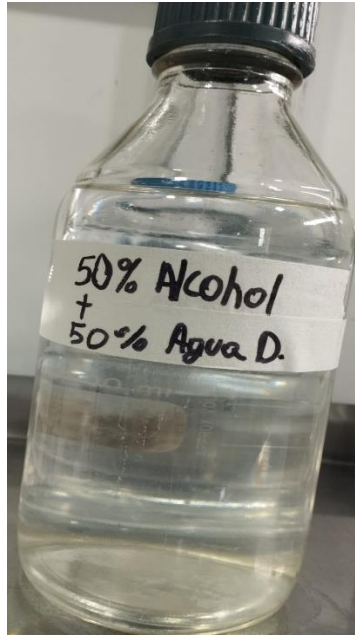
*Nota.* Datos de autoría propios.

*Muestras de snacks de frutos secos trituradas*



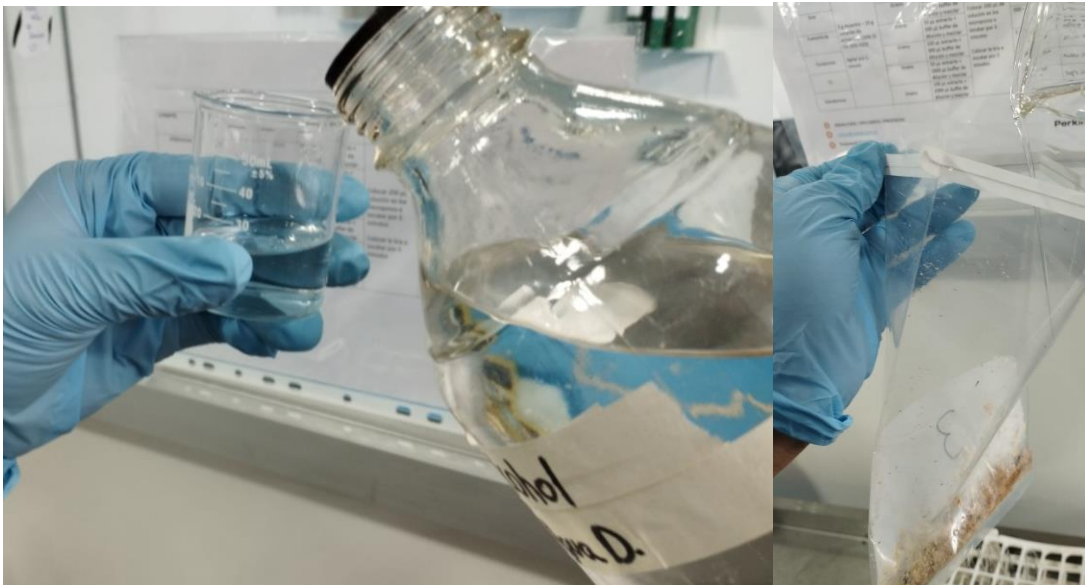
*Nota.* Datos de autoría propios.

*Solución de extracción (agua destilada y etanol al 50%)*



*Nota. Datos de autoría propios.*

*Adición de la solución de extracción a la muestra (10 ml etanol + 10 ml agua destilada)*



