

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

ESCUELA DE POSGRADO

DOCTORADO EN CIENCIA ANIMAL



**“PRESENCIA DE AFLATOXINA M1, ZEARALENONA Y SUS
FACTORES DE RIESGO EN LECHE DE VACA EN DIFERENTES
PROVINCIAS DE ECUADOR”**

Presentada por:

BYRON HUMBERTO PUGA TORRES

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR
DOCTORIS PHILOSOPHIAE EN CIENCIA ANIMAL**

Lima – Perú

2022

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
DOCTORADO EN CIENCIA ANIMAL**

**“PRESENCIA DE AFLATOXINA M1, ZEARALENONA Y SUS
FACTORES DE RIESGO EN LECHE DE VACA EN DIFERENTES
PROVINCIAS DE ECUADOR”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR
DOCTORIS PHILOSOPHIAE (Ph.D.)**

Presentada por:

BYRON HUMBERTO PUGA TORRES

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Ph.D. Víctor Guevara Carrasco

PRESIDENTE

Ph.D. Carlos Gómez Bravo

ASESOR

Dra. María Elena Villanueva Espinoza

MIEMBRO

Ph.D. Patricia Glorio Paulet

MIEMBRO

Dr. Arturo Valdivia Flores

MIEMBRO EXTERNO

DEDICATORIA

*A mi esposa Samantha, por su amor,
paciencia y apoyo incondicional*

*A mis hijas Anahí y Romina, el amor que
me inspira a crecer día a día*

*A mis padres José y Azucena, porque
mucho de lo que soy se lo debo a ellos*

*A mis hermanos, sobrinos y familia
política, por estar siempre a mi lado*

AGRADECIMIENTO

Un agradecimiento infinito a mi asesor, Ph.D. Carlos Gómez Bravo, por su enorme apoyo científico y pedagógico, a más de su guía durante todo este proceso.

A la Universidad Central del Ecuador por permitirme crecer profesionalmente.

A la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional Agraria La Molina, docentes, personal administrativo y compañeros, por haberme acogido y brindado la oportunidad de adquirir conocimientos durante mis estudios de Doctorado.

Al Dr. Eduardo Aragón, Dr. Francisco de la Cueva y Dr. Fernando Sempértegui, por su apoyo desinteresado.

A Santiago Gordillo, Santiago Miranda, Wilson Espín y Enrique Navarrete por su siempre colaboración.

Un agradecimiento especial a Gabriela Cisneros, Mayra Cachiguango, Denisse Alarcón, David Salazar, Miguel Cáceres y a la Sra. Rosario Tigse por su invaluable colaboración en este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1	PRODUCCIÓN DE LECHE EN ECUADOR	3
2.2	MICOTOXINAS	4
2.2.1	Aflatoxina B ₁ (AFB ₁)	5
2.2.2	Aflatoxina M ₁ (AFM ₁)	6
2.2.3	Zearalenona	8
2.3	MICOTOXICOSIS EN ANIMALES PRODUCTIVOS.....	10
2.4	FACTORES QUE INFLUENCIAN LA PRESENCIA DE MICOTOXINAS EN LECHE.....	12
2.5	TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE MICOTOXINAS: INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMA (ELISA) E INMUNOCROMATOGRAFÍA DE FLUJO LATERAL (LFIA).....	14
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
3.1	LOCALIZACIÓN	16
3.2	MATERIALES	17
3.2.1	Recolección y duración.....	17
3.2.2	Muestras y muestreo	17
3.3	MÉTODOS.....	18
3.3.1	Preparación y análisis de las muestras	18
3.3.2	Análisis de AFM ₁ en leche cruda por LFIA	19
3.3.3	Análisis de ZEA en leche cruda por ELISA.....	19
3.3.4	Determinación de posibles factores que influyen la presencia de micotoxinas	21
3.3.5	Tipo de investigación.....	21
3.3.6	Análisis estadístico	21
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
4.1	PRESENCIA DE ZEA EN LECHE CRUDA DE ECUADOR	23
4.2	PRESENCIA DE AFM ₁ EN LECHE CRUDA DE ECUADOR	29
4.3	FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A LA PRESENCIA DE AFM ₁ EN LECHE CRUDA DE ECUADOR.....	36
V.	CONCLUSIONES	43
VI.	RECOMENDACIONES	44

VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
VIII.	ANEXOS	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Valores mínimos, media y máximo de ZEA por cantón, provincia y región climática.....	24
Tabla 2: Valores mínimos, media y máximo de ZEA por meses, región climática, tipo de productor y sistema de producción	25
Tabla 3: Valores mínimos, media y máximos de AFM ₁ obtenidos por provincial, región climática y época climática.....	31
Tabla 4: Límites máximos permitidos para AFM ₁ en leche cruda, en diferentes países y el contenido de varias investigaciones.	35
Tabla 5: Tipo de pasto, henolaje, ensilaje y alimento balanceado consumido por los animales (124/209) cuya leche incumple la normativa europea para AFM ₁	37
Tabla 6: Variables explicativas del análisis de factores de riesgo para la posible asociación con la ocurrencia de AFM ₁ en leche cruda.	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Bioconversión de AFB ₁ a AFM ₁	6
Figura 2: Bioconversión de ZEA.....	9
Figura 3: Mapa de Ecuador marcado las provincias donde se realizó el muestreo.	17
Figura 4: Diagrama de cajas con los valores por meses, época climática, provincias, región climática, tipo de productor y sistemas de producción para ZEA.	28
Figura 5: Diagrama de cajas con los valores por meses, época climática, provincias, región climática, tipo de productor y sistemas de producción para AFM ₁	32

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Muestreo de leche cruda y encuestas.	67
Anexo 2: Análisis de AFM ₁ por LFIA.	69
Anexo 3: Análisis de ZEA por ELISA.	70
Anexo 4: Encuesta Región Costa.	71
Anexo 5: Encuesta Región Sierra o Interandina.	73
Anexo 6: Datos totales obtenidos en la investigación.	75
Anexo 7: Resultados estadísticos obtenidos de ZEA.	80
Anexo 8: Resultados estadísticos de AFM ₁	87
Anexo 9: Resultados estadísticos de la asociación de factores de riesgo de la presencia de AFM ₁	94
Anexo 6: Datos totales obtenidos en la investigación.	75
Anexo 7: Resultados estadísticos de obtenidos de ZEA.	80
Anexo 8: Resultados estadísticos de AFM ₁	87
Anexo 9: Resultados estadísticos de la asociación de factores de riesgo de la presencia de AFM ₁	94

RESUMEN

Aflatoxina M₁ (AFM₁) es una micotoxina carcinógena y hepatotóxica, mientras que Zearalenona (ZEA) es un disruptor endócrino por su capacidad de adoptar una configuración similar al 17-beta-estradiol. El objetivo de la investigación fue determinar la presencia de estas micotoxinas, y sus factores de riesgo, en leche cruda del centro-norte de Ecuador. Se recolectaron 209 muestras durante la época seca (junio y agosto) y lluviosa (abril y noviembre) de 2019. Las concentraciones de AFM₁ se midieron con ensayos inmunocromatográficos de flujo lateral, mientras que ZEA por ELISA. El 100 por ciento de las muestras contenían AFM₁, con una media de 0.0774 µg/kg (0.023 - 0.751 µg/kg), excediendo el límite regulatorio europeo (0.05 µg/kg) en el 59.3 por ciento (124/209) de las muestras, mientras que el 1.9 por ciento (4/209) excedió el límite legal ecuatoriano (0.5 µg/kg). ZEA se encontró en el 99.5 por ciento de las muestras (208/209), con una media de 1.5 µg/kg (0 - 10.2 µg/kg), en niveles muy por debajo de los límites máximos permitidos por la legislación internacional (30 a 1000 µg/kg). Se usaron pruebas no paramétricas, donde los resultados de ZEA no variaron significativamente ($p \geq 0.05$) por cantones, provincias, clima, región climática, tipos de productores, sistemas de producción. Para AFM₁, existieron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre provincias (mayor Manabí), meses de estudio (junio), época climática (época seca) y región climática (región costera). Para determinar factores de riesgo en relación a la aparición de AFM₁ en leche, se utilizó un ajuste de modelo lineal por mínimos cuadrados ponderados, encontrándose que el consumo de leguminosas, uso de ensilaje, sistema de producción intensivo y los grandes productores presentaron niveles más altos de AFM₁. Si bien la contaminación por ZEA y AFM₁ en la leche cruda no rebasa los límites permitidos por la legislación ecuatoriana, pero debido a su presencia, es necesario desarrollar un programa de vigilancia continua de estas micotoxinas.

Palabras clave: AFM₁, ZEA, leche cruda, Ecuador.

ABSTRACT

Aflatoxin M₁ (AFM₁) is a carcinogen and hepatotoxic mycotoxin, whereas Zearalenone (ZEA) is an endocrine disruptor due to its capacity to adopt a similar configuration to 17-beta-estradiol. The objective of the research was to determine the presence of these mycotoxins, and their risk factors, in raw milk in North-center Ecuador. 209 samples were collected during the dry season (June and August) and rainy season (April and November) in 2019. The concentrations of AFM₁ were measured through immunochromatographic lateral flow assays, while ZEA through ELISA. 100 percent of the samples contained AFM₁, with a median of 0.0774 µg/kg (0.023 – 0.751 µg/kg), exceeding the European regulatory limit (0.05 µg/kg) in 59.3 percent (124/209) of the samples. While 1.9 percent (4/209) exceeded the Ecuadorian legal limit (0.5 µg/kg). ZEA was found in 99.5 percent of the samples (208/209), with a median of 1.5 µg/kg (0 – 10.2 µg/kg), in levels far below the maximum limits allowed by international legislation (30 to 1000 µg/kg). Non-parametric tests were used, where the results of ZEA did not vary significantly ($p \geq 0.05$) by cantons, provinces, climate, climatic region, types of producers, production systems. For AFM₁, there were significant differences ($p \leq 0.05$) within provinces (highest in Manabí), months of study (June), climatic season (dry season) and climatic region (coastal region). In order to determine risk factors regarding the appearance of AFM₁ in milk, an adjustment was made through the weighted least squares model, it was found that the consumption of legumes, use of ensilage, intensive production system and the major producers presented higher levels of AFM₁. Although the contamination by ZEA and AFM₁ in raw milk does not exceed the limits allowed by Ecuadorian legislation, but due to their presence, a continuous vigilance program for these mycotoxins should be developed.

Keywords: AFM₁, ZEA, raw milk, Ecuador.

I. INTRODUCCIÓN

La leche constituye un medio de cultivo perfecto para favorecer el crecimiento de microorganismos, por lo que la misma y sus derivados pueden provocar enfermedades en los consumidores, especialmente por contaminación con patógenos o sus toxinas (FAO 2016). Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs) constituyen un problema recurrente alrededor del planeta y una causa importante de morbilidad e incluso mortalidad; se conoce que al menos 250 son consideradas como ETAs, dentro de las cuales se encuentran las micotoxicosis (Palomino-Camargo y González -Muñoz 2014).

Las micotoxinas son metabolitos secundarios de los hongos filamentosos, los cuales se forman al final de la fase exponencial o al principio de la estacionaria en el crecimiento del moho; son componentes naturales y prácticamente inevitables que entran fácilmente a la cadena alimentaria, directamente a partir de componentes vegetales de alimentos contaminados con micotoxinas, o indirectamente por crecimiento de hongos toxigénicos en los alimentos. Estas micotoxinas pueden causar micotoxicosis tanto en humanos como en animales, por lo que pueden estar presentes en productos alimenticios de origen animal como carne, leche, huevos, etc. (Alshannaq y Yu 2017, Barbera *et al.* 2017, Soriano del Castillo 2007). Tienen la característica de poseer una alta estabilidad durante todas las etapas de producción, incluido el proceso de pasteurización de la leche (Udomkun *et al.* 2017). La micotoxina y micotoxicosis más conocida es la producida por el género *Claviceps* del centeno, causante del ergotismo (Soriano 2007); sin embargo, los principales productores de micotoxinas son los miembros de tres géneros fungosos: *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*. Se han identificado más de 300 micotoxinas, de las cuales seis se encuentran frecuentemente en alimentos: Aflatoxinas (AF), Tricotecenos (TRI), Zearalenona (ZEA), Fumonisinias (FUM), Ocratoxinas (OTA) y Patulina (PAT). Éstas son las causantes de varios problemas de seguridad alimentaria en todo el mundo, siendo las AF las más tóxicas (Serrano y Cardona 2015, Udomkun *et al.* 2017).

Se ha seleccionado a Aflatoxina M₁ y Zearalenona, debido a su alta ocurrencia en Sudamérica, en donde la Fumonisina está en un 77 por ciento, Zearalenona 38 por ciento, Aflatoxina 20 por ciento, Deoxynivalenol 16 por ciento y Ochratoxin A 10 por ciento. Siendo mayor la presencia de Fumonisinas; sin embargo, no existen estudios en leche de esta micotoxina debido a que en bovinos su absorción es baja, normalmente solo llega a sangre el 5 por ciento de la dosis ingerida inicialmente; y de esta pequeña fracción absorbida, la misma es rápidamente distribuida y eliminada a través de la orina y heces; solamente, un pequeñísimo porcentaje (1.4 por ciento de la dosis), que entra en el ciclo de circulación enterohepática, se queda en el organismo. Igualmente, se considera que el bovino es bastante resistente a esta micotoxina, y en humanos la información acerca del efecto de la fumonisina es escasa (Schatzmayr y Streit 2013).

Las Aflatoxinas (AF), producidas por el género *Aspergillus*, son las de mayor preocupación a nivel mundial, pues AFB₁ es la más tóxica, la cual después de ser ingerida y debido su alta solubilidad en grasas, es fácilmente absorbida a nivel gastrointestinal, llegando al hígado donde es convertida en Aflatoxina M₁ (AFM₁) (Grim 2017, Rosim *et al.* 2018); puede llegar a la leche, por tanto, también a los derivados y productos lácteos (Akhtar *et al.* 2017, Assaf *et al.* 2019). La Zearalenona (ZEA) es una micotoxina lactona procedente del hongo *Fusarium*, siendo el *F. roseum graminearum* el que produce ZEA en mayor concentración; afecta a varios tipos de alimentos a nivel mundial, como trigo, maíz, cebada, sorgo, ajonjolí, heno, ensilaje y pienso animal (Gimeno y Martins 2011, Duarte-Vogel y Villamil-Jiménez 2006). En Ecuador existen escasos estudios de la presencia de AFM₁ y nulos de ZEA; tampoco se ha identificado dicha presencia en las distintas regiones del país, por lo que fue importante levantar esta información para garantizar la calidad de la leche producida, la calidad e inocuidad de los alimentos fabricados y los ingresos económicos de los productores.

Por lo tanto, el objetivo general de la presente investigación fue establecer los niveles de contaminación de AFM₁ y ZEA en la producción lechera de Ecuador; teniendo como objetivos específicos: 1) cuantificar la contaminación en pequeños, medianos y grandes productores de dos regiones diferentes de Ecuador (interandina y costera) y en distinta época climática (seca y lluviosa), y 2) determinar los posibles factores que podrían asociarse a la presencia de estas micotoxinas en la leche cruda.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 PRODUCCIÓN DE LECHE EN ECUADOR

Según la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario (AGROCALIDAD), en el año 2020, en el Ecuador continental, se contabilizaron un total de 4 520 693 cabezas de ganado bovino, encontrándose 8.46 por ciento de toros, 36.73 por ciento de vacas, 9.43 por ciento de toretes, 10.20 por ciento de vaconas, 15.43 por ciento terneros y 19.75 por ciento de terneras (AGROCALIDAD 2020). La producción láctea en Ecuador, en el 2020, alcanzó los 6.15 millones de litros, de los cuales el 76.46 por ciento fue vendida en líquido, 12.40 por ciento procesada en los terrenos (producción artesanal de subproductos), 8.52 por ciento destinada al consumo en los terrenos, 2.40 por ciento para alimentación en balde y el 0.23 por ciento destinada a otros fines (INEC- ESPAC 2021). Aproximadamente el 75 por ciento de la leche ecuatoriana se comercializa y consume sin ningún tipo de tratamiento térmico y tan solo el 25 por ciento se industrializa (AGSO 2016).

La provincia interandina de Pichincha, cuya capital es Quito, históricamente ha sido la mayor productora de leche de Ecuador, constituyendo actualmente el 13.49 por ciento de la producción total (INEC- ESPAC 2021); tiene zonas de altura y zonas subtropicales, donde sus ocho cantones son productores de leche (CIL 2015). La segunda provincia con mayor producción es Manabí (INEC 2020), ubicada en la región costera o litoral, y que representa poco más del 12 por ciento de la leche ecuatoriana (INEC 2018); cuenta con el mayor número de bovinos (más de un millón de animales), de los cuales el 30 por ciento producen leche, con un aumento progresivo de dicha actividad; su zona norte y central son las más productivas, en donde destacan los cantones Chone, Cojimíes, Pedernales y El Carmen (CIL 2015). Finalmente, entre las dos provincias se encuentra Santo Domingo de los Tsáchilas (región costa), cuya producción de leche representa aproximadamente el 4 por ciento del total nacional (INEC 2020).

La sierra o región interandina tiene un clima templado frío durante todo el año, mientras que en la región costera siempre hay un clima cálido. No existen estaciones climáticas en Ecuador, sólo existen un período lluvioso, entre noviembre y mayo, y un período seco, entre junio y septiembre (INAMHI 2006). La provincia de Pichincha tiene una temperatura entre 5-20 °C, 70-75 por ciento de humedad y se encuentra a una altitud entre 2500-3200 metros sobre el nivel del mar. Manabí dispone de una temperatura ambiente que oscila entre 20–35 °C, con 82–90 por ciento de humedad relativa y está entre 150–300 metros sobre el nivel del mar. Santo Domingo de los Tsáchilas tiene una temperatura entre 21–32 °C, con 80–90 por ciento de humedad y está ubicada a una altura entre 150–300 metros sobre el nivel del mar.

2.2 MICOTOXINAS

Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos provenientes de los hongos filamentosos, los cuales son organismos eucariotas multicelulares, carentes de clorofila y formados por hifas. El término micotoxina deriva de las palabras griegas *mikes* (hongo) y *toxina* (veneno) y se caracterizan por tener bajo peso molecular, menor de 1000 Daltons, siendo no esenciales para el crecimiento vegetativo en cultivo puro del hongo (al igual que los antibióticos), formándose al final de la fase exponencial o al principio de la estacionaria, aunque comúnmente se indica que están presentes en la esporulación. Son toxinas ubicuas que se encuentran en una amplia variedad de alimentos y piensos, pudiendo desarrollarse en los alimentos en cualquier etapa de la cadena alimentaria, y cuya ingestión causa desde toxicidad aguda a trastornos de salud a largo plazo o crónicos (IFST 2015, Alshannaq y Yu 2017, Soriano del Castillo 2007).

Comúnmente tienen mayor presencia en regiones o países con climas de alta temperatura y humedad o donde hay malas cosechas y malas condiciones de almacenamiento, pues dichas condiciones favorecen el desarrollo del hongo filamentosos, y consecuentemente sus micotoxinas (IFST 2015). Con respecto a la época climática, existen datos que muestran una tendencia estacional en los niveles de micotoxinas en la leche, siendo estos mayores en los meses fríos (en países de 4 estaciones) probablemente debido al almacenamiento prolongado requerido para los alimentos que serán ofrecidos al ganado (Becker-Algeri *et al.* 2016).

En el caso de la exposición y riesgo a la salud pública, una de las principales causas es la alimentación de los animales, debido a que, a través de la misma, puede llegar al humano ya sea mediante la carne, leche o huevos procedentes de los mismos. Se da principalmente cuando la comida de éstos animales pudo haber sido contaminada directamente con un hongo toxigénico, con la posterior formación de micotoxinas; también se puede contaminar indirectamente cuando un ingrediente de un proceso se ha contaminado previamente con hongos toxigénicos y, aunque el hongo puede eliminarse o destruirse durante el procesamiento, sus toxinas no (IFST 2015).

De acuerdo a la Norma Técnica Ecuatoriana (NTE) INEN 9 (INEN 2012), la cantidad máxima permitida de AFM₁ en leche cruda en Ecuador es de 0.5 µg/kg; dicha Norma no menciona la cantidad máxima permitida de ZEA, pero menciona que la leche cruda no debe tener residuos de sustancias tóxicas en cantidades superiores al máximo permitido por el Codex Alimentarius. La Unión Europea indica que el límite máximo para AFM₁ es de 0.05 µg/kg en leche fluida cruda (European 2010). Para ZEA, diferentes regulaciones a nivel mundial han establecido límites entre 30 y 1000 en los alimentos (Codex-Alimentarius 1999, European-Commission 2006, EFSA 2011, 2016, FAO 2004).

2.2.1 Aflatoxina B₁ (AFB₁)

Las AF son producidas principalmente por ciertas cepas de *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*, los cuales pueden contaminar diversos cultivos agrícolas (Udomkun *et al.* 2017). Se ha determinado hasta el momento un total de 18 AF, de las cuales la AFB₁ es la más tóxica, siendo mutagénica, teratogénica, hepatotóxica, inclusive produciendo problemas renales e inmunocupresores al inducir un complejo proceso autofágico en los macrófagos (células THP-1 y células RAW264.7), pudiendo inclusive llegar a ser carcinógena (Becker-Algeri *et al.* 2016, Gimeno y Martins 2011, An *et al.* 2017).

En el caso de la vaca lechera, luego de la ingestión de alimento contaminado con AFB₁, esta micotoxina se metaboliza parcialmente en el rumen y luego en el hígado, transformándose principalmente en el metabolito hidroxilado llamado AFM₁, el cual se elimina a través de los líquidos corporales como orina, bilis y, si se encuentra en lactación, por la leche (Cook *et al.* 1986, Kuilman *et al.* 2000, 1998) entre las 12-24 horas después de la ingestión de AFB₁

(Soriano del Castillo 2007, Battacone *et al.* 2009). Se ha observado incluso valores de transferencia tan bajos como 0.09 por ciento (Rangel-Muñoz *et al.* 2020), siendo lo más común que entre el 0.35 y el 6 por ciento de AFB₁ ingerida por el ganado vacuno se transfiere a la leche como AFM₁ (EFSA 2004, Fink-Gremmels 2008), encontrándose por ejemplo en México, una tasa de transferencia de entre el 0.71 a 0.78 por ciento (Hernandez-Valdivia *et al.* 2021).

AFB₁ y AFM₁ pueden causar un grave peligro para la salud pública, ya que pueden causar problemas renales, hepáticos y cáncer de hígado, pulmón o colon (Li *et al.* 2019, Marchese *et al.* 2018, Saha y Wu 2019). Se ha encontrado que el 43.9 por ciento del total anual de casos de cáncer de hígado, en Bangladesh, se asociaron con AF ingerida (Saha y Wu 2019).

2.2.2 Aflatoxina M₁ (AFM₁)

La AFM₁ es un hidroxilado-metabolito producto de la bioconversión (Figura 1) de AFB₁, al ser metabolizada por la familia de enzimas del citocromo P450 microsomal (Akhtar *et al.* 2017, Grim 2017); in vitro, en células epiteliales mamarias bovinas, la biotransformación de AFB₁ en AFM₁ se correlacionó directamente con la concentración de sustrato y el tiempo de exposición (Caruso *et al.* 2008 citado por Battacone *et al.* 2009).

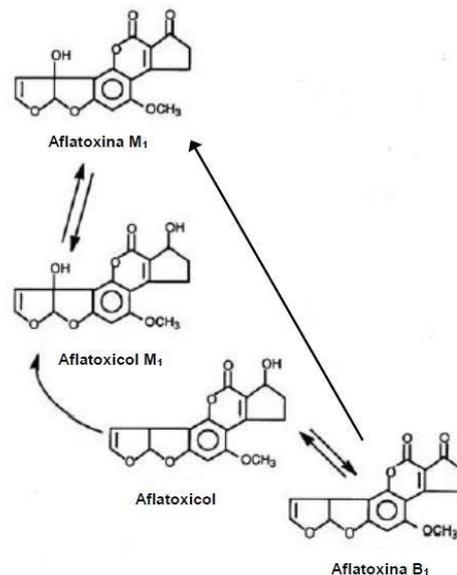


Figura 1: Bioconversión de AFB₁ a AFM₁.

Fuente: Peña-Rodas *et al.*(2018)

Como se mencionó, la AFM₁ es detectada en la leche entre 12 a 24 horas después del consumo de AFB₁, lo que confirma el hecho de que la AFB₁ se absorbe fácilmente dentro del tracto gastrointestinal y se transforma rápidamente. La concentración de AFM₁ aumenta al tercer día de la exposición y luego alcanza una condición de estado estacionario, el cual está positivamente relacionado con la ingesta de AFB₁; así mismo, a medida que termina la ingesta de alimento contaminado, la concentración de AFM₁ disminuye rápidamente y ya no se detecta después de tres días (Battacone *et al.* 2009). La AFM₁ es un carcinógeno humano de clase 2B y es la única micotoxina con límites máximos de residuos establecidos en la leche cruda (Gao *et al.* 2016); se considera la presencia en la leche y productos lácteos riesgosa para la salud humana, debido a que no se destruye durante el proceso de pasteurización y calentamiento; pues, a su relativa estabilidad durante este proceso, al igual que en el almacenamiento de leche y durante la preparación de diversos productos lácteos; esto ocasiona graves riesgos para la salud pública; por lo que, se vuelve indispensable el control periódico de este producto de origen animal y sus derivados; así mismo, necesario que los alimentos para vacas lecheras se almacenen de tal manera que no se contaminen (Branch *et al.* 2013, Çelik *et al.* 2005).

Existen reportes indicando la presencia en todo el mundo de AFM₁ en leche; sin embargo, sus niveles varían considerablemente en diferentes regiones, dependiendo del sistema de producción, clima y las especies lecheras (Guo *et al.* 2019). Estos problemas son mucho más graves en los países de bajos ingresos, donde su presencia puede ser común e incluso extrema, incluida la contaminación de la leche materna y las fórmulas infantiles (Awaisheh *et al.* 2019, Warth *et al.* 2016). Por lo tanto, un estudio permanente de AFM₁ es necesario para proteger la salud humana y el comercio (Nguyen *et al.* 2020) para desarrollar e implementar regulaciones y sistemas de control respecto a la presencia de AFM₁ en leche y sus derivados, garantizando así la calidad y seguridad de los alimentos (Becker-Algeri *et al.* 2016, Mulunda *et al.* 2013).

En Alexandría-Egipto, se mostraron valores de concentración media de AFM₁ en el 40 por ciento de las muestras de leche analizadas (0.0093 a 0.085 µg/kg), así como en sus derivados (Aiad y El-Makarem 2013). En Turquía, de 85 muestras de leche pasteurizada, el 88.23 por ciento estaban contaminadas con AFM₁, y el 64 por ciento superaban el límite permitido de AFM₁ en la leche según la legislación Turca y el Codex Alimentarius (Çelik *et al.* 2005). En Jordania, de 175 muestras, la concentración de AFM₁ en el 66 por ciento de las muestras

de leche cruda fue superior al límite de tolerancia máximo aceptado por la Unión Europea y 23 por ciento al de los Estados Unidos (Sharaf 2016). En el Estado de Jartum – Sudán, de 143 muestras de leche se encontró AFM₁ en el 100 por ciento de las muestras (Suliman y Abdalla 2013). Así mismo, en Vojvodina-Serbia, se encontró AFM₁, con grandes diferencias entre pequeños y grandes productores (Horvatović *et al.* 2016). En Brasil, se analizó un total de 107 muestras de leche UHT comercializada en las ciudades de São Paulo y Marília y se detectó AFM₁ en el 73.8 por ciento de las muestras (Shundo *et al.* 2006). En Argentina, en el 2012, se encontró AFM₁ con una media de 0.059 µg/kg en la leche (Signorini *et al.* 2012).

2.2.3 Zearalenona

La Zearalenona (ZEA) es una micotoxina ácido resorcil de lactona, producida principalmente por *Fusarium graminearum* y *F. culmorum*, y en menor medida por *F. equiseti*, *F. gibbosum*, *F. oxysporum* y *F. moniliforme* (Dänicke y Winkler 2015); éstos hongos se encuentran como contaminantes naturales del maíz y subproductos, así como en la cebada, trigo, avena, sorgo, semilla de sésamo, heno y ensilados (Gimeno y Martins 2011). Su máxima presencia se da en variaciones de temperatura entre 20 y 25 por ciento, y si la actividad del agua es considerable, mayor será la producción de ZEA (Soriano del Castillo 2007), porque las lluvias pueden incrementar significativamente su concentración en el trigo, mientras que en ausencia de humedad, permanece en concentraciones muy bajas incluso cuando está severamente afectado por *Fusarium* (Kharbikar *et al.* 2015).

Luego de la ingesta oral de ZEA, es relativamente rápida su absorción por parte de los animales, aunque debido a una muy alta excreción biliar, resulta dificultoso medir el grado de absorción (Król *et al.* 2018). Se ha determinado dos vías principales de biotransformación (Figura 2), la primera se da reduciendo el grupo cetona del carbono 7, por un grupo hidroxilo, obteniendo α -zearalenol (α -ZEA) (Gholamreza y Soghra 2014) que puede ser de 3 a 4 veces mayor en toxicidad que el compuesto original (Becker-Algeri *et al.*, 2016) y el β -zearalenol (β -ZEA) que es inofensivo. La segunda vía se basa en una reducción en el doble enlace entre el carbono 11 y 12, formando Zearalanona (ZAN) (Pleadin 2015). Estas vías permiten que pueda secretarse en la leche de una vaca en lactación y encontrarse en la misma (Zinedine *et al.* 2007).

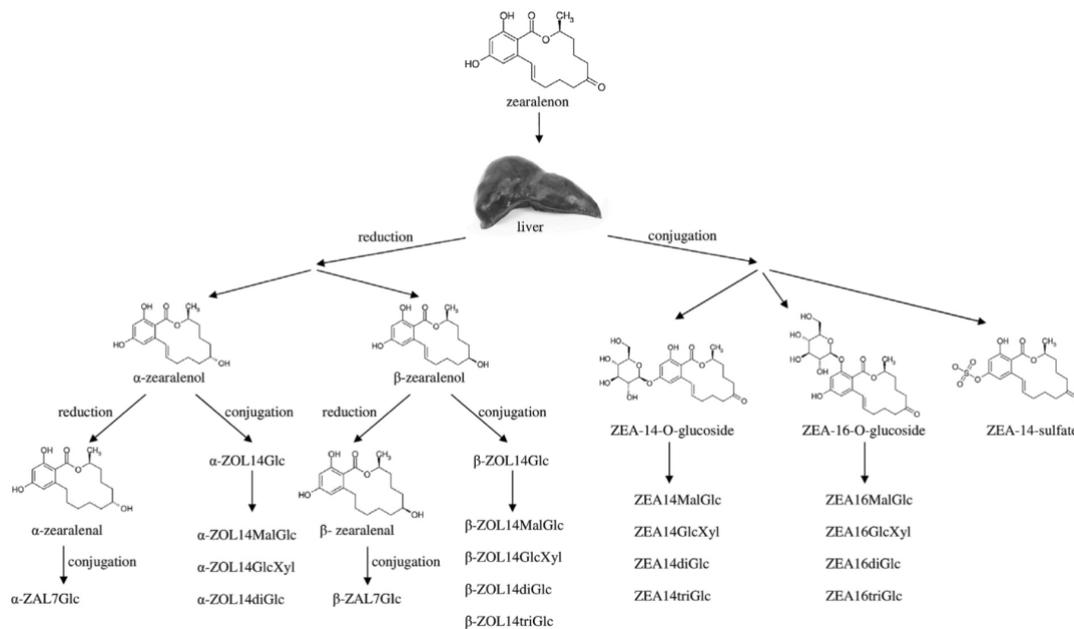


Figura 2: Bioconversión de ZEA

Fuente: Rogowska *et al.*(2019)

ZEA, a diferencia de las AF, no es cancerígena, pero como se menciona anteriormente tiene efectos estrogénicos por su capacidad de adoptar una configuración semejante al 17- β -estradiol y por ende unirse a sus receptores (Becker-Algeri *et al.* 2016), produciendo inhibición de la maduración folicular y la ovulación por la reducción de la concentración de FSH, dando lugar a casos muy significativos de hiperestrogenismo, con vulvas dilatadas y enrojecidas (vulvovaginitis y edemas de vulva), cuadros de hiperestrogenismo con tumefacción e hipertrofia de la vulva, útero, glándula mamaria y pezones (Gimeno y Martins 2011). La afinidad y el poder relativo de la estrogénicidad, en orden descendente es α -ZEA, α -zearalanol (α -ZAN), β -ZEA, ZAN, ZEA y β -zearalanol (β -ZAN) (Steinkellner *et al.* 2019). ZEA y sus metabolitos son causantes de problemas en la función reproductiva de humanos y animales (Li *et al.* 2020).

Existe todavía la duda abierta de si tales estrógenos representan un riesgo para la salud humana, pero se encontró que la ingesta diaria de estrógenos con leche puede ser mayor que los niveles de estrógeno en el suero humano, por lo que se necesitan más estudios para evaluar la importancia de la leche y los productos lácteos como fuente de estrógenos para los seres humanos (Stypuła-tr *et al.* 2015). No se ha determinado cuáles son los niveles máximos permitidos de ZEA en la leche de vaca y sus derivados, a pesar de su alta

producción y consumo a nivel mundial, porque su eliminación en la leche es muy baja (Prelusky *et al.* 1990). La transformación de ZEA a sus metabolitos se realiza en el hígado (principalmente) y por los protozoos del rumen (Malekinejad *et al.* 2006), luego se puede transferir a la leche cruda en forma de ZEA y α -ZEA (Bullerman y Bianchini 2007). En vacas lecheras alimentadas, con tres niveles diferentes de maíz contaminado con ZEA, se determinó que las tasas de conversión fueron de 0 a 0.0075 por ciento, lo que, en condiciones normales, no debería representar un riesgo debido a tasas de transición insignificantes (Winkler *et al.* 2015).

Cabe mencionar que la microbiota del rumen, formada por protozoos y bacterias, en bovinos sanos, constituye el primer sistema de defensa, disminuyendo el contenido de contaminación por micotoxinas de los alimentos, minimizando el riesgo de excreción en la leche; sin embargo, en animales enfermos o cuando existe una contaminación excesiva por micotoxinas en sus dietas, o a su vez cambios en la dieta, esta línea de defensa puede resultar ineficaz (Becker-Algeri *et al.* 2016). Se sugirió que podría haber alteraciones en la degradación de esta micotoxina, dependiendo de la proporción de alimentos concentrados contaminados, fermentación ruminal o alteraciones hepáticas asociadas en la formación y volumen de bilis (Dänicke *et al.* 2014).

2.3 MICOTOXICOSIS EN ANIMALES PRODUCTIVOS

En un estudio de exposición a largo plazo en vacas lecheras, las cuales consumieron dietas naturalmente contaminadas con concentraciones bajas de ZEA y AFB₁, se determinó que éstas micotoxinas pueden tener una influencia negativa en el recuento de células somáticas, los parámetros sanguíneos y la inmunidad de los animales; también determinaron que la adición de un aditivo anti-micotoxina a la dieta de vacas lecheras puede prevenir muchos de estos efectos (Jovaisiene *et al.* 2016).

Otro estudio en vacas lecheras alimentadas con tres diferentes niveles de maíz contaminado con ZEA, determinó que las tasas de conversión para ZEN fueron de 0 a 0.0075 por ciento, independiente de la exposición, y concluyeron también que estaban por debajo o cerca de los límites máximos permitidos en el alimento, no representando un riesgo para los consumidores debido a las tasas de transición insignificantes (Winkler *et al.* 2015). Otra

investigación con vacas lecheras alimentadas con proporciones graduadas de maíz contaminado con toxina *Fusarium*, concluyó que la ingesta de DON y ZEA de 0.5 mg ZEN/kg y 5 mg DON/kg no tuvo efectos considerables en el parámetro de rendimiento de las vacas lecheras y que el aumento de las concentraciones plasmáticas de ZEA y DON pudo indicar la exposición de toxinas a través de las dietas (Winkler *et al.* 2014). En otra publicación para determinar los efectos de la alimentación de una mezcla de maíz contaminado con micotoxinas de *Fusarium*, sobre la condición física, pero esta vez en cerdas gestantes y lactantes y el desarrollo de su descendencia, después de la fase experimental, los resultados indicaron que el consumo de ZEA condujo a una reducción en la ganancia de masa de la cerda, durante la gestación; también se redujo el número total de fetos, el número de lechones nacidos y el peso al nacer de la camada ($P \leq 0.05$) (Zhang *et al.* 2015).

En investigaciones sobre la citotoxicidad de AFM₁, ocratoxina A (OTA), ZEA y a-zearalenol (a-ZOL), individualmente y en combinación, en células Caco-2 humanas, se demostró que OTA y AFM₁ tenían una citotoxicidad similar, pero que fue mayor que la de ZEN y a-ZOL, después de una exposición de 72 h; así mismo, indicaron que la presencia de OTA, ZEN, o a-ZOL con AFM₁ condujo a citotoxicidad aditiva y sinérgica en la mayoría de las combinaciones; la citotoxicidad de AFM₁ aumentó dramáticamente en presencia de OTA, ZEA o a-ZOL ($p \leq 0.01$), indicando que los LMR establecidos para AFM₁ deben ser reevaluados considerando su co-ocurrencia frecuente con otras micotoxinas en alimentos para bebés que contienen leche y cereales (Gao *et al.* 2016).

Se realizaron experimentos de campo para identificar el impacto de las lluvias post-floración sobre la concentración de ZEA en el grano de trigo cosechado, demostrando al final de la investigación que las precipitaciones post-floración pueden aumentar significativamente la ZEA en el trigo (aumentando aún más con una cosecha tardía), pero puede reducirse significativamente con la aplicación de prothioconazol; así mismo, se mostró que en ausencia de humedad en la estación tardía, la ZEA se mantiene a concentraciones muy bajas incluso cuando el trigo es severamente afectado por *Fusarium* (Kharbikar *et al.* 2015).

En los animales domésticos, los daños hepáticos son los principales problemas que ocasionan las dosis elevadas de AF, siendo los bovinos de leche y el ovino más resistentes que el porcino o las aves; otros factores que influyen en los daños que pueden causar las AF

son la edad, actividad hormonal y nutricional, y factores externos como el estrés medioambiental y la duración/dosis (agudo o crónico) de la ingesta (Rubio *et al.* 2011). Varios estudios han demostrado que las micotoxinas alteran la salud de las vacas lecheras, su reproducción y producción, ocasionando graves y grandes pérdidas económicas en los ganaderos (Bani Ismail *et al.* 2020, Jiang *et al.* 2019, 2020, Kosicki *et al.* 2016).

En intoxicaciones crónicas en animales, los primeros signos clínicos son falta de apetito, disminución del crecimiento e incluso la pérdida de peso, en resumen, la improductividad en general; por lo tanto en animales lecheros ocasiona una disminución de su producción, con disminución o no de la temperatura corporal, descamación de la piel de los labios, prolapso de recto y edema en la cavidad abdominal, lo que se traduce en pérdidas económicas para el productor, debido a que, a pesar de que los animales no muestran signos de enfermedad, la producción de leche sí se verá afectada; si la intoxicación es aguda, el animal podría morir o habría que sacrificarlo (Rubio *et al.* 2011). En un estudio realizado en México, en vacas lecheras alimentadas con dietas contaminadas naturalmente con AF en concentración de $8.1 \pm 5.2 \mu\text{g/kg}$, no se pudo apreciar enfermedad clínica en 90 vacas Holstein, pero sí se apreciaron variaciones en valores bioquímicos de los animales, especialmente la concentración sérica de albúmina, proteína total y glutatión. Sin embargo, pese a las bajas dosis de micotoxinas pero expuestas a largo plazo, se pudo determinar aflatoxicosis subclínica, lo que se tradujo en fallas en las tasas reproductivas de los animales (Hernandez-Valdivia *et al.* 2021).

2.4 FACTORES QUE INFLUENCIAN LA PRESENCIA DE MICOTOXINAS EN LECHE

La presencia de hongos ocasiona la presencia de sus toxinas, y las mismas pueden estar presentes en los alimentos desde el crecimiento de los cultivos o luego de la cosecha; pero también pueden contaminarse durante el almacenaje, transporte, procesado y utilización de los piensos en la dieta animal (IFST 2015). Dentro de las principales causas de contaminación se encuentran la temperatura, humedad y la actividad de diferentes insectos (condiciones ambientales, época del año y de manejo) y el tipo de cultivo, disponibilidad de agua (época del año). Así mismo es importante conocer las condiciones de almacenaje,

humedad, temperatura, limpieza, uso de conservantes y de atrapadores de toxinas (Gimeno y Martins 2011, Soriano 2007).

En Argentina, se determinó que los niveles de AF, DON y ZEA en el ensilaje de maíz y los alimentos concentrados fueron los factores más correlacionados con las concentraciones de micotoxinas en la leche (Signorini *et al.* 2012). Mientras que en un estudio realizado, por un año, en una sola granja lechera grande ubicada en la región norte del Perú, se encontró que el 16 por ciento de las muestras (n=529) contenían niveles por AFM₁ en leche cruda, por encima del nivel máximo permitido por la Unión Europea, debido a que las materias primas con las que se fabrica el alimento para las vacas contienen niveles de AFB₁ por encima de los límites permitidos, en la siguiente relación: 2.59 por ciento de las muestras de maíz, 20 por ciento en soya entera, 20 por ciento en trigo, 46.4 por ciento en harina de soya y 50 por ciento en semillas de algodón, encontrándose mayor presencia, tanto de AFB₁ y AFM₁, en el mes de diciembre correspondiente a la primavera local (Salazar *et al.* 2021).

Como se ha explicado anteriormente, la presencia de AFM₁ en la leche se debe al consumo de alimentos contaminados con AFB₁ por vacas lactantes (Abyaneh *et al.* 2019, Van Eijkeren *et al.* 2006), por lo tanto es necesario identificar los factores de riesgo, dentro de los sistemas de producción de leche que están asociados a la presencia de AF, considerándose fundamental para la formulación de programas y políticas de control por parte de los países (Patyal *et al.* 2020).

Actualmente existen varias estrategias para reducir los niveles de micotoxinas, por ejemplo, se determinó que los sobrenadantes libres de células obtenidos del suero de leche después de la fermentación por gránulos de kefir (CIDCA AGK1) tienen efectos contra el crecimiento de *Fusarium graminearum* y la consecuente producción de ZEA, ya que tiene actividad antifúngica sobre el hongo e inhibe también la producción de micotoxinas, pero de una forma dependiente de la cepa (Gamba *et al.* 2016). Datos que coinciden con estudios que usaron gránulos de kéfir, donde los resultados mostraron que los microorganismos de dichos granos adsorben del 82 a 100 por ciento de AFB₁, ZEA y ocratoxina A (OTA) cuando se cultivan en leche; indicando que las cepas principales que fueron capaces de adsorción de micotoxinas fueron identificadas como *Lactobacillus kefir* (KFLM, la más activa, adsorbiendo del 80 al 100 por ciento), *Kazachstania servazzii* (KFGY7, retuvo más

micotoxina después de los experimentos de desorción, con valores de 65, 69 y 67 por ciento para AFB₁, OTA y ZEA, respectivamente) y *Acetobacter syzygii*; sugieren que el consumo de Kefir puede ayudar a reducir la absorción gastrointestinal de las micotoxinas y, en consecuencia, reducir sus efectos tóxicos, pudiendo tener una nueva característica biobiótica que sería la adsorción de micotoxinas (Ben *et al.* 2017).

2.5 TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE MICOTOXINAS: INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMA (ELISA) E INMUNOCROMATOGRAFÍA DE FLUJO LATERAL (LFIA)

En el mercado se encuentran varias pruebas para análisis y detección de micotoxinas. Las pruebas rápidas son fáciles de realizar, mientras que los métodos de referencia requieren mayor tiempo y son más costosos, pero los resultados son mucho más precisos (Olejniczak 2019). Las pruebas se dividen en: 1) de screening y 2) de confirmación (Santos Pereira *et al.* 2019, Soriano 2007), donde las más comunes son el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y el inmunoensayo de flujo lateral (LFIA), para las primeras, y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) combinada con la espectrometría de masas (LC/MS), como método de referencia (Olejniczak 2019).

Las técnicas de screening son altamente sensibles, eliminan rápidamente muestras negativas a micotoxinas y son económicas, pero tienen baja especificidad. Algunas pruebas incluyen inmunoensayos, biosensores y las no invasivas, como el Radioinmuno ensayo (RIA), ELISA, LFIA e inmunoensayo de polarización de fluorescencia (FPIA) (Santos Pereira *et al.* 2019) utilizan anticuerpos como reactivos, y si utilizan enzimas, se consideran inmunoensayos enzimáticos, lo cual cuantifica una sustancia al producirse una intensidad de color transformada a números absolutos por lectores fotométricos (Crowther 2009).

Debido a que las micotoxinas tienen bajo peso molecular, los límites de detección deben ser muy bajos, por lo que el método seleccionado debe ser capaz de detectar pequeñas cantidades de estas toxinas (Turner *et al.* 2015), procurando que sean de fácil uso, precisos y rápidos para poder ser detectados en alimentos aún en bajos niveles de concentración. Dentro de éstas técnicas se encuentran los inmunoensayos tipo ELISA y LFIA (Maragos 2016) con las cuales se realizó el presente estudio.

La técnica de ELISA es de bajo costo, fácil de utilizar y relativamente disponible en todos los países (Otieno *et al.* 2013), por lo que es considerada el ensayo de screening más usado para la detección de micotoxinas, pues es rápida, cuenta con un alto índice de repetitividad y sensibilidad (Pleadin *et al.* 2019). Detecta micotoxinas como antígenos, las cuales se juntarán con anticuerpos específicos y reaccionarán con una enzima reveladora (Santos Pereira *et al.* 2019). Es una técnica precisa y confiable, teniendo como principales ventajas la rapidez, costo más accesible y es ideal para tener una primera estimación. Entre las desventajas mencionaremos que solo se pueden detectar en ciertas materias primas, no analiza todas las micotoxinas y se necesitan al menos 30 muestras para cada kit (Olejniczak 2019). Se deben tomar las precauciones de seguridad de las personas que manipulan el kit y observar las medidas de eliminación correcta, pues sus reactivos pueden ser peligrosos para los analistas y para el medio ambiente (Shi *et al.* 2019).

La cromatografía permite identificar muchas sustancias químicas (Gu *et al.* 2018), siendo una variación económica la técnica de LFIA, pues permite la detección rápida de analitos específicos (Welandar 2017) inclusive *in situ* (Rahman *et al.* 2019). Su fundamento es la migración de la muestra por medio de un flujo lateral a través de una membrana porosa sobre una almohadilla absorbente (Oliveira-Rodríguez *et al.* 2016). El movimiento de la muestra líquida, pasa a lo largo de una tira de material polimérico, atravesando varias zonas donde se han unido las moléculas que ejercen interacciones más o menos específicas con el analito (Posthuma-Trumpie *et al.* 2009). Sus ventajas incluyen la rapidez en el análisis, es económica y no requiere de equipos especiales; sin embargo, no existen pruebas para todas las micotoxinas, siendo solo disponibles para AF, DON, ZEA y FUM (Olejniczak 2019).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LOCALIZACIÓN

Para cuantificar la presencia de AFM₁ y ZEA en leche cruda producida en Ecuador, se tomó muestra de tres provincias ecuatorianas: Pichincha (la mayor productora de la Sierra y del Ecuador), Manabí (la mayor productora de la Costa) y la que se encuentra en medio de las dos anteriores, que es Santo Domingo de los Tsáchilas (ubicada en la región Costa). Las tres provincias constituyen la región centro-norte de Ecuador y representan alrededor del 30 por ciento de la producción de leche ecuatoriana (Figura 3).

La sierra o región interandina, donde se encuentra la provincia de Pichincha, tiene un clima templado frío durante todo el año; mientras que en la región costera (Manabí y Santo Domingo de los Tsáchilas) el clima es continuamente cálido. No existen estaciones climáticas en Ecuador, sólo existen un período lluvioso, entre noviembre y mayo, y un período seco, entre junio y septiembre (INAMHI 2006). La provincia de Pichincha tiene una temperatura entre 5-20 °C, 70-75 por ciento de humedad y se encuentra a una altitud entre 2500-3200 metros sobre el nivel del mar. Manabí dispone de una temperatura ambiente que oscila entre 20-35 °C, con 82-90 por ciento de humedad relativa y está entre 150-300 metros sobre el nivel del mar. Santo Domingo de los Tsáchilas tiene una temperatura entre 21-32 °C, con 80-90 por ciento de humedad y está ubicada a una altura entre 150 -300 metros sobre el nivel del mar.

3.2 MATERIALES

3.2.1 Recolección y duración

Se recolectaron muestras ($n=209$) en los meses de abril y noviembre (época lluviosa), junio y agosto (época seca) de 2019. De las muestras recolectadas, el 72.3 por ciento pertenecían a la provincia de Pichincha (151/209), el 22.9 por ciento a Manabí (48/209), y 4.8 por ciento a Santo Domingo de los Tsáchilas (10/209). En cuanto a la época climática, el 53.1 por ciento correspondió a la época de lluvias (111/209) y el 46.9 por ciento a la época seca (98/209).



Figura 3: Mapa de Ecuador marcado las provincias donde se realizó el muestreo.

3.2.2 Muestras y muestreo

Cada muestra de leche constituyó una Unidad Observacional. Se recolectaron muestras de leche cruda dependiendo del volumen de producción de cada provincia, siendo mayor en Pichincha, seguida de Manabí y luego Santo Domingo de los Tsáchilas (Anexo 1).

Las muestras recolectadas provinieron de granjas lecheras pequeñas (26/209), medianas (127/209) y grandes (56/209). El criterio para clasificar a los proveedores fue realizado de acuerdo al número de vacas en producción lechera, de la siguiente manera:

1. *Pequeños productores*: Entre 1 a 20 vacas en producción.

2. *Medianos productores*: Entre 21 a 100 vacas en producción.
3. *Grandes productores*: Más de 100 vacas en producción.

Respecto a los sistemas de producción, la clasificación fue:

1. *Intensivo*: Ganado mantenido en condiciones de estabulación.
2. *Extensivo*: Ganado mantenido en pastizales y desarrollado en terrenos.
3. *Mixto*: Ganado que pasa parte de su tiempo en pastizales y parte en estabulación.

Las muestras de leche fueron recolectadas directamente de los tanques de enfriamiento de cada granja (Anexo 1), siguiendo las pautas de muestreo de leche indicadas por la NTE INEN-ISO 707 (INEN 2014). Posteriormente fueron refrigeradas y transportadas mediante hieleras a una temperatura entre 2 y 5°C al Laboratorio de Control de Calidad de la Leche de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Central del Ecuador, donde fueron almacenadas a -20 °C hasta el respectivo análisis.

3.3 MÉTODOS

3.3.1 Preparación y análisis de las muestras

Todos los análisis se realizaron siguiendo la metodología indicada por las técnicas usadas. Se utilizó la indumentaria adecuada, mandil, cofia, mascarilla y guantes de nitrilo [Herenco Group, Skolgatan 24, Jönköping, Sweden]. Antes de realizar el análisis, las muestras de leche fueron descongeladas a temperatura ambiente, centrifugadas a 4000 giros/minuto, durante 10 minutos y la capa de grasa de la parte superior de la leche fue descartada.

Para la prueba de AFM₁ por LFIA, no se realizó ninguna dilución en la leche. Mientras que, para la medición de ZEA por ELISA, se diluyeron 20 µl de la muestra de leche descremada con metanol [Merck, Darmstadt, Germany], al 35 por ciento con un factor de dilución de 1:10. Todos los reactivos se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su uso y se homogenizaron por inversión lenta. Fueron preparados apenas los volúmenes necesarios para la cantidad de pozos utilizados en la placa de ELISA y minutos antes de realizar el análisis.

En el ensayo de ELISA, la solución de lavado fue de 1X (1X Wash Solution). Para la mezcla de anticuerpos de ZEA, se mezcló 1 volumen del Anticuerpo de ZEA con 1 volumen de Conjugado Anticuerpo – con peroxidasa de rábano (HRP #2). Esta mezcla se utilizó dentro de los 5 minutos después de su preparación, pues un mayor tiempo de almacenamiento puede dar como resultado valores de detección más bajos.

3.3.2 Análisis de AFM₁ en leche cruda por LFIA

Se utilizaron las pruebas de análisis AFLA M₁-V VICAM® (Vicam, 34 Maple Stret, Milford, MA 01757, USA) para la detección de anticuerpos monoclonales específicos para AFM₁. Las muestras se incubaron en una incubadora Delvotest® DSM-MiniS-11548 (Nangzhou Allsheng Instrument Co., Ltd., Building 1 y 2, Zheheng Science Park, Zhuantang Town, Xihu District, Hangzhou, China) y la lectura se realizó con un Lector Vertu de flujo lateral 1648 (Vicam, 34 Maple Stret, Milford, MA, EE. UU.), cuyo detector óptico se orienta a lo largo de la tira reactiva y transforma los datos en una concentración de micotoxinas a través de una curva de calibración. El kit mide AFM₁ con límites de detección de 0.025 µg/kg (25 ppt) y límite máximo de 0.75 µg/kg (750 ppt).

Para iniciar el proceso, se debe calibrar el lector Vertu, lo cual se consigue escaneando el código de barras del kit, el cual emitirá un sonido cuando se acepte el código, e indicará el número de lote de las tiras y la micotoxina a analizar. La muestra de leche, de 200 µl, se añadió al vial de prueba de tiras AFLAM₁-V que contenía el conjugado. Luego se mezcló manualmente 3 veces durante 5 segundos cada una y se incubó a 40°C durante 10 min con la tira reactiva. Posteriormente la tira fue insertada en el lector Vertu, se presionó la tecla central del lector (OK) y se procedió con la lectura. El resultado apareció directamente en la pantalla en diez segundos (Anexo 2).

3.3.3 Análisis de ZEA en leche cruda por ELISA

La técnica de ELISA consiste en un análisis colorimétrico competitivo, en donde anticuerpos contra ZEA están adheridos en cada uno de los pocillos de la placa. Aquí se agregó la muestra de leche junto ZEA conjugadas con HRP. Si ZEA estuviese presente en las muestras, competiría por el anticuerpo del pocillo dejando a un lado las micotoxinas conjugadas con HRP, por lo que una vez que adicionáramos el sustrato, se formaría una coloración con

intensidad inversamente proporcional con la concentración de micotoxina presente en la leche cruda analizada. Se utilizaron los Kits de ensayo MaxSignal® ZEARALENONE ELISA [Bioo Scientific Corporation, 7050 Burlleson Rd – Austin, TX, USA], el cual es un inmunoensayo enzimático competitivo para el análisis cuantitativo de ZEA. La lectura de las microplacas se realizó con el equipo Stat Fax 3200-2260 [Awareness Technology, Inc, Palm City, FL, USA] usando una longitud de onda de 450 nm.

El kit tiene una alta sensibilidad (0.1 ng/g o µg/kg) y bajo límite de detección para la leche (0.1 µg/kg), extracción de alta recuperación (>80 por ciento), rápido (menos de 1 hora) y rentable; alta reactividad cruzada con ZEN (138 por ciento), α-ZEN (91 por ciento) y α-ZAN (69 por ciento) y con alta reproducibilidad. Posee una especificidad de ZEA: 100 por ciento, ZAN: 138 por ciento, α-ZEA: 91 por ciento, β-ZEN: 21 por ciento, α-ZAN: 69 por ciento y β-ZAN: 6 por ciento. El kit incluyó soluciones estándar de ZEA de 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1.5, 4.5 y 25 ng/ml o µg/kg, que se utilizaron para generar curvas de regresión entre concentración de ZEA y la densidad óptica.

La leche descremada fue analizada siguiendo las instrucciones del fabricante y realizando los análisis por duplicado. Se agregaron 50 µl de cada estándar de ZEA en orden ascendente, de baja a alta concentración. En los siguientes pocillos se agregaron 50 µl de cada muestra y posteriormente 100 µl de Conjugado ZEA-HRP. Se homogenizaron las soluciones manualmente mediante movimientos suaves de la placa durante 1 minuto. Luego de incubar la placa a temperatura ambiente, por 30 min, se decantó completamente la solución de los pocillos para desecar el líquido. Se realizó el lavado de placa por 3 ocasiones con 300 µl de solución de lavado 1X. Agregamos 100 µl de sustrato TMB a cada pocillo, mezclando suavemente la placa durante un minuto e incubando a temperatura ambiente por 15 minutos. Finalmente se colocaron 100 µl de la solución de parada (Stop Buffer) para detener la reacción enzimática. Se limpió con un paño la parte inferior de la placa para evitar humedad o huellas dactilares que interfieran con las lecturas y se dio lectura inmediatamente en el lector de placas a una longitud de onda de 450 nm (Anexo 3).

Para diseñar la curva estándar en base a la absorbancia relativa media (por ciento), se puede utilizar la fórmula *Estándar de absorbancia (o muestra) x 100*, la cual se divide para la *Absorbancia estándar cero*, la cual es proveniente de cada estándar de referencia en función de su concentración en ng/mL en una curva logarítmica. Con los valores medios de

absorbancia relativa para cada muestra, se determina la concentración de ZEA a partir de la curva estándar. En la investigación utilizamos el programa de análisis ELISA MaxSignal® en Excel entregado por el propio proveedor, el cual realiza este procedimiento automáticamente.

3.3.4 Determinación de posibles factores que influyen la presencia de micotoxinas

Mientras se realizaba el muestreo, se aplicó una encuesta a los productores (Anexo 1), en base a una adaptación de un estudio similar realizado en Argentina (Michlig et al. 2016), en la que cada productor encuestado respondió un cuestionario de opción múltiple, teniendo una encuesta para la Costa (Anexo 4) y otra para la Sierra (Anexo 5). Se consultó sobre la dieta que recibían sus animales en los días previos al muestreo, así como las distintas características de sus sistemas de producción, constando de las siguientes preguntas: a) Tipo de alimento (pasto, silo, heno, pienso concentrado); b) Tipo de pasto (leguminosas, gramíneas y variedad de cada una); c) Materia prima del silo y forma de almacenamiento; d) Tipo de heno y sus ingredientes; e) Tipo de alimento concentrado (preparado o elaborado en la propia finca) y cómo se almacena; f) Tamaño de la finca (Pequeña, Mediana, Grande); y g) Sistema de producción (Mixto, Intensivo, Extensivo).

3.3.5 Tipo de investigación

La investigación fue observacional; analítica transversal (Rojas 2015) para los datos de las poblaciones; fue determinado la presencia, o no, de AFM₁ y ZEA en leche cruda de pequeños, medianos y grandes productores de dos regiones de Ecuador (Interandina y Costa), en dos épocas climáticas (seca y lluviosa), y para los factores de riesgo que hubieran por la presencia de las mismas, se planteó inicialmente el Diseño Completamente al Azar (DCA).

3.3.6 Análisis estadístico

Todos los resultados se expresaron como concentraciones media, mínima y máxima de AFM₁ y ZEA. Antes del análisis en DCA, se realizó la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov, obteniendo un valor de probabilidad de 2.2×10^{-16} ($p \leq 0.05$), no observándose una distribución normal de los datos, razón por la cual se utilizaron pruebas no paramétricas (Celis De La Rosa y Labrada 2014). Se utilizó la prueba de Kruskal Wallis

para comparar los resultados de AFM₁ y ZEA en leche cruda por provincia, tipo de productor, sistema de producción y meses de muestreo. En el caso de diferencias significativas, se realizó un análisis post-hoc utilizando la prueba de Mann-Whitney con una corrección de Bonferroni para disminuir la probabilidad de error tipo I. También se utilizó la prueba de Wilcoxon para comparar los valores correspondientes a la estación y región climática.

Debido a las muy bajas concentraciones de ZEA en la leche, no se pudo realizar el análisis de factores de riesgo. En el caso de AFM₁ en leche, los resultados y las encuestas fueron tabuladas en Hoja de Microsoft Excel. Mediante el uso de tabla de frecuencias, se obtuvo el porcentaje de cada alimento en relación a los niveles de AFM₁ que superaban el límite máximo permitido de las normativas ecuatoriana y europea; un intervalo de confianza al 95 por ciento para la proporción de muestras que incumpliesen con la normativa fue generado. El nivel de AFM₁ en la leche cruda de las explotaciones lecheras de Ecuador se utilizó como variable dependiente y otros factores cualitativos como variables explicativas. Se realizó un ajuste a un modelo lineal utilizando mínimos cuadrados ponderados con la finalidad de tomar en cuenta la sobredispersión (heterocedasticidad) existente en las diferentes combinaciones de niveles de los factores. Para los resultados se realizó una tabla del Análisis de Variancia (Anova) para los factores en estudio con las sumas de cuadrados tipo III y se aplicó la prueba de comparación múltiple de Tukey, con la finalidad de establecer las diferencias entre los niveles de los distintos factores.

El procesamiento de datos se llevó a cabo aplicando el software estadístico “R” (R Core Team 2020) [RStudio Inc. Boston, MA, USA], y el nivel de significación estadística fue establecido en un nivel Alpha de $p \leq 0.05$ para todas las comparaciones.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 PRESENCIA DE ZEA EN LECHE CRUDA DE ECUADOR

Se determinó que el 99.5 por ciento (208/209) de las muestras de leche cruda analizadas fueron positivas para ZEA, pero todas las muestras de leche analizadas tenían niveles muy por debajo de los límites máximos permitidos por diferentes normativas alimentarias, que oscilan entre 30 µg/kg y 1000 µg/kg (Codex-Alimentarius 1999, European-Commission 2006, EFSA 2011, 2016, FAO 2004). En la Tablas 1 y 2, y en la Figura 4 se muestran los resultados obtenidos por cantones, provincias, meses, región climática, época climática, tipo de productor y sistema de producción.

Por cantones, el valor medio general de ZEA fue de 1.5 µg/kg; mientras que el valor mínimo fue de 0 µg/kg, el máximo de 10.2 µg/kg y la media más alta de 2.0 µg/kg, todos pertenecientes al cantón Chone de Manabí. Por las provincias en estudio, el valor mínimo fue de 0 µg/kg y el valor máximo de 10.2 µg/kg, siendo dos de ellas de Manabí; la media más baja, de 1.4 µg/kg, pertenece a Pichincha, mientras que la más alta fue de 1.6 µg/kg, de Manabí y Santo Domingo. Por los cantones y provincias de la investigación, el p-valor obtenido fue de 0.5683 y 0.6541, respectivamente ($p \geq 0.05$), por lo que no existen diferencias significativas entre ellos (Tabla 1).

En cuanto a la región climática, el valor mínimo fue de 0 µg/kg y el valor máximo fue de 10.2 µg/kg, ambos pertenecientes a la región de la Costa. La media más baja de 1.4 µg/kg corresponde a la región de la Sierra, mientras que la más grande, de 1.6 µg/kg, corresponde a la Costa. El valor p fue 0.8426 ($p \geq 0.05$), por lo que no existen diferencias significativas entre las regiones climáticas (Tabla 1).

Tabla 1: Valores mínimos, media y máximo de ZEA por cantón, provincia y región climática.

Variable		Mínimo ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Media ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Máximo ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Cantón				
Mejía	Pichincha	0.8	1.3 ^a	2.1
Quito	Pichincha	0.8	1.6 ^a	3.6
Cayambe	Pichincha	0.5	1.5 ^a	3.2
Pedro Moncayo	Pichincha	0.9	1.8 ^a	4.2
Rumiñahui	Pichincha	0.9	1.4 ^a	2.7
Chone	Manabí	0.0	2.0 ^a	10.2
El Carmen	Manabí	0.3	1.4 ^a	2.5
Alluriquín	Santo Domingo	1.0	1.6 ^a	3.5
Provincia				
Pichincha		0.5	1.4 ^a	4.2
Manabí		0.0	1.6 ^a	10.2
Santo Domingo de los Tsáchilas		1.0	1.6 ^a	3.5
Región climática				
Costa (Manabí y Santo Domingo)		0.0	1.6 ^a	10.2
Inter-andina (Pichincha)		0.5	1.4 ^a	4.2

Letras iguales indican que no existen diferencias significativas entre los diferentes lugares.

Pruebas estadísticas: 1) Kruskal Wallis: cantones, provincias; 2) Wilcoxon: región climática.

En los resultados por mes (Tabla 2), el valor mínimo de 0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ corresponde al mes de junio, mientras que el máximo de 10.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ corresponde a abril. La media más baja de 1.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ se encontró en el mes de junio y la más alta, de 1.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$, en abril. El p-valor fue 2.253e-07 ($p \geq 0.05$), por lo que existen diferencias significativas, entre los meses de abril vs junio, junio vs agosto, junio vs noviembre y agosto vs noviembre. Por época climática, encontrándose que el valor mínimo de 0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ correspondió a la época seca y el máximo de 10.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a la época de lluvias. La media más baja fue de 1.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (temporada seca) y la más alta fue de 1.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (temporada de lluvias). El p-valor obtenido fue 0.4469 ($p \geq 0.05$), por lo que no existen diferencias significativas entre las estaciones climáticas.

Tabla 2: Valores mínimos, media y máximo de ZEA por meses, región climática, tipo de productor y sistema de producción

Variable	Mínimo ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Media ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Máximo ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Meses			
Abril	0.3	1.9 ^a	10.2
Junio	0.0	1.1 ^a	2.0
Agosto	0.8	1.5 ^a	2.1
Noviembre	0.5	1.4 ^a	8.0
Época climática			
Lluviosa	0.3	1.6 ^a	10.2
Seca	0.0	1.4 ^a	8.0
Tipo de productor			
Pequeños	0.8	1.4 ^a	3.0
Medianos	0.0	1.5 ^a	10.2
Grandes	0.3	1.4 ^a	3.6
Sistema de producción			
Extensivo	0.3	1.4 ^a	4.0
Intensivo	0.8	2.8 ^a	10.2
Mixto	0.0	1.5 ^a	8.0

Letras iguales indican que no existen diferencias significativas entre los diferentes lugares

Pruebas estadísticas: 1) Kruskal Wallis: meses, tipos de productor y sistemas de producción; 2) Wilcoxon: época climática.

Por tipo de productor (Tabla 2), el valor mínimo fue de 0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y el valor máximo fue de 10.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, siendo ambos de medianos productores. La media más baja de 1.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ fue de los grandes productores, mientras que la media más alta fue de 1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ perteneciente al grupo de medianos productores. El valor de p fue 0.8225 ($p \geq 0.05$), por lo que no existen diferencias significativas entre los resultados entre los tipos de productores durante el período de estudio. En cuanto a los sistemas de producción, el valor mínimo de 0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ corresponde al sistema de producción mixto, mientras que el valor máximo (10.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$) al sistema intensivo. La media más baja fue de 1.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (sistema extensivo) y la más alta fue de 2.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (intensivo). El valor p fue 0.4368 ($p \geq 0.05$), por lo que no existen diferencias significativas entre los sistemas de producción.

En la Figura 4, el diagrama de caja presenta los valores de ZEA por meses, época climática, provincias, región climática, tipo de productor y sistemas de producción, donde se muestra una distribución relativamente pareja de cuartiles, sin embargo se aprecia una cola larga en las cajas del mes de abril, época lluviosa, provincia de Pichincha, región interandina, productores medianos y sistema extensivo de producción. Así mismo se presentan 2 valores atípicos (muy por encima de la media y en la parte superior de la figura), uno en el mes de abril y otro en noviembre, los cuales corresponden a la época lluviosa; también en productores medianos de la provincia de Manabí (región costa), uno de los cuales pertenece a un sistema de producción intensivo, y el otro a un productor mixto.

No existen estudios sobre la determinación de ZEA en leche cruda de Ecuador, por lo que esta investigación es pionera. Nuestros resultados de positividad son bastante superiores a los encontrados en diversos estudios, sin embargo, las concentraciones determinadas son bastante bajas. En China, la presencia de ZEA se determinó solo en el 23.3 por ciento de las muestras de leche cruda, el 16.7 por ciento en la leche pasteurizada y el 25 por ciento en la leche en polvo de varias granjas lácteas y diferentes supermercados en Beijing (Huang *et al.* 2014). En la leche de Montecarlo, se encontró una media de 0.39 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y se asoció con otras micotoxinas. También se detectó ZEA en el 9 por ciento de 185 fórmulas para lactantes a base de leche de vaca (Meucci *et al.* 2011), siendo el maíz la principal fuente de ellas (Coffey *et al.* 2009). En Argentina, ZEA se determinó en una concentración de 0.13 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en leche cruda, donde el ensilado de maíz y el alimento balanceado son los mayores reservorios de micotoxinas (Signorini *et al.* 2012) y en Portugal, se ha encontrado ZEA en el 100 por ciento de muestras de leche de una granja lechera (Viegas *et al.* 2019).

También se ha determinado ZEA en leche materna de Turquía, en una media de 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Dinleyici *et al.* 2018), mientras que en fórmulas infantiles de 4 marcas diferentes de Italia, ZEA se determinó en el 9 por ciento (7/185) de las muestras, con un valor máximo de 0.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$, α -ZEA en 26 por ciento (9/185), cuyo valor máximo fue de 12.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$, y β -ZEA en 28 por ciento (53/185) con un máximo de 73.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$. No se encontraron α -ZAN ni β -ZAN (Meucci *et al.* 2011).

Se necesitan más estudios para evaluar la importancia de la leche y sus derivados como fuente de estrógenos para seres humanos (Stypuła-tr *et al.* 2015). Si bien ZEA no es carcinógeno directo (Becker-Algeri *et al.* 2016), tiene efectos disruptivos sobre el equilibrio hormonal debido a su similitud con los estrógenos naturales (Jocsak *et al.* 2019, Kowalska *et al.* 2016), por lo que puede causar enfermedades del sistema reproductivo, incluidos cánceres de próstata, ovario, cuello uterino o mama (Rogowska *et al.* 2019). También es tóxico para las células hepáticas (Yoon *et al.* 2020), así como para el desarrollo de gametos y embriogénesis en humanos y animales (Yang *et al.* 2018). Puede producir pubertad precoz en niñas, trastornos de fertilidad y reproducción en mujeres (ELIKA 2013), reducción de testosterona, espermatogénesis e incluso feminización en hombres (Cao *et al.* 2019), causando daño a las células germinales y la estructura testicular (Yang *et al.* 2018).

Otro gran inconveniente es que ZEA, al igual que otras micotoxinas, puede bioacumularse en el organismo (Rogowska *et al.* 2019) lo que se convierte en un grave problema, porque en la leche puede encontrarse frecuentemente junto con OTA o AFM₁ (Zheng *et al.* 2018), que como se ha mencionado, no pueden ser destruidas fácilmente en los alimentos (Stadler *et al.* 2019, Pleadin *et al.* 2019, Zheng *et al.* 2018). Aunque por sí sola puede provocar estrés oxidativo en intestino delgado, íleon y ganglios linfáticos mesentéricos (Cheng *et al.* 2020), cuando se combina con varias micotoxinas, causa problemas más graves en la función intestinal (Wu *et al.* 2019) y citotoxicidad en células Caco-2 humanas (Gao *et al.* 2016). Por esta razón, es necesario tomar las medidas adecuadas para reducir los riesgos para la salud humana y animal (Bani Ismail *et al.* 2020).

Debido a las bajas concentraciones encontradas de ZEA en la leche cruda, no fue posible estadísticamente medir los factores de riesgo asociados a su presencia. Solamente fue posible medir dichos factores para AFM₁ y en las granjas donde su presencia superaba el límite permitido por la legislación europea. Debido a que la presencia de AFM₁ en leche se debe al consumo de alimentos contaminados con AFB₁ por las vacas lactantes (Abyaneh *et al.* 2019, Van Eijkeren *et al.* 2006), es necesario identificar los factores dentro de los sistemas de producción lechera que se encuentren asociados a la presencia de AF, lo cual es indispensable para la formulación de programas y políticas de control por parte de los países (Patyal *et al.* 2020).

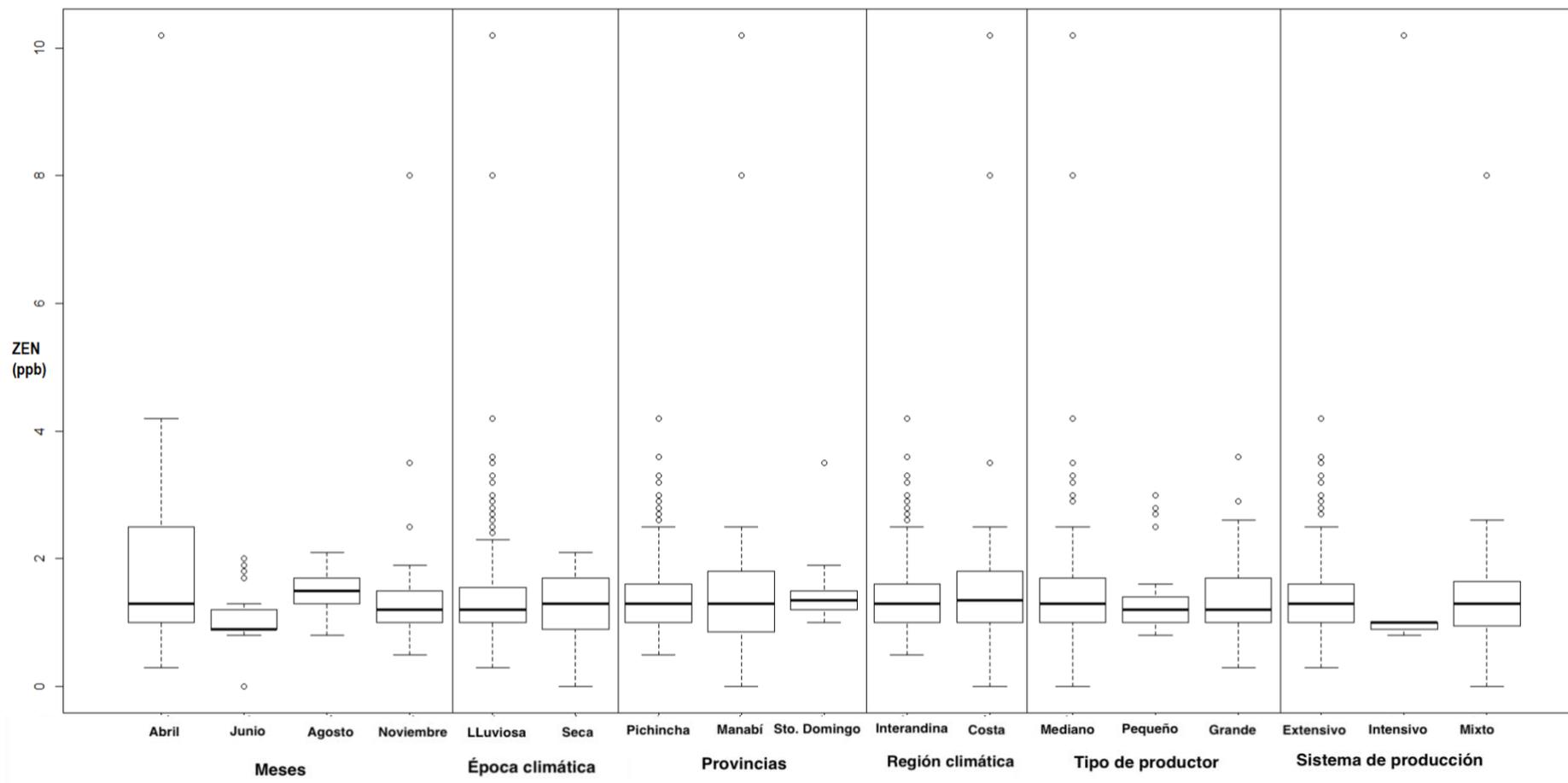


Figura 4: Diagrama de cajas con los valores por meses, época climática, provincias, región climática, tipo de productor y sistemas de producción para ZEA.

4.2 PRESENCIA DE AFM₁ EN LECHE CRUDA DE ECUADOR

Los resultados obtenidos por provincias, época climática, región climática y meses se muestran en la Tabla 3, y en la Figura 5. Se encontró AFM₁ en el 100 por ciento de las 209 muestras de leche cruda de diferentes provincias ecuatorianas, con una concentración promedio de 0.077 µg/kg. El análisis de la leche mostró que la provincia de Manabí tuvo un promedio (0.1256 µg/kg) de AFM₁ aproximadamente dos veces mayor que la media de la provincia de Pichincha (0.0639 µg/kg); curiosamente, la provincia de Santo Domingo tuvo un promedio (0.0485 µg/kg) de aproximadamente un tercio en comparación con Manabí, a pesar de ser provincias vecinas y compartir características climáticas similares.

El nivel de contaminación por AFM₁ en la leche difirió entre las provincias (valor de p de 5.332×10^{-5}), y hubo diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los resultados de las provincias durante el período de estudio, específicamente entre las provincias de Manabí y Pichincha y también entre Manabí y Santo Domingo (Tabla 3). Los resultados en las diferentes regiones climáticas, indicaron que la media más baja fue de 0.064 µg/kg perteneciente a la región interandina (Pichincha) y la más alta fue de 0.1123 µg/kg de la región costa (Manabí y Santo Domingo). Se obtuvo un valor de p de 0.0008957 ($p \leq 0.05$) y presentó diferencias significativas, siendo la región costera la que tuvo los niveles más altos de micotoxina (Tabla 3), seguramente por sus altas temperaturas y humedad, que son condiciones ambientales propicias para el crecimiento de hongos y la producción de micotoxinas. La estación climática también difirió en la contaminación por AFM₁, donde los niveles más altos se encontraron en la época seca (media de 0.0845 µg/kg), mientras que la media más baja, de 0.0701 µg/kg, correspondió a la temporada de lluvias (Tabla 3), encontrándose diferencias significativas entre las estaciones durante el período de estudio (valor de p de 0.005509).

Para los resultados en los diferentes meses de muestreo (Tabla 3), la media más baja fue de 0.0554 µg/kg, encontrada en noviembre (temporada de lluvias) y la más alta fue de 0.1082 µg/kg en junio (estación seca). Se observaron diferencias significativas entre los períodos de estudio (valor de p de 0.001406), específicamente entre abril-junio y junio-noviembre. Se observa que hubo varios valores más altos y atípicos en algunos casos en relación a las otras observaciones, especialmente para el mes de junio en la época seca (Figura 5). Esto

posiblemente se debió a que las lluvias fueron escasas durante este período, lo que provocó una escasez de material de pastoreo y, por lo tanto, una limitación para que los agricultores alimentaran a sus vacas con alimentos como silo (principalmente maíz), heno y alimento balanceado. Estos materiales son más propensos a la contaminación por *Aspergillus* y, por lo tanto, a la producción de Aflatoxinas.

Respecto a los tipos de productores, los medianos presentaron la media más alta (0.0817 $\mu\text{g}/\text{kg}$), mientras que la media más baja, de 0.0577 $\mu\text{g}/\text{kg}$, fue de pequeños productores. No se observaron diferencias significativas entre los resultados para diferentes tipos de productores (valor de p de 0.5976) durante el período de estudio (Tabla 3). En los casos de productores medianos con un sistema de producción extensivo (pastoreo), la cantidad significativa de valores atípicos posiblemente se pueda atribuir al uso correspondiente de alimento balanceado en el momento del ordeño.

Los valores obtenidos para diferentes tipos de sistemas de producción (Tabla 3) presentaron media más alta de 0.0837 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en los sistemas de producción mixta. Por otro lado, la media más baja de 0.0710 $\mu\text{g}/\text{kg}$ se observó para el sistema intensivo. Tampoco hubo diferencias significativas (valor de p de 0.3493) entre los sistemas de producción.

En la Figura 5, el diagrama de caja presenta los valores de AFM_1 por meses, época climática, provincias, región climática, tipo de productor y sistemas de producción, donde se muestra una distribución relativamente pareja de cuartiles, con excepción del mes de junio (época seca), provincia de Manabí, así como de la región Costa. Se aprecia también una cola larga en productores medianos y sistemas extensivos de producción. Así mismo, se presentan 4 valores atípicos (muy por encima de la media y en la parte superior de la figura), los cuales pertenecen a la siguientes variables: dos en el mes de abril (época lluviosa) y otros dos en junio (época seca), uno perteneciente a la provincia de Pichincha y los 3 restantes a Manabí, tres a medianos productores y uno a grandes, finalmente, tres pertenecientes a sistemas extensivos de producción y uno a un sistema mixto.

Tabla 3: Valores mínimos, media y máximos de AFM₁ obtenidos por provincial, región climática y época climática.

Variable	Mínimo (µg/kg)	Media (µg/kg)	Máximo (µg/kg)	p-valor
Provincia				
Manabí	0.0350	0.1256	0.7500	
Pichincha	0.0230	0.0639	0.7510	5.332 × 10 ⁻⁵ (<i>p</i> ≤ 0.05)
Santo Domingo de los Tsáchilas	0.0400	0.0485	0.0600	
Época climática				
Seca	0.0230	0.0845	0.7510	0.005509 (<i>p</i> ≤ 0.05)
Lluviosa	0.0250	0.0701	0.7500	
Región climática				
Costa	0.0350	0.1123	0.7500	0.0008957 (<i>p</i> ≤ 0.05)
Interandina	0.0230	0.0640	0.7510	
Meses				
Abril	0.0250	0.0862	0.7500	
Junio	0.0390	0.1082	0.7510	0.001406 (<i>p</i> ≤ 0.05)
Agosto	0.0230	0.0656	0.2260	
Noviembre	0.0250	0.0554	0.1690	
Tipo de productor				
Grande	0.0270	0.0768	0.7500	
Mediano	0.0230	0.0817	0.7510	0.5976 (<i>p</i> ≥ 0.05)
Pequeño	0.0280	0.0577	0.1700	
Sistema de producción				
Intensivo	0.0520	0.070	0.1050	
Mixto	0.0230	0.0837	0.7510	0.3493 (<i>p</i> ≥ 0.05)
Extensivo	0.0250	0.0761	0.7500	

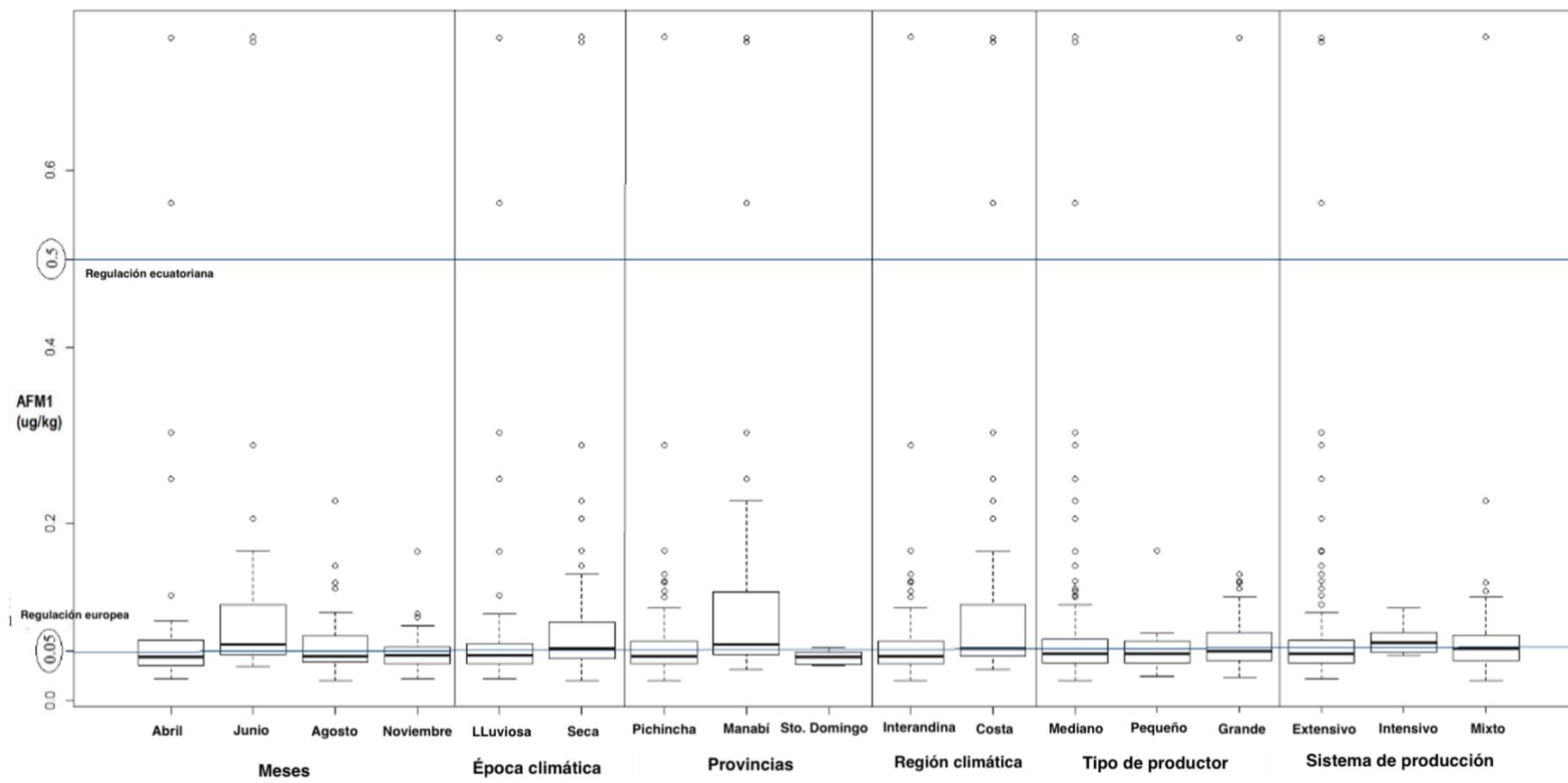


Figura 5: Diagrama de cajas con los valores por meses, época climática, provincias, región climática, tipo de productor y sistemas de producción para AFM₁.

Respecto al cumplimiento de la Normativa, solamente el 1.9 por ciento de las muestras (4/209) no cumplió con el límite máximo permitido establecido por la normativa ecuatoriana (0.5 µg/kg). De estas muestras, el 25 por ciento (1/4) correspondía a Pichincha (región interandina) y el otro 75 por ciento (3/4) a Manabí (región costera); ninguna muestra por encima del valor estándar correspondió a Santo Domingo de los Tsáchilas.

En comparación con la normativa europea, que permite un máximo de 0.05 µg/kg, el 59.3 por ciento (124/209) de las muestras no cumplen con la legislación antes mencionada. Al respecto, el 63.7 por ciento (79/124) de las muestras por encima de este límite procedían de Pichincha (región interandina), el 32.3 por ciento (40/124) de Manabí (región Costa) y el 4.0 por ciento (5/124) de Santo Domingo de los Tsáchilas (región costera). Considerando estos mismos estándares regulatorios, el 48.4 por ciento (60/124) de las muestras por encima del límite se recolectaron durante la temporada de lluvias, y el 51.6 por ciento restante (64/124) fueron de la temporada seca. Asimismo, el 28.2 por ciento (35/124) correspondía a grandes productores, el 59.7 por ciento (74/124) a medianos productores y el 12.1 por ciento (15/124) a pequeños productores. Además, el 77.4 por ciento (96/124) tiene un sistema de pastoreo extensivo, el 18.6 por ciento (23/124) realiza un sistema mixto (pastoreo y estabulados), y el 4.0 por ciento (5/124) son de sistema intensivo.

Algunos países podrían tener altos niveles de AFM₁ debido a la falta de conocimiento, tecnología e instalaciones deficientes de los productores, todo lo cual contribuye al crecimiento de hongos productores de toxinas (Rahmani *et al.* 2018). Por esa razón, muchos países han establecido diferentes límites máximos para AFM₁ en la leche cruda (Tabla 4); por ejemplo, la Unión Europea y algunos otros países usan 0.05 ug/kg, mientras que Estados Unidos, Latinoamérica (excepto Chile) y algunos países asiáticos usan 0.5 ug/kg.

En Ecuador existen pocos estudios de la presencia de AFM₁ en leche cruda. En nuestros resultados se encontró AFM₁ en el 100 por ciento de las muestras en las provincias que representan más del 30 por ciento de la producción total ecuatoriana con un promedio de 0.0774 µg/kg; esta media es mas del doble de la obtenida en 5 provincias de la región interandina ecuatoriana, donde observaron un promedio de 0.034 µg/kg (rango 0.019-0.07 µg/kg) en 50 muestras de leche cruda, provenientes de centros de acopio. En este mismo estudio, el 100 por ciento de las muestras analizadas estuvieron por debajo del límite máximo

establecido por la normativa ecuatoriana, y solo el 4 por ciento (2/50) de las muestras excedieron la normativa europea (González 2018). Así mismo, los datos actuales contradicen totalmente el estudio realizado en el cantón Biblán-Azuay-Ecuador, donde no se encontró presencia de AFM₁ en ninguna de las 88 muestras de 22 fincas de medianos productores (Ortiz y Cazar 2014).

Según la Tabla 4, los resultados obtenidos también contradicen con los de otros países de América Latina, cuyo promedio fue de 0.037 µg/kg (Molina *et al.* 2019). En Arequipa-Perú, no se encontraron residuos de AFM₁ (Ortiz 2009), mientras que en Argentina, la concentración de AFM₁ fue de 0.059 µg/kg, y esa leche superó el límite máximo del MERCOSUR (0.5 µg/kg) y la normativa de la UE en un 0.81 por ciento y un 32.65 por ciento, respectivamente (Signorini *et al.* 2012). En El Llano-México, el 54.16 por ciento de 216 muestras presentaron micotoxinas, pero ninguna excedió el límite permitido mexicano de 0.5 µg/kg y 27.31 por ciento excedieron el límite europeo (Miranda 2015). En el mismo país, se analizaron las fórmulas para lactantes y los investigadores encontraron que el 20 por ciento de las 55 muestras tenían valores de AFM₁ por encima del LMR de la UE de 0.25 µg/kg (Quevedo-Garza *et al.* 2020). Asimismo, en Valparaíso-Chile, el 36 por ciento de las 44 muestras analizadas excedieron la normativa europea (Núñez y Hervé 2018).

En países desarrollados se ha controlado la presencia de AFM₁ (Tabla 4), por ejemplo, entre 2013 y 2018, en 31702 muestras de leche cruda en Italia (556413 toneladas) presentaron un promedio mensual de entre 0.00719 y 0.02253 µg/kg (Serraino *et al.* 2019). En China, el 75.2 por ciento de las 133 muestras de leche cruda fueron positivas para AFM₁ (media de 0.0159 µg/kg), pero ninguna superó el límite chino o europeo (Xiong *et al.* 2020). Sin embargo, el 4.64 por ciento de 1207 (56/1207) muestras de leche en polvo para lactantes fueron positivas para AFM₁, pero ninguna superó el límite chino (Li *et al.* 2018).

En los países en desarrollo, por otro lado, el problema de AFM₁ es variable (Tabla 4). Por ejemplo, se informó un promedio general de 0.056 µg/kg en Irán, según un estudio de metanálisis (Khaneghahi *et al.* 2020). En la India, el 20.67 por ciento de 150 muestras contenían niveles superiores al límite permitido local (0.5 µg/kg) (Sharma *et al.* 2019). En Punjab-Pakistán, el 70 por ciento (n=690) de leche cruda estaban por encima del límite de 0.5 µg/kg (Akbar *et al.* 2019). En Canakkale-Turkia, solamente el 3.3 por ciento (n=120) excedieron los límites locales (Eker *et al.* 2019). Asimismo, las 175 muestras de leche de

Jordania contenían AFM₁, donde el 66 por ciento no cumplía la legislación europea y el 23 por ciento la estadounidense (Sharaf 2016). En Nairobi-Kenia, las 96 muestras de leche cruda contenían AFM₁, encontrándose que el 66.6 por ciento estaban por encima del límite europeo y el 7.5 por ciento superaba la reglamentación local (0.5 µg/kg) (Kuboka *et al.* 2019).

Tabla 4: Límites máximos permitidos para AFM₁ en leche cruda, en diferentes países y el contenido de varias investigaciones.

País	Límite Máximo (µg/kg)	Número de muestras	Media µg/kg	Muestras positivas a AFM ₁	Muestras ≥ 0.5 µg/kg	Muestras ≥ 0.05 µg/kg	Tipo de análisis	Límite de detección (µg/kg)	Referencia
USA	0.5								
UE	0.05								
		209	0.077	209 (100%)	4 (1.91%)	124 (59.3%)	LFIA	0.025	Este estudio
Ecuador	0.5	50	0.034	50 (100%)	0 (0%)	2 (4%)	LFIA	0.02	(González 2018)
		88	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	ELISA/SNAP	0.05	(Ortiz y Cazar 2014)
Perú	0.5	40	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	ELISA/SNAP	0.05	(Ortiz 2009)
Argentina	0.5	-	0.059	100%	(0.81%)	(32.65%)	-	-	(Signorini <i>et al.</i> 2012)
México	0.5	216	0.026	117 (54.16%)	0 (0%)	31 (27.31%)	ELISA	0.05	(Miranda 2015)
Chile	0.05	44	0.06	33 (75%)	33 (75%)	16 (36.4%)	HPLC-FL	0.0091	(Núñez y Hervé 2018)
Italia	0.05	31702	0.00719–0.02253	-	-	-	LFIA y ELISA	0.025	(Serraino <i>et al.</i> 2019)
China	0.5	133	0.0159	100 (75.2%)	0 (0%)	0 (0%)	LC-MS/MS	0.005	(Xiong <i>et al.</i> 2020)
Irán	0.1	77 estudios	0.056				Meta-análisis		(Khaneghahi <i>et al.</i> 2020)
India	0.5	150	0.262	77 (51.33%)	31 (20.67%)	46 (30.66%)	HPLC	0.052	(Sharma <i>et al.</i> 2019)
Pakistán	0.5	690	0.640	690 (100%)	483 (70%)	690 (100%)	ELISA	0.1	(Akbar <i>et al.</i> 2019)
Turquía	0.5	120	0.0051	107 (89.2%)	4 (3.33%)	13 (10.83%)	ELISA	0.005	(Eker <i>et al.</i> 2019)
Jordán	0.5	175	0.0689	175 (100%)	40 (23%)	115 (66%)	ELISA	0.025	(Sharaf 2016)
Kenia	0.5	96	0.2903	96 (100%)	7 (7.5%)	64 (66.6%)	ELISA	0.005	(Kuboka <i>et al.</i> 2019)

LFIA: Inmuncromatografía de flujo lateral; ELISA: Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas; SNAP: Software de proceso de evaluación no funcional; HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución; HPLC-FL: Cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia; LC-MS/MS: Cromatografía líquida junto con espectrometría de masas en tándem.

En cuanto a la época climática, algunos autores han indicado que no influye en la presencia de AFM₁ (Molina *et al.* 2019); sin embargo, se encontraron diferencias entre las estaciones en este estudio (p de 0.005509), donde se observaron los valores más altos para la estación seca. Este hallazgo es similar al estudio realizado en 48 muestras de leche de Chiapas-México, donde se obtuvieron promedios de 0.55 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en la época seca y 0.13 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en la época de lluvias. Esta observación se atribuyó a la alimentación de animales con ensilaje y piensos contaminados (Gutiérrez *et al.* 2013), ya que el estrés por calor y la sequía pueden provocar un aumento de las concentraciones de AFM₁ en la leche (Peña-Rodas *et al.* 2018). Sin embargo, otros autores han indicado que las concentraciones más altas ocurren en invierno, ya que la temperatura y la humedad podrían contribuir a la producción de AFB₁ en los alimentos recolectados o almacenados (Yunus *et al.* 2019, Ismail *et al.* 2015). Por ejemplo, el 100 por ciento de las muestras analizadas en Irán durante el invierno tenían las concentraciones más altas de AFM₁ (Dakhili *et al.* 2016), y en un estudio de metanálisis de 77 casos, también se determinó que los niveles más altos estaban en invierno (Khaneghahi *et al.* 2020). Esta conclusión también es corroborada por un estudio en Punjab-Pakistán, donde la media más alta, de 0.875 $\mu\text{g}/\text{kg}$, se encontró en invierno (Akbar *et al.* 2019).

4.3 FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A LA PRESENCIA DE AFM₁ EN LECHE CRUDA DE ECUADOR

En la Tabla 5 se detalla el tipo de pasto, henolaje, ensilaje y alimento balanceado consumido por los animales de las explotaciones muestreadas, en base a las 124 (de 2019) explotaciones ganaderas cuya leche contiene niveles superiores al máximo permitido por la legislación europea. La leguminosa más consumida fue el trébol blanco (*Trifolium repens*), mientras que, en el caso de las gramíneas, las más utilizadas son la mezcla de raygrass (*Lolium perenne*) con kikuyo (*Pennisetum clandestinum*), raygrass solo y pasto brachiaria (*Brachiaria brizantha*). Entre los productores que ofrecen ensilaje a sus animales, la mayoría maneja silo de maíz (*Zea mays*), y almacena en mayor medida en silo de bolsa. En cuanto a la alimentación con henolaje, el ingrediente principal fue raygrass, seguido de alfalfa (*Medicago sativa*), kikuyo y avena (*Avena sativa*). Finalmente, en cuanto a los alimentos balanceados, la gran mayoría ofrecen de marca comercial, mientras que la forma predominante de almacenamiento fue en bodega cerrada.

Tabla 5: Tipo de pasto, henolaje, ensilaje y alimento balanceado consumido por los animales (124/209) cuya leche incumple la normativa europea para AFM₁.

Alimento	Muestras	Porcentaje (%)
Pasto: Leguminosas	52/124	43.4
Trébol blanco (<i>Trifolium repens</i>)	48/52	92.3
Mezcla de alfalfa (<i>Medicago sativa</i>) y trébol blanco (<i>Trifolium repens</i>)	3/52	5.8
Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>)	1/52	1.9
Pasto: Gramíneas	122/124	98.4
Mezcla de raygrass (<i>Lolium perenne</i>) y kikuyo (<i>Pennisetum clandestinus</i>)	40/122	33.0
Raygrass (<i>Lolium perenne</i>)	18/122	14.8
Brachiaria (<i>Brachiaria brizantha</i>)	16/122	13.1
Saboya (<i>Panicum maximum</i>)	11/122	9.0
Kikuyo (<i>Pennisetum clandestinus</i>)	7/122	5.6
Mezcla de brachiaria (<i>Brachiaria brizantha</i>) y saboya (<i>Panicum maximum</i>)	5/122	4.1
Otras mezclas (kikuyo, pasto azul, saboya, brachiaria, pasto estrella, king grass, mar alfalfa, pasto elefante, llantén)	25/122	20.4
Ensilaje	42/124	33.9
Maíz (<i>Zea mays</i>)	34/42	81.0
Mezcla de maíz con otros ingredientes (alfalfa, saboya, sorgo, palma africana)	4/42	9.5
Mezcla de raygrass (<i>Lolium perenne</i>) con kikuyo (<i>Pennisetum clandestinus</i>)	3/42	7.1
Mulato (<i>Brachiaria hibrido</i>)	1/42	2.4
Henolaje	14/124	11.3
Raygrass (<i>Lolium perenne</i>)	4/14	28.6
Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>)	2/14	14.3
Kikuyo (<i>Pennisetum clandestinus</i>)	2/14	14.3
Avena (<i>Avena sativa</i>)	2/14	14.3
Otras mezclas (alfalfa, raygrass, barley, maiz, sorgo, pasto azul, trébol blanco)	4/14	28.5
Alimento balanceado	112/124	90.3
Alimento comercial	93/112	83.0
Fabricado en la granja	18/112	16.1
Formulación Ad-hoc	1/112	0.9

En cuanto a los factores de riesgo asociados a la presencia de AFM₁ (Tabla 6), se encontró que no existe una relación estadísticamente significativa ($p \geq 0.05$) con respecto al consumo de leguminosas, henolaje y alimento balanceado por parte de los animales. Solo se asoció significativamente ($p \leq 0.05$) a la alimentación de ganado con pastos, sin embargo no existen estudios que demuestren la presencia de *Aspergillus* en pastos frescos (Gallo *et al.* 2015, Merlassino 2014).

En el caso del uso de ensilaje, como parte de la dieta de las vacas lecheras, este fue el único pienso que estuvo en un nivel muy cercano al de asociación. Por este motivo, y debido a que todas las muestras de leche presentaron niveles de AFM₁, cualquiera de los piensos puede constituir una fuente de AFB₁, ya que un alimento no podría asociarse como factor de riesgo exclusivo. Respecto a los sistemas de producción y tamaño de la finca, existe una relación estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) en el sistema intensivo y los grandes productores, ya que presentaron mayores niveles de AFM₁ al corregir la heterocedasticidad.

En este estudio se asoció a los grandes productores y al sistema intensivo, lo que coincide con lo indicado en Kenia, donde los alimentos tienden a estar contaminados por AF en los sistemas intensivos (Kagera *et al.* 2019). Sin embargo, estos datos no coinciden con los obtenidos en Irán y Serbia, donde los niveles más altos de AFM₁ se encontraron en pequeños productores (Hashemi 2016, Horvatović *et al.* 2016) tampoco coincide con el estudio en India, donde no hubo diferencia significativa entre los diferentes productores y tipos de fincas (Patyal *et al.* 2020).

Tabla 6: Variables explicativas del análisis de factores de riesgo para la posible asociación con la ocurrencia de AFM₁ en leche cruda.

Variables explicativas	Nivel	Muestra (n)	Media (µg/kg)	Rango (µg/kg)	AFM ₁ en niveles superiores a la Unión Europea (%)	p-valor
Pasto	Leguminosas	106	0.0656	0.025 – 0.751	52 (49.1%)	0.003023 ^{ab}
	Gramíneas	207	0.0774	0.023 – 0.751	122 (58.9%)	
Henolaje en la dieta animal	Si	24	0.0852	0.029 – 0.563	14 (58.3%)	0.877101 ^a
	No	185	0.0764	0.023 – 0.751	110 (59.5%)	
Alimento balanceado en la dieta animal	Si	188	0.0748	0.023 – 0.750	112 (59.6%)	0.528951 ^a
	No	21	0.1001	0.027 – 0.751	12 (57.1%)	
Almacenamiento del alimento balanceado	Bodega cerrada	165	0.0763	0.023 – 0.750	96 (58.2%)	0.391659 ^a
	Bodega abierta	1	0.0720	0.0720	1 (100%)	
	No almacenada	9	0.0568	0.045 – 0.067	8 (88.9%)	
	En recipientes	13	0.0686	0.031 – 0.136	7 (53.8%)	
Ensilado en la dieta animal	Si	64	0.1026	0.027 – 0.751	42 (65.6%)	0.063237 ^a
	No	145	0.0663	0.023 – 0.745	82 (56.6%)	
Almacenamiento del ensilaje	Bolsa	48	0.1046	0.027 – 0.751	32 (66.7%)	0.391659 ^a
	Montón	15	0.0999	0.036 – 0.563	10 (66.7%)	
	Trinchera	1	0.049	0.049	0 (0%)	
Tipo de productor	Pequeño		0.0760 ^b	0.028 – 0.700	15 (57.7%)	0.000416 ^{ab}
	Mediano		0.0753 ^b	0.023 – 0.751	74 (58.3%)	
	Grande		0.0892 ^a	0.027 – 0.750	35 (62.5%)	
Sistemas de producción	Mixtos		0.0667 ^b	0.023 – 0.751	39 (59.0%)	0.000048 ^{ab}
	Intensivo		0.0896 ^a	0.052 – 0.105	5 (100%)	
	Extensivo		0.0832 ^a	0.025 – 0.750	96 (58.2%)	

Letras iguales indican que no existen diferencias significativas entre los diferentes lugares.

Pruebas estadísticas: Análisis de varianza con suma de cuadrados tipo III y comparación múltiple de medias de Tukey.

En la investigación se encontró un alto consumo de pasto por parte de los animales, y esto se debe a que Ecuador cuenta con condiciones ambientales favorables, en la mayor parte de su territorio, para la producción continua de forrajes durante todo el año (León *et al.* 2018), por lo que en la gran mayoría del ganado lechero pastorea, ya que es más económico que otros tipos de alimentos (Valverde 2013). Sin embargo, no existen estudios que demuestren la preferencia de *Aspergillus* en los pastos antes mencionados, lo que se sabe es que ciertos hongos endofíticos realizan un tipo de simbiosis con el raygrass perenne y son capaces de almacenar metabolitos secundarios tóxicos dentro de la planta (Merlassino 2014). Por lo tanto, los pastos no se consideran propensos a la contaminación por AFB₁ (Tsiplakou *et al.* 2014), solo en pienso concentrado, silo o heno (Fink-Gremmels 2008). Así mismo, a través de un estudio de revisión de varias publicaciones, se determinó que existen pocos estudios sobre la presencia de micotoxinas en pastos frescos, la cual es muy limitada en comparación con la presencia en cereales; lo que se sabe es que los hongos filamentosos pueden crecer en forrajes, pero solo los géneros *Fusarium* y *Alternaria*, mientras que *Aspergillus* tiene preferencia por granos y cereales, por esta razón, ninguno de los estudios realizados a nivel mundial reporta la presencia de este tipo de hongos y AF en forrajes frescos (Gallo *et al.* 2015).

En cuanto al ensilaje, si bien es cierto que la mayoría de los hongos se eliminan en el proceso de elaboración de este pienso, los del género *Aspergillus* son capaces de soportar altas concentraciones de ácidos orgánicos, dióxido de carbono y baja disponibilidad de oxígeno (Gallo *et al.* 2015). Por tanto, constituye un excelente sustrato para el crecimiento y desarrollo de *Aspergillus* y por tanto de AFB₁ (Del Palacio *et al.* 2016), siendo dependiente del tiempo de cosecha, riego, control de plagas, humedad, así como daños mecánicos al grano en el momento del ensilado (Prandini *et al.* 2009). En el presente estudio se determinó que el uso de silo en la alimentación animal fue el más cercano al nivel de asociación de significancia con la presencia de AFM₁ en la leche, siendo el ingrediente más utilizado en su elaboración, el maíz (*Zea mays*), que justamente es el grano más propenso a la contaminación por *Aspergillus* (Alonso *et al.* 2011, Kagera *et al.* 2019, Ogunade *et al.* 2018). El silo de maíz es uno de los principales factores de riesgo de AF en varios países, por ejemplo, en Kenia, el 99 por ciento de las muestras (83/84) contenían niveles de AFM₁, con una media bastante alta de 0.84 µg/kg, donde el 56.3 por ciento de los animales recibieron ensilaje (Kagera *et al.* 2019). En México, en 48 muestras de leche orgánica, las mayores concentraciones de AFM₁ se encontraron en la época seca debido al incumplimiento de

buenas prácticas agrícolas y al uso de ensilaje y probablemente alimento para animales contaminado (Gutiérrez *et al.* 2013). Por estas razones, el uso de silo de maíz en Ecuador podría ser una fuente importante de AFB₁ en la dieta de las vacas lecheras.

En cuanto al almacenamiento de ensilaje, se sabe que los hongos se desarrollan mejor cuando este no es el correcto (Kemboi *et al.* 2020), lo que favorece su crecimiento, principalmente cuando existe un sellado inadecuado del silo, presencia de agujeros en el revestimiento o por instalaciones de almacenamientos inadecuados (Variance *et al.* 2018). Las condiciones ambientales son favorables para el desarrollo de hongos, principalmente cuando el silo es más cálido y húmedo (Pereyra *et al.* 2008). Nuestra encuesta determinó que la mayor cantidad de agricultores lo almacena en bolsas, lo que coincide con varios autores, quienes encontraron que el mayor porcentaje de contaminación con AF ocurre en productos ensilados en bolsas, principalmente después de períodos de almacenamiento largos e inadecuados, siendo influenciado por el tiempo de cosecha del maíz, la fertilización, el riego, el control de plagas y la humedad del ensilaje (Baliukonien *et al.* 2012, Fink-Gremmels 2008, Prandini *et al.* 2009).

Respecto al uso del henolaje, diversos estudios han determinado que es un alimento donde puede crecer *Aspergillus* y por tanto que se puede encontrar la presencia de AF (Dhakal y Sbar 2020, Tsiplakou *et al.* 2014), siendo el heno de alfalfa, en varios estudios, el producto que ha contenido AFB₁ en niveles superiores al límite máximo permitido por la Unión Europea (Bani Ismail *et al.* 2020, Rodríguez-Blanco *et al.* 2020, Sugiyama *et al.* 2008). En el caso de Ecuador, los ingredientes más utilizados fueron justamente la Alfalfa y también Raygrass.

La investigación también encontró que la mayoría de los agricultores alimentan a sus animales con alimentos balanceados, lo que coincide con el estudio realizado en Punjab, India, donde la alimentación con piensos concentrados ya preparados determinó la presencia de AFM₁ en la leche (Patyal *et al.* 2020). Asimismo, en México y Kenia, la mayor presencia de AFM₁ se debió a un mayor consumo de concentrado durante el ordeño, principalmente de alimentos comerciales (Gutiérrez *et al.* 2013, Kagera *et al.* 2019). Esto se explica porque *Aspergillus* tiene preferencia por cereales o granos. (Alpizar Solís 2016, Giovanni *et al.* 2019) con una correlación entre AFM₁ en la leche, y la presencia de AFB₁ en el alimento concentrado recibido por las vacas lecheras (Sugiyama *et al.* 2008). Por lo tanto, es necesario

controlar el almacenamiento del pienso concentrado, ya que la temperatura y la humedad contribuyen a la producción de AFB₁ (Yunus *et al.* 2019, Ismail *et al.* 2015). Posiblemente en Ecuador exista un almacenamiento inadecuado del concentrado, lo que provoca la contaminación de los alimentos con hongos.

Finalmente, se ha encontrado evidencia de que actualmente el cambio climático, que provoca sequías e inundaciones, puede incrementar la producción de hongos micotoxigénicos y por tanto su incremento en alimentos (Milićević *et al.* 2019). Asimismo, la prevalencia de micotoxinas en los alimentos puede ser alta, siendo mayor en la materia prima que en los productos terminados, encontrándose AFB₁ en la harina de maní, semillas de algodón y maíz, que son ingredientes de la alimentación de las vacas lecheras (Marin *et al.* 2013). Por tanto, los productores deben ser conscientes de los efectos perjudiciales que las AF provocan en sus animales y en la salud pública, por lo que deben buscar estrategias para reducir su presencia en los piensos ofrecidos al ganado lechero (Mohammedi-Ameur *et al.* 2020), mediante Buenas Prácticas Agrícolas en pre y poscosecha; así como, el correcto almacenamiento de cultivos forrajeros y descontaminación física o química de alimentos contaminados (Giovati *et al.* 2015).

V. CONCLUSIONES

1. Se estableció que el 100 por ciento de las muestras de leche cruda de diferentes provincias del Ecuador contenían AFM₁, encontrándose diferencias significativas en la región costera y en la época seca del año, pero no entre tipos de productores y sistemas de producción.
2. Se cuantificó los niveles de AFM₁, encontrándose por encima del límite máximo permitido por la Unión Europea al 59.3 por ciento de las muestras, sin embargo, solo el 1.9 por ciento de las mismas tenían niveles por encima del límite permitido por la legislación ecuatoriana y del codex alimentarius.
3. En cuanto a ZEA, se estableció que el 99.5 por ciento de leche cruda analizada tenía la micotoxina, pero con niveles muy por debajo de los permitidos por los organismos internacionales, sin encontrarse diferencias significativas entre las regiones, época climática, tipo de productores y sistemas de producción.
4. Se encontró asociación entre la presencia de AFM₁ en la leche con los grandes productores, sistema intensivo y la alimentación del ganado con gramíneas; el uso de ensilaje tuvo un nivel muy cercano al de asociación; mientras que, no se encontró asociación respecto al consumo de los animales de leguminosas, henolaje y alimento balanceado.
5. Con los datos obtenidos, la investigación es útil para concluir que la leche de Ecuador en un posible peligro para la salud de los consumidores; pues, si la contaminación por ZEA y AFM₁ no rebasan los límites permitidos por la legislación ecuatoriana, pero si en el caso de la segunda en gran medida los límites europeos. El consumo frecuente de estas micotoxinas puede producir efectos sinérgicos y bioacumularse en los consumidores, por lo que su monitoreo debe ser permanente y urgente en Ecuador.

VI. RECOMENDACIONES

1. Se hace necesario monitorear continuamente la leche del Ecuador y hacer esfuerzos para reducir el contenido de AFB₁ y ZEA en la dieta del ganado lechero, y de esta manera la presencia de AFM₁ y ZEA en la leche.
2. Implementar prácticas de almacenamiento de alimentos, así como control de calidad en las materias primas con las que se elaboraron los piensos animales, mediante la formación y sensibilización a los ganaderos sobre la importancia y riesgos de la presencia de AF y ZEA en los piensos y la leche cruda.
3. Aumentar controles y educar a los productores lecheros sobre los problemas de salud pública causados por estas micotoxinas, especialmente en la provincia de Manabí y en la estación seca.
4. Se recomienda utilizar ELISA y LFIA como pruebas de screening y posteriormente realizar pruebas confirmatorias mediante la Cromatografía Líquida de Alta Resolución, solamente en las muestras negativas para abaratar los costos de los análisis.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abyaneh, HK; Bahonar, A; Noori, N; Yazdanpanah, H; Aliabadi, MHS. 2019. Exposure to aflatoxin M1 through milk consumption in Tehran population, Iran. Iranian Journal of Pharmaceutical Research 18(3):1332-1340. DOI: <https://doi.org/10.22037/ijpr.2019.1100764>.

AGROCALIDAD (Agencia de Control y Regulación Fito y Zoonosanitario). 2020. Catastro Bovino 2020. Disponible en: <https://www.agrocalidad.gob.ec/#>

AGSO (Asociación de Ganaderos de la Sierra y el Oriente). 2016. Producción leche en el Ecuador (en línea). Guayaquil-Ecuador, s.e.; 19 mar. Disponible en <http://www.eltelegrafo.com.ec/noticias/economia/8/las-pymes-procesan-800-000-litros-de-leche>.

Aiad, A; El-Makarem, A. 2013. Aflatoxin M₁ levels in milk and some dairy products in Alexandria City. Assiut Vet Med. J. Vol 59(139):93-98.

Akbar, N; Nasir, M; Naeem, N; Ahmad, MUD; Iqbal, S; Rashid, A; Imran, M; Gondal, TA; Atif, M; Salehi, B; Sharifi-Rad, J; Martorell, M; Cho, WC. 2019. Occurrence and seasonal variations of aflatoxin M1 in milk from Punjab, Pakistan. Toxins 11(10):1-15. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins11100574>.

Akhtar, S; Shahzad, MA; Yoo, S; Ismail, A; Hameed, A; Ismail, T; Riaz, M. 2017. Determination of Aflatoxin M₁ and Heavy Metals in Infant Formula Milk Brands Available in Pakistani Markets (en línea). Korean Journal for Food Science of Animal Resources 37(1):79-86. DOI: <https://doi.org/10.5851/kosfa.2017.37.1.79>.

Alonso, V; Gonzalez-Pereyra, M; Armando, M; Dogi, C; Dalcerro, A; Rosa, C; Chiacchiera, S; Cavaglieri, L. 2011. Silage Contribution to Aflatoxin B1 Contamination of Dairy Cattle

Feed (en línea). s.l., InTech. DOI: <https://doi.org/10.5772/22136>.

Alpizar S, C. 2016. Presencia de hongos y contaminación con micotoxinas en ensilajes para alimentación de rumiantes. Artículo de Revisión (en línea). *Revista Ciencias Veterinarias* 33(1):7. DOI: <https://doi.org/10.15359/rcv.33-1.1>.

Alshannaq, A; Yu, J. 2017. Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 14:1-20. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph14060632>.

An, Y; Shi, X; Tang, X; Wang, Y; Shen, F; Zhang, Q. 2017. Aflatoxin B1 Induces Reactive Oxygen Species-Mediated Autophagy and Extracellular Trap Formation in Macrophages. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00053>.

Assaf, JC; Khoury, AE; Chokr, A; Louka, N; Atoui, A. 2019. A novel method for elimination of aflatoxin M1 in milk using *Lactobacillus rhamnosus* GG biofilm (en línea). *International Journal of Dairy Technology* 72(2):248-256. DOI: <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12578>.

Awaisheh, SS; Rahahleh, RJ; Algroom, RM; Al-Bakheit, AA; Al-Khaza'leh, JM; Al-Dababseh, BA. 2019. Contamination level and exposure assessment to aflatoxin m₁ in jordanian infant milk formulas. *Italian Journal of Food Safety* 8(3):127-130. DOI: <https://doi.org/10.4081/ijfs.2019.8263>.

Baliukonien, V; Bakutis, B; Vaivadait, T; Bartkienė, E; Jovaišien, J. 2012. Prevalence of fungi and mycotoxins in silage and milk in Lithuania. (en línea). *Veterinarija ir Zootechnika* 59(81):3-9.En: <https://pdfs.semanticscholar.org/ba09/eff44a2362c3c8c0bfe0b780efc499914ab8.pdf>.

Bani Ismail, Z; Al-Nabulsi, F; Abu-Basha, E; Hananeh, W. 2020. Occurrence of on-farm risk factors and health effects of mycotoxins in dairy farms in Jordan. *Tropical Animal Health and Production* Epub ahead. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11250-019-02166-9>.

Barbera, GL; Capriotti, AL; Cavaliere, C; Foglia, P; Montone, CM; Chiozzi, RZ; Lagan, A. 2017. Followed by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Analysis for the Determination of Mycotoxins in Cereals. *Toxins* 9:147. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins9040147>.

Battacone, G; Nudda, A; Palomba, M; Mazzette, A; Pulina, G. 2009. The transfer of aflatoxin M₁ in milk of ewes fed diet naturally contaminated by aflatoxins and effect of inclusion of dried yeast culture in the diet (en línea). *Journal of Dairy Science* 92(10):4997-5004. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1684>.

Becker-Algeri, TA; Castagnaro, D; Bortoli, K De; Souza, C De; Drunkler, DA. 2016. Mycotoxins in Bovine Milk and Dairy Products : A Review. *Journal of Food Science* 81(3):544-552. DOI: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13204>.

Ben, F; Fedhila, K; Chaieb, K; Kouidhi, B; Bakhrouf, A; Abrunhosa, L. 2017. Adsorption of aflatoxin B₁, zearalenone and ochratoxin A by microorganisms isolated from Kenaf grains. *International Journal of Food Microbiology* 251:1-7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.03.021>.

Branch, F; Darsanaki, RK; Mohammadi, M; Kolavani, MH; Issazadeh, K; Aliabadi, MA; Branch, L. 2013. Determination of Aflatoxin M₁ Levels in Raw Milk Samples in Gilan, Iran (en línea). *Advanced Studies in Biology* 5(4):151-156. Disponible en <https://pdfs.semanticscholar.org/7534/b10afcbb9c27462b8a4fde101e656932a359.pdf>.

Bullerman, LB; Bianchini, A. 2007. Stability of mycotoxins during food processing (en línea). *International Journal of Food Microbiology* 119(1-2):140-146. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.035>.

Cao, H; Zhi, Y; Xu, H; Fang, H; Jia, X. 2019. Zearalenone causes embryotoxicity and induces oxidative stress and apoptosis in differentiated human embryonic stem cells (en línea). *Toxicology in Vitro* 54:243-250. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.09.020>.

Çelik, TH; Sarımeahmetoğlu, B; Küplülü, Ö. 2005. Aflatoxin M₁ contamination in pasteurised milk (en línea). *Veterinarski Arhiv* 75(1):57-65. Disponible en

<http://wwwi.vef.hr/vetarhiv/papers/2005-75-1-8.pdf>.

Celis De La Rosa, A; Labrada, V. 2014. Bioestadística (en línea). Tercera Ed. Editorial El Manual Moderno, SA de CV (ed.). México DF, s.e. 63-70 p. Disponible en https://www.academia.edu/21856685/Celis_De_La_Rosa_Alfredo_Y_Labrada_Vanessa_-_Bioestadistica_3ed_.

Cheng, Q; Jiang, S; Huang, L; Wang, Y; Yang, W; Yang, Z; Ge, J. 2020. Effects of zearalenone-induced oxidative stress and Keap1–Nrf2 signaling pathway-related gene expression in the ileum and mesenteric lymph nodes of post-weaning gilts (en línea). *Toxicology* 429:Epub ahead. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2019.152337>.

CIL (Centro de la Industria Láctea). 2015. La Leche del Ecuador - Historia de la lechería ecuatoriana (en línea). Primera ed. (CIL), C de la IL (ed.). Quito-Ecuador, (CIL). 192 p. Disponible en el link: <http://www.pichincha.gob.ec/publicaciones/item/702-la-leche-del-ecuador.html>.

Codex-Alimentarius. 1999. Documento de posición sobre Zearalenona (en línea, sitio web). Disponible: http://www.fao.org/tempref/codex/Meetings/CCFAC/ccfac31/FA99_15S.pdf.

Coffey, R; Cummins, E; Ward, S. 2009. Exposure assessment of mycotoxins in dairy milk (en línea). *Food Control* 20(3):239-249. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.05.011>.

Cook, WO; Richard, JL; Osweiler, GD; Trampel, DW. 1986. Clinical and pathologic changes in acute bovine aflatoxicosis: rumen motility and tissue and fluid concentrations of aflatoxins B1 and M1. (en línea). *American Journal of Veterinary Research* 47(8):1817-25. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3092707>.

Crowther, J. 2009. The ELISA Guidebook Series Editor. Second Edi. Vienna-Austria, Humana Press. 9-16 p. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-1-60327-254-4>.

Dakhili, M; Shalibeik, S; Ahmadi, I. 2016. Detection of Aflatoxin M1 in Milk from Qom (Aried and Semiaried) Province of Iran (en línea). *International Journal of Advanced*

Biotechnology and Research 7(3):1461-1465. Disponible en <https://pdfs.semanticscholar.org/fdd7/953ddc49f55911c463a27fd153af0017abc0.pdf>.

Dänicke, S; Keese, C; Meyer, U; Starke, A; Rehage, J; Keese, C; Meyer, U; Starke, A. 2014. Zearalenone (ZEN) metabolism and residue concentrations in physiological specimens of dairy cows exposed long-term to ZEN-contaminated diets differing in concentrate feed proportions (en línea). Archives of Animal Nutrition 68(6):492-506. DOI: <https://doi.org/10.1080/1745039X.2014.973236>.

Dänicke, S; Winkler, J. 2015. Invited review: Diagnosis of zearalenone (ZEN) exposure of farm animals and transfer of its residues into edible tissues (carry over) (en línea). Food and Chemical Toxicology 84:225-249. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.08.009>.

Dhakal, A; Sbar, E. 2020. Aflatoxin Toxicity (en línea). StatPearls (ed.). s.l., StatPearls Publishing. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557781/>.

Dinleyici, M; Aydemir, O; Yildirim, GK; Kaya, TB; Carman, KB. 2018. Human mature milk zearalenone and deoxynivalenol levels in Turkey. (en línea). Neuro endocrinology letters 39(4):325-330. Disponible en: https://pdfs.semanticscholar.org/9cc8/5b58c0744b28641d7f22641301e6e902d16b.pdf?_ga=2.192560810.169326383.1577495976-498466131.1574084487.

Duarte-Vogel, S; Villamil-Jiménez, LC. 2006. Micotoxinas en la Salud Pública (en línea). Revista de Salud Pública (Bogota, Colombia) 8(1):129-135. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0124-00642006000400011>.

EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria). 2004. Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain [CONTAM] related to Aflatoxin B1 as undesirable substance in animal feed (en línea). EFSA Journal 2(3):39. DOI: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2004.39>.

_____. 2011. Scientific Opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food (en línea). EFSA Journal 9(6):2197. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2197>.

_____. 2016. Appropriateness to set a group health-based guidance value for zearalenone and its modified forms. *EFSA Journal* 14(4):46. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4425>.

Van Eijkeren, JCH; Bakker, MI; Zeilmaker, MJ. 2006. A simple steady-state model for carry-over of aflatoxins from feed to cow's milk (en línea). *Food Additives and Contaminants* 23(8):833-838. DOI: <https://doi.org/10.1080/02652030600779890>.

Eker, FY; Muratoglu, K; Eser, AG. 2019. Detection of aflatoxin M1 in milk and milk products in Turkey. *Environmental Monitoring and Assessment* 191(8):1-8. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10661-019-7668-9>.

ELIKA, FV. 2013. Zearalenona (en línea, sitio web). Disponible en http://www.elika.net/datos/pdfs_agrupados/Documento19/zea_web.pdf.

European-Commission. 2006. Commission regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs (en línea). *Official Journal of the European Union* 364:5-24. Disponible en <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2006R1881:20100701:EN:PDF>. European, C. 2010. REGLAMENTO (EU) N o 165/2010 (en línea). s.l., s.e. p. 8-12. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010R0165&rid=2>.

FAO (Food and Agriculture Organization). 2004. Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones en el año 2003 (en línea, sitio web). Disponible en <http://www.fao.org/3/a-y5499s.pdf>.

_____. 2016. Leche y productos lácteos - peligros para la salud (en línea, sitio web). Disponible en <http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/leche-y-productos-lacteos/peligros-para-la-salud/es/#.WlzdW1PhB1s>.

Fink-Gremmels, J. 2008. The role of mycotoxins in the health and performance of dairy cows (en línea). *The Veterinary Journal* 176(1):84-92. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.12.034>.

Gallo, A; Giuberti, G; Frisvad, J; Bertuzzi, T; Nielsen, K. 2015. Review on Mycotoxin Issues in Ruminants: Occurrence in Forages, Effects of Mycotoxin Ingestion on Health Status and Animal Performance and Practical Strategies to Counteract Their Negative Effects (en línea). *Toxins* 7(8):3057-3111. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins7083057>.

Gamba, RR; Antoni, G De; Peláez, AL. 2016. Whey permeate fermented with kefir grains shows antifungal effect against *Fusarium graminearum*. *Journal of Dairy Research* 83:249-255. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0022029916000121>.

Gao, YN; Wang, JQ; Li, SL; Zhang, YD; Zheng, N. 2016. Aflatoxin M1 cytotoxicity against human intestinal Caco-2 cells is enhanced in the presence of other mycotoxins. *Food and Chemistry Toxicology* 96:79-89. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.07.019>.

Gholamreza, K; Soghra, M. 2014. *Mycotoxins*. s.l., Apple Academic Press. p. 179-198 DOI: <https://doi.org/10.1201/9781315161075>.

Gimeno, A; Martins, ML. 2011. *Micotoxinas y Micotoxicosis en Animales y Humanos* (en línea). TerceraEdi. *Special Nutrients, I* (ed.). Miami-USA, s.e. 1-130 p. Disponible en [http://www.specialnutrients.com/pdf/book/3 edición MICOTOXINAS LR Secure.pdf](http://www.specialnutrients.com/pdf/book/3%20edicion%20MICOTOXINAS%20LR%20Secure.pdf).

Giovanni, S Di; Zambrini, V; Varriale, A; Auria, SD. 2019. Sweet Sensor for the Detection of Aflatoxin M1 in Whole Milk. *ACS Omega* 4(7):12803-12807. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b01300>.

Giovati, L; Magliani, W; Ciociola, T; Santinoli, C; Conti, S; Polonelli, L. 2015. AFM₁ in Milk: Physical, Biological, and Prophylactic Methods to Mitigate Contamination (en línea). *Toxins* 7(10):4330-4349. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins7104330>.

González, P. 2018. Determinación de Aflatoxina M1 en leche cruda de vaca en centros de acopio de pequeños productores en las cinco provincias de la sierra con mayor producción en el Ecuador (en línea). s.l., Universidad De Las Américas-Ecuador. 98 p. Disponible en <http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/9836/1/UDLA-EC-TMACSA-2018-18.pdf>.

Grim, CJ. 2017. The Hotspot for (Global) One Health in Primary Food Production : Aflatoxin M₁ in Dairy Products. *Frontiers in Public Health* | 4:1-11. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2016.00294>.

Gu, J; Wu, W; Huang, M; Long, F; Liu, X; Zhu, Y. 2018. Application of High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Linear Ion Trap Quadrupole Orbitrap Mass Spectrometry for Qualitative and Quantitative Assessment of Shejin-Liyan Granule Supplements. *Molecules* 23(884):1-11. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules23040884>.

Guo, L; Wang, Y; Fei, P; Liu, J; Ren, D. 2019. A survey on the aflatoxin M₁ occurrence in raw milk and dairy products from water buffalo in South China (en línea). *Food Control* 105:159-163. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.05.033>.

Gutiérrez, R; Vega, S; Ruiz, JL; Yamazaki, A; Rivera, JG; Escobar, A. 2013. Evaluación de aflatoxina M₁ en leche orgánica producida en Tecpatán, Chiapas, México (en línea). *Revista de Salud Animal* 35(1):33-37. Disponible en <http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v35n1/rsa05113.pdf>.

Hashemi, M. 2016. A survey of aflatoxin M₁ in cow milk in Southern Iran (en línea). *Journal of Food and Drug Analysis* 24(4):888-893. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.05.002>.

Hernandez-Valdivia, E; Valdivia-Flores, A; Cruz-Vazquez, C; Martínez-Saldaña, M; Quezada-Tristan, T; Rangel-Muñoz, E; Ortiz-Martinez, R; Medina-Esparza, L; Jaramillo-

Juarez, J. 2021. Diagnosis of Subclinical Aflatoxicosis by Biochemical Changes in Dairy Cows under Field Conditions (en línea). *The Pakistan Veterinary Journal* 41(01):33-38. DOI: <https://doi.org/10.29261/pakvetj/2020.075>.

Horvatović, MP; Glamočić, D; Jajić, I; Krstović, S; Guljaš, D; Gjorgjievski, S. 2016. Aflatoxin M₁ in raw milk in the region of Vojvodina. *M. POLOVINSKI HORVATOVIĆ* 66(3):239-245. DOI: <https://doi.org/10.15567/mljekarstvo.2016.0309>.

Huang, LC; Zheng, N; Zheng, BQ; Wen, F; Cheng, JB; Han, RW; Xu, XM; Li, SL; Wang,

JQ. 2014. Simultaneous determination of aflatoxin M1, ochratoxin A, zearalenone and α -zearalenol in milk by UHPLC–MS/MS (en línea). Food Chemistry 146(1):242-249. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.047>.

IFST(Institute of Food Science and Technology). 2015. Micotoxins (en línea, sitio web). Consultado 6 may 2018. Disponible en <https://www.ifst.org/knowledge-centre/information-statements/mycotoxins>.

INAMHI (Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología). 2006. Climas del Ecuador. En: [http://www.serviciometeorologico.gob.ec/gisweb/TIPO_DE_CLIMAS/PDF/CLIMAS DEL ECUADOR 2016.pdf](http://www.serviciometeorologico.gob.ec/gisweb/TIPO_DE_CLIMAS/PDF/CLIMAS_DEL_ECUADOR_2016.pdf).

INEC- ESPAC(Instituto Nacional de Estadísticas y Censos - Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua). 2021. Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua 2020 (en línea, sitio web). Disponible en https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac-2020/Presentacion ESPAC 2020.pdf.

INEC (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos). 2018. Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (en línea, sitio web). Disponible en https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac-2018/Presentacion de principales resultados.pdf.

_____. 2020. Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (ESPAC) 2019 (en línea, sitio web). Consultado 7 jul. 2020. Disponible en https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac-2019/Presentacion de los principales resultados ESPAC 2019.pdf.

INEN (Servicio Ecuatoriano de Normalización). 2012. Leche cruda: Requisitos NTE INEN 9 (en línea, sitio web). Disponible en: https://www.gob.ec/sites/default/files/regulations/2018-10/Documento_BL NTE INEN 9 Leche cruda Requisitos.pdf.

_____. 2014. Leche y productos lácteos. Directrices para la toma de muestras (ISO

707:2008, IDT) (en línea). Quito-Ecuador, s.e. p. 1-49. Disponible en http://www.normalizacion.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2014/NORMAS_2014/ACO/17122014/nte-inen-iso-707-ext.pdf.

Ismail, A; Akhtar, S; Levin, RE; Ismail, T; Riaz, M; Amir, M. 2015. Aflatoxin M1: Prevalence and decontamination strategies in milk and milk products (en línea). *Critical Reviews in Microbiology* :1-10. DOI: <https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.958051>.

Jiang, Y; Hansen, PJ; Xiao, Y; Amaral, TF; Vyas, D; Adesogan, AT. 2019. Aflatoxin compromises development of the preimplantation bovine embryo through mechanisms independent of reactive oxygen production (en línea). *Journal of Dairy Science* 102(11):10506-10513. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16839>.

Jiang, Y; Ogunade, IM; Arriola, KG; Pech-Cervantes, AA; Kim, DH; Li, X; Xue, YL; Vyas, D; Adesogan, AT. 2020. Short communication: Effects of a physiologically relevant concentration of aflatoxin B1 with or without sequestering agents on in vitro rumen fermentation of a dairy cow diet (en línea). *Journal of Dairy Science* 103(2):1559-1565. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17318>.

Jocsak, G; Ioja, E; Kiss, DS; Toth, I; Barany, Z; Bartha, T; Frenyo, L V.; Zsarnovszky, A. 2019. Endocrine disruptors induced distinct expression of thyroid and estrogen receptors in rat versus mouse primary cerebellar cell cultures. *Brain Sciences* 9(12):1-19. DOI: <https://doi.org/10.3390/brainsci9120359>.

Jovaisiene, J; Bakutis, B; Baliukoniene, V; Gerulis, G. 2016. Fusarium and Aspergillus mycotoxins effects on dairy cow health , performance and the efficacy of Anti-Mycotoxin Additive. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 19(1):79-87. DOI: <https://doi.org/10.1515/pjvs-2016-0011>.

Kagera, I; Kahenya, P; Mutua, F; Anyango, G; Kyallo, F; Grace, D; Lindahl, J. 2019. Status of aflatoxin contamination in cow milk produced in smallholder dairy farms in urban and peri-urban areas of Nairobi County: a case study of Kasarani sub county, Kenya (en línea). *Infection Ecology & Epidemiology* 9(1):1547095. DOI: <https://doi.org/10.1080/20008686.2018.1547095>.

Kemboi, DC; Antonissen, G; Ochieng, PE; Croubels, S; Okoth, S; Kangethe, EK; Faas, J; Lindahl, JF; Gathumbi, JK. 2020. A Review of the Impact of Mycotoxins on Dairy Cattle Health: Challenges for Food Safety and Dairy Production in Sub-Saharan Africa (en línea). *Toxins* 12(4):222. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins12040222>.

Khaneghahi A, H; Bahonar, A; Noori, N; Yazdanpanah, H; Shojaee AliAbadi, MH. 2020. The overall and variations of Aflatoxin M1 contamination of milk in Iran: A systematic review and meta-analysis study (en línea). *Food Chemistry* 310:125848. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125848>.

Kharbikar, LL; Dickin, ET; Edwards, SG. 2015. Impact of post-anthesis rainfall , fungicide and harvesting time on the concentration of deoxynivalenol and zearalenone in wheat. *Food Additives & Contaminants* 32(12):2075-2085. DOI: <https://doi.org/10.1080/19440049.2015.1084652>.

Kosicki, R; Błajet-Kosicka, A; Grajewski, J; Twarużek, M. 2016. Multiannual mycotoxin survey in feed materials and feedingstuffs (en línea). *Animal Feed Science and Technology* 215:165-180. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.03.012>.

Kowalska, K; Habrowska-Górczyńska, DE; Piastowska-Ciesielska, AW. 2016. Zearalenone as an endocrine disruptor in humans. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 48:141-149. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.10.015>.

Król, A; Pomastowski, P; Rafińska, K; Railean-Plugaru, V; Walczak, J; Buszewski, B. 2018. Microbiology neutralization of zearalenone using *Lactococcus lactis* and *Bifidobacterium* sp. (en línea). *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 410(3):943-952. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0555-8>.

Kuboka, MM; Imungi, JK; Njue, L; Mutua, F; Grace, D; Lindahl, JF. 2019. Occurrence of aflatoxin M1 in raw milk traded in peri-urban Nairobi, and the effect of boiling and fermentation (en línea). *Infection Ecology & Epidemiology* 9(1):1625703. DOI: <https://doi.org/10.1080/20008686.2019.1625703>.

Kuilman, M; Maas, RF.; Fink-Gremmels, J. 2000. Cytochrome P450-mediated metabolism

and cytotoxicity of aflatoxin B1 in bovine hepatocytes (en línea). *Toxicology in Vitro* 14(4):321-327. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0887-2333\(00\)00025-4](https://doi.org/10.1016/S0887-2333(00)00025-4).

Kuilman, M; Maas, RFM; Judah, DJ; Fink-Gremmels, J. 1998. Bovine Hepatic Metabolism of Aflatoxin B 1 (en línea). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46(7):2707-2713. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf980062x>.

León, R; Bonifaz, N; Gutiérrez, F. 2018. Pastos y forrajes del Ecuador: siembra y producción de pasturas (en línea). Primera Ed. Abya-Yala, EU (ed.). Quito-Ecuador, s.e. 616 p. Disponible en [https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/17928/1/PASTOS Y FORRAJES DEL ECUADOR.pdf](https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/17928/1/PASTOS_Y_FORRAJES_DEL_ECUADOR.pdf).

Li, H; Li, S; Yang, H; Wang, Y; Wang, J; Zheng, N. 2019. L-proline alleviates kidney injury caused by AFB1 and AFM1 through regulating excessive apoptosis of kidney cells. *Toxins* 11(4):1-12. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins11040226>.

Li, P; Su, R; Yin, R; Lai, D; Wang, M; Liu, Y; Zhou, L. 2020. Detoxification of Mycotoxins through Biotransformation (en línea). *Toxins* 12(2):121. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins12020121>.

Li, S; Min, L; Wang, G; Li, D; Zheng, N; Wang, J. 2018. Occurrence of aflatoxin M1 in raw milk from manufacturers of infant milk powder in China. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 15(5):1-8. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph15050879>.

Malekinejad, H; Maas-Bakker, R; Fink-Gremmels, J. 2006. Species differences in the hepatic biotransformation of zearalenone (en línea). *The Veterinary Journal* 172(1):96-102. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2005.03.004>.

Maragos, CM. 2016. Multiplexed biosensors for mycotoxins. *Journal of AOAC International* 99(4):849-860. DOI: <https://doi.org/10.5740/jaoacint.16-0112>.

Marchese, S; Polo, A; Ariano, A; Velotto, S; Costantini, S; Severino, L. 2018. Aflatoxin B₁ and M₁: Biological properties and their involvement in cancer development. *Toxins* 10(6):1-

19. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins10060214>.

Marin, S; Ramos, AJ; Cano-Sancho, G; Sanchis, V. 2013. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment (en línea). *Food and Chemical Toxicology* 60:218-237. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.07.047>.

Merlassino, JL. 2014. Micotoxinas (en línea). s.l., Universidad Nacional del Mar del Plata. . Disponible en http://www.biblioteca.unlpam.edu.ar/rdata/tespo/0_mermic162.pdf.

Meucci, V; Soldani, G; Razzuoli, E; Saggese, G; Massart, F. 2011. Mycoestrogen Pollution of Italian Infant Food (en línea). *The Journal of Pediatrics* 159(2):278-283.e1. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2011.01.028>.

Michlig, N; Signorini, M; Gaggiotti, M; Chiericatti, C; Basílico, JC; Repetti, MR; Beldomenico, HR. 2016. Risk factors associated with the presence of aflatoxin M1 in raw bulk milk from Argentina (en línea). *Food Control* 64:151-156. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.12.025>.

Milićević, D; Petronijević, R; Petrović, Z; Đjinović-Stojanović, J; Jovanović, J; Baltić, T; Janković, S. 2019. Impact of climate change on aflatoxin M1 contamination of raw milk with special focus on climate conditions in Serbia. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 99(11):5202-5210. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.9768>.

Miranda, C. 2015. Factores de riesgo asociados con la ocurrencia de la AFM1 en la leche cruda de vaca en establos de la región el Llano, México (en línea). s.l., Universidad Autónoma de Aguascalientes. Disponible en: <http://bdigital.dgse.uaa.mx:8080/xmlui/handle/11317/381>.

Mohammedi-Ameur, S; Dahmane, M; Brera, C; Kardjadj, M; Ben-Mahdi, MH. 2020. Occurrence and seasonal variation of aflatoxin M1 in raw cow milk collected from different regions of Algeria. *Veterinary World* 13(3):433-439. DOI: <https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.433-439>.

Molina, A; Chavarría, G; Alfaro-Cascante, M; Leiva, A; Granados-Chinchilla, F. 2019.

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 M₁ in Dairy Products (en línea). *Toxins* 11(6):312. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins11060312>.

Mulunda, M; Ngoma, L; Nyirenda, M; Motsei, L; Bakunzi, F. 2013. A Decade of Aflatoxin M₁ Surveillance in Milk and Dairy Products in Developing Countries (2001-2011): A Review. *Pharmacology, Toxicology and Pharmaceutical Science* . DOI: <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/53286>.

Nguyen, T; Flint, S; Palmer, J. 2020. Control of aflatoxin M₁ in milk by novel methods: A review (en línea). *Food Chemistry* 311:125984. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125984>.

No Title. 1998. .

Núñez, C; Hervé, L. 2018. Determinación de la aflatoxina M₁ en lecherías de la Región Metropolitana y Región de Valparaíso (en línea). s.l., Universidad de Chile. Disponible en <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/168623/Determinacion-de-la-aflatoxina.pdf?sequence=4&isAllowed=y>.

Ogunade, IM; Martinez-Tupia, C; Queiroz, OCM; Jiang, Y; Drouin, P; Wu, F; Vyas, D; Adesogan, AT. 2018. Silage review: Mycotoxins in silage: Occurrence, effects, prevention, and mitigation (en línea). *Journal of Dairy Science* 101(5):4034-4059. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13788>.

Olejniczak, R. 2019. The right mycotoxin testing method for you (en línea, sitio web). Disponible en <https://www.allaboutfeed.net/Mycotoxins/Articles/2019/7/The-right-mycotoxin-testing-method-for-you-454500E/>.

Oliveira-Rodríguez, M; López-Cobo, S; Reyburn, HT; Costa-García, A; López-Martín, S; Yáñez-Mó, M; Cernuda-Morollón, E; Paschen, A; Valés-Gómez, M; Blanco-López, MC. 2016. Development of a rapid lateral flow immunoassay test for detection of exosomes previously enriched from cell culture medium and body fluids. *Journal of Extracellular Vesicles* 5(1). DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.3402/jev.v5.31803>.

Ortiz, C. 2009. Análisis De Aflatoxina M₁ En Leche Fresca De Establos (en línea). *Revista*

de Investigaciones Veterinarias del Perú 20(1):139-141. Disponible en http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172009000100021.

Ortiz, M; Cazar, M. 2014. Determinación de la presencia de Aflatoxina M1 y Antibióticos en leche cruda de las fincas de mayor producción del cantón Biblán (en línea). s.l., Universidad del Azuay-Ecuador. Disponible en <http://dspace.uazuay.edu.ec/bitstream/datos/3341/1/10109.pdf>.

Otieno, PO; Owuor, PO; Lalah, JO; Pfister, G; Schramm, K. 2013. Comparative evaluation of ELISA kit and HPLC DAD for the determination of chlorpyrifos ethyl residues in water and sediments. *Talanta* 117:250-257. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.09.014>.

Del Palacio, A; Bettucci, L; Pan, D. 2016. Fusarium and Aspergillus mycotoxins contaminating wheat silage for dairy cattle feeding in Uruguay (en línea). *Brazilian Journal of Microbiology* 47(4):1000-1005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.06.004>.

Palomino-Camargo, C; González -Muñoz, Y. 2014. Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos. *Molecular techniques for detection and identification of pathogens in food : ADVANTAGES AND*. 31(3):535-546.

Patyal, A; Gill, JPS; Bedi, JS; Aulakh, RS. 2020. Potential risk factors associated with the occurrence of aflatoxin M1 in raw milk produced under different farm conditions (en línea). *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes* 55(9):827-834. DOI: <https://doi.org/10.1080/03601234.2020.1787019>.

Peña-Rodas, O; Martinez-Lopez, R; Hernandez-Rauda, R. 2018. Occurrence of Aflatoxin M1 in cow milk in El Salvador: Results from a two-year survey (en línea). *Toxicology Reports* 5:671-678. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.06.004>.

Pereyra, MLG; Alonso, VA; Sager, R; Morlaco, MB; Magnoli, CE; Astoreca, AL; Rosa, CAR; Chiacchiera, SM; Dalcerro, AM; Cavaglieri, LR. 2008. Fungi and selected mycotoxins from pre- and postfermented corn silage (en línea). *Journal of Applied Microbiology* 104(4):1034-1041. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03634.x>.

Pleadin, J. 2015. Mycotoxins in grains and feed - contamination and toxic effect in animals

(en línea). *Biotechnology in Animal Husbandry* 31(4):441-456. DOI: <https://doi.org/10.2298/BAH1504441P>.

Pleadin, J; Frece, J; Markov, K. 2019. Mycotoxins in food and feed (en línea). 1 ed. s.l., Elsevier Inc., vol.89. 297-345 p. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2019.02.007>.

Posthuma-Trumpie, GA; Korf, J; Van Amerongen, A. 2009. Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey (en línea). *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 393(2):569-582. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2287-2>.

Prandini, A; Tansini, G; Sigolo, S; Filippi, L; Laporta, M; Piva, G. 2009. On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products (en línea). *Food and Chemical Toxicology* 47(5):984-991. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.10.005>.

Prelusky, D; Scott, P; Trenholm, H; Lawrance, G. 1990. Minimal Transmission of Zearalenone to Milk of Dairy Cows. *Journal of Environmental Science and Health, Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes* 25(1):87-103. DOI: <https://doi.org/10.1080/03601239009372678>.

Quevedo-Garza, PA; Amador-Espejo, GG; Salas-García, R; Ramos-Peña, EG; Trujillo, AJ. 2020. Aflatoxin M1 determination in infant formulae distributed in Monterrey, Mexico. *Toxins* 12(2):1-8. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins12020100>.

Rahman, HU; Yue, X; Yu, Q; Xie, H; Zhang, W; Zhang, Q; Li, P. 2019. Specific antigen-based and emerging detection technologies of mycotoxins. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 99(11):4869-4877. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.9686>.

Rahmani, J; Alipour, S; Miri, A; Fakhri, Y; Riahi, S-M; Keramati, H; Moradi, M; Amanidaz, N; Pouya, RH; Bahmani, Z; Mousavi Khaneghah, A. 2018. The prevalence of aflatoxin M1 in milk of Middle East region: A systematic review, meta-analysis and probabilistic health risk assessment (en línea). *Food and Chemical Toxicology* 118:653-666. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.06.016>.

Rangel-Muñoz, EJ; Valdivia-Flores, AG; Moreno-Rico, O; Hernández-Delgado, S; Cruz-Vázquez, C; De-Luna-López, MC; Quezada-Tristán, T; Ortiz-Martínez, R; Máyek-Pérez, N. 2020. Caracterización de *Aspergillus Flavus* y cuantificación de aflatoxinas en pienso y leche cruda de vacas en Aguascalientes, México (en línea). *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 11(2):435-454. DOI: <https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i2.5686>.

R Core Team. 2020. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>.

Rodríguez-Blanco, M; Ramos, AJ; Prim, M; Sanchis, V; Marín, S. 2020. Usefulness of the analytical control of aflatoxins in feedstuffs for dairy cows for the prevention of aflatoxin M1 in milk (en línea). *Mycotoxin Research* 36(1):11-22. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12550-019-00362-y>.

Rogowska, A; Pomastowski, P; Sagandykova, G; Buszewski, B. 2019. Zearalenone and its metabolites: Effect on human health, metabolism and neutralisation methods. *Toxicon* 162(March):46-56. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.03.004>.

_____. 2019. Zearalenone and its metabolites: Effect on human health, metabolism and neutralisation methods (en línea). *Toxicon* 162:46-56. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.03.004>.

Rosim, RE; De Oliveira, CA; Corassin, CH. 2018. Aflatoxina M1 e Aflatoxina B1-lisina como Biomarcadores de Avaliação da Eficiência de Adsorventes para Aflatoxinas: Artigo de Revisão. (en línea). *Ensaio e Ciência: C. Biológicas, Agrárias e Da Saúde* 22(3):171-178. Disponible-en: <http://revista.pgskroton.com.br/index.php/ensaioeciencia/article/view/4815>.

Rubio, R; Berruga, M; Molina, A. 2011. Incidencia De Aflatoxina M1 En Leche De Ovejas Manchegas. *Sitio Argentino de Producción Animal* :1-5.

Saha Turna, N; Wu, F. 2019. Risk assessment of aflatoxin-related liver cancer in Bangladesh (en línea). *Food Additives & Contaminants: Part A* 36(2):320-326. DOI: <https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1567941>.

Salazar, I; López, I; Glorio-Paulet, P; Gomez, C. 2021. Aflatoxin B 1 contamination of feedstuff on a dairy farm in Northern Peru and aflatoxin M 1 concentrations in raw milk (en línea). *World Mycotoxin Journal* 14(3):287-292. DOI: <https://doi.org/10.3920/WMJ2020.2672>.

Santos Pereira, C; C. Cunha, S; Fernandes, JO. 2019. Prevalent Mycotoxins in Animal Feed: Occurrence and Analytical Methods (en línea). *Toxins* 11(5):290. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins11050290>.

Schatzmayr, G; Streit, E. 2013. Global occurrence of mycotoxins in the food and feed chain : facts and figures. *World Mycotoxin Journal*, 6(3):213-222. DOI: <https://doi.org/10.3920/WMJ2013.1572>.

Serraino, A; Bonilauri, P; Kerekes, K; Farkas, Z; Giacometti, F; Canever, A; Zambrini, AV; Ambrus, Á. 2019. Occurrence of Aflatoxin M1 in Raw Milk Marketed in Italy: Exposure Assessment and Risk Characterization. *Frontiers in Microbiology* 10(November). DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02516>.

Serrano, H; Cardona, N. 2015. Micotoxicosis y micotoxinas: generalidades y aspectos básicos. (en línea). *Revista CES Medicina* 29(1):143-152. Disponible en <http://www.scielo.org.co/pdf/cesm/v29n1/v29n1a12.pdf>.

Sharaf, O. 2016. Aflatoxin M1 levels in raw milk, pasteurized milk and infant formula (en línea). *Italian Journal of Food Safety* 5(3):158-160. DOI: <https://doi.org/10.4081/ijfs.2016.5788>.

Sharma, H; Jadhav, VJ; Garg, SR. 2019. Aflatoxin M1 in milk in Hisar city, Haryana, India and risk assessment (en línea). *Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance* 00(00):1-5. DOI: <https://doi.org/10.1080/19393210.2019.1693434>.

Shi, L; Yu, T; Luo, M; Wang, H. 2019. Preparation monoclonal β -type anti-idiotypic antibody of zearalenone and development of green ELISA quantitative detecting technique (en línea). *Preparative Biochemistry & Biotechnology* 0(0):1-6. DOI: <https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1703195>.

Shundo, L; Sabino, M; Lutz, IA; Biológica, SDQ; Paulo, S. 2006. Aflatoxin M₁ in milk by Immunoaffinity Column Cleanup with TLC/HPLC Determination. *Brazilian Journal of Microbiology* 37:164-167.

Signorini, ML; Gaggiotti, M; Molineri, A; Chiericatti, CA; Zapata de Basílico, ML; Basílico, JC; Pisani, M. 2012. Exposure assessment of mycotoxins in cow's milk in Argentina (en línea). *Food and Chemical Toxicology* 50(2):250-257. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.09.036>.

Soriano del Castillo, JM. 2007. Micotoxinas en alimentos (en línea). Primera ed. Ediciones Diaz de Santos (ed.). Valencia, España, s.e. 424 p. Disponible en <https://www.editdiazdesantos.com/libros/soriano-micotoxinas-en-alimentos-L03008080101.html>.

Soriano, JM. 2007. Micotoxinas en alimentos (en línea). Santos, ED de (ed.). Madrid-España, s.e. 1-34 p. Disponible en <https://www.editdiazdesantos.com/libros/soriano-micotoxinas-en-alimentos-L03008080101.html>.

Stadler, D; Berthiller, F; Suman, M; Schuhmacher, R; Krska, R. 2019. Novel analytical methods to study the fate of mycotoxins during thermal food processing. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* . DOI: <https://doi.org/10.1007/s00216-019-02101-9>.

Steinkellner, H; Binaglia, M; Dall'Asta, C; Gutleb, AC; Metzler, M; Oswald, IP; Parent-Massin, D; Alexander, J. 2019. Combined hazard assessment of mycotoxins and their modified forms applying relative potency factors: Zearalenone and T2/HT2 toxin (en línea). *Food and Chemical Toxicology* 131:110599. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110599>.

Stypuła-tr, S; Minta, M; Radko, L; Zmudzki, J. 2015. Application of the yeast-based reporter gene bioassay for the assessment of estrogenic activity in cow ' s milk from Poland. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 40:876-885. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.09.022>.

Sugiyama, K; Hiraoka, H; Sugita-Konishi, Y. 2008. Aflatoxin M₁ Contamination in Raw

Bulk Milk and the Presence of Aflatoxin B1 in Corn Supplied to Dairy Cattle in Japan (en línea). *Journal of the Food Hygienic Society of Japan (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)* 49(5):352-355. DOI: <https://doi.org/10.3358/shokueishi.49.352>.

Suliman, SE; Abdalla, MA. 2013. Presence Of Aflatoxin M₁ In Dairy Cattle Milk In Khartoum State-Sudan. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SCIENTIFIC & TECHNOLOGY RESEARCH* 2(4):10-12.

Tsiplakou, E; Anagnostopoulos, C; Liapis, K; Haroutounian, SA; Zervas, G. 2014. Determination of mycotoxins in feedstuffs and ruminant's milk using an easy and simple LC-MS/MS multiresidue method (en línea). *Talanta* 130:8-19. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.06.018>.

Turner, NW; Bramhmbhatt, H; Szabo-Vezse, M; Poma, A; Coker, R; Piletsky, SA. 2015. Analytical methods for determination of mycotoxins: An update (2009-2014) (en línea). *Analytica Chimica Acta* 901(1):12-33. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.10.013>.

Udomkun, P; Nimo, A; Nagle, M; Müller, J; Vanlauwe, B; Bandyopadhyay, R. 2017. Innovative technologies to manage aflatoxins in foods and feeds and the profitability of application – A review. *Food Control* 76:127-138. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.01.008>.

Valverde, M. 2013. Análisis estadístico de la influencia de la Fiebre Aftosa en el desarrollo del sector ganadero al 2009. (en línea). s.l., Universidad Central del Ecuador. . Disponible en <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/1791/1/T-UCE-0005-275.pdf>.

Variante, ACF; Santos, FC dos; Castro, FF de; Barbosa-Tessmann, IP; Santos, GT dos; Pozza, MS dos S. 2018. The occurrence of aflatoxigenic *Aspergillus* spp. in dairy cattle feed in Southern Brazil (en línea). *Brazilian Journal of Microbiology* 49(4):919-928. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.05.005>.

Viegas, S; Assunção, R; Twarużek, M; Kosicki, R; Grajewski, J; Viegas, C. 2019. Mycotoxins feed contamination in a dairy farm – potential implications for milk contamination and workers' exposure in a One Health approach (en línea). *Journal of the*

Science of Food and Agriculture 100:1118-1123. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.10120>.

Warth, B; Braun, D; Ezekiel, CN; Turner, PC; Degen, GH; Marko, D. 2016. Biomonitoring of Mycotoxins in Human Breast Milk: Current State and Future Perspectives. *Chemical Research in Toxicology* 29:1087-1097. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.6b00125>.

Welander, V. 2017. Development of a microwell-based lateral flow immunoassay for detection of tetracycline in cow milk. s.l., Faculty of Engineering, Lund University. 34 p.

Winkler, J; Kersten, S; Meyer, U; Engelhardt, U; Dänicke, S. 2014. Residues of zearalenone (ZEN), deoxynivalenol (DON) and their metabolites in plasma of dairy cows fed Fusarium contaminated maize and their relationships to performance parameters (en línea). *Food and Chemical Toxicology* 65:196-204. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.12.020>.

Winkler, J; Kersten, S; Valenta, H; Meyer, U; Engelhardt, UH; Dänicke, S. 2015. Development of a multi-toxin method for investigating the carryover of zearalenone , deoxynivalenol and their metabolites into milk of dairy cows. *Food Additives & Contaminants* 32(3):371-380. DOI: <https://doi.org/10.1080/19440049.2015.1011714>.

Wu, C; Gao, Y; Li, S; Huang, X; Bao, X; Wang, J; Zheng, N. 2019. Modulation of intestinal epithelial permeability and mucin mRNA (MUC2, MUC5AC, and MUC5B) expression and protein secretion in Caco-2/HT29-MTX co-cultures exposed to aflatoxin M1, ochratoxin A, and zearalenone individually or collectively (en línea). *Toxicology Letters* 309(1):1-9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.03.010>.

Xiong, J; Peng, L; Zhou, H; Lin, B; Yan, P; Wu, W; Liu, Y; Wu, L; Qiu, Y. 2020. Prevalence of Aflatoxin M1 in raw milk and three types of liquid milk products in central-south China (en línea). *Food Control* 108:106840. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106840>.

Yang, D; Jiang, X; Sun, J; Li, X; Li, X; Jiao, R; Peng, Z; Li, Y; Bai, W. 2018. Toxic effects of zearalenone on gametogenesis and embryonic development: A molecular point of review (en línea). *Food and Chemical Toxicology* 119:24-30. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.06.003>.

Yoon, JE; Lee, KY; Seok, JS; Cheng, WN; Kwon, HC. 2020. Zearalenone Induces Endoplasmic Reticulum Stress and Modulates the Expression of Phase I / II Enzymes in Human Liver Cells. *Toxins* 12(1):1-15. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins12010002>.

Yunus, A; Imtiaz, N; Khan, H; Ibrahim, M; Zafar, Y. 2019. Aflatoxin Contamination of Milk Marketed in Pakistan: A Longitudinal Study (en línea). *Toxins* 11(2):110. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins11020110>.

Zhang, Y; Gao, R; Liu, M; Shi, B; Shan, A. 2015. Theriogenology Use of modified halloysite nanotubes in the feed reduces the toxic effects of zearalenone on sow reproduction and piglet development (en línea). *Theriogenology* 83(5):932-941. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.11.027>.

Zheng, N; Gao, YN; Liu, J; Wang, HW; Wang, JQ. 2018. Individual and combined cytotoxicity assessment of zearalenone with ochratoxin A or α -zearalenol by full factorial design (en línea). *Food Science and Biotechnology* 27(1):251-259. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0197-9>.

Zinedine, A; Soