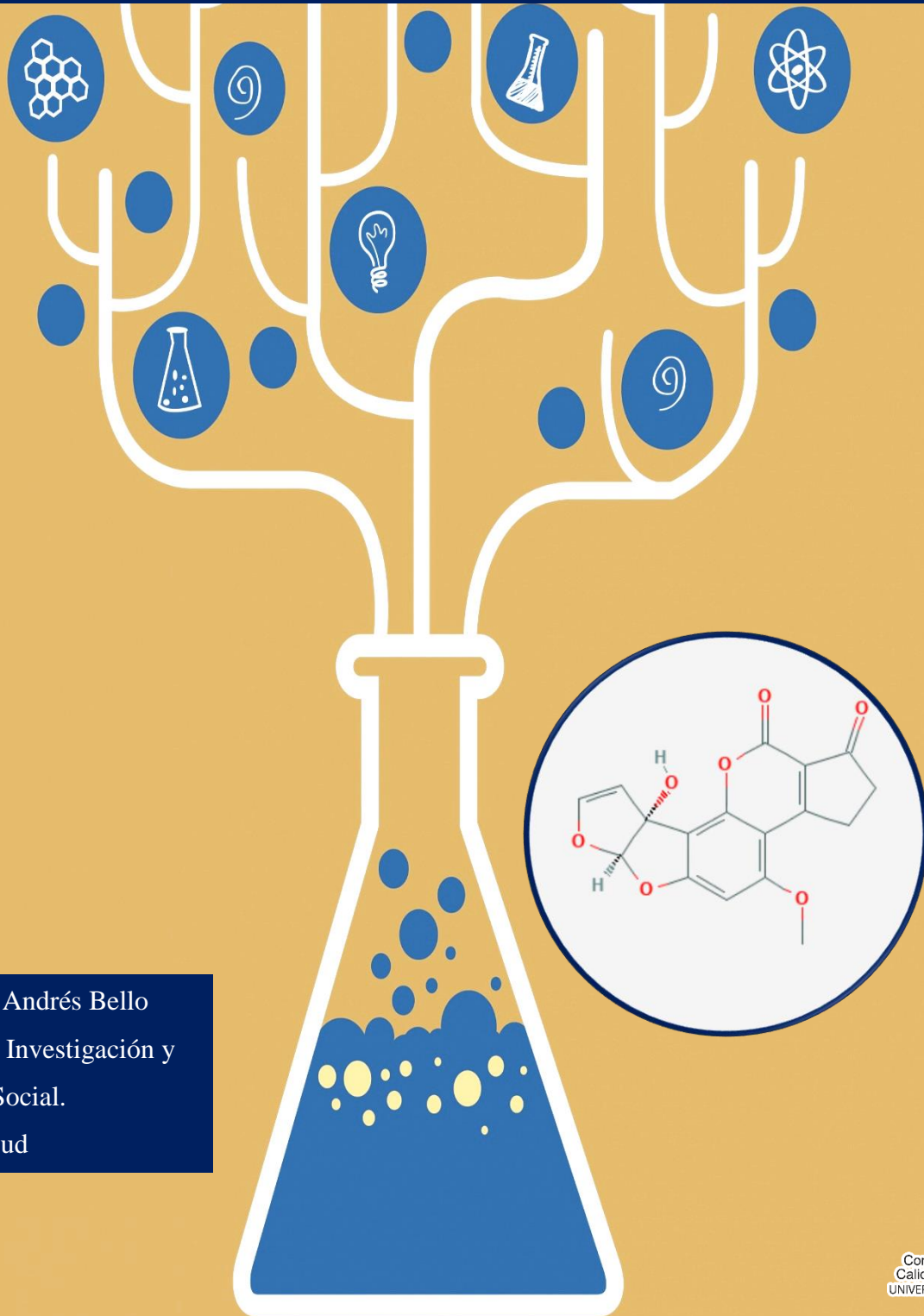


# Aflatoxina M<sub>1</sub> en queso duro blando, comercializado en San Miguel, resultados de monitoreo 2018-2019.



Universidad Doctor Andrés Bello  
Dirección Nacional de Investigación y  
Proyección Social.  
Área: Salud



# Aflatoxina M<sub>1</sub> en queso duro blando, comercializado en San Miguel, resultados de monitoreo 2018-2019.

---

*ÁREA DE SALUD*

2019



Comisión de Acreditación de la  
Calidad de la Educación Superior  
UNIVERSIDAD DR. ANDRÉS BELLO (UNAB)  
ACREDITADA  
2019 - 2024



Laboratorio de Inocuidad  
Alimentaria **UNAB**

Universidad Doctor Andrés Bello

Dirección Nacional de Investigación y Proyección Social

Laboratorio de Inocuidad Alimentaria

**Aflatoxina M<sub>1</sub> en queso duro blando, comercializado en San Miguel, resultados de monitoreo 2018-2019.**

©2019, Universidad Doctor Andrés Bello

Primera Edición 2019

Código institucional: SM/INV/C/2019

**Investigadores:**

Oscar Peña Rodas <sup>a†</sup>, Roxana Martínez López <sup>a‡</sup>, Roberto Hernández Rauda <sup>b\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Inocuidad de Alimentos, Universidad Doctor Andrés Bello, San Salvador, El Salvador. 1a Calle Poniente y 41a Avenida Norte, 2128, Colonia Flor Blanca, San Salvador, El Salvador, América Central.

<sup>†</sup> E-mail: [oscar.pena@unab.edu.sv](mailto:oscar.pena@unab.edu.sv)

<sup>‡</sup> E-mail: [roxana.martinez@unab.edu.sv](mailto:roxana.martinez@unab.edu.sv)

<sup>b</sup> Dirección de Investigación y Proyección Social, Universidad Doctor Andrés Bello. 1a Calle Poniente y 41a Avenida Norte, 2128, Colonia Flor Blanca, San Salvador, El Salvador, América Central. Fax: +503 22608541

<sup>\*</sup> E-mail: [roberto.rauda@unab.edu.sv](mailto:roberto.rauda@unab.edu.sv)

## ÍNDICE

Resumen .....	1
Abstract .....	3
1. Introducción.....	5
2. Métodos .....	7
2.1. Tipo de estudio y Muestreo .....	7
2.1 Reactivos, kits ELISA y equipamiento .....	8
2.2 Preparación de la muestra y extracción de AFM <sub>1</sub> .....	9
2.3 Análisis de AFM <sub>1</sub> en muestras por ELISA competitivo .....	10
2.4 Validación del Método Analítico .....	10
2.5 Niveles Máximos para Aflatoxina M <sub>1</sub> .....	12
2.6 Parámetros Meteorológicos .....	12
2.7 Análisis Estadístico .....	13
3. Resultados .....	13
3.1 Método de Validación .....	13
3.2 Prevalencia Estacional de AFM <sub>1</sub> en queso, según origen .....	16
3.3 Variación Estacional de AFM <sub>1</sub> en queso, según origen .....	20
4. Discusión .....	22
5. Conclusiones .....	27
6. Reconocimientos .....	28
7. Financiamiento .....	28
8. Referencias .....	29
9. Apéndice 1 .....	39



## Resumen

La Aflatoxina M<sub>1</sub> es un metabolito cancerígeno y genotóxico de las Aflatoxinas presentes en alimentos para ganado lactante contaminados por hongos; es excretada a través de la leche y al utilizarla para fabricar quesos, la toxina también se transferirá al lácteo. La contaminación del queso duro blando con AFM<sub>1</sub> parece variar según la estación del año, posiblemente debido al régimen alimenticio que pasa de pastura fresca en época lluviosa a alimentos secos en época seca y viceversa. Esta investigación determinó tanto la prevalencia y contenidos de AFM<sub>1</sub> en quesos de origen local y nicaragüense comercializados en San Miguel, El Salvador, como los cambios ocurridos según la estación y la asociación entre niveles de AFM<sub>1</sub> con parámetros meteorológicos. La prevalencia significativamente más alta de contaminación por AFM<sub>1</sub> en quesos locales como nicaragüenses se encontró en época seca y la más baja en época lluviosa (57.1% vs. 0.0%; 47.4% vs. 22.7%, respectivamente), la misma tendencia se observó en contenidos de AFM<sub>1</sub> (0.107 µg/kg vs. 0.080 µg/kg; 0.050 vs. 0.039 µg/kg, respectivamente). Una relación significativa se demostró entre niveles de AFM<sub>1</sub> con los promedios de lluvia acumulada y de humedad relativa según la época muestreada. Las prevalencias de la AFM<sub>1</sub> en los quesos indican que El Salvador y Nicaragua son endémicos a contaminación de lácteos por esa micotoxina. La variación estacional puede deberse a escasez de lluvia que promueve el crecimiento de hongos aflatoxicogénicos en las materias primas de los concentrados para ganado lechero, de esa forma, el consumo de alimento contaminado causará el aumento temporal de la AFM<sub>1</sub> en la leche y sus derivados.

## **Abreviaturas**

AFM<sub>1</sub>: Aflatoxina M1

AFB<sub>1</sub>: Aflatoxina B1

AFs: Aflatoxinas totales (B1+B2+G1+G2)

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

%RSD: Coeficiente de variación

HORRAT: Ecuación de Horwitz

## **Compuestos químicos estudiados en esta investigación:**

Aflatoxina M<sub>1</sub> (PubChem: 15558498)

Aflatoxinas Totales, mezcla de origen natural de:

Aflatoxina B<sub>1</sub> (PubChem: 14403)

Aflatoxina B<sub>2</sub> (PubChem: 2724360)

Aflatoxina G<sub>1</sub> (PubChem: 14421)

Aflatoxina G<sub>2</sub> (PubChem: 2724362)



## **Abstract**

Aflatoxin M<sub>1</sub> is a carcinogenic and genotoxic metabolite of Aflatoxins present in fungi contaminated food for lactating cattle, it is excreted through milk and when used to make cheese, the toxin will also be transferred to the dairy. The contamination of soft hard cheese with AFM<sub>1</sub> seems to vary according to the season of the year, possibly due to the diet that passes from fresh pasture in the rainy season to dry foods in the dry season and vice versa. This research determined both the prevalence and contents of AFM<sub>1</sub> in cheeses of local and Nicaraguan origin marketed in San Miguel, El Salvador, as well as the changes occurred according to the season and the association between AFM<sub>1</sub> levels with meteorological parameters. The significantly higher prevalence of AFM<sub>1</sub> contamination in local cheeses such as Nicaraguans was found in the dry season and the lowest in the rainy season (57.1% vs. 0.0%; 47.4% vs. 22.7%, respectively), the same trend was observed in AFM<sub>1</sub> contents (0.107 µg/kg vs. 0.080 µg/kg; 0.050 vs. 0.039 µg/kg, respectively). A significant relation was demonstrated between levels of AFM<sub>1</sub> with the averages of accumulated rainfall and relative humidity according to the sampled season. The prevalence of AFM<sub>1</sub> in cheeses indicate that El Salvador and Nicaragua are endemic to dairy contamination by that mycotoxin. The seasonal variation may be due to a lack of rainfall that promotes the growth of aflatoxicogenic fungi in the raw materials of dairy cattle concentrates, thus, the consumption of contaminated feed will cause the temporary increase of AFM<sub>1</sub> in milk and its derivatives.



## 1. Introducción

Las Aflatoxinas (AFs) son metabolitos secundarios de algunos mohos del género *Aspergillus spp.*, que contaminan de forma natural los cereales que sirven como ingredientes de los alimentos para humanos y animales, sea durante el período de pre-cosecha como de post-cosecha (1). Las AFs más comunes son la B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>, y su producción es propiciada por condiciones ambientales como alta temperatura, sequía, déficit de lluvia y la humedad relativa (2, 3, 4, 5), que varían a medida se suceden las estaciones, así como de un año a otro.

La Aflatoxina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) es el principal metabolito de la AFB<sub>1</sub>, producida mediante un proceso de hidroxilación que ocurre en los hepatocitos (6, 7, 8, 9, 10, 11) y se ha concluido que existe evidencia suficiente para considerarla como un genotóxico carcinógeno, aunque su potencia es 10 veces menor que la AFB<sub>1</sub> (12). Cuando el ganado bovino ingiere alimento o forraje contaminado por AFs, se estima que entre el 0.3% y el 6.2% del contenido de AFB<sub>1</sub> se transforma en AFM<sub>1</sub> y se excreta en la leche [7, 8, 9, 13, 14]. Si leche contaminada por AFM<sub>1</sub> es utilizada para elaborar quesos, esa toxina se transferirá de la materia prima al producto final (15, 16, 17), proceso que es potenciado por la afinidad de la AFM<sub>1</sub> por la caseína (2, 4, 16, 18, 19) y que subyace al efecto de concentración del contenido de esa toxina que tiene la transformación de leche a queso (2, 17, 20), alcanzando valores hasta 5.6 veces el contenido inicial de AFM<sub>1</sub> en la leche en quesos blandos (21) y hasta 4.5 veces en quesos duros (2, 22).

La prevalencia de contaminación y los contenidos de la AFM<sub>1</sub> en la leche y los quesos varían estacionalmente, asociados a cambios en la temperatura, la lluvia, la humedad relativa o a eventos como la sequía y las inundaciones (2, 3, 4, 5, 23). A la base de tal fluctuación

estacional está la disponibilidad de forraje verde, pues hay evidencia que la producción de leche de animales que consumen pastura fresca presenta menores valores de prevalencia y de contenidos de AFM<sub>1</sub> (24, 25, 26), mientras que el riesgo de contaminación de la leche por la AFM<sub>1</sub> se incrementa cuando el ganado se alimenta principalmente con concentrados, más susceptibles a ser colonizados por hongos aflatoxicogénicos por condiciones inapropiadas durante su almacenamiento, y que ocurre precisamente en épocas con escasez de pastura (3, 18, 23, 24, 26), de esa manera, el uso de alimentos contaminados provocará el aumento temporal de la AFM<sub>1</sub> en la leche y, por consiguiente, en sus derivados (15, 16, 17, 19).

El consumo aparente de quesos duros en El Salvador, incluyendo el duro blando, alcanzó 30821.8 TM en 2005, de todo ese volumen importado, el 71.8% provino desde Nicaragua (27). La importación del queso duro-blanco sigue en crecimiento, pasando de 11240 a 13266.7 TM, y de 29.7 a 35.2 millones de dólares entre 2014 y 2017 (28, 29). Los datos anteriores dan relevancia a tres aspectos, el consumo de queso duro blando es elevado y está creciendo entre la población salvadoreña y, precisamente por ese comportamiento, plantas procesadoras de lácteos de Nicaragua, tanto industriales, semi-industriales y artesanales exportan legal e ilegalmente sus productos en El Salvador (30) y no hay reportes locales ni nicaragüenses relacionados con el monitoreo de la AFM<sub>1</sub> en ese tipo de queso.

En vista de lo anterior, es necesario monitorear el queso duro blando comercializado en San Miguel, El Salvador, para determinar la prevalencia de contaminación y los contenidos de AFM<sub>1</sub> en quesos de origen local y nicaragüense, los cambios ocurridos acuerdo a la época del año y la asociación entre los niveles de contaminación por AFM<sub>1</sub> con parámetros meteorológicos.

## **2. Métodos**

### **2.1 Tipo de estudio y muestreo.**

Este fue un estudio descriptivo-observacional longitudinal, realizado entre julio de 2018 y julio de 2019, espaciando tres meses entre un muestreo y otro, de tal manera que los períodos de colecta de muestra fueron julio-agosto de 2018 (época lluviosa), noviembre-diciembre de 2018 (época transicional lluviosa-seca), febrero-marzo de 2019 (época seca) y junio-julio de 2019 (época inicial lluviosa).

Durante el año de estudio, se muestrearon repetidamente entre 27 y 28 comercios (puestos de venta) minoristas, ubicados en el mercado municipal de San Miguel y colectando muestras de queso duro blando o “Morolique”, tanto de fabricación local, como nicaragüense.

Los comercios minoristas muestreados tienen menos de 50 kg de lácteos de cada tipo en anaquel, y venden queso duro blando de fabricación local o nicaragüense, informando previamente al consumidor del origen del producto ofertado. Cada muestra colectada pesó 1 kg, cumpliendo así con las especificaciones de muestreo para el control oficial de micotoxinas en alimentos establecidas por la Comisión de Comunidades Europeas [31] y fue conservada en frío durante el transporte hacia el laboratorio. Las muestras fueron almacenadas a 2-4 °C en un congelador horizontal hasta su procesamiento y análisis.

El total de muestras de queso duro blando colectadas y analizadas fue 104, 82 procesadas en El Salvador (local) y 22 provenientes de Nicaragua (nicaragüense), pero comercializadas en El Salvador. La distribución de las muestras, según período de colecta y origen del queso, fue de la siguiente manera: julio-agosto de 2018 (20 local, 6 nicaragüense), noviembre-diciembre de 2018 (22 local, 4 nicaragüense), febrero-marzo de 2019 (19 local, 7 nicaragüense) y junio-julio de 2019 (21 local, 5 nicaragüense).

## **2.2 Reactivos, kits ELISA y equipamiento**

Los químicos usados en el procedimiento para la extracción de la AFM<sub>1</sub> de las muestras de queso fueron de grado reactivo para análisis. El diclorometano, metanol y n-hexano fueron comprados de Merck KGaA (Darmstadt, Alemania), el acetonitrilo grado HPLC fue suplido por Avantor™ (Ecatepec de Morelos, México). Los kits VERATOX para cuantificación de la AFM<sub>1</sub> (100% reactividad cruzada para AFM<sub>1</sub>, <1% para AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> y AFG<sub>2</sub>) fueron comprados a NEOGEN® Corporation (Lansing, Michigan, USA), el estándar de referencia de la AFM<sub>1</sub> en acetonitrilo (1 µg/ml), utilizado para el procedimiento de sobrecarga de muestras de queso, fue obtenido de Trilogy Analytical Laboratory (Missouri, USA).

La homogeneización de las muestras se hizo con un procesador de alimentos NutriBullet® serie 600 (Homeland Housewares, LLC, California, USA). En la extracción de la AFM<sub>1</sub> de las muestras homogeneizadas se utilizaron el vortex Genie 2 (Daigger Scientific, Illinois, USA), el baño ultrasónico MH5800 (Branson Ultrasonics Corporation, Connecticut, USA), el agitador de microplacas ELISA CPS-350 (Jeio Tech, Massachusetts, USA), Centrifuga Refrigerada Z366 K (HERMLE Labortechnik GmbH, Wehingen, Alemania). Para el secado de los extractos se utilizó una Dry Bath Incubator (Daigger Scientific, Illinois, USA), una bomba de Aire Luft Pump (CORALIFE®, Wisconsin, USA) y la cámara de extracción de flujo laminar Biobase model FH 1200 (Biobase®, Jinan, China). Para el procedimiento tanto de validación del método analítico como de cuantificación de la AFM<sub>1</sub> se utilizaron los lectores de microplacas ELISA HTI Immunochem-2100 (High Technology Inc., Massachusetts, USA) y MR-96A (Mindray Bio-Medical Electronics Co., Ltd, Shenzhen,

China), así como el lavador de microplacas MW-12A (Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Ltd, Shenzhen, China).

### **2.3 Preparación de las muestras y extracción de AFM<sub>1</sub>**

Cada muestra de 1 kg de queso duro blando se homogeneizó utilizando un procesador de alimentos de 600 watts de potencia. Para la extracción, dos gramos de la muestra de queso y 10 ml de diclorometano fueron añadidos a un tubo de 50 ml y agitados con vortex por 1 minuto a temperatura ambiente. Para facilitar el proceso de extracción, los tubos se colocaron en un baño ultrasónico con frecuencia de 40 kHz durante 10 minutos a temperatura ambiente, seguida por una agitación rotatoria por 15 minutos, posteriormente se incubaron a 50 °C por 30 minutos y se centrifugaron a 3500 rpm por 15 minutos a 10 °C. Cinco mililitros del extracto sobrenadante y evaporado a 60 °C utilizando corriente de aire y un hot plate dentro de una cámara de extracción. El residuo oleoso fue disuelto nuevamente en 0.5 ml de metanol, 0.5 ml de agua destilada y 4 ml de 100% hexanos, agitados con vortex por 1 y centrifugado a 3500 rpm por 10 minutos a 10°C. La capa superior de hexano sobrenadante fue removida completamente y se extrajo una alícuota de 0.5 ml de la capa inferior de la mezcla metanol-agua, vertiéndola en un tubo, añadiendo 2 ml del diluyente de la muestra incluido en el kit VERATOX para AFM<sub>1</sub> y agitando con vortex por 1 minuto. Una alícuota de 100 µl de esta dilución fue ensayado directamente con el kit de ELISA.

## **2.4 Análisis de AFM<sub>1</sub> en muestras por ELISA competitivo**

La concentración de AFM<sub>1</sub> se determinó en las muestras de queso utilizando el kit VERATOX para AFM<sub>1</sub> con un rango de cuantificación entre 0.005 y 0.100 µg/kg, según las especificaciones del fabricante [32]. Todos los reactivos se aclimataron a temperatura ambiente ( $24 \pm 2$  °C) previo a su uso.

Doscientos cincuenta µl de las soluciones estándar de AFM<sub>1</sub> (0, 0.005, 0.015, 0.030, 0.060 y 0.100 µg/kg) e igual volumen de muestras fueron colocados en pocillos de mezcla coloreados de rojo, después se transfirieron 100 µl de controles y muestras de los pocillos rojos a otros recubiertos con anticuerpos por duplicado, y se agitaron a 600 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente ( $24 \pm 2$  °C). Posteriormente, los pocillos con anticuerpos se enjuagaron cinco veces con el buffer de lavado incluido en el kit, se drenaron bien, se le añadió a cada uno 100 µl del conjugado y se agitaron nuevamente a 600 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente ( $24 \pm 2$  °C). Los pocillos volvieron a enjuagarse cinco veces con el buffer de lavado, se drenaron, se les añadió 100 µl de sustrato/cromógeno y volvieron a ser agitados a 600 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente ( $24 \pm 2$  °C). Se descartó el sustrato sobrante de los pocillos, se lavaron de nuevo, se les añadió 100 µl de solución stop y se agitaron manualmente. Las mediciones se realizaron a 650 nm, antes de transcurrir 20 minutos después de añadir la solución stop [32].

## **2.5 Validación del Método Analítico**

La validación del método analítico se hizo aplicando dos criterios de evaluación, la recuperación media y la precisión intermedia. El procedimiento para evaluar la recuperación media consistió en sobrecargar muestras de queso duro con patrones de AFM<sub>1</sub> en



concentraciones conocidas, previo a su análisis [33]. La extracción de la toxina y su cuantificación se hizo de la misma forma descrita para las muestras de queso, excepto que fueron sobrecargadas con soluciones de AFM<sub>1</sub> a concentraciones de 0.050, 0.100, 0.200, 0.300, 0.400, 0.500 y 0.600 µg/kg, de forma similar a otras validaciones realizadas [2, 4, 18] (Apéndice 1). La sobrecarga de AFM<sub>1</sub> se llevó a cabo por cuadruplicado para cada nivel y los análisis se realizaron con el mismo método, el mismo tipo de queso, los mismos instrumentos y kits reactivos, pero con diferentes analistas durante cinco días seguidos, según lo especificado para evaluar la precisión inter-ensayo [2, 33].

La recuperación porcentual% fue calculada dividiendo el contenido medido de una muestra entre la concentración de sobrecarga y el cociente resultante se multiplica por 100, por tanto, la recuperación media % es el promedio simple del conjunto de valores de recuperación obtenidos por día y por concentración de sobrecarga [33]. El rango aceptable para valores de recuperación media % de un analito en concentraciones iguales o inferiores a 1 µg/kg es de 40 a 120%, según lo establecido por AOAC International [33].

Para evaluar la precisión intermedia o inter-ensayo, se calculó el coeficiente de variación de la recuperación media (%RSD) de muestras sobrecargadas, utilizando la ecuación de Horwitz y complementariamente la Horwitz Ratio (HORRAT) para efectos comparativos [33, 34]. Bajo condiciones de reproducibilidad intra-laboratorio, los valores de la %RSD para un analito en concentraciones iguales o inferiores a 1 µg/kg no deben ser mayores al 30%, umbral establecido por AOAC International [33], mientras que los valores de la HORRAT deben estar entre 0.3 y 1.3 [34].

## **2.6 Niveles Máximos para Aflatoxina M<sub>1</sub>**

En las regulaciones del estándar de calidad de los quesos duros no madurados, tanto de El Salvador como de Nicaragua, no se especifican límites máximos permisibles para AFM<sub>1</sub> [35, 36] por esa razón se adoptó en este trabajo el nivel máximo de 0.050 µg/kg recomendado por la Comunidad Europea que lo aplica tanto para leche líquida como para los lácteos tomando en consideración el efecto de concentración de esa micotoxina causada por el secado o el procesamiento de la leche (12, 26). La adopción de ese límite se basa en la aplicación del principio ALARA: “Tan bajo como sea razonablemente alcanzable”, considerando que la AFM<sub>1</sub> es un cancerígeno genotóxico y que la exposición a cualquier nivel pone a los consumidores en riesgo de sufrir cáncer (12). Es mandatorio aclarar que otros niveles máximos permitidos para la AFM<sub>1</sub> en quesos han sido establecidos por iniciativa propia en cinco países europeos, debido a la falta de un límite de consenso legalmente establecido por la EU (2, 22, 26); de esa manera se promueve un balance práctico entre la necesidad de controlar el contenido máximo permisible de AFM<sub>1</sub> y anticipar las consecuencias económicas de establecer un límite regulatorio demasiado estricto para la comercialización de los lácteos (5, 16).

## **2.7 Parámetros Meteorológicos**

Para establecer la asociación entre los contenidos promedio de AFM<sub>1</sub> en quesos de origen salvadoreño como nicaragüense con algunos parámetros meteorológicos, los promedios de lluvia acumulada mensual (mm), de temperatura (°C) y de humedad relativa del aire (%) fueron obtenidos de los reportes generados por el Observatorio Ambiental del Ministerio de Medio Ambiente de El Salvador y por la Dirección General de Meteorología del Instituto Nicaragüense de Estudios Territoriales, disponibles en los websites

<https://www.ineter.gob.ni/met.html> y <http://www.marn.gob.sv/informes-sequia-meteorologica/>. Los datos de los parámetros previamente indicados para El Salvador se tomaron de 18 estaciones distribuidas en todo el territorio, mientras que las medidas que corresponden a Nicaragua fueron tomadas de las estaciones ubicadas en la Zona del Pacífico Occidental y la Región Norte, territorios fronterizos con El Salvador y Honduras, donde hay explotación ganadera, se acopia y procesa leche para producir los quesos que se exportan a El Salvador (30).

## **2.8 Análisis Estadístico**

La significación estadística para diferencias entre los valores de las prevalencias se determinó a través de Chi Square test, y para los promedios se utilizó Student t test, estableciendo para ambas pruebas una significación de ( $p < 0.05$ ). En el caso de la prueba para medias, se aplicó previamente la prueba de Levene para comprobar homogeneidad de las varianzas. Para establecer la asociación entre variables, se calculó el coeficiente  $r$  de Pearson. La aplicación de las pruebas y la generación de las figuras se hizo con el programa IBM SPSS Statistics v.24 para Windows.

## **3. Resultados**

### **3.1 Método de validación de parámetros para determinar AFM<sub>1</sub> en pool de muestras de queso duro blando**

Los valores de la recuperación media y de la precisión inter-ensayo como parámetros de validación del método para analizar la AFM<sub>1</sub>, se presentan en la Tabla 1. El valor de la recuperación promedio para la sobrecarga de 0.050  $\mu\text{g}/\text{kg}$  obtenida durante los cinco días del ensayo, fue de 178.54%, excediendo el límite superior de rango de recuperación aceptable establecido entre 40% y 120%; es de notar que la sobrecarga de 0.050  $\mu\text{g}/\text{kg}$  coincide con las

concentraciones de la AFM<sub>1</sub> encontradas en las muestras de queso analizadas durante el monitoreo. La recuperación promedio para las sobrecargas mayores que 0.050 µg/kg, obtenidas durante los cinco días del ensayo, se ajustaron mejor al rango establecido, en el caso del sustituto de 0.100 µg/kg (123.89%) excedió ligeramente el límite superior de 120%, mientras que los cinco niveles restantes de sobrecarga no sobrepasaron la recuperación promedio de 99%. Los valores de recuperación media no variaron significativamente entre los cinco días que duró el ensayo de validación ni entre las concentraciones de sobrecarga ( $F = 1.804, 139 \text{ df}, p = 0.132$ ).

Respecto al coeficiente de variación bajo condiciones de reproducibilidad (%RSD), presentó un rango de valores promedio desde 17.84 a 23.07, indistintamente de las seis concentraciones de sobrecarga utilizadas, por lo que no superó el valor límite o umbral de 30% para contenidos iguales o inferiores a 1.0 µg/kg. La HORRAT, otro parámetro de la precisión inter-ensayo, presentó un rango de valores desde 0.92 a 1.04 (Tabla 1), ajustándose a los límites establecidos entre 0.3 y 1.3; los valores de la HORRAT tampoco variaron significativamente entre los cinco días que duró el ensayo de validación ni entre las concentraciones de sobrecarga ( $F = 1.952, 139 \text{ df}, p = 0.105$ ).

Tabla 1. Parámetros de la precisión del método para análisis de Aflatoxina M<sub>1</sub> en muestras sobrecargadas de queso duro blando.

Precisión															
Nivel de sobrecarga $\mu\text{g}/\text{kg}$	Día 1 (n=4 por nivel)		Día 2 (n=4 por nivel)		Día 3 (n=4 por nivel)		Día 4 (n=4 por nivel)		Día 5 (n=4 por nivel)		Precisión promedio		Precisión esperada	Valores aceptables de precisión	
	Recuperación media (%)	RSD (%)	Recuperación media (%)	RSD (%)	Recuperación media (%)	RSD (%)	Recuperación media (%)	RSD (%)	Recuperación media (%)	RSD (%)	Recuperación media (%)	RSD (%) <sup>1</sup>	PRSD (%)	HORRAT	Valor de referencia
0.050	147.15	23.71	215.10	22.38	191.75	22.78	191.00	22.79	147.70	23.69	178.54	23.07	25.12	0.92	
0.100	112.73	22.23	129.95	21.76	140.75	21.49	140.73	21.49	95.30	22.79	123.89	21.95	22.63	0.97	
0.200	89.84	20.74	84.98	20.92	93.29	20.61	93.91	20.59	112.90	20.04	94.98	20.58	20.39	1.01	
0.300	75.45	20.01	113.53	18.82	80.28	19.82	80.27	19.82	101.21	19.14	90.15	19.52	19.18	1.02	0.3 a 1.3
0.400	119.30	17.88	85.47	18.81	83.71	18.86	83.87	18.86	82.99	18.89	91.07	18.66	18.37	1.02	
0.500	119.33	17.30	112.04	17.46	84.93	18.20	84.01	18.23	90.87	18.02	98.23	17.84	17.76	1.00	
0.600	44.54	19.52	121.29	16.78	89.62	17.57	89.47	17.57	70.97	18.19	83.18	17.93	17.28	1.04	

<sup>1</sup>Para ser aceptables, los valores de recuperación porcentual promedio deben estar en el rango del 40% al 120%, y la precisión o RSD% debe ser menor a 45.3, según el criterio de Horwitz, y menor a 30.0 según el valor indicado por la AOAC International [34]

### **3.2 Prevalencia estacional de AFM<sub>1</sub> en quesos duro blando salvadoreños y nicaragienses**

La prevalencia de AFM<sub>1</sub> en quesos de origen local y los parámetros meteorológicos predominantes, se presentan en la Tabla 2. Durante el período de julio a agosto de 2018, el 5.0% de las muestras de quesos locales fue negativo a la AFM<sub>1</sub>, el 55.0% se encontró en el rango de 0.005 a 0.050 µg/kg y el 40.0% superó los 0.050 µg/kg; a este período muestreado le caracterizó haber sufrido una sequía severa de 34 días consecutivos sin lluvia, no obstante, tuvo una precipitación acumulada de 205.8 mm, temperatura promedio de 25.7 °C y humedad relativa de 77.8%. Entre noviembre y diciembre de 2018, todas las muestras fueron positivas a la AFM<sub>1</sub>, presentando la prevalencia más alta de casos con niveles entre los 0.005 y 0.050 µg/kg durante todo el año monitoreado (77.3%), en tanto que la proporción de muestras que sobrepasaron los 0.050 µg/kg fue de 22.7%; este período experimentó una alta precipitación acumulada (234.3 mm), temperatura promedio de 25.0 y humedad relativa de 80.4%.

Entre febrero y marzo de 2019, se presentó el 5.2% de muestras negativas, el 47.4% de casos con niveles entre los 0.005 y 0.050 µg/kg, y la prevalencia más alta de muestras que sobrepasaron los 0.050 µg/kg durante el año muestreado (47.4%); la temporada en cuestión tuvo la menor precipitación acumulada promedio de los cuatro trimestres muestreados (3.6 mm), una temperatura de 26.6 °C y la humedad relativa más baja del período muestreado (63.9%). El período entre junio y julio de 2019 tuvo la prevalencia significativamente más alta de muestras negativas a la AFM<sub>1</sub> (19.0%,  $\chi^2 = 15.71$ , 5 df,  $p < 0.05$ ), el 52.4% de casos con niveles entre los 0.005 y 0.050 µg/kg y el 28.6% de muestras que sobrepasaron el nivel de 0.050 µg/kg; este período muestreado tuvo una sequía leve de 7 días consecutivos sin

lluvia, con una precipitación acumulada de 231.8 mm, temperatura promedio de 27.5 °C y humedad relativa del 76.5%.

La variación estacional de las prevalencias de contaminación por AFM<sub>1</sub> en quesos nicaragüenses, así como los parámetros meteorológicos, se muestran en la Tabla 3. Entre julio y agosto de 2018, el 0.0% de las muestras de quesos nicaragüenses fue negativo a la AFM<sub>1</sub>, mientras que el 83.3% se encontraron con niveles entre los 0.005 y 0.050 µg/kg y solo el 16.7% sobrepasó los 0.050 µg/kg; este período muestreado tuvo una precipitación acumulada de 118.6 mm, temperatura promedio de 25.8 °C y humedad relativa de 72.5%. De noviembre a diciembre de 2018, el 0.0% de las muestras resultaron negativas a la AFM<sub>1</sub>, presentó también la prevalencia significativamente más alta de casos con niveles entre los 0.005 y 0.050 µg/kg durante todo el año monitoreado 100%, con ninguna muestra que sobrepasara el límite de 0.050 µg/kg (0%); este período experimentó la mayor precipitación acumulada del año (239.7 mm), temperatura promedio de 25.4 y humedad relativa de 82.3%.

Entre febrero y marzo de 2019, se determinó el 0.0% de muestras negativas, el 42.9.0% de casos con niveles entre 0.005 y 0.050 µg/kg, y con una prevalencia de 57.1% que sobrepasó el límite de 0.050 µg/kg; la temporada en cuestión tuvo la menor precipitación acumulada del año (4.5 mm), temperatura de 25.9 °C y humedad relativa promedio de 64.8%. El período entre junio y julio de 2019 tuvo 0% de muestras por debajo de <0.005 µg/kg, una amplia mayoría de 80.0% entre 0.005 y 0.050 µg/kg y tan solo un 20% sobrepasó el límite establecido, este período muestreado tuvo una precipitación acumulada de 153.3 mm, temperatura promedio de 27.1 °C y humedad relativa de 75.7%.

Tabla 2. Prevalencia de AFM<sub>1</sub> en queso duro blando salvadoreño, comercializado en puestos minoristas de la ciudad de San Miguel. Julio de 2018 a julio de 2019.

Clasificación basada en los niveles de AFM <sub>1</sub>	Meses muestreados por año			
	Julio a agosto, 2018	Noviembre a diciembre, 2018	Febrero a marzo, 2019	Junio a julio, 2019
< 0.005 µg/kg (< LDC)	1 (5.0%)	0 (0.0%)	1 (5.2%)	4 (19.0%)
0.005 – 0.050 µg/kg	11 (55.0%)	17 (77.3%)	9 (47.4%)	11 (52.4%)
> 0.050 µg/kg	8 (40.0%)	5 (22.7%)	9 (47.4%)	6 (28.6%)
<b>Rango de contenidos (µg/kg)</b>	0.000 a 0.092	0.005 a 0.072	0.000 a 0.485	0.000 a 0.279
<b>Tamaño de la muestra</b>	20	22	19	21

< LDC: Debajo del límite de cuantificación de la prueba.  
Muestras tomadas de queso de origen salvadoreño: 82.

Tabla 3. Prevalencia de AFM<sub>1</sub> en queso duro blando nicaragüense, comercializado en puestos minoristas de la ciudad de San Miguel. Julio de 2018 a julio de 2019.

Clasificación basada en los niveles de AFM <sub>1</sub>	Meses muestreados por año			
	Julio a agosto, 2018	Noviembre a diciembre, 2018	Febrero a marzo, 2019	Junio a julio, 2019
< 0.005 µg/kg (< LDC)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
0.005 – 0.050 µg/kg	5 (83.3%)	4 (100%)	3 (42.9%)	4 (80.0%)
> 0.050 µg/kg	1 (16.7%)	0 (0.0%)	4 (57.1%)	1 (20.0%)
<b>Rango de contenidos (µg/kg)</b>	0.028 a 0.051	0.031 a 0.044	0.028 a 0.184	0.006 a 0.070
<b>Tamaño de la muestra</b>	6	4	7	5

< LDC: Debajo del límite de cuantificación de la prueba.  
Muestras tomadas de queso de origen nicaragüense: 22.



### **3.3 Variación estacional del contenido de AFM<sub>1</sub> en queso duro blando salvadoreño y nicaragüense.**

Los niveles de AFM<sub>1</sub> en muestras de queso duro blando salvadoreño, obtenidas durante los cuatro trimestres monitoreados se presentan en la Figura 1. Se encontraron diferencias significativas entre los contenidos promedio de julio a agosto de 2018 ( $0.045 \pm 0.003 \mu\text{g/kg}$ ) y de febrero a marzo de 2019 ( $0.107 \pm 0.015 \mu\text{g/kg}$ ), coincidiendo parcialmente con la tendencia mostrada por las prevalencias de casos de contaminación por AFM<sub>1</sub> en muestras colectadas en los mismos períodos, especialmente aquellas que exceden los  $0.050 \mu\text{g/kg}$  (Tabla 2). Adicionalmente, los contenidos promedio de AFM<sub>1</sub> en muestras de queso duro blando tienen una baja pero significativa asociación con los valores de precipitación acumulada promedio (Pearson  $r = -0.197$ ,  $p < 0.05$ ,  $n = 152$ ) y con la humedad relativa (Pearson  $r = -0.225$ ,  $p < 0.01$ ,  $n = 152$ ), registrados durante los cuatro trimestres monitoreados.

Los niveles de AFM<sub>1</sub> en muestras de queso duro blando provenientes de Nicaragua, obtenidas durante los cuatro trimestres monitoreados se presentan en la Figura 2. Se encontraron diferencias significativas entre los contenidos promedio de febrero a marzo de 2019 ( $0.080 \pm 0.007 \mu\text{g/kg}$ ) con los de julio a agosto de 2018 ( $0.039 \pm 0.006 \mu\text{g/kg}$ ), con los niveles de noviembre a diciembre de 2018 ( $0.039 \pm 0.003 \mu\text{g/kg}$ ) y con aquellos obtenidos en junio y julio de 2019 ( $0.030 \pm 0.010 \mu\text{g/kg}$ ). Las diferencias significativas encontradas en los contenidos de AFM<sub>1</sub> coinciden con la tendencia mostrada por las prevalencias de muestras contaminadas por esa micotoxina, que exceden el límite de  $0.050 \mu\text{g/kg}$  y que fueron colectadas en los mismos períodos (Tabla 3). Adicionalmente, la variación en los contenidos promedio de AFM<sub>1</sub> en muestras de queso duro blando presentan una baja pero

significativa asociación con los valores de precipitación acumulada promedio (Pearson  $r = -0.266$ ,  $p < 0.010$ ,  $n = 160$ ) y con la humedad relativa porcentual (Pearson  $r = -0.264$ ,  $p < 0.010$ ,  $n = 160$ ), registrados durante el período del monitoreo.

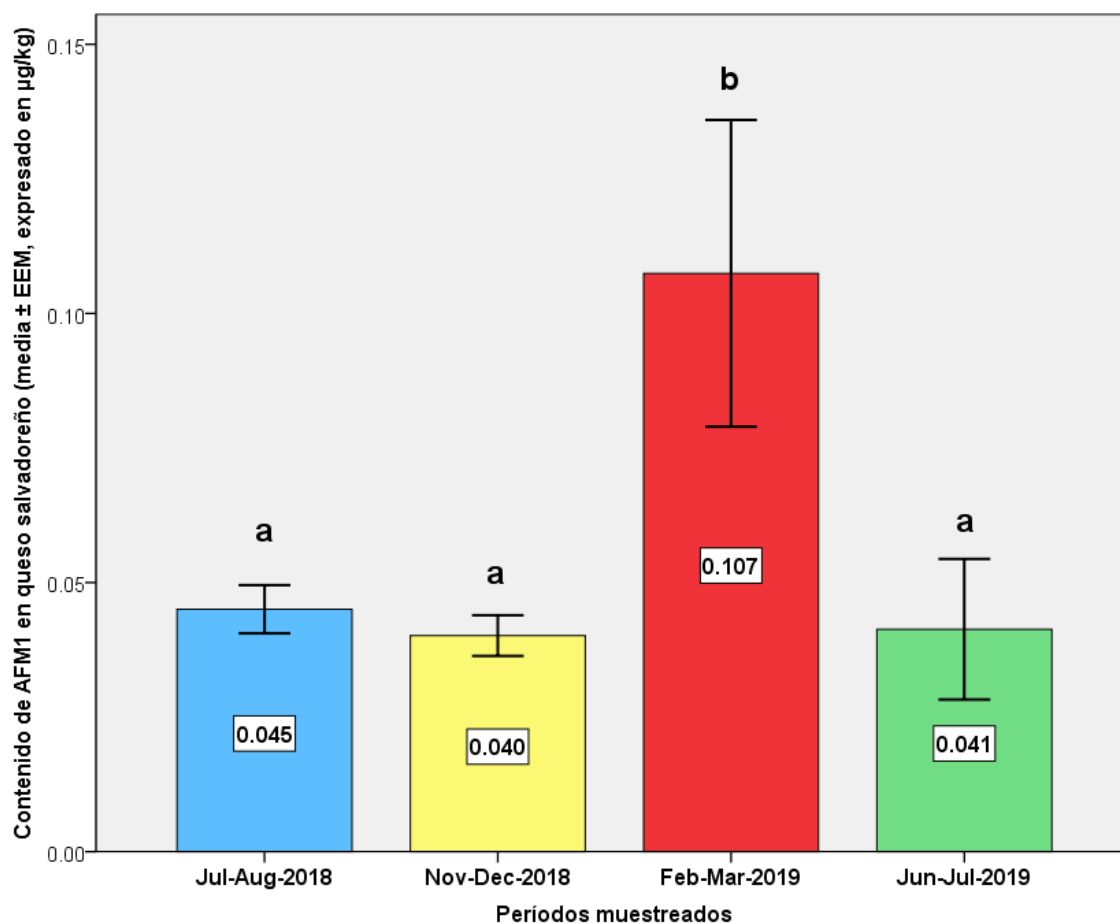


Figura 1. Variación de los contenidos medios de AFM<sub>1</sub> en muestras de queso duro blando elaborado localmente y comercializado en puestos minoristas de la ciudad de San Miguel, según meses y año de colecta. Los números dentro de las barras de colores representan el contenido promedio y las barras “I” indican  $\pm 1$  error estándar de la media ( $n=82$ ). Las barras con superíndices distintos difieren significativamente entre un período y otro ( $p < 0.05$ , Student t test).

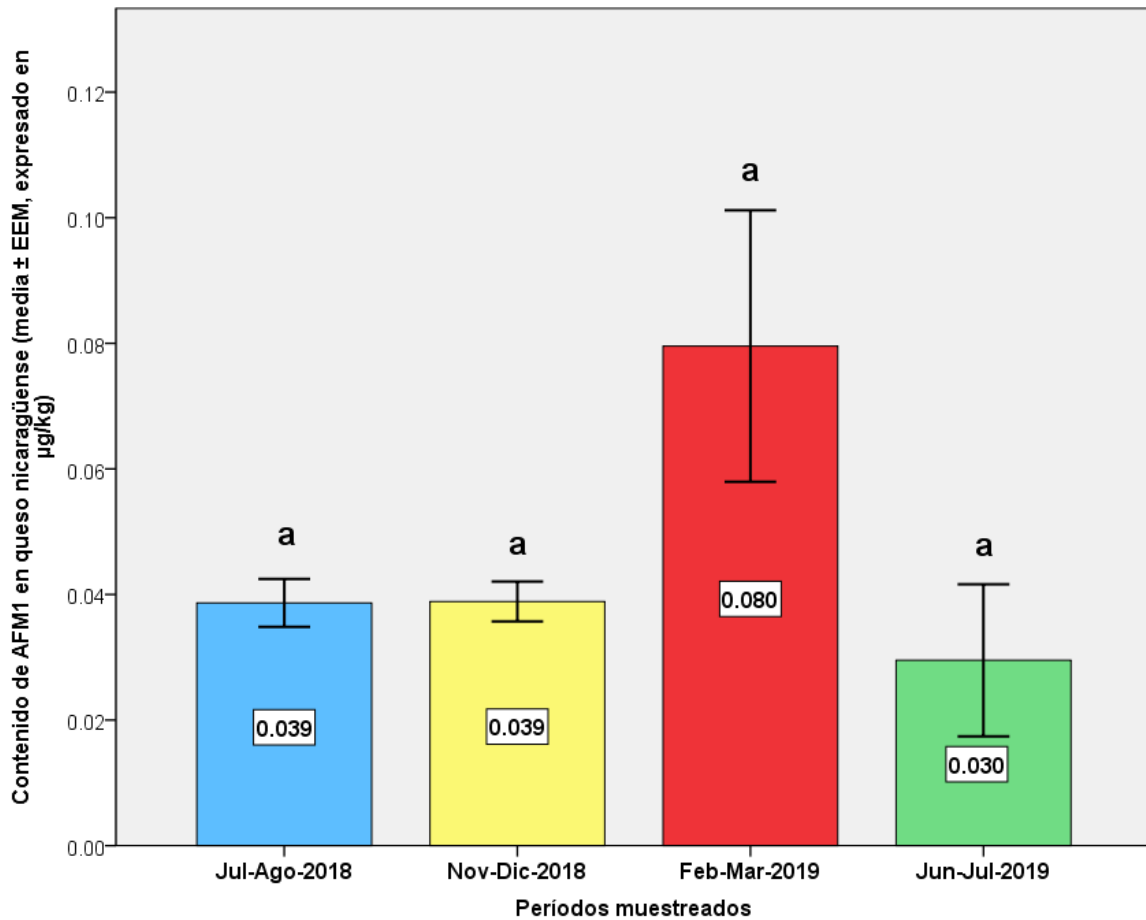


Figura 2. Variación de los contenidos medios de AFM<sub>1</sub> en muestras de queso duro blando elaborado en Nicaragua y comercializado en puestos minoristas de la ciudad de San Miguel, según meses y año de colecta. Los números dentro de las barras de colores representan el contenido promedio y las barras “I” indican  $\pm 1$  error estándar de la media (n=22). Las barras con superíndices distintos difieren significativamente entre un período y otro ( $p < 0.05$ , Student t test).

#### 4. Discusión

Según los resultados obtenidos en la validación del método analítico, los promedios de recuperación para las sobrecargas iguales y mayores a 0.100 µg/kg, se ubican entre 83 y 123%, coincidiendo con el rango de 40 a 120%, considerados como valores aceptables de

recuperación media para concentraciones iguales o inferiores a 1 µg/kg, especificado para ese parámetro de validación [33] y que son similares a los resultados obtenidos en otros ensayos de recuperación de esa micotoxina en quesos [4, 20, 25].

Respecto a la precisión inter-ensayo, ninguno de las mediciones tanto de recuperación promedio ni de la %RSD variaron significativamente entre los cinco días que duró el ensayo, además el rango de valores de %RSD (17 a 23%) obtenidos en este trabajo no sobrepasan los umbrales establecidos por la Comisión del Codex Alimentarius (45.3%) o por la AOAC International (30%) [33]. Por otra parte, el rango de los promedios de la HORRAT calculados en el ensayo de cinco días, varió entre 0.92 y 1.04 cumplen con los valores aceptados para condiciones de repetibilidad intra-laboratorio (0.3 a 1.3) [34].

En términos generales, la mayoría de muestras de queso duro blando tanto salvadoreño como nicaragüense resultaron positivas a la AFM<sub>1</sub> ( $\geq 92.7\%$  y  $\geq 100\%$ , respectivamente), detectando la mayor prevalencia de casos que excedieron el límite de 0.050 µg/kg en los meses de febrero y marzo de 2019 (47.4% y 57.1%, respectivamente), período que corresponde a la época seca, caracterizado por mínima precipitación acumulada y menor humedad relativa porcentual, mientras que los menores valores de prevalencia (0% y 0%, respectivamente) ocurrieron en noviembre y diciembre de 2018, meses que corresponden a la época transicional lluviosa-seca, tipificados por alta precipitación acumulada y promedios altos de humedad relativa porcentual.

Los períodos comprendidos entre julio y agosto de 2018 y entre junio y julio de 2019, presentaron prevalencias de muestras que sobrepasan el límite de 0.050 µg/kg de 40.0% y 28.6% respectivamente para quesos salvadoreños, y de 16.7% y 20.0% respectivamente para quesos nicaragüenses, coincidiendo ambos períodos con la época lluviosa.

Respecto a las fluctuaciones descritas en las prevalencias de contaminación del queso duro blando de ambos orígenes, varios estudios aportan evidencia acerca de la variación estacional de la AFM<sub>1</sub> en leche y sus derivados [18, 23, 24, 26, 38]; sin embargo, se ha descrito que eventos o condiciones prolongadas de escasez de lluvia o de sequía y de altas temperaturas están asociadas a alzas en la contaminación por AFM<sub>1</sub> en productos lácteos o en su materia prima [2, 3, 5, 23, 39], precisamente porque las alzas en la temperatura y la disminución de la precipitación pluvial promueven condiciones para el crecimiento de hongos aflatoxicogénicos en cereales como el maíz [8, 9, 40, 41], la principal fuente de carbohidratos para la elaboración de concentrado para el ganado [3, 40, 42, 43], por consiguiente, el consumo de alimento contaminado causará el aumento temporal de la AFM<sub>1</sub> en la leche y sus derivados [2, 5, 16]. El entramado anterior explicaría el alza en la prevalencia de muestras de queso salvadoreño y nicaragüense con niveles de AFM<sub>1</sub> que exceden el nivel de 0.050 µg/kg durante los meses de la época seca, precisamente cuando se recurre más al uso de alimentos suplementarios ante la escasez de pasto para todo el ganado, especialmente el lactante.

Indistintamente de la época del año muestreado, los valores de prevalencia de AFM<sub>1</sub> son elevados tanto en quesos salvadoreños (92.7%) como en nicaragüenses (100%), lo que indica que ambos países son endémicos para la contaminación de los lácteos por esa micotoxina. Por otra parte, la proporción de quesos positivos a la AFM<sub>1</sub> de ambos orígenes, reportada, es similar o más alta que los valores informados en la mayoría de otros estudios presentados en la Tabla 4, exceptuando aquellos de Italia y Argentina por tratarse de estudios realizados para estimar el efecto incremental de la concentración de la toxina en la elaboración del queso o del proceso de transferencia de las Aflatoxinas en el alimento del ganado al queso [2, 21].

Tabla 4. Prevalencias y niveles de AFM<sub>1</sub> en quesos, por año del informe, país de procedencia y estación climática.

Año y localidad	No. muestras	Prevalencia y estación	Contenidos (rango y/o promedio $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Referencia
1996, España	9	55.5%, no determinado	0.020 a 0.130, 0.074	15
2004, Libia	20	75%, verano	0.110 a 0.520, $0.290 \pm 0.160$	47
2009, Italia	25	100%, de finales de otoño a inicios de invierno	0.111 a 0.413, $0.246 \pm 0.095$	2
2010, Turquía	304	71.1%, de otoño de 2006 a finales de verano de 2007	0.051 a 0.860, $0.263 \pm 0.198$	1
2011, Irán	75	Total de las cuatro estaciones: 65.3%,	Primavera, $0.162 \pm 0.024$ Verano, $0.051 \pm 0.015$ Otoño, $0.053 \pm 0.018$ Invierno, $0.083 \pm 0.020$	18
2012, Irán	50	80%, invierno de 2008 40%, verano de 2009	$0.055$ a $0.374$ , $0.083 \pm 0.079$ $0.041$ a $0.215$ , $0.024 \pm 0.025$	19
2013, Irán	823	40 a 86.6%, no determinado	No disponible	49
2014, Irán	20	No determinado	Primavera, no detectado Verano, $0.031 \pm 0.005$ Otoño, $0.047 \pm 0.006$ Invierno, $0.119 \pm 0.070$	25
2014, Turquía	40	50%, no determinado	$0.050$ a $0.700$ , $0.130$	46
2015, Serbia	10	100%, finales de primavera e inicios de verano	$0.13$ a $0.22$ , $0.64$	16
2016, Turquía	100	52%, otoño	$0.106$ a $0.702$ , $0.211$	17
2017, Irán	180	57.8%, invierno 50.0, verano	$0.153 \pm 0.0003$ $0.121 \pm 0.0023$	4
2017, Irán	100	52%, invierno	$0.052$ a $0.424$ , $0.169 \pm 0.032$	48
2018, Italia	40	27.5%, invierno, primavera e inicios de verano	$0.039$ a $0.096$	44
2019, Argentina	36	100%, invierno	$0.084$	21

En términos generales, durante los meses de febrero y marzo de 2019 se encontraron los niveles promedios de AFM<sub>1</sub> significativamente más altos, tanto en quesos de origen salvadoreño ( $0.107 \pm 0.007 \mu\text{g/kg}$ ) como nicaragüenses ( $0.080 \pm 0.005 \mu\text{g/kg}$ ), coincidiendo con los promedios más bajos tanto de precipitación acumulada ( $< 5 \text{ mm}$ ) como de humedad relativa ( $< 65\%$ ) para esa zona del Istmo Centroamericano; mientras que los contenidos promedio de AFM<sub>1</sub> significativamente más bajos se detectaron entre noviembre y diciembre de 2018 para los quesos salvadoreños, y entre junio y julio de 2019 para los lácteos nicaragüenses, en ambos casos coincidiendo con promedios relativamente altos de precipitación acumulada ( $> 118 \text{ mm}$ ) y con valores de humedad relativa promedio que no exceden el 80%.

El alza en los contenidos promedio de AFM<sub>1</sub> en quesos salvadoreños y nicaragüenses durante la época del año con menor cantidad de lluvia acumulada coincide no solo con las mayores prevalencias de contaminación por esa micotoxina sino con las evidencias que indican que la escasez o ausencia de lluvia está asociada al aumento de la contaminación por AFM<sub>1</sub> en leche y sus derivados [5, 23, 39].

Indistintamente de la época del año muestreada, los rangos y los promedios de los niveles de AFM<sub>1</sub> tanto en quesos salvadoreños como nicaragüenses, presentados en este trabajo, son menores que los valores obtenidos en la mayoría de estudios mostrados en la Tabla 4, pero similares a los reportados en España, Irán, Italia y Argentina [15, 19, 21, 25, 44]. En todo caso, aunque El Salvador y Nicaragua son endémicos para la contaminación del queso por la AFM<sub>1</sub>, en otras regiones geográficas se reportan niveles sustancialmente más elevados de esta micotoxina, por ejemplo, algunos países del medio oriente.

La comprensión de esa fluctuación estacional y de la alta prevalencia de la AFM<sub>1</sub> en los quesos puede dar la base para seleccionar la mejor época y las prácticas de los cultivos que sirven

para la elaboración de los alimentos para el ganado, previniendo así su contaminación por hongos toxicogénicos y, en consecuencia, la transferencia de la AFM<sub>1</sub> a los productos lácteos. Es necesario también abordar en próximos estudios la estimación del riesgo que representa para los salvadoreños de todas las edades el consumo frecuente de productos contaminados por AFM<sub>1</sub>, como ha sido realizado en leche y en quesos [4, 45, 50].

## **5. Conclusiones**

El método para cuantificar la AFM<sub>1</sub> utilizado en este trabajo demostró tener una precisión adecuada por haber alcanzado valores aceptables de recuperación media y de reproducibilidad intermedia o precisión inter-ensayo.

Los elevados valores de prevalencia de la AFM<sub>1</sub> en los quesos de ambos orígenes indican que tanto El Salvador como Nicaragua son endémicos para la contaminación de los lácteos por esa micotoxina; no obstante, los contenidos promedio encontrados en este trabajo no sobrepasan a los reportados en otras zonas geográficas como Medio Oriente.

La prevalencia de casos que exceden el límite de 0.050 µg/kg y los contenidos promedio de AFM<sub>1</sub> en los quesos varían estacionalmente, alcanzando mediciones más altas durante la época con menores valores de precipitación pluvial y humedad relativa, mientras que las prevalencias más bajas se registraron durante la temporada con mayor cantidad de lluvia acumulada y mayor humedad relativa porcentual, indistintamente del país de origen de los lácteos. Esa variación estacional puede deberse a condiciones de escasez de lluvia que están asociadas al aumento de la contaminación de los lácteos por AFM<sub>1</sub>, precisamente porque promueven el crecimiento de hongos aflatoxicogénicos en las materias primas utilizadas para elaborar los concentrados para



ganado lechero, de esa forma, el consumo de alimento contaminado causará el aumento temporal de la AFM<sub>1</sub> en la leche y sus derivados.

Conocer la variación estacional de la AFM<sub>1</sub> en los lácteos permitirá tomar decisiones informadas en cuanto a la temporada y las prácticas que representen menos riesgo de contaminación por hongos toxicogénicos en los cultivos utilizados para la alimentación del ganado, previniendo así la contaminación por la AFM<sub>1</sub> y su transferencia a los lácteos.

## **6. Reconocimientos**

Los autores expresan su agradecimiento a los profesionales en Laboratorio Clínico: Lic. Mario Ernesto Pineda y Licda. Marta Rodríguez de Guzmán, por su valiosa cooperación con el procesamiento y los análisis de las muestras; y a Lic. Samuel Cano, Máster José Domingo, por su valioso apoyo con la logística para la recolección de las muestras; asimismo, agradecen al Ing. Mario Rivas, por su apreciada asistencia en el procesamiento y recolección de datos meteorológicos obtenidos de las bases de datos oficiales.

## **7. Financiamiento**

Este trabajo fue financiado completamente por la Universidad Dr. Andrés Bello, a través de fondos específicos para la investigación.

## 8. Referencias

1. M. Aydemir, G. Atasever, M. Adigüzel, M. Atasever, K. Özturan, Determination of aflatoxin M<sub>1</sub> levels in some cheese types consumed in Erzurum – Turkey, Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg. 16 (2010) S87-S91. <http://dx.doi.org/10.9775/kvfd.2009.1639>
2. A.C. Manetta, M. Giammarco, L. Di Giuseppe, I. Fusaro, A. Gramenzi, A. Formigoni, G. Vignola, L. Lambertini, Distribution of aflatoxin M<sub>1</sub> during Grana Padano cheese production from naturally contaminated milk, Food Chem. 113 (2009) 595-599. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.091>
3. R. Bahrami, Y. Shahbazi, Z. Nikousefat, Occurrence and seasonal variation of aflatoxin in dairy cow feed with estimation of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk from Iran, Food Agr. Immunol. 27 (2016) 388-400. <http://dx.doi.org/10.1080/09540105.2015.1109613>
4. Y. Shahbazi, Z. Nikousefat, N. Karami, Occurrence, seasonal variation and risk assessment of exposure to aflatoxin M<sub>1</sub> in Iranian traditional cheeses, Food Control 79 (2017) 356-362. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.04.021>
5. B. Udovicki, K. Audenaert, S. De Saeger, A. Rajkovic, Overview on the mycotoxins incidence in Serbia in the period 2004-2016, Toxins 10 (2018) 279. <https://doi.org/10.3390/toxins10070279>
6. IARC International Agency for Research on Cancer, Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene, IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. 82 (2002) 171-274, Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK326619>. Accesado 5 noviembre 2018.

7. A.A. Fallah, A. Barani, Z. Nasiri, Aflatoxin M1 in raw milk in Qazvin Province, Iran: a seasonal study, *Food Addit. Contam. Part B Surveill.* 8 (2015) 195–198. <https://doi.org/10.1080/19393210.2015.1046193>
8. N. Bilandžić, I. Varenina, B.S. Kolanović, Đ.B. Luburić, M. BeniĆ, L. Cvetnić, S. Tanković, Ž. Cvetnić, Monitoring of aflatoxin M1 in raw cow milk in Croatia during Winter 2015, *Mljekarstvo* 66 (2016) 81–85, Disponible en [https://hrcak.srce.hr/index.php?show=clanak&id\\_clanak\\_jezik=222333](https://hrcak.srce.hr/index.php?show=clanak&id_clanak_jezik=222333). Accesado 5 noviembre 2018.
9. A. Bellio, D.M. Bianchi, M. Gramaglia, A. Loria, D. Nucera, S. Gallina, M. Gili, L. Decastelli, Aflatoxin M1 in cow's milk: Method validation for milk sampled in Northern Italy, *Toxins* 8 (2016) 57. <https://doi.org/10.3390/toxins8030057>
10. P. Landeros, M. Noa, Y. López, D.G. González, E. Noa, M. Real, C. Juárez, M.S. Medina, Niveles de aflatoxina M1 en leche cruda y pasteurizada comercializada en la zona metropolitana de Guadalajara, México, *Rev. Salud Anim.* 34 (2012) 40–45, Disponible en [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0253570X2012000100006&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253570X2012000100006&lng=es&tlng=es) Accesado 6 noviembre 2018
11. M. Hashemi, A survey of aflatoxin M1 in cow milk in Southern Iran, *J. Food Drug Anal.* 24 (2016) 888-893. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.05.002>
12. Codex Alimentarius Commission, Comments submitted on the draft maximum level for Aflatoxin M<sub>1</sub> in milk, Agenda item 15a. CX/FAC 01/20, FAO, Rome, Italy, 2001, Disponible en [https://mafiadoc.com/codex-alimentarius-commission\\_5b0397998ead0e5e738b45fe.html](https://mafiadoc.com/codex-alimentarius-commission_5b0397998ead0e5e738b45fe.html). Accesado 6 noviembre 2018

13. G. Chavarría, F. Granados-Chinchilla, M. Alfaro-Cascante, A. Molina, Detection of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk, cheese, and sour cream samples from Costa Rica, using enzyme-assisted extraction and HPLC, *Food Addit. Contam. Part B Surveill.* 8 (2015) 128–135.  
<https://10.1080/19393210.2015.1015176>
14. S.S. Omar, Aflatoxin M<sub>1</sub> levels in raw milk, pasteurized and infant formula, *Ital. J. Food Saf.* 5 (2016) 3. <http://dx.doi.org/10.4081/ijfs.2016.5788>
15. M.J. Barrios, M.J. Gualda, J.M. Cabanas, L.M. Medina, R. Jordano, Occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in cheeses from the South of Spain, *J. Food Prot.* 59 (1996) 898-900.  
<http://dx.doi.org/10.4315/0362-028X-59.8.898>
16. B. Škrbić, I. Antić, J. Živančev, Presence of aflatoxin M<sub>1</sub> in white and hard cheese samples from Serbia, *Food Control* 50 (2015) 111-117.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.08.031>
17. E. Özgören, A.K. Seçkin, Aflatoxin M<sub>1</sub> contamination in mouldy cheese, *Mljekarstvo* 66 (2016) 154–159, doi: 10.15567/mljekarstvo.2016.0208, Disponible en [https://hrcak.srce.hr/index.php?show=clanak&id\\_clanak\\_jezik=228076](https://hrcak.srce.hr/index.php?show=clanak&id_clanak_jezik=228076). Accesado 5 noviembre 2018.
18. A.A. Fallah, M. Rahnama, T. Jafari, S.S. Saei-Dehkordi, Seasonal variation of aflatoxin M<sub>1</sub> contamination in industrial and traditional Iranian dairy products, *Food Control* 22 (2011) 1653-1656. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.03.024>
19. H.R. Tavakoli, M. Riazipour, A. Kamkar, H.R. Shaldehi, A.S. Mozaffari, Occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in white cheese samples from Tehran, Iran, *Food Control* (2012) 293-295.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.07.024>

20. M.H. Iha, C.B. Barbosa, I.A. Okada, M.W. Trucksess, Aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and distribution and stability of aflatoxin M<sub>1</sub> during production and storage of yoghurt and cheese, *Food Control* 29 (2013) 1-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.05.058>
21. D. Costamagna, M. Gaggiotti, C.A. Chiericatti, L. Costabel, G.M.L. Audero, M. Taverna, M.L. Signorini, *Tox. Rep.* 6 (2019) 782-787. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.07.004>
22. R. Rubio, C.C. Licón, M.I. Berruga, M.P. Molina, A. Molina, Occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in the Manchego cheese supply chain, *J. Dairy Sci.* 94 (2010) 2775-2778. DOI: 10.3168/jds.2010.4017, Disponible en [https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(11\)00265-7/fulltext](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(11)00265-7/fulltext) Accesado 6 noviembre 2018.
23. L.C.A. Picinin, M.M.O.P. Cerqueira, E.A. Vargas, A.M.Q. Lana, I.M. Toaldo, M.T. Bordignon-Luiz, Influence of climate conditions on aflatoxin M<sub>1</sub> contamination in raw milk from Minas Gerais State, Brazil, *Food Control* 31 (2013) 419-424. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.10.024>
24. R. Kazemi, M. Miri, Aflatoxin M<sub>1</sub> contamination in dairy products, *J. Sci. Today's World* 2 (2013) 500-514, Disponible en [https://www.researchgate.net/publication/236963843\\_Aflatoxin\\_M1\\_Contamination\\_in\\_Dairy\\_Products](https://www.researchgate.net/publication/236963843_Aflatoxin_M1_Contamination_in_Dairy_Products) Accesado 29 noviembre 2018.
25. A. Rahimirad, H. Malekinejad, A. Ostadi, S. Yeganeh, S. Fahimi, Aflatoxin M<sub>1</sub> concentration in various dairy products: Evidence for biologically reduced amount of AFM<sub>1</sub> in yoghurt, Iran. *J. Public Health* 43 (2014) 1139-1144, Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4411911/> Accesado 29 noviembre 2018.

26. T. A. Becker-Algeri, D. Castagnaro, K. de Bortoli, C. de Souza, D.A. Drunkler, E. Bardiale-Furlong, Mycotoxins in bovine milk and dairy products: A review, J. Food Sci. 81 (2016) R544-R552. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13204>
27. El Salvador Superintendencia de Competencia, Estudio sobre condiciones de competencia del sector de quesos en El Salvador, Intendencia de Estudios, San Salvador, El Salvador, 2010, Disponible en [https://www.sc.gob.sv/wp-content/uploads/estudios\\_IE/estudios\\_PDF/Estudio\\_Quesos.pdf](https://www.sc.gob.sv/wp-content/uploads/estudios_IE/estudios_PDF/Estudio_Quesos.pdf) Accesado 24 julio 2018.
28. El Salvador Ministerio de Agricultura y Ganadería, Anuario de estadísticas agropecuarias 2014-2015, Dirección General de Economía Agropecuaria, División de Estadísticas Agropecuarias, San Salvador, El Salvador, 2015, Disponible en <http://www.mag.gob.sv/direccion-general-de-economia-agropecuaria/estadisticas-agropecuarias/anuarios-de-estadisticas-agropecuarias/> Accesado 17 agosto 2019.
29. El Salvador Ministerio de Agricultura y Ganadería, Anuario de estadísticas agropecuarias 2017-2018, Dirección General de Economía Agropecuaria, División de Estadísticas Agropecuarias, San Salvador, El Salvador, 2018, Disponible en <http://www.mag.gob.sv/direccion-general-de-economia-agropecuaria/estadisticas-agropecuarias/anuarios-de-estadisticas-agropecuarias/> Accesado 17 agosto 2019
30. UNCTAD United Nations Conference on Trade and Development, Estudio sobre la cadena de comercialización de productos lácteos en Nicaragua, UNCTAD COMPAL, Switzerland, 2008, Disponible en <https://unctadcompal.org/wp-content/uploads/2017/03/Nicaragua-Sector-Lacteos.pdf> Accesado 10 julio 2018.

31. The Commission of the European Communities, Commission regulation (EC) No. 401/2006 of 23 February 2006, Laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs, OJ L70 (2006) 12-34, Disponible en <https://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/usefulinf/files/es401-2006.pdf>. Accesado 28 octubre 2018.
32. NEOGEN Corporation, Instructions of VERATOX<sup>®</sup> for Aflatoxin M<sub>1</sub> quantitative test, NEOGEN Corporation Customer Service, Lansing, Michigan, 2013, Disponible en [http://foodsafety.neogen.com/pdf/procedures/8019\\_ne\\_pro.pdf](http://foodsafety.neogen.com/pdf/procedures/8019_ne_pro.pdf). Accesado 21 mayo 2018.
33. I. Taverniers, M. De Loose, E. Van Bockstaele, Trends in quality in analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance, Trend. Anal. Chem. 23 (2004) 535-552. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.04.001>
34. C. Rivera, R. Rodríguez, Horwitz equation as quality benchmark in ISO/IEC 17025 testing laboratory. Bufete de Ingenieros Industriales S.C., México, 2011, Disponible en <https://www.semanticscholar.org/paper/HORWITZ-EQUATION-AS-QUALITY-BENCHMARK-IN-ISO-%2F-IEC-Rivera-Rodríguez/d6d6a38d1a9e01e526ca4e2b5b8d804670e5414f> Accesado 27 julio 2019
35. El Salvador, Ministerio de Economía, Norma Salvadoreña Obligatoria. Estándares de calidad. Norma general de CODEX para el queso. Especificaciones, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, San Salvador, El Salvador, 2003, Available at [http://www.puntofocal.gov.ar/notific\\_otros\\_miembros/sica\\_67.01.14.05.pdf](http://www.puntofocal.gov.ar/notific_otros_miembros/sica_67.01.14.05.pdf) Acceado 17 agosto 2019.

36. Nicaragua, Ministerio de Fomento e Industria Norma técnica obligatoria nicaragüense. Productos lácteos. Quesos. Especificaciones, Comisión Nacional de Normalización Técnica y Calidad, Managua, Nicaragua, 2018, Disponible en [http://legislacion.asamblea.gob.ni/normaweb.nsf/\(\\$All\)/6880ED5ADDCCA290062582B9006E9A09?OpenDocument](http://legislacion.asamblea.gob.ni/normaweb.nsf/($All)/6880ED5ADDCCA290062582B9006E9A09?OpenDocument) Accesado 17 agosto 2019.
37. R. Hernandez-Rauda, R. Martinez-Lopez, O. Peña-Rodas, Validation and seasonal variation of mean levels and prevalence of AFM<sub>1</sub> in white hard cheeses made in El Salvador and Nicaragua, Mendeley Data, v2. 2019. <http://dx.doi.org/10.17632/5hm687y7td.2>
38. N. Sohrabi, H. Gharahkoli, A seasonal study for determination of aflatoxin M1 level in dairy products in Iranshahr, Iran, Curr. Med. Mycol. 2 (2016) 27-31. <https://doi.org/10.18869/acadpub.cmm.2.3.27>
39. O. Peña-Rodas, R. Martinez-Lopez, R. Hernandez-Rauda, Occurrence of aflatoxin M1 in cow milk in El Salvador: Results from a two-year survey, Tox. Rep. 5 (2018) 671-678. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.06.004>
40. EFSA European Food Safety Authority, Modelling, predicting and mapping the emergence of aflatoxins in cereals in the European Union due to climate change, Question No EFSA-Q-2009-00812, Parma, Italy, 2012, Disponible en <https://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/en-223> Accesado 27 julio 2018
41. P. Battilani, P. Toscano, H.J. Van der Fels-Klerx, A. Moretti, M. Camardo Leggieri, C. Brera, A. Rortais, T. Goumperis, T. Robinson, Aflatoxin B<sub>1</sub> contamination in maize in Europe increases due to climate change, Sci. Rep. 6 (2016) 24328. <https://doi.org/10.1038/srep24328>
42. K.A. Chohan, F. Awan, M.M. Ali, U. Iqbal, M. Ijaz, Assessment of aflatoxin in dairy concentrate feeds, total mixed rations, silage and various feed ingredients in Pakistan, Pak. J.



Zool. 48 (2016) 277–280, Disponible en [http://zsp.com.pk/pdf48/277-280%20\(35\)%20Short%20communications%20QPJZ-0050-2015%2017-8-15.pdf](http://zsp.com.pk/pdf48/277-280%20(35)%20Short%20communications%20QPJZ-0050-2015%2017-8-15.pdf).

Accesado 25 julio 2018.

43. A. Molina, G. Chavarría, M. Alfaro-Cascante, A. Leiva, F. Granados-Chinchilla, Mycotoxins at the start of the food chain in Costa Rica: Analysis of six *Fusarium* toxins and Ochratoxin A between 2013 and 2017 in animal feed and aflatoxin M<sub>1</sub> in dairy products, *Toxins* 11 (2019) 312. <https://doi.org/10.3390/toxins11060312>

44. S. Viridis, C. Scarano, C. Spanu, F. Piras, A.M. Mocci, G. Murittu, I. Ibba, M. Desogus, E.P.L. De Santis, Determination of aflatoxin M<sub>1</sub> in long-ripened Pecorino Romano, Grana Padano and Parmigiano Reggiano cheeses, *Proceedings of 72nd Convegno Società Italiana delle Scienze Veterinarie* (20-22 Jun 2018) 293, Disponible en [https://www.researchgate.net/publication/326264743\\_Determination\\_of\\_Aflatoxin\\_M1\\_in\\_long-ripened\\_Pecorino\\_Romano\\_Grana\\_Padano\\_and\\_Parmigiano\\_Reggiano\\_cheeses](https://www.researchgate.net/publication/326264743_Determination_of_Aflatoxin_M1_in_long-ripened_Pecorino_Romano_Grana_Padano_and_Parmigiano_Reggiano_cheeses)

Accesado 28 junio 2019.

45. I.N. Tsakiris, M.N. Tzatzarakis, A.K. Alegakis, M.I. Vlachou, E.A. Renieri, A.M. Tsatsakis, Risk assessment scenarios of children's exposure to aflatoxin M<sub>1</sub> residues in different milk types from the Greek market, *Food Chem. Toxicol.* 56 (2013) 261-265. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.02.024>

46. S. Bakirdere, T. Yaroğlu, N. Tirik, M. Demiröz, A. Karaca, Determination of trace aflatoxin M<sub>1</sub> levels in milk and milk products consumed in Turkey by using enzyme-linked immunosorbent assay, *Food Agr. Immunol.* 25 (2014) 61-69. <http://dx.doi.org/10.1080/09540105.2012.733354>

47. A.M. Elgerbi, K.E. Aidoo, A.A.G. Candlish, R.F. Tester, Occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in randomly selected North African milk and cheese samples, *Food Addit. Contam.* 21 (2004) 592-597. <https://doi.org/10.1080/02652030410001687690>
48. A. Sharifzadeh, P. Ghasemi-Dehkordi, M. Foroughi, E. Mardanpour-Shahrekordi, S. Ramazi, Aflatoxin M<sub>1</sub> contamination levels in cheeses sold in Isfahan Province, Iran, *Osong Public Health Res. Perspect.* 8 (2017) 260-263. <https://doi.org/10.24171/j.phrp.2017.8.4.05>
49. R. Kazemi, M.M. Doost, M. Azizollahi, Aflatoxin M<sub>1</sub> contamination in milk and milk products in Iran: A review, *J. Chem. Health Risks* 3 (2013) 13-20. <https://doi.org/10.22034/jchr.2018.544034>
50. S. Ahlberg, D. Grace, G. Kiarie, Y. Kirino, J. Lindahl, A risk assessment of aflatoxin M<sub>1</sub> exposure in low and mid-income dairy consumers in Kenya, *Toxins* 10 (2018) 348. <https://doi.org/10.3390/toxins10090348>



# Apéndice 1



## **Apéndice 1. Procedimiento para realizar la validación de los métodos de extracción y analítico de la AFM<sub>1</sub> en queso duro blando.**

1. Preparación de la solución “madre” de AFM<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub> reference solution)
  - 1.1. Del vial de 2 ml de la solución de referencia que contiene 1 µg/ml o 1000 ng/ml, extraer 1 ml con pipeta.
  - 1.2. Verter ese volumen de 1 ml en un matraz volumétrico (balón de aforamiento) de 250 ml y completar hasta la marca con Acetonitrilo grado reactivo.
  - 1.3. Agitar la solución con vortex durante un minuto.
  - 1.4. Verter dentro de un frasco de vidrio ámbar con boca ancha y rotular, identificando el contenido de la solución en 4 nanogramos/ml y consignando la fecha de elaboración de la solución madre.
  - 1.5. La solución deberá conservarse en frío y dejar que alcance la temperatura ambiente (atemperar), antes de utilizarla para los análisis de cada día.
2. Extraer 1400 µl de la solución madre de AFM<sub>1</sub>, verter en un vial o microtubo cónico tipo Eppendorf y agitarlo con vortex por 10 segundos, este volumen será extraído diariamente y servirá para hacer la sobrecarga de las muestras de queso.
3. Cada día, pese dos (2) gramos del pool de quesos (mezcla de nacional y nicaragüense), previamente rallado y colóquelos en un tubo de centrífuga de 50 ml y repita ese procedimiento hasta tener siete (7) tubos de centrífuga de 50 ml, más un tubo adicional con los dos (2) gramos de muestra que no serán sobrecargados, al que se denominará Muestra sin sobrecarga.
4. Sobrecarga. Del microtubo Eppendorf con la solución madre (4 ng/ml de AFM<sub>1</sub>):
  - 4.1. Extraer 300 µl y añadirlo justo sobre la muestra de queso del primer tubo de centrifugado de 50 ml. No agitar el tubo, rotularlo con la sobrecarga 0.600 µg/kg
  - 4.2. Extraer 250 µl y añadirlo justo sobre la muestra de queso del segundo tubo de centrifugado de 50 ml. No agitar el tubo, rotularlo con la sobrecarga 0.500 µg/kg
  - 4.3. Extraer 200 µl y añadirlo justo sobre la muestra de queso del tercer tubo de centrifugado de 50 ml. No agitar el tubo, rotularlo con la sobrecarga 0.400 µg/kg
  - 4.4. Extraer 150 µl y añadirlo justo sobre la muestra de queso del cuarto tubo de centrifugado de 50 ml. No agitar el tubo, rotularlo con la sobrecarga 0.300 µg/kg
  - 4.5. Extraer 100 µl y añadirlo justo sobre la muestra de queso del quinto tubo de centrifugado de 50 ml. No agitar el tubo, rotularlo con la sobrecarga 0.200 µg/kg
  - 4.6. Extraer 50 µl y añadirlo justo sobre la muestra de queso del sexto tubo de centrifugado de 50 ml. No agitar el tubo, rotularlo con la sobrecarga 0.100 µg/kg
  - 4.7. Extraer 25 µl y añadirlo justo sobre la muestra de queso del séptimo tubo de centrifugado de 50 ml. No agitar el tubo, rotularlo con la sobrecarga 0.050 µg/kg
  - 4.8. La muestra de queso del octavo tubo no llevará sobrecarga de AFM<sub>1</sub>, y se deberá rotular Muestra sin sobrecarga.

5. Después de sobrecargar cada uno de los tubos con las diferentes concentraciones de AFM<sub>1</sub>, dejar evaporar el solvente (Acetonitrilo) a temperatura ambiente por 30 minutos, dentro de la cámara de extracción, solo bajando la placa de vidrio, pero sin activarla.
6. Transcurridos los 30 minutos y considerando que se ha evaporado el solvente (Acetonitrilo), adicionar 10 ml de Diclorometano al 100%, a cada uno de los siete tubos de 50 ml sobrecargados.
  - 6.1. Adicionar también 10 ml de Diclorometano al 100% a la muestra dentro del tubo denominado Muestra sin sobrecarga.
7. Agitar cada uno de los ocho tubos de centrifugado con vortex durante 1 minuto.
8. Mientras se procede con los pasos 4, 5 y 6, llenar hasta el límite funcional la cubeta del baño ultrasónico.
9. Los siete tubos de centrifugado, debidamente rotulados, con las muestras de queso sobrecargada más el tubo con la Muestra sin sobrecarga (en total 8 tubos), deben colocarse dentro del rack del baño ultrasónico, teniendo cuidado de distribuirlos uniformemente, asegurando así la mayor simetría posible en la aplicación del tratamiento de extracción por ultrasonido (frecuencia prefijada de 40 Khz).
10. Fijar la perilla de control de tiempo en 10 minutos, encender el baño ultrasónico y comenzar con el tratamiento de disrupción.
11. Finalizados los 10 minutos, colocar los ocho tubos en un agitador rotatorio y accionarlo durante 15 minutos para hacer la extracción de la Aflatoxina M<sub>1</sub>.
12. Finalizados los 15 minutos, trasvasar la solución de los tubos de 50 ml a tubos de vidrio con capacidad de 15 ml (tubos de trasvase).
13. Incubar los tubos a 50°C durante 30 minutos.
14. Centrifugar los tubos de trasvase a 3500 rpm durante 15 minutos, fijando la temperatura del interior del equipo a 10°C.
15. Retire por pipeteo 5 ml del supernadante de Diclorometano y coloque en un tubo de vidrio (tubo de trasvase).
16. Evaporar el Diclorometano hasta secarlo, utilizando un baño de maría (hotplate + beaker + agua), a una temperatura de 60°C, utilice flujo de aire impelido por bombeo eléctrico para acelerar la evaporación.
17. El residuo grasoso u oleoso que queda de la evaporación, vuelva a disolverlo en 0.5 ml de Metanol al 100% y 0.5 ml de agua destilada, a continuación, añada 4 ml de Hexanos al 100%.
18. Agitar cada tubo durante 1 minuto.
19. Vuelva a centrifugar los tubos con la solución de Metanol+Agua+n-Hexanos a 3500 rpm durante 10 minutos, a una temperatura de 10°C.
20. Remover completamente la capa superior que corresponde a los Hexanos, utilizando pipeta tipo Pasteur.

21. Tome una alícuota de 0.5 ml de la capa que quedó después de remover los Hexanos de cada tubo y que corresponde a la mezcla de Metanol+Agua y disuélvala en 2 ml del diluyente de la muestra que viene en cada kit de Aflatoxina M<sub>1</sub>.
22. Agitar nuevamente cada tubo durante 1 minuto.
23. Extraiga de cada tubo, un volumen de 100 µl de la mezcla reconstituida (Metanol+Agua+Diluyente de la Muestra) y ensaye directamente vertiéndolo en cada pocillo del kit Veratox® de Aflatoxina M<sub>1</sub>.

## **24. Validación:**

### **24.1. Primer día**

- 24.1.1. Cuatro pocillos del kit de AFM<sub>1</sub> (4) se les pipeteará 100 µl de la mezcla (Metanol+Agua+Diluyente) sobrecargada con 0.600 µg/kg,
- 24.1.2. Otros cuatro pocillos con 100 µl de la mezcla sobrecargada con 0.500 µg/kg,
- 24.1.3. Cuatro más con 100 µl cada uno de la mezcla sobrecargada con 0.400 µg/kg,
- 24.1.4. Otros cuatro con 100 µl cada uno de la mezcla sobrecargada con 0.300 µg/kg,
- 24.1.5. Cuatro más con 100 µl cada uno de la mezcla sobrecargada con 0.200 µg/kg,
- 24.1.6. Otros cuatro pocillos del kit se les pipeteará 100 µl de la mezcla sobrecargada con 0.100 µg/kg
- 24.1.7. A cuatro pocillos se les pipeteará 100 µl cada uno de la mezcla sobrecargada con 0.050 µg/kg.
- 24.1.8. Los últimos cuatro pocillos del kit se les pipeteará 100 µl de la mezcla sin sobrecargar
- 24.1.9. Se ensayarán los 32 micropocillos sobrecargados junto con los controles de 0, 5, 15, 30, 60 y 100 ppt de AFM<sub>1</sub> (un pocillo por control), completando así los 38 micropocillos del kit.
- 24.1.10. Registrar las densidades ópticas y convertir a valores de concentración de AFM<sub>1</sub>.

### **24.2. Segundo día**

- 24.2.1. Cuatro pocillos del kit de AFM<sub>1</sub> (4) se les pipeteará 100 µl de la mezcla (Metanol+Agua+Diluyente) sobrecargada con 0.600 µg/kg,
- 24.2.2. Otros cuatro pocillos con 100 µl de la mezcla sobrecargada con 0.500 µg/kg,
- 24.2.3. Cuatro más con 100 µl cada uno de la mezcla sobrecargada con 0.400 µg/kg,
- 24.2.4. Otros cuatro con 100 µl cada uno de la mezcla sobrecargada con 0.300 µg/kg,
- 24.2.5. Cuatro más con 100 µl cada uno de la mezcla sobrecargada con 0.200 µg/kg,
- 24.2.6. Otros cuatro pocillos del kit se les pipeteará 100 µl de la mezcla sobrecargada con 0.100 µg/kg
- 24.2.7. A cuatro pocillos se les pipeteará 100 µl cada uno de la mezcla sobrecargada con 0.050 µg/kg.



- 24.2.8. Los últimos cuatro pocillos del kit se les pipeteará 100 µl de la mezcla sin sobrecargar
- 24.2.9. Se ensayarán los 32 micropocillos sobrecargados junto con los controles de 0, 5, 15, 30, 60 y 100 ppt de AFM<sub>1</sub> (un pocillo por control), completando así los 38 micropocillos del kit.
- 24.2.10. Registrar las densidades ópticas y convertir a valores de concentración de AFM<sub>1</sub>.

### **24.3. Tercer día**

- 24.3.1. Cuatro pocillos del kit de AFM<sub>1</sub> (4) se les pipeteará 100 µl de la mezcla (Metanol+Agua+Diluyente) sobrecargada con 0.600 µg/kg,
- 24.3.2. Otros cuatro pocillos con 100 µl de la mezcla sobrecargada con 0.500 µg/kg,
- 24.3.3. Cuatro más con 100 µl cada uno de la mezcla sobrecargada con 0.400 µg/kg,
- 24.3.4. Otros cuatro con 100 µl cada uno de la mezcla sobrecargada con 0.300 µg/kg,
- 24.3.5. Cuatro más con 100 µl cada uno de la mezcla sobrecargada con 0.200 µg/kg,
- 24.3.6. Otros cuatro pocillos del kit se les pipeteará 100 µl de la mezcla sobrecargada con 0.100 µg/kg
- 24.3.7. A cuatro pocillos se les pipeteará 100 µl cada uno de la mezcla sobrecargada con 0.050 µg/kg.
- 24.3.8. Los últimos cuatro pocillos del kit se les pipeteará 100 µl de la mezcla sin sobrecargar
- 24.3.9. Se ensayarán los 32 micropocillos sobrecargados junto con los controles de 0, 5, 15, 30, 60 y 100 ppt de AFM<sub>1</sub> (un pocillo por control), completando así los 38 micropocillos del kit.
- 24.3.10. Registrar las densidades ópticas y convertir a valores de concentración de AFM<sub>1</sub>.

### **24.4. Cuarto día**

- 24.4.1. Cuatro pocillos del kit de AFM<sub>1</sub> (4) se les pipeteará 100 µl de la mezcla (Metanol+Agua+Diluyente) sobrecargada con 0.600 µg/kg,
- 24.4.2. Otros cuatro pocillos con 100 µl de la mezcla sobrecargada con 0.500 µg/kg,
- 24.4.3. Cuatro más con 100 µl cada uno de la mezcla sobrecargada con 0.400 µg/kg,
- 24.4.4. Otros cuatro con 100 µl cada uno de la mezcla sobrecargada con 0.300 µg/kg,
- 24.4.5. Cuatro más con 100 µl cada uno de la mezcla sobrecargada con 0.200 µg/kg,
- 24.4.6. Otros cuatro pocillos del kit se les pipeteará 100 µl de la mezcla sobrecargada con 0.100 µg/kg
- 24.4.7. A cuatro pocillos se les pipeteará 100 µl cada uno de la mezcla sobrecargada con 0.050 µg/kg.
- 24.4.8. Los últimos cuatro pocillos del kit se les pipeteará 100 µl de la mezcla sin sobrecargar

24.4.9. Se ensayarán los 32 micropocillos sobrecargados junto con los controles de 0, 5, 15, 30, 60 y 100 ppt de AFM<sub>1</sub> (un pocillo por control), completando así los 38 micropocillos del kit.

24.4.10. Registrar las densidades ópticas y convertir a valores de concentración de AFM<sub>1</sub>.

#### **24.5. Quinto día**

24.5.1. Cuatro pocillos del kit de AFM<sub>1</sub> (4) se les pipeteará 100 µl de la mezcla (Metanol+Agua+Diluyente) sobrecargada con 0.600 µg/kg,

24.5.2. Otros cuatro pocillos con 100 µl de la mezcla sobrecargada con 0.500 µg/kg,

24.5.3. Cuatro más con 100 µl cada uno de la mezcla sobrecargada con 0.400 µg/kg,

24.5.4. Otros cuatro con 100 µl cada uno de la mezcla sobrecargada con 0.300 µg/kg,

24.5.5. Cuatro más con 100 µl cada uno de la mezcla sobrecargada con 0.200 µg/kg,

24.5.6. Otros cuatro pocillos del kit se les pipeteará 100 µl de la mezcla sobrecargada con 0.100 µg/kg

24.5.7. A cuatro pocillos se les pipeteará 100 µl cada uno de la mezcla sobrecargada con 0.050 µg/kg.

24.5.8. Los últimos cuatro pocillos del kit se les pipeteará 100 µl de la mezcla sin sobrecargar

24.5.9. Se ensayarán los 32 micropocillos sobrecargados junto con los controles de 0, 5, 15, 30, 60 y 100 ppt de AFM<sub>1</sub> (un pocillo por control), completando así los 38 micropocillos del kit.

24.5.10. Registrar las densidades ópticas y convertir a valores de concentración de AFM<sub>1</sub>.

#### **En total, para la prueba de validación se necesitan:**

- I. Cinco libras de queso duro blando, comprado durante la víspera, procesadas (ralladas) el mismo día, pero por separado y almacenadas en frío hasta aplicarles el tratamiento de extracción y de análisis.
- II. Cinco kits completos de Aflatoxina M<sub>1</sub> más uno para compensar pérdidas por cualquier fallo en la prueba de validación.
- III. 250 ml de solución madre de AFM<sub>1</sub>, a una concentración de 4 nanogramos/ml.
- IV. Sobrecargar las muestras de queso diariamente, extrayendo los volúmenes correspondientes de la alícuota de Solución Madre de AFM<sub>1</sub> (4 ng/ml), vertida en un microtubo Eppendorf, correspondientes a las concentraciones finales:
  - a. 300 µl para alcanzar la sobrecarga de 0.600 µg/kg,
  - b. 250 µl para llegar a la sobrecarga de 0.500 µg/kg,
  - c. 200 µl para lograr la sobrecarga de 0.400 µg/kg,
  - d. 150 µl para obtener la sobrecarga de 0.300 µg/kg,
  - e. 100 µl para conseguir la sobrecarga de 0.200 µg/kg,

- f. 50  $\mu\text{l}$  para alcanzar la sobrecarga de 0.100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,
  - g. 25  $\mu\text{l}$  para tener la sobrecarga de 0.050  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .
- V. Los volúmenes residuales de cada microtubo con la solución madre, descartarlos al final del día de uso.



2019



Aflatoxina M<sub>1</sub> en queso duro blando, comercializado en San Miguel, resultados de monitoreo 2018-2019.