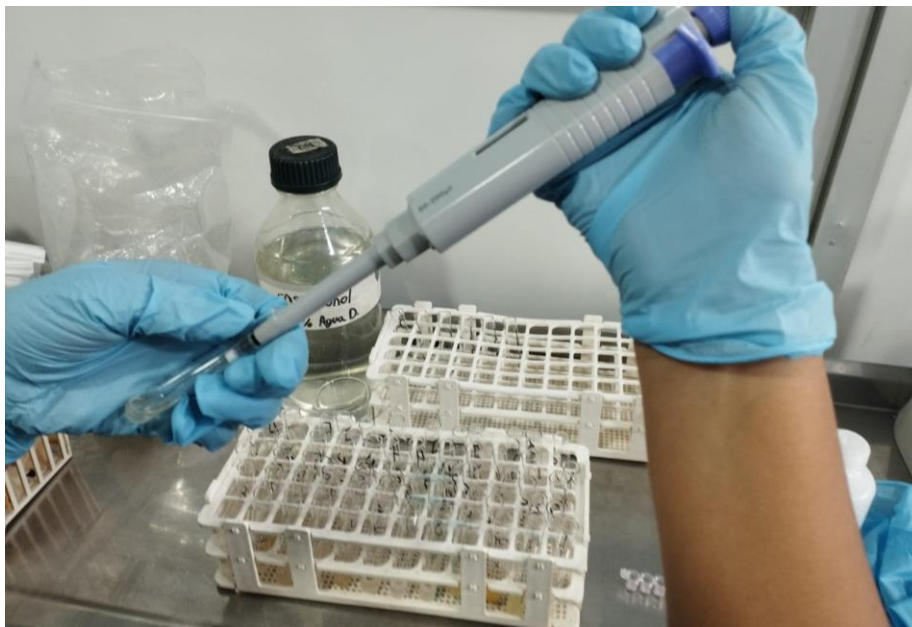
*Nota. Datos de autoría propios*

*Extracción de 100  $\mu$ L de sol. resultante (extracto + muestra)*



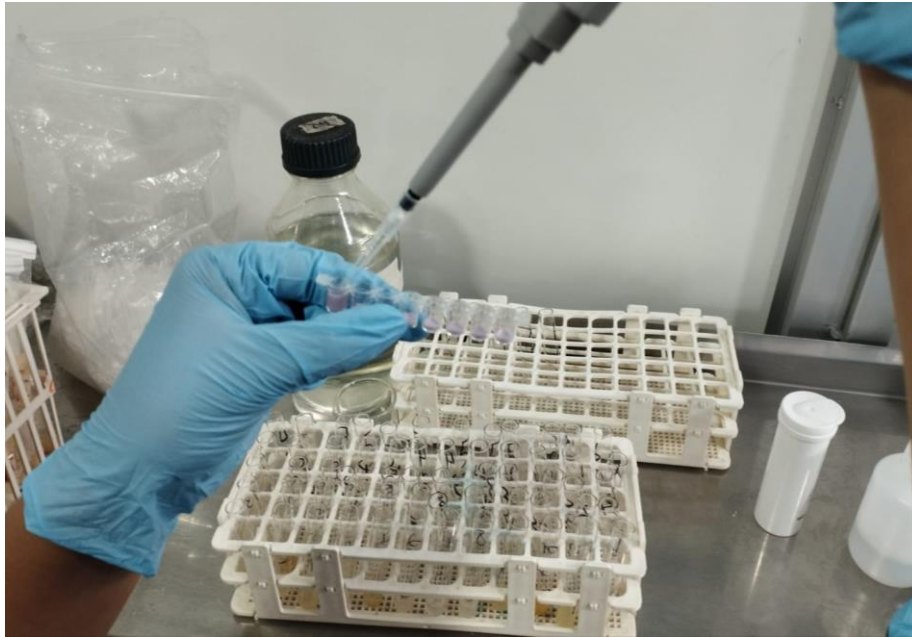
*Nota. Datos de autoría propios.*

Tubo de ensayo con: sol. resultante + sol. buffer



*Nota. Datos de autoría propios.*

*Depositar 200  $\mu$ L de sol. resultante en micropocillos para respectiva incubación*



*Nota. Datos de autoría propios*

*Primera incubación por 3 min*



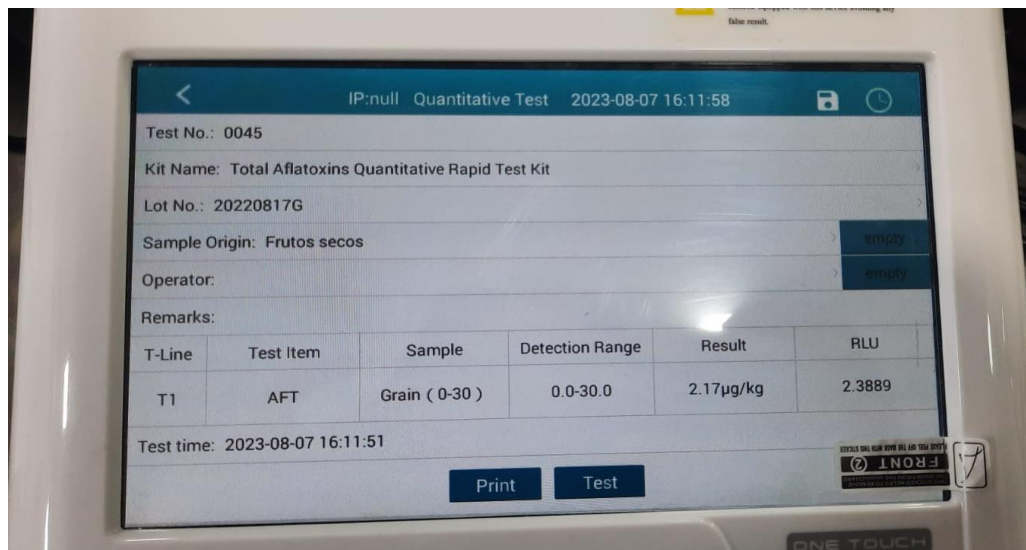
*Nota. Datos de autoría propios.*

*Adición de tiras reactivas e incubación por 5 min*



*Nota. Datos de autoría propios.*

*Lectura de resultados en equipo lector*



*Nota. Datos de autoría propios.*

**Apéndice B:** Tablas de clasificación de frutos secos

*Clasificación de snacks de frutos secos declarando su composición 100%, resultado de detección y marca comercial*

