



**UNIVERSIDAD DE CUENCA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**Determinación de Aflatoxina M<sub>1</sub> en quesillos artesanales  
comercializados en los mercados de la ciudad de Cuenca  
mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución  
(HPLC)**

**Trabajo de titulación previo a  
la obtención de título de  
Bioquímica Farmacéutica**

**AUTOR:**

**GABRIELA CAROLINA VALLEJOS QUISIGÜIÑA**

**CI: 060403040-3**

**DIRECTORA:**

**Dra. MARÍA FERNANDA UGUÑA ROSAS. Mg. Sc**

**CI: 010378228-0**

**ASESORA:**

**DRA. SILVIA JOHANA ORTIZ ULLOA, PhD.**

**CI: 030108289-7**

**Cuenca- Ecuador**

**2016**



## **RESUMEN**

Este estudio se realizó con el objeto de conocer el nivel de aflatoxina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) presente en quesillos artesanales comercializados en los mercados 9 de Octubre, 12 de Abril, 10 de Agosto y Feria Libre de la Ciudad de Cuenca mediante la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) y su grado de adecuación con la normativa de Brasil correspondiente a 2.5 ug/Kg de AFM<sub>1</sub> en quesos. Se analizaron 33 muestras, donde 7 muestras fueron positivas de las cuales 4 estaban entre el límite de detección y cuantificación (0,04 – 0,08ug/kg), 3 fueron cuantificables, siendo la máxima concentración 0.83 ug/kg .Los valores de AFM<sub>1</sub> fueron inferiores al límite máximo permitido por la normativa , por lo tanto, las distintas muestras de quesillos artesanales comercializados en los mercados 9 de Octubre, 12 de Abril, 10 de Agosto y Feria Libre de la Ciudad de Cuenca estudiadas en esta investigación podrían considerarse aptas para el consumo humano en cuanto a exposición a AFM<sub>1</sub>.

**PALABRAS CLAVES:** Aflatoxina M1, quesillo, HPLC.



## **ABSTRACT**

This study was conducted in order to determine the level of aflatoxin M1 (AFLA M1) present in artisan cheeses sold in markets “9 de Octubre, 12 de April, 10 de Agosto and Feria Libre” of the City of Cuenca by the technique Liquid Chromatography High Resolution (HPLC) and their suitability with Brazilian legislation corresponding to 2.5 ug/kg of AFLA M1 in cheese. 33 samples were analyzed, where 7 samples were positive of which 4 were among the limit of detection and quantification (0.04 to 0.08 ug/kg), 3 were quantifiable, the maximum concentration of 0.83 ug/kg. The values of AFLA M1 were below the maximum limit allowed by the rules. Therefore, different samples of artisan cheeses sold in markets 9 de Octubre, 12 de April, 10 de Agosto and Feria Libre” in the city of Cuenca studied in this research could be considered fit for human consumption in terms of exposure to AFLA M1.

**KEYWORDS:** Aflatoxin M1, CHEESE, HPLC.



## ÍNDICE

### Contenido

RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	1
ÍNDICE.....	1
ÍNDICE DE TABLAS .....	1
ÍNDICE DE FIGURAS .....	1
AGRADECIMIENTO .....	1
DEDICATORIA .....	10
INTRODUCCIÓN .....	11
MARCO TEÓRICO.....	12
1. AFLATOXINAS EN LÁCTEOS .....	13
1.1 Aflatoxinas.....	13
1.2 Aflatoxina M1 (AFM1) .....	14
1.3 Mortalidad por aflatoxinas.....	16
1.4 Presencia de la aflatoxina M1 en los lácteos .....	17
1.5 Regulación de AFM1 .....	17
1.6 Métodos de detoxificación de AFM1 .....	17
1.7 Quesillo artesanal.....	18
1.7.1. Elaboración del quesillo .....	18
1.8 Disposiciones generales para la leche cruda.....	19
MATERIALES Y MÉTODOS .....	21
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
2.1 Tipo de estudio.....	22
2.2 Muestreo .....	22
2.3 ANÁLISIS DE AFLATOXINA M1 .....	22
2.3.1 Fundamento del análisis .....	22
2.3.2 Equipos, materiales y reactivos .....	23
2.3.3 Procedimiento de extracción y clean-up .....	24
2.3.4 Análisis de aflatoxina M1 por HPLC .....	24
2.3.5 Análisis de datos cromatográficos .....	25



*UNIVERSIDAD DE CUENCA*

2.3.6 Técnicas de procesamiento y análisis .....	25
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	27
3.1 Recolección de muestras de queso .....	28
3.1 Análisis de resultados.....	28
3.3 DISCUSIÓN.....	30
4. CONCLUSIONES .....	33
5. RECOMENDACIONES .....	34
REFERENCIAS.....	35
ANEXOS .....	40



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Límite máximo para contaminantes de los mismos o sus metabolitos intermediarios en la recolección de la leche cruda.....	20
Tabla 2.1 Materiales, equipos y reactivos requeridos para análisis de aflatoxina M <sub>1</sub> por HPLC.....	23
Tabla 3.1. Muestras recolectadas en los diferentes mercados de la ciudad de Cuenca.....	28
Tabla 3.2 Concentración de AFM <sub>1</sub> en ug/kg de muestras cuantificables.....	29



## **ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1.1. Estructura de la AFM <sub>1</sub> .....	14
Figura 1.2. Transformación de la aflatoxina B <sub>1</sub> a la aflatoxina M <sub>1</sub> a través de la citocromo p450.....	15



Yo, Gabriela Carolina Vallejos Quisigüiña autora de la tesis **“DETERMINACIÓN DE AFLATOXINA M1 EN QUESILLOS ARTESANALES COMERCIALIZADOS EN LOS MERCADOS DE LA CIUDAD DE CUENCA MEDIANTE LA TECNICA DE CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).”** reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Bioquímica Farmacéutica. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora.

Cuenca, 07 de Julio del 2016

---

Gabriela Carolina Vallejos Quisigüiña

0604030403





UNIVERSIDAD DE CUENCA

Yo, Gabriela Carolina Vallejos Quisigüiña autora de la tesis "**DETERMINACIÓN DE AFLATOXINA M1 EN QUESILLOS ARTESANALES COMERCIALIZADOS EN LOS MERCADOS DE LA CIUDAD DE CUENCA MEDIANTE LA TECNICA DE CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).**" certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 07 de Julio del 2016

A handwritten signature in blue ink, reading 'Gabriela Carolina Vallejos Quisigüiña', written over a horizontal line.

Gabriela Carolina Vallejos Quisigüiña

0604030403



*UNIVERSIDAD DE CUENCA*

## **AGRADECIMIENTO**

A mi familia por siempre estar.

A la Universidad de Cuenca por abrirme sus puertas.

A mi querida tutora, Dra. Fernanda Uguña, por su gran ayuda, digna de un maravilloso ser humano como lo es ella.

A mis Asesoras, Dra. Gabriela Astudillo, y Dra. Johana Ortiz, por todo su tiempo y colaboración en este proyecto.



*UNIVERSIDAD DE CUENCA*

## **DEDICATORIA**

A Dios, que me ha dado la fuerza mental y espiritual en la realización de este trabajo.

A mis amados padres, Dr. Francisco y Dra. Eufemia, por su ejemplo de valor y constancia y por su apoyo incondicional.

A mi hermano David, por siempre estar a mi lado.

A mis abuelos Dr. Enrique, Gabriel, Eufemia y Dolores, que amorosamente me han enseñado a salir adelante.



## INTRODUCCIÓN

Las aflatoxinas son un tipo de micotoxinas producidas por hongos del género *Aspergillus*. Estas han recibido mayor atención que cualquier otro tipo de micotoxinas porque han demostrado tener un potente efecto inmunosupresor y carcinogénico en animales de laboratorio y en humanos.

La aflatoxina B1 (AFB1), es una micotoxina que puede encontrarse en los piensos de ganado lechero, en el interior del organismo del animal que consumió piensos contaminados con AFB1, se transforma en la aflatoxina M1 (AFM1), la cual es secretada en la leche destinada al consumo humano. La AFM1 que se encuentra en la leche no se degrada en la elaboración de productos lácteos, por lo tanto contamina el producto final como el queso artesanal, lo cual pone en riesgo a la población.

En el presente trabajo se determinó los niveles de AFM<sub>1</sub> presente en quesillos artesanales comercializados en los mercados 9 de Octubre, 12 de Abril, 10 de Agosto y Feria Libre de la ciudad de Cuenca mediante la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).



*UNIVERSIDAD DE CUENCA*

# MARCO TEÓRICO



## 1. AFLATOXINAS EN LÁCTEOS

### 1.1 Aflatoxinas

La palabra aflatoxina es un neologismo, cuyas primeras cuatro letras (afla) son un acrónimo formado, a partir del nombre latinizado del hongo: *Aspergillus flavus*, productor de toxinas, de donde se tomó la letra A del género (*Aspergillus*) y las primeras letras, fla, de la especie (*flavus*); organismo de donde se aisló. Por su parte el texto complementario, toxina, deriva del latín *toxicus*, de *toxicum*, “veneno”, procedente a su vez del término griego *toxikon*, veneno (TREVINO, 2000).

Las aflatoxinas constituyen una especie de micotoxinas producidas en pequeñas concentraciones por hongos del género *Aspergillus*.

Las aflatoxinas por lo general afectan a los cultivos en el campo antes de la cosecha. La contaminación post - cosecha puede ocurrir si la humedad del producto durante el almacenaje, pero también se pueden detectar algunas veces leche, queso, maíz, maní, semilla de algodón, almendras, higos, especias, y una variedad de otros alimentos y piensos (SORIANO DEL CASTILLO, 2011).

Existen hasta el momento aproximadamente 18 tipos pero solo cuatro son contaminantes de los alimentos, estas son B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> las más tóxicas son la aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) y la aflatoxina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>), siendo esta última un metabolito producto de la biotransformación de la Aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), (Torres, Aparicio, & García, 2014). Todas las aflatoxinas son carcinogénicas, mutagénicas y teratogénicas pero la aflatoxina B<sub>1</sub> es considerada la más tóxica estando clasificada como cancerígena para el ser humano y la aflatoxina M<sub>1</sub>, como posiblemente cancerígena para el ser humano. (ELIKA, 2013)

De entre todas ellas, destaca desde el punto de vista de la inocuidad alimentaria la aflatoxina B<sub>1</sub>, tanto por ser la más prevalente en alimentos como la más tóxica para los seres humanos. (DENG, SHI-XI, & col, 2010)

Pese a que la contaminación de aflatoxinas en los alimentos es un tema de importancia para la salud pública, en el Ecuador, existen muy escasas evaluaciones básicas de la ingesta de aflatoxinas; situación explicada por la falta de control de límites sobre la contaminación de micotoxinas en los alimentos y por la falta de recursos para establecer un sistema de control sobre los mismos.

## 1.2 Aflatoxina M1 (AFM1)

La AFM<sub>1</sub> es metabolito oxidativo de las AFB<sub>1</sub>. Es derivado 4-hidroxilados de la AFB<sub>1</sub>. La AFM<sub>1</sub> es excretada en la leche de las hembras de mamíferos que consumen AFB<sub>1</sub> en la dieta, la misma que es metabolizada y excretada en la leche al cabo de 30 días. (CARVAJAL, 2013) (FERNANDEZ & REPETTO, 2012)

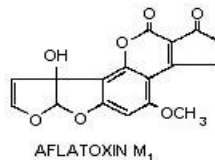


Figura 1.3. Estructura de la AFM<sub>1</sub>

Fuente: (CAMEAN & REPETTO, 2015).

La AFM<sub>1</sub> es el derivado metabólico más importante de la AFB<sub>1</sub>. En la figura 1.2 se muestra el paso de la AFB<sub>1</sub> a la AFM<sub>1</sub> por la citocromo p 450. La concentración de AFM<sub>1</sub> en la leche variará según la cantidad de AFB<sub>1</sub> ingerida, la duración del consumo del alimento contaminado y del estado de salud del animal. Al mismo tiempo, debido al sistema metabólico de los animales poligástricos, las concentraciones de AFM<sub>1</sub> en la leche varían entre animales, de un día para otro, y de una producción de leche a la siguiente. (CASTILLO S. D., 2001)

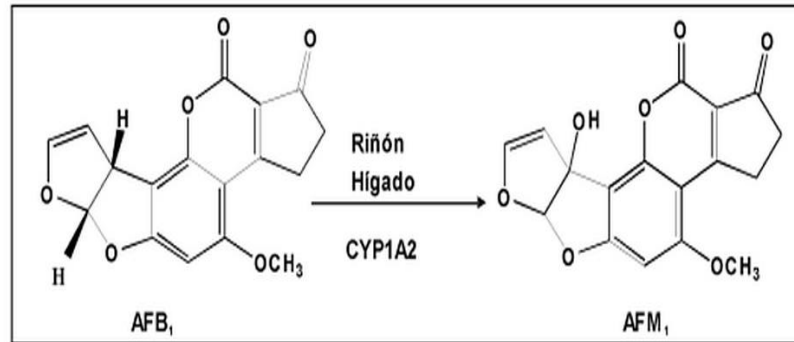


Figura 1.4. Transformación de la aflatoxina B<sub>1</sub> a la aflatoxina M<sub>1</sub> a través de la citocromo p450. Fuente: (CASTILLO J. , 2007).

La aflatoxina M<sub>1</sub> es clasificada por la Agencia Internacional de Investigaciones del Cáncer (IARC) como clase 2B, posible carcinógeno. Se encuentra en la leche y en los derivados lácteos procedentes de animales que hayan ingerido alimentos contaminados con AFB<sub>1</sub>. (Méndez-Albores & Moreno-Martínez 2009) (ORTIZ, 2009)

Las toxinas se metabolizan a aflatoxicol mediante una deshidrogenasa NADH dependiente. El proceso es sensible a las hormonas sexuales, lo que explica la diferente susceptibilidad individual, superior en niños y varones. Parece ser que un prerrequisito para la inducción de carcinoma hepático es la exposición previa o simultánea al virus de la Hepatitis B (RODRIGUEZ MENCINAS, 2000)

Las aflatoxinas ingeridas, que se absorben por el tracto gastrointestinal, son metabólicamente activadas o detoxificadas en las células de la mucosa intestinal y en el hígado, donde sufren una biotransformación por medio de procesos de epoxidación, hidroxilación, o-des-metilación, conjugación y procesos espontáneos (BOGANTES & col., 2004).

La toxina entra en la célula y su metabolismo en el retículo endoplasmático puede dar lugar a la formación de la AFB<sub>1</sub>-8, 9-epóxido, éste compuesto presenta afinidad por diversas macromoléculas tales como ácidos nucleicos y proteínas a las que se une covalentemente y por ello puede dar lugar a disrupciones en la transcripción y en la traducción, respectivamente.

Se liga al ADN, interfiriendo con la capacidad de la ADN polimerasa, hecho que favorece la aparición de mutaciones por replicación incompleta. Interfiere con la actividad de la ARN polimerasa dependiente del ADN (por su gran capacidad de ligarse al ADN), produciendo como consecuencia, la disminución en el ARN





mensajero y la síntesis proteica. (MONTO & WRIGHT, 2001). El aducto de ADN formado, AFB<sub>1</sub>-guanina se elimina por orina usándose como biomarcador.

La unión del epóxido a las proteínas es responsable de su toxicidad y origina la eliminación de un aducto, AFB<sub>1</sub>-lisina, que se emplea como biomarcador en suero (GALTIER, 1999). Tiene también la capacidad de ligarse a proteínas estructurales y funcionales, alterando su estabilidad. Este efecto es, en gran parte, el responsable de la toxicidad aguda.

La forma aguda de la intoxicación cursa con vómitos, convulsiones, desnutrición, coma y muerte. Tras una ingesta masiva (2-6mg) día se observó hepatitis aguda y muerte súbita secundaria a hemorragia gastrointestinal. Así se observó, durante un mes, produjo una epidemia de hepatitis en la India (RODRIGUEZ MENCINAS, 2000).

La AFB<sub>1</sub> es la más abundante y también la más tóxica, es el compuesto natural carcinogénico más potente que se conoce y está clasificada por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, IARC por sus siglas en Inglés, en el grupo 1 por existir evidencias comprobadas en humanos. El órgano más afectado por las Aflatoxinas es el hígado, existen varios estudios que relacionan el cáncer de hígado con su presencia en los alimentos. Además, hay que tener en cuenta otros efectos tóxicos como sus propiedades inmunosupresoras o su capacidad para interferir en factores nutricionales. Las Aflatoxinas se encuentran sobre todo en cacahuetes y en maíz así como en una gran diversidad de alimentos producidos a partir de éstos. Pueden aparecer también en soja, sorgo, pistachos, frutos secos, cerveza, especias y leche (AFM<sub>1</sub>). Es muy frecuente la presencia de Aflatoxina en piensos para la alimentación de animales de granja (ABRUNHOSA & col, 2012).

### **1.3 Mortalidad por aflatoxinas**

Las aflatoxinas en los alimentos presentan un nivel crítico de sus concentraciones, después de este punto suelen ser letales, con una alta tasa de mortalidad en aquellos que los ingieran. DL50 para AFM<sub>1</sub> 10.38 ug/Kg de peso vivo, (CASTILLO S. D., 2001) y TDI de 2 ng/Kg de peso. (GIMENO & MARTINS, 2011)



#### 1.4 Presencia de la aflatoxina M1 en los lácteos

La aflatoxina M1 llega a la leche indirectamente por el consumo por parte de animales en periodo de lactación de alimentos contaminados con aflatoxinas, lo que da a lugar la aparición en la leche de estos animales diversos metabolitos tóxicos. Este es principalmente el caso de la contaminación de leche y sus derivados con AFM<sub>1</sub>, pudiendo aparecer, aunque en menores cantidades, AFM<sub>2</sub>, AFM<sub>1</sub>, AFGM<sub>1</sub>, AFGM<sub>2</sub>, AFB<sub>1</sub> y AFM<sub>4</sub>.

La contaminación con aflatoxina M1 de la leche no puede ser completamente prevenida porque la AFB<sub>1</sub> está presente naturalmente en los granos. No es posible eliminar por completo la AFB<sub>1</sub> de los alimentos, ni de la leche. Sin embargo, se puede controlar la cantidad de AFM<sub>1</sub> presente en la leche limitando la cantidad de aflatoxina en los alimentos para animales. (CARLSON & y.col, 2002).

La AFM<sub>1</sub> que se encuentra presente en la leche utilizada para la elaboración de quesos y quesillos, no se degrada en el proceso, sino que ésta se une a las proteínas lo que hace que su concentración sea mayor que la de la leche.

#### 1.5 Regulación de AFM1

En la Unión Europea se establece que para leche cruda, leche destinada a la fabricación de productos a base de leche y leche de consumo tratada térmicamente, la concentración máxima permitida de aflatoxina M1 es de 0.05ug/Kg. (EUR, 2000)

En el Ecuador para la leche cruda la NTE INEN 09:2012 establece un máximo de 0.5 ug/Kg para AFM<sub>1</sub>.

La normativa brasilera establece un máximo de AFM<sub>1</sub> permitido en leche de 0.5ug/Kg y para quesos de 2.5 ug/Kg. (MINISTÉRIO DE SAÚDE, 2011)

#### 1.6 Métodos de detoxificación de AFM1

En la etapa de fabricación de quesos, cuando se realiza la proteólisis de la leche, la caseína aumenta su hidrofobicidad, característica necesaria para la unión de AFM<sub>1</sub> a la caseína, que conlleva a un factor de enriquecimiento en el cuajo. Por esta razón es importante encontrar métodos que aseguran la



inactivación de la toxina en la leche antes de ser utilizada en la producción de los quesos. (ARANGUREN, 2009)

Para disminuir la concentración inicial de AFM<sub>1</sub> en la leche, se han realizado varios experimentos en donde se encuentra que cuando la leche es calentada a 64 °C por 30 min., entre 64 y 100 °C de 15 a 20 min, o a calentamientos directos de la leche durante 3-4 horas y algunos procesos de pasteurización; se evidenció que la concentración de la aflatoxina prácticamente se ve inalterada, teniendo la capacidad de residir en derivados lácteos. (ARANGUREN, 2009)

Con otros tipos de calentamientos entre 71 y 120 °C por 30 min., se ha reducido la AFM<sub>1</sub> entre un 12-35% y con otros procesos de pasteurización como la ultrapasteurización, esterilización, evaporación, secado Roller y Spray, se ha conseguido disminuir la contaminación de AFM<sub>1</sub> del orden de 32 a 86% (ARANGUREN, 2009)

Otro método, aplicado en leches, es la radiación UV, esta actúa sobre el doble enlace del anillo furánico, siendo capaz de disminuir la concentración entre un 3,6 y un 100% dependiendo del tiempo de exposición de la leche y el volumen tratado.

También se utilizan métodos químicos como la exposición de la leche a bisulfato potásico al 0.4% a 25 °C durante 5 horas, presentándose una disminución en la concentración de AFM<sub>1</sub> de hasta un 45%. (ARANGUREN, 2009)

Ya que la AFB<sub>1</sub> se absorbe en el estómago del mamífero también se puede eliminar con un método de adsorción con carbono activado o aluminocilicato.

## **1.7 Quesillo artesanal**

Según la NTE INEN 1528:2012 “Quesillo criollo”, es el queso no madurado, escaldado, alto en humedad con textura blanda suave y elástica fabricado con leche, acidificada con ácido láctico, cuajado generalmente con cuajo líquido.

### **1.7.1. Elaboración del quesillo**

La elaboración del quesillo para el consumo humano transita por varias etapas que van desde la recepción de la leche, su acidificación, cuajado hasta el envasado para su posterior distribución.



El proceso comienza con la filtración y estandarización (3,3% contenido graso) y tratamiento térmico de la leche (50°C durante 30 minutos). La leche debe estar estandarizada a un valor específico con respecto a la relación proteína/grasa (CASTAÑEDA & GRAPPIN, 2002).

Luego de higienizada, la leche se ajusta a la temperatura entre 30°C – 45°C. Se adiciona cuajo, agitándose por cinco minutos y se deja reposar por diez minutos, la adición de suero láctico permite incrementar la acidez de la leche agitando constantemente la leche, cuando es evidente la separación de las caseínas se detiene la agitación y se deja reposar la cuajada, después del reposo se la separa del suero fresco y se la pone en mesa de escurrido; haciendo volteos periódicos cada 2 ó tres minutos, mediante la aplicación directa de calor moldeándose con la finalidad de dar al quesillo una forma y tamaño según las exigencias del mercado, almacenándose a una temperatura de 3 a 4°C. (RAMIREZ, 2010).

### **1.8 Disposiciones generales para la leche cruda**

1. La leche cruda se considera no apta para consumo humano cuando:
  - a) Es obtenida de animales cansados, deficientemente alimentados, desnutridos, enfermos o manipulados por personas afectadas de enfermedades infectocontagiosas.
  - b) Contiene sustancias extrañas ajenas a la naturaleza del producto como: conservantes (formaldehído, peróxido de hidrógeno, hipocloritos, cloraminas, dicromato de potasio, lactoperoxidasa adicionada), adulterantes (harinas, almidones, sacarosa, cloruros, suero de leche, grasa vegetal), neutralizantes, colorantes y residuos de medicamentos veterinarios, en cantidades que superen los límites indicados.
  - c) Contiene calostro, sangre, o ha sido obtenida en el período comprendido entre los 12 días anteriores y los 7 días posteriores al parto.
  - d) Contiene gérmenes patógenos o un contaje microbiano superior al máximo permitido por la presente norma, toxinas microbianas o residuos de pesticidas, y metales pesados en cantidades superiores al máximo permitido. (ver tabla 5)



## UNIVERSIDAD DE CUENCA

La leche cruda después del ordeño debe ser enfriada, almacenada y transportada hasta los centros de acopio y/o plantas procesadoras en recipientes apropiados autorizados por la autoridad sanitaria competente.

En los centros de acopio la leche cruda debe ser filtrada y enfriada, a una temperatura inferior a 10°C con agitación constante

La tabla 1.1, muestra lo límite máximo para los contaminantes de la leche cruda según lo dispuesto en INEN NTE 9: 2012). Estos límites de permisibilidad están encaminados a lograr niveles que no interfieran negativamente en la salud humana y no garantizan la ausencia total.

Requisito	Límite máximo (LM)	Método de ensayo
Plomo, mg/kg	0,02	ISO/TS 6733
Aflatoxina M1, µg/kg	0,5	ISO 14674

Tabla 1.1 Límite máximo para contaminantes de los mismos o sus metabolitos intermediarios en la recolección de la leche cruda. Fuente: (INEN NTE 9, 2012)



*UNIVERSIDAD DE CUENCA*

# **MATERIALES Y MÉTODOS**



## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Tipo de estudio

El tipo de estudio se propone con carácter descriptivo.

### 2.2 Muestreo

El muestreo se realizó durante el período comprendido del 12 al 24 de abril del año 2016. En total, se recolectaron 33 muestras de quesillo siguiendo un muestreo estratificado en los 4 mercados de mayor concurrencia: 9 de Octubre (4 muestras), 12 de Abril (3 muestras), 10 de Agosto (4 muestras) y “Feria Libre” (21 muestras). Las muestras fueron recolectados según las directrices del manual de muestreo de alimento del Laboratorio de Alimentos y Nutrición del Proyecto VLIR-IUC “Alimentación, Nutrición y Salud” basándose en 50 encuestas aplicadas a la población de Cuenca. Ver Anexo 1 y 2.

Cada muestra fue etiquetada con su código respectivo, fecha de recolección, lugar, procedencia y tratamiento térmico hasta el momento de compra. Las muestras fueron mantenidas en refrigeración hasta su análisis individual. La toma de las muestras se realizó en distintos días de acuerdo con la mayor afluencia en cada mercado así: Feria Libre (sábados y domingos), 12 de abril (sábados), 10 de agosto (domingo) y 9 de octubre (domingo).

Para conocer los días de compra se llevaron a cabo 50 encuestas de consumo en los mercados donde posteriormente se realizó el muestreo. Ver Anexo 3

### 2.3 ANÁLISIS DE AFLATOXINA M<sub>1</sub>

#### 2.3.1 Fundamento del análisis

La determinación de aflatoxina M<sub>1</sub> inicia con la extracción de la micotoxina utilizando columnas de inmovilización. La columna contiene anticuerpos específicos unidos sobre un material de soporte sólido. A medida que la muestra pasa a través de la columna, los anticuerpos se unen selectivamente con cualquier AFM<sub>1</sub> (antígeno) contenida en el de la muestra, para dar un



complejo anticuerpo-antígeno. La columna es lavada y la toxina unida es liberada por el anticuerpo después de la elución de la columna con metanol/acetonitrilo. La cantidad de AFM<sub>1</sub> es determinada por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase inversa vinculado a un detector de fluorescencia.

### 2.3.2 Equipos, materiales y reactivos

El análisis se realizó durante los días 10 de abril al 10 de mayo de 2016 en las instalaciones del Laboratorio de Alimentos y Nutrición del Proyecto VLIR-IUC “Alimentación, Notición y Salud”, Universidad de Cuenca, Campus Balzay. Los equipos, materiales y reactivos se detallan en la tabla 2.1

EQUIPOS	MATERIALES	REACTIVOS
<ul style="list-style-type: none"> <li>Centrífuga MICRO 220P</li> <li>Baño María</li> <li>Manifold</li> <li>HPLC con detector de fluorescencia (Agilent 1200, US)</li> <li>Baño ultrasónico (Branson, US)</li> <li>Homogeneizador horizontal (VWR, US)</li> <li>Rotavapor Heidolph HB</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tubos falcón de 15 y 50 ml</li> <li>Gradillas para los tubos falcón</li> <li>Pipetas de 10 ml</li> <li>Micropipetas de 10-100 µl y 100-1000 µl</li> <li>Pipetas Pasteur</li> <li>Embudos de vidrio</li> <li>Papel filtro (Whatman N°4)</li> <li>Probeta 250ml</li> <li>Vasos de precipitación (50ml)</li> <li>Papel aluminio</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Estándar de aflatoxina M1 10 µg/mL en acetonitrilo</li> <li>Columnas de inmunoafinidad (EASI-EXTRACT®Aflatoxin)</li> <li>Acetonitrilo, grado HPLC</li> <li>Metanol, grado HPLC</li> <li>Ácido acético Glacial</li> <li>Agua pura, grado HPLC</li> <li>Solución tampón de fosfato (PBS)</li> <li>Cloroformo</li> <li>Agua destilada</li> <li>Metanol:Acetonitrilo (2:3)</li> </ul>

Tabla 2.1 Materiales, equipos y reactivos requeridos para análisis de aflatoxina M<sub>1</sub> por HPLC





### 2.3.3 Procedimiento de extracción y clean-up

- Pesar 15 g. de queso
- Agregar 1 ml de solución saturada de Cloruro de Sodio (36%) y 75 ml de cloroformo.
- Licuar 3 minutos.
- Filtrar y recoger en un erlenmeyer de 125 ml.
- Lavar con 25 ml de cloroformo.
- Filtrar y recoger en un erlenmeyer de 125 ml.
- Licuar 1 minuto.
- El filtrado se evapora en el rotavapor a 40°C.
- Centrifugar a 4000 rpm x 15 min. a 4°C.
- Quitar la capa superficial de grasa con pipeta pasteur.
- El residuo disolver con 1 ml. de MeOH, 30 ml de agua destilada y 50 ml de hexano
- Colocar en embudo de separación y separar la parte alcohólica recolectándola en un erlenmeyer de 125ml
- Para el clean-up, preparar la columna a temperatura ambiente, dejando pasar el líquido que contiene y añadir 3 ml de PBS
- Pasar el extracto recogido a través de la columna y la AFM<sub>1</sub> presente en la muestra es retenida por el anticuerpo dentro del gel de la columna.
- Lavar la columna con 10 ml de PBS, y 10 ml de agua para eliminar el material no unido.
- Eluir la AFM<sub>1</sub> de la columna con 1.5 ml de una solución de metanol /acetonitrilo (2:3 v/v), utilizando la técnica de backflushing (3 veces) y recolectando el eluido en un vial.
- Añadir 1 ml de agua y recolectar en el mismo vial.
- El eluido recolectado (2.5 ml) es utilizado para el análisis por HPLC de fase inversa.

### 2.3.4 Análisis de aflatoxina M1 por HPLC

El análisis de AFM<sub>1</sub> en HPLC se realizó según el método estandarizado por el Laboratorio de Alimentos y Nutrición del Proyecto VLIR-IUC "Alimentación, Nutrición y Salud". Las condiciones de análisis se detallan a continuación:



Columna: Zorbax Eclipse Plus C18 (4.6 x 250 mm, 5 µm) (Agilent, US)

Velocidad de flujo de la fase móvil: 0.8ml/ min.

Detector de fluorescencia: Excitación 365nm. Emisión 450nm.

Temperatura de la columna: 35°C.

Volumen de inyección de la muestra: 20 µl.

Modo de inyección: isocrático.

Fase Móvil: Solución acuosa de ácido acético al 2%: Acetonitrilo: Metanol (40:35:25 v/v).

El método empleado presenta los siguientes parámetros analíticos:

Linealidad y rango dinámico lineal: 0.05 – 10 ng/ml; R<sup>2</sup>= 0.9989

Límite de detección: 0.04 ng/ml.

Límite de cuantificación: 0.08 ng/ml.

### 2.3.5 Análisis de datos cromatográficos

El cálculo de las concentraciones de AFM<sub>1</sub> se realizó por interpolación de la curva de calibración área bajo la curva del pico cromatográfico vs concentración. La curva de calibración se realizó a 8 niveles de concentración: 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10 ng/ml (µg/L) partiendo de un estándar madre de AFM<sub>1</sub> en acetonitrilo.

Finalmente, se realizó una corrección por el método de extracción, utilizando la siguiente ecuación:

$$C \text{ (ng/ml)} = \frac{C_i \text{ (ng/mL)}}{ml}$$

Donde:

c= concentración de aflatoxina M1 que se encuentra en la muestra analizada.

C1 = concentración de aflatoxina M1 que se encuentra en la alícuota inyectada.

ml = volumen de extracto en la inyección.

### 2.3.6 Técnicas de procesamiento y análisis

Se realizó una base de datos en el programa Microsoft Excel para Windows. La información fue recogida durante los días previstos en el estudio. Se realizó



## *UNIVERSIDAD DE CUENCA*

un análisis descriptivo .El proceso incluyó la medición de concentraciones de aflatoxinas por el método de cromatografía líquida de alta resolución en el laboratorio.



*UNIVERSIDAD DE CUENCA*

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



## RESULTADOS

### 3.1 Recolección de muestras de quesillo

Se realizó el muestreo de los quesillos en los diferentes Mercados de la ciudad de Cuenca conforme a la Tabla 3.1

Mercado	Fechas y días de recolección							
	Miércoles 13/04/16	Viernes 15/04/16	Sábado 16/04/16	Domingo 17/04/16	Martes 19/04/16	Miércoles 20/04/16	Viernes 22/04/16	Sábado 07/0516
<b>Feria Libre</b>	4	2	4	1				
<b>9 De Octubre</b>					2		3	4
<b>10 De Agosto</b>							3	5
<b>12 De Abril</b>		2	1			2		
<b>Total de muestras/día</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>6</b>	<b>9</b>

Tabla 3.1. Muestras recolectadas en los diferentes mercados de la ciudad de Cuenca.

### 3.1 Análisis de resultados

En total, se analizaron 33 muestras de quesillo mediante la técnica de HPLC. Se encontraron 7 muestras (21%) sobre el límite de detección (LOD=0.04



$\mu\text{g/kg}$  o  $\text{ug/kg}$ ) o positivas a  $\text{AFM}_1$ , de las cuales 4 muestras se consideran detectables pero no cuantificables (entre LOD y LOQ) y 3 fueron cuantificables, es decir estuvieron sobre el límite de cuantificación ( $\text{LOQ}=0.08 \mu\text{g/kg}$  o p.p.b.). con un mínimo de  $0.12 \text{ug/kg}$  y un máximo de  $0.83\text{p.p.b}$  donde todas las muestras cumplen con la normativa de Brasil (MINISTÉRIO DE SAÚDE, 2011)( fecha de consulta) y cuales el máximo permitido , Un resumen de los resultados se presenta en la Tabla 3.2.

<b>Muestras positivas (&gt;LOD)</b>	7/33 (21%)
<b>LOD-LOQ</b>	4/33 (12%)
<b>&gt; LOQ</b>	3/33 (9%)
X $\pm$ DE: $0.44 \pm 0.36 \text{ug/kg}$	
Rango (mín-máx): $0.12 - 0.83 \text{ug/kg}$	

Tabla 3.2 Concentración de  $\text{AFM}_1$  en  $\text{ug/kg}$  de muestras cuantificables  
LOD (Límite de Detección):  $0.04 \text{ug/kg}$   
LOD-LOQ:  $0.04 \text{ug/kg} - 0.08 \text{ug/kg}$   
LOQ (Límite de Cuantificación):  $> 0.08 \text{ug/kg}$



### 3.3 DISCUSIÓN

Ecuador no tiene normativa para la concentración de AFM<sub>1</sub> en quesos, por lo tanto los resultados obtenidos variaron entre un mínimo de 0,12 ug/kg y un máximo de 0,83ug/kg estos niveles de contaminación se compararon con la normativa Brasileira para AFM<sub>1</sub> en quesos que es de 2.5 ug/kg (MINISTÉRIO DE SAÚDE, 2011). y todos estuvieron bajo el límite permisible.

Los resultados de este estudio son comparables con los encontrados en otros estudios por ejemplo, en Río de Janeiro en 30 quesos analizados se encontró AFM<sub>1</sub> en un 60%, las concentraciones variaron de 0.16 a 0.69 ug/kg, de los cuales el 26.7% se encontró por encima del límite de tolerancia de la Unión Europea (0.5 ug/kg) y todos si cumplen con la norma de Brasil (DA SILVA, FRAGA, MACHADO, & MIRANDA, 2013). y otro estudio en 60 quesos de cabra en México se observó una prevalencia del 30 % de AFM<sub>1</sub> en un rango de 0.1 – 1.61 µg/kg, (CORONADO, y otros, 2010) Por otro lado, en otros estudios se han encontrado niveles de contaminación mucho más altas que este trabajo como en Turquía en 41 muestras de queso se encontró una prevalencia del 51.3% con una concentración entre 0.052-2.52 µg/kg (HAMPIKYAN, HAMPARSUM, COLAK, & BARIS, 2010); y otro estudio en Minas de Gerais en 75 muestras de queso y una prevalencia del 74.7% de AFM<sub>1</sub> se detectaron concentraciones entre 0.02 y 6.92ug/kg . (ABRANTES, OLIVEIRA, PEREIRA, PRADO, SANTOS, & VELOSO, 2000).

Según (HUSEYIN, RECEP, ENGIN, & ERTAN, 2007) en la distribución de la toxina AFM<sub>1</sub> en la leche, y queso, la concentración de AFM<sub>1</sub> en el queso fue 3,37 veces mayor que en la leche. En comparación con el nivel de adición inicial, el porcentaje de la toxina en los quesos varió entre 35-42%. En el caso del quesillo la concentración AFM<sub>1</sub> aumenta en el producto terminado, aunque la AFM<sub>1</sub> es soluble en agua, y se debería perder en el suero, ésta tiene mayor afinidad a la caseína y se unen, aumentando la concentración de AFM<sub>1</sub> en el quesillo.



## UNIVERSIDAD DE CUENCA

En este caso si 200 g. del quesillo con nuestra mayor concentración de AFM<sub>1</sub> 0.83ug/Kg es consumido por una persona de 50 Kg estaría ingiriendo 0.166ug/Kg de peso de AFM<sub>1</sub>, lo cual es menor a la DT50 que es 10.38ug/Kg de peso.

Considerando la baja prevalencia de las muestras positivas, no fue posible explorar una posible asociación con el mercado de procedencia.

El quesillo con AFM<sub>1</sub> se contaminó por la leche con AFM<sub>1</sub>, la cual vino de un mamífero que consumió piensos con AFB<sub>1</sub>, éste debe ser el primer punto de control, ya que se puede contaminar el alimento para el ganado en el cultivo, cosecha o almacenamiento, corresponde tomar en cuenta los factores como temperatura y humedad en el lugar de almacenamiento del alimento destinado a los animales y el uso de fungicidas para evitar el crecimiento de los hongos productores de AFB<sub>1</sub>. Otro punto de control es la leche destinada a la producción de quesillo para que tenga una concentración menor a 0.5ug/Kg de AFM<sub>1</sub>.

Al estudiar casos de AFM<sub>1</sub> en quesos en países como Francia, Emiratos Árabes, Alemania y Turquía entre otros, se encuentra que sus concentraciones algunas veces son indetectables y algunas superan los 0.05ug/Kg de la norma de la Unión Europea, sugiriendo que han conseguido controlar la presencia de AFM<sub>1</sub> en el queso, ya sea por la reducción de AFB<sub>1</sub> de los alimentos del ganado o por la detoxificación de AFM<sub>1</sub> en la leche, y puede servir de guía para aquellos productores de leche y de quesillo para disminuir la concentración de AFM<sub>1</sub>.





*UNIVERSIDAD DE CUENCA*

# **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**



# IV

## 4. CONCLUSIONES

Las muestras analizadas de quesillos en los mercados 9 de Octubre, 12 de Abril, 10 de Agosto y Feria Libre de la ciudad de Cuenca fueron positivas para AFM<sub>1</sub> 21 % y con un mínimo de 0,12 p.p.b. y un máximo de 0,83p.p.b. Estos niveles de contaminación se encuentran debajo de 2.5 p.p.b. que es límite permisible en la normativa de Brasil la cual se usó de referencia pues el Ecuador no tiene la normativa respectiva. En base a estos resultados se concluye que los quesillos son seguros para la población en cuanto a AFM<sub>1</sub>.

La Norma ecuatoriana para quesos frescos donde está incluido el quesillo no tiene nivel máximo permitido para la AFM<sub>1</sub>; sin embargo se establece que la leche con que se elaboran estos productos debe cumplir con las especificaciones sanitarias marcadas en la norma de leche NTE INEN: 9-10:2012.

Los resultados de esta investigación nos indican la importancia de elevar los niveles de conocimiento sobre la inocuidad de los productos lácteos respecto a la contaminación con AFM<sub>1</sub> y también la aplicación de las buenas prácticas en el almacenamiento de alimentos de animales en el Ecuador.

Tomando en cuenta que la eliminación de AFM<sub>1</sub> en la leche y productos derivados, es un proceso complejo y costoso que no garantiza la eliminación completa de AFM<sub>1</sub>, la solución se debe programar para la eliminación de la AFB<sub>1</sub> aplicando medidas preventivas en las etapas de producción del alimento del ganado.



# V

## 5. RECOMENDACIONES

- Es necesario implementar un sistema de análisis de  $AFM_1$ , para favorecer la disminución de la  $AFM_1$  en los productos lácteos como el queso.
- Es preciso socializar la necesidad de elaborar quesos con materias primas de calidad. Es necesario que aumente la responsabilidad de los productores de leche y los elaboradores de queso a fin de concientizar a lo largo de la cadena alimentaria sobre los riesgos para la salud de consumir y/o comercializar los quesos que podrían estar contaminados con  $AFM_1$  u otras micotoxinas provenientes del consumo de alimentos contaminados por parte de los animales.
- Ya que las especies productoras de  $AFB_1$  aparecen en condiciones climáticas propicias (humedad y lluvia) se deja una puerta abierta para posteriores estudios con la variación del clima



*UNIVERSIDAD DE CUENCA*

## **REFERENCIAS**



ABARCA, M., ACCENSI, F., & col. (2001). *ORGANIZACION DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACION Y LA AGRICULTURA*.

Recuperado el 18 de Noviembre de 2014, de [http://www.fao.org/waicent/faoinfo/food-safety-quality/cd\\_higiene/cnt/cnt\\_sp/sec\\_1/01.mouldandmyco.html](http://www.fao.org/waicent/faoinfo/food-safety-quality/cd_higiene/cnt/cnt_sp/sec_1/01.mouldandmyco.html)

ABRANTES, F., OLIVEIRA, M., PEREIRA, M., PRADO, U., SANTOS, L., & VELOSO, T. (2000). *Aflatoxin M1 in samples of "Minas" cheese commercialized in the city of belo horizonte – Minas Gerais/Brazil*. Recuperado el 08 de Febrero de 2016, de [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-20612000000300020](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612000000300020)

ABRUNHOSA, L., & col. (2012). Micotoxinas detectadas en productos alimenticios en Portugal:Revisión. (Biociencias, Ed.) *Revista Bio Ciencias* , 2 (1 / Año 3), 5-31.

ALLCROFT, R., & col. (1961). *A toxic factor in Brazilian groundnut meal*.

Recuperado el 16 de 11 de 2014, de Amlam International: [http://amlan.com/spanish/downloads/WP\\_Dairy\\_SP.pdf](http://amlan.com/spanish/downloads/WP_Dairy_SP.pdf)

ARANGUREN, E. (2009). *Detección de Aflatoxina M1 en quesos frescos*.

Recuperado el 06 de Noviembre de 2015

BOGANTES, P., & col., y. (2004). *Aflatoxinas*. Recuperado el 18 de Noviembre de 2014, de SciELO:

[http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0001-60022004000400004](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-60022004000400004)

CAMEAN, A., & REPETTO, M. (2015). *Toxicología Alimentaria* (1ra ed.).

España, Madrid- Buenos Aires, España: Díaz de Santos.

CARLSON, & y.col. (2002). *Aflatoxina M1 en Leche*. Recuperado el 18 de

Noviembre de 2014, de Lecheria: <http://www.engormix.com/MA-ganaderia-leche/sanidad/articulos/aflatoxina-leche-t315/p0.htm>

CARVAJAL, M. (2013). Transformacion de la aflatoxina B1 de alimentos, en el

cancerígeno humano, aducto AFB1 - ADN. *Revista Especializada en Ciencias Quimico - Biologicas* .

CASTAÑEDA, R., & GRAPPIN, R. (2002). *La reología en la caracterización y*

*tipificación de quesos*. Recuperado el 11 de Mayo de 2016, de <http://www-biblio.inti.gob.ar/gsd/cgi-bin/library.cgi?e=d-10000-00---off-0inti--00-2---0-10-0---0---0direct-10---5-----0-1l--10-es-Zz-1---20-about---01-3-1-00-0--4--0--0-01-00-0utfZz-8-00&a=d&c=inti&cl=CL2.1.23&d=HASHc57662bf1c7b4280b94e4a>

CASTILLO, J. (2007). *MICOTOXINAS EN ALIMENTOS*. España.

CASTILLO, S. D. (2001). *Micotoxinas en Alimentos*. Recuperado el 30 de 06 de

2016, de [https://books.google.com.ec/books?id=wgRVcFvk--IC&pg=PA188&lpg=PA188&dq=td50+afm1&source=bl&ots=IS2\\_V-](https://books.google.com.ec/books?id=wgRVcFvk--IC&pg=PA188&lpg=PA188&dq=td50+afm1&source=bl&ots=IS2_V-)



5nF1&sig=M\_mpBdJSZvNzJmUNTrLlKPJz-ak&hl=es-419&sa=X&redir\_esc=y#v=onepage&q=td50%20afm1&f=false

CETTIA. (2008). *Evaluación de la calidad higiénico-sanitaria y determinación de las características organolépticas y físico químicas del quesoillo que se expende en los mercados de la ciudad de Loja*. Universidad Técnica de Loja, Loja.

CORONADO, M., ESCOBAR, A., GUTIERREZ, G., MARTINEZ, F., PEREZ, J., URBAN, G., y otros. (2010). *Aflatoxina M1 en leche y queso de cabra producidos en paseo el Grande, Guanajuato, México*. Recuperado el 21 de Mayo de 2016, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0253-570X2010000200003](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2010000200003)

DA SILVA, A., FRAGA, E., MACHADO, F., & MIRANDA, I. (2013). *Aflatoxin M1 Contamination in Grated Parmesan Cheese Marketed in Rio de Janeiro- Brazil*. Recuperado el 08 de Enero de 2016, de [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-89132014000200016](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132014000200016)

DENG, SHI-XI, & col. (2010). Toxic effects and residue of aflatoxin B1 in tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) during long-term dietary exposure. (*Aquaculture, Ed.*) *Aquaculture* , 307 (3-4), 233-240.

ELIKA. (28 de 02 de 2013). *Fundacion Vasca para la Seguridad Agroalimentaria*. Recuperado el 15 de Noviembre de 2014, de Ficha Aflatoxina B1 Alimentacion Animal: [http://www.elika.eus/datos/pdfs\\_agrupados/Documento15/AFLATOXINA%20B1%202012%20maquetado.pdf](http://www.elika.eus/datos/pdfs_agrupados/Documento15/AFLATOXINA%20B1%202012%20maquetado.pdf)

EUR, L. (2000). Recuperado el 02 de Enero de 2016, de [http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A32006R1881#ntr6-L\\_2006364EN.01001501-E0006](http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A32006R1881#ntr6-L_2006364EN.01001501-E0006)

FERNANDEZ, C., & REPETTO, M. (2012). *Toxicología alimentaria*. (E. D. Santos, Ed.)

GALTIER, P. (1999). *Toxicol-Tox*. Mexico.

GIMENO, A., & MARTINS, M. (2011). *Micotoxinas y Micotoxicosis en Humanos*. Miami, USA: Special Nutrients INC.

HAMPIKYAN, HAMPARSUM, B., COLAK, O., & BARIS, C. (2010). *Determination of aflatoxin M1 levels in Turkish white, kashar and tulum cheeses*. Recuperado el 11 de Mayo de 2016, de <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301820861>

HUSEYIN, O., RECEP, C., ENGIN, Y., & ERTAN, G. (2007). *Destino de aflatoxina M1 en la kashar queso*. Recuperado el 29 de Junio de 2016, de <https://translate.google.com/translate?hl=es-419&sl=en&u=http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1745-4565.2007.00062.x/abstract&prev=search>

INEN NTE 9. (2012). LECHE CRUDA. REQUISITOS Quinta Revisión.



MARTINEZ, C. (2011). *Evaluación de un adsorbente de micotoxinas de nueva generación como aditivo de pienso en animales de renta*. Recuperado el 01 de Marzo de 2015, de

<http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/48521/jcbm1de1.pdf?sequence=1>

MENDEZ, A., & MORENO, E. (2009). *Las micotoxinas: contaminantes naturales de los alimentos*. Recuperado el 15 de Noviembre de 2014, de Revista ciencia: <http://www.revistaciencia.amc.edu.mx/online/619-Albores%20Micotoxinas.pdf>

MINISTÉRIO DE SAÚDE, B. (2011). *Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos*. Recuperado el 27 de Mayo de 2016, de [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0007\\_18\\_02\\_2011\\_rep.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0007_18_02_2011_rep.html)

MONTO, A., & WRIGHT, T. (2001). *The epidemiology and prevention of hepatocellular carcinoma*. Recuperado el 11 de Noviembre de 2015, de SciELO:

[http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_nlinks&ref=019917&pid=S0001-6002200400040000400024&lng=en](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=019917&pid=S0001-6002200400040000400024&lng=en)

ORTIZ, C. (2009). *Análisis de Aflatoxina M1 en leche fresca de establos lecheros de Arequipa. Analysis of Aflatoxin M1 in raw milk of Dairy Farms in Arequipa*. Recuperado el 05 de febrero de 2015, de

[http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1609-91172009000100021&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1609-91172009000100021&script=sci_arttext)

RAMIREZ, J. (2010). *El quesillo*. Recuperado el 12 de Marzo de 2016, de [https://drive.google.com/file/d/0B5Z\\_xL0itc6dYjg2OTg2NjltY2FiZi00ZWZWMzLTlhOTEtNzFjMjIwZWZWM4YjJj/view](https://drive.google.com/file/d/0B5Z_xL0itc6dYjg2OTg2NjltY2FiZi00ZWZWMzLTlhOTEtNzFjMjIwZWZWM4YjJj/view)

RODRIGUEZ MENCINAS, E. (2000). *MANUAL DE TOXICOLOGIA BASICA*. España.

ROMANGNOLI, M., & col. (2009). *Facultad de Ciencias Agrarias Universidad Nacional de Rosario*. Recuperado el 18 de Noviembre de 2014, de Revista Agromensajes de la facultad.:

<http://www.fcagr.unr.edu.ar/Extension/Agromensajes/27/2AM27.htm>

SANDOVAL, G. (Junio de 2013).

<http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/2159/1/T-UCE-0008-13.pdf>.

Recuperado el 02 de Abril de 2016, de

<http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/2159/1/T-UCE-0008-13.pdf>

SMITH, J., & col. (2013). *Aflatoxins*. Recuperado el 11 de Noviembre de 2014, de National Cancer Institute at the National Institute of Health:

<http://www.cancer.gov/cancertopics/causes-prevention/risk/substances/aflatoxins>

SORIANO DEL CASTILLO, J. M. (2011). *Micotoxinas en Alimentos*.

Recuperado el 08 de Febrero de 2016, de



*UNIVERSIDAD DE CUENCA*

[https://books.google.com.ec/books/about/Micotoxinas\\_en\\_alimentos.html?id=wuZvCQAAQBAJ&redir\\_esc=y](https://books.google.com.ec/books/about/Micotoxinas_en_alimentos.html?id=wuZvCQAAQBAJ&redir_esc=y)

Torres, M., Aparicio, J., & García, J. (2014). Aflatoxicosis. *REDVET*, 15 (2), 4-5.

TREVIÑO, J. (2000). *Aflatoxina*. Recuperado el 21 de Febrero de 2016, de <http://etimologias.dechile.net/?aflatoxina>

UGUÑA ROSAS, M. (Abril de 2013).

<http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/4703>. Recuperado el 20 de Mayo de 2016, de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/4703>

YAD, & col. (14 de Junio de 2013). *Human aflatoxin exposure in Kenya, 2007: a cross-sectional study*. (P. med, Ed.)





*UNIVERSIDAD DE CUENCA*

# **ANEXOS**



**Anexo 1. Modelo de encuesta para selección de Mercados y días de compra**

**ENCUESTA SOBRE PREFERENCIAS DE COMPRA DE QUESILLO**

Número de registro   
Fecha de la encuesta (dd/mm/aa)   
Lugar de la encuesta

**DATOS DEL ENCUESTADO:**

Edad   
Sexo

**PREFERENCIA DE CONSUMO**

**¿Usted y/o su familia consume**  
**1. quesillo?**

1 Si   
2 No

**¿Dónde compra el**  
**2. quesillo?**

(incluir alguna referencia del lugar)

**3. ¿Qué días a la semana compra el quesillo?**

1 Lunes   
2 Martes   
3 Miércoles   
4 Jueves   
5 Viernes   
6 Sábado   
7 Domingo

**4. ¿Qué tan maduro prefiere comprar el quesillo?**

Muy fresco (<2 días)  
1. días   
2. Fresco (2-4 días)   
3. Maduro (>4 días)

4. Cualquiera



## Anexo 2. Resultados de Encuesta

Número de personas  
encuestadas:50

	<b>TOTAL</b>	<b>Lunes</b>	<b>Martes</b>	<b>Miércoles</b>	<b>Jueves</b>	<b>Viernes</b>	<b>Sábado</b>	<b>Domingo</b>
<b>Feria Libre</b>	16			5	1	3	5	2
<b>9 de Octubre</b>	13		2	1	1	4	4	1
<b>10 de Agosto</b>	12			1	2	2	6	1
<b>12 de Abril</b>	7			2	1	2	1	1
<b>Otros</b>	2						2	
<b>Total por Mercado</b>		<b>0</b>	<b>2</b>	<b>9</b>	<b>5</b>	<b>11</b>	<b>18</b>	<b>5</b>



**Anexo 3. Plan de Muestreo**

	13/04/2016	14/04/2016	15/04/2016	16/04/2016	17/04/2016
	<b>MIERCOLES</b>	<b>JUEVES</b>	<b>VIERNES</b>	<b>SABADO</b>	<b>DOMINGO</b>
<b>FERIA LIBRE</b>	4		2	4	1
<b>9 DE OCTUBRE</b>					
<b>10 DE AGOSTO</b>					
<b>12 DE ABRIL</b>			2	1	
	<b>4</b>		<b>4</b>	<b>5</b>	<b>1</b>

	19/04/2016	20/04/2016	22/04/2016	23/04/2016
	<b>MARTES</b>	<b>MIERCOLES</b>	<b>VIERNES</b>	<b>SABADO</b>
<b>FERIA LIBRE</b>				
<b>9 DE OCTUBRE</b>	2		3	4
<b>10 DE AGOSTO</b>			3	5
<b>12 DE ABRIL</b>		2		
	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>6</b>	<b>9</b>



#### Anexo 4 Curva de calibración de AFM<sub>1</sub> utilizada para los cálculos

Concentración ng/ml	Área	RT (Tiempo de Retención)
75	4,6	4,096
50	3	4,094
25	1,5	4,092
10	0,42	4,093
5	0,32	4,091
2	0,1	4,095

X **4,308**

SD 0,015

RSD 0,35

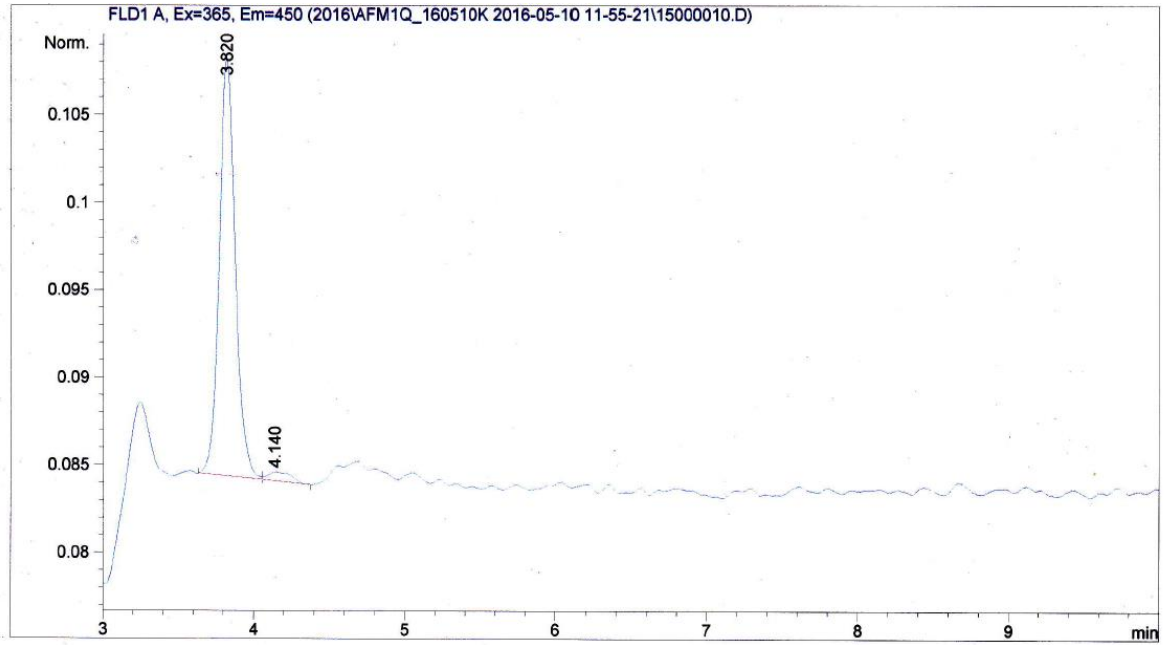


Anexo 5: AFM<sub>1</sub> en queso artesanal

Fecha de lote	Nº muestra	AFM <sub>1</sub>		Corrección recuperación (%R=13.5) ug/kg AFM <sub>1</sub>
		Área	TR	
13/04/2016	1	0,0065	4,198	0,06
13/04/2016	2			
13/04/2016	3	0,0017	4,148	-0,03
13/04/2016	4			
15/04/2016	5	0,0021	4,129	-0,02
15/04/2016	6	0,0052	4,111	0,035
15/04/2016	7	0,0039	4,122	0,01
15/04/2016	8	0,0045	4,147	0,02
18/04/2016	9	0,0023	4,104	-0,02
18/04/2016	10	0,0022	4,1	-0,02
18/04/2016	11	0,0066	4,039	0,06
18/04/2016	12			
18/04/2016	13			
18/04/2016	14	0,0460	4,174	0,83
19/04/2016	15			
19/04/2016	16	0,0031	4,049	-0,01
20/04/2016	17			
20/04/2016	18	0,0061	4,129	0,05
21/04/2016	19			
21/04/2016	20	0,0044	4,076	0,02
21/04/2016	21	0,0064	4,072	0,06
21/04/2016	22			
21/04/2016	23	0,0220	4,135	0,36
21/04/2016	24	0,0093	4,082	0,12
5/10/2016	25			
5/10/2016	26	0,0007	4,055	-0,05
5/10/2016	27	0,0047	4,183	0,03
5/10/2016	28	0,0003	4,086	-0,06
5/10/2016	29	0,0037	4,187	0,01
5/10/2016	30			
5/10/2016	31	0,0012	4,05	-0,04
5/10/2016	32			
5/10/2016	33	0,0020	4,043	-0,03



Anexo 6 Standard HPLC AFM<sub>1</sub>





Anexo 7 Muestra positiva HAPLC AFM<sub>1</sub>