Tipo de clasificación	Descripción de frutos secos	Resultado $\mu\text{g}/\text{Kg}$	Marca
100 % frutos secos	Almendras: tostadas, saladas, peladas, con sabor a humo,	$> 2 \mu\text{g}/\text{Kg}$	Bonanza,
	Maní: salado, recubierto estilo japonés y horneado		Corfruit,
	Macadamia salada		Del sur,
	Nueces de nogal: peladas		Donpichu,
	Nuez de la india sin cáscara		Granuts
	Nuez de Brasil		La original,
			Manitoba,
			Nature's heart,
			PatiPami,
			Pro-alimentos
	Cotopaxi,		
	Productos cris C. Ltda.,		
	Schullo		
	Seeberger,		
	Supermaxi.		
	Macadamia: con sal, sin flúor, natural	N/D	Nature's heart,
	Nuez de la india cashew tostada salada.		Rey macadamia,
	Pistachos: con cáscara, tostado, salado		Rosa dulce,
			Schullo
	Nueces		Sunshine,
			Supermaxi.

*Nota.* Datos de autoría propios.

*Clasificación de snacks de mix de frutos secos declarando su composición de mix, resultado de detección y marca comercial.*

Tipo de clasificación	Descripción de frutos secos	Resultado $\mu\text{g/Kg}$	Marca
Mix de frutos secos	Maní, nueces	$> 2 \mu\text{g/Kg}$	Karay,
	Mezcla de maíz chulpi, maíz mote, maní tostado y sal		La Original
	Maní, semillas de girasol, almendras y nueces.		Nature's Heart, Trunuts
	Maní, habas, garbanzo		
	Almendras, nuez de la india, Cashew, maní, nueces, sal. Maní y nueces de la india.		N/D

*Nota.* Datos de autoría propios.



*Clasificación de snacks de frutos secos declarando su composición de mix de frutos secos con (frutas deshidratadas, yogurt, chocolate amargo y blanco, jaleas, entre otros tipos de aderezo), resultado de detección y marca comercial.*

Tipo de clasificación	Descripción de frutos secos	Resultado µg/Kg	Marca
Mix de snacks de frutos secos con: frutas deshidratadas, yogurt, chocolate amargo y blanco, jaleas, entre otros tipos de aderezo en su composición.	Mezcla de frutos secos y frutas deshidratadas	> 2 µg/Kg	Alideli,
	Mezcla de frutos secos, frutas deshidratadas, maní confitado y chocolate		Corfruit, Del Sur, El Artesanal,
	Mix de maní salado, maní garrapiñado y maní con ajonjolí		El Nogal, Granuts
	mezcla: maní, pasas, almendras y chocolates recubiertos		La Original, Made with love
	Nueces peladas, almendras, maní tostado y pasas		crocas, Manitoba
	Almendras, pasas, ajonjolí, coco rallado		Nature's Heart, Paqui gourmet,
	Bocaditos de coco, almendras, pepa de sambo y chía		Productos Cris C. Ltda,
	Choco nuts mix 60% cacao		Supermaxi
	Almendra, Cashew, arándano		
	Mezcla de maní sin sal, maní crocante picante, limón, habas saladas, maíz tostado, garbanzo		
Mezcla de frutas secas. Nueces, almendras y pasas rubias			
Frutos secos. Maní, arándanos y yogurt			
Mix de nuez, almendra, chocolate orgánico, maní y pasas			

Mezcla de frutas secas. Nueces, almendras y pasas morenas.		
Frutas secas y frutos secos		
Maní recubierto estilo japonés picante y con sabor a limón		
Maní con pasas		
Mezcla de maní sin sal, maní crocante picante, limón, habas saladas, maíz tostado, almendras		
Mezcla de maní salado, maní recubierto con chocolate, arándanos deshidratados, maíz tostado, maní crocante, almendras, maní confitado, maní con ajonjolí		
Pasas, almendras, nueces		
Mezcla de maní salados, almendras, cereal a base de hojuelas de avena y quinoa, frutas deshidratadas y nueces, trozos de arándanos recubiertos con cobertura de yogurt griego, maní con sabor a miel y uvas pasas deshidratadas	N/D	Del Sur, El Artesanal, La Original, Made with love crocas,
Almendras con chocolate		Manitoba,
Nueces de nogal con azúcar morena y canela		Nature's Heart, Nature Valley,
Nueces peladas, almendras, arándanos y pasas		Schullo Tosh
Mezcla de frutos secos y arándano rojo sabor vainilla-cereza		

---

Arándanos deshidratados, nueces  
pecanas

---

Barra de cereal con trozos de  
arándanos y nueces

---

Fusión de nuez pecana y canela.  
Mezcla de frutos secos y  
deshidratados saborizados

---

Bocaditos de almendras, cashews,  
arándanos, chía y miel de abeja

---

barras de granola

---

Maní, nueces, almendras y pasas

---

*Nota.* Datos de autoría propios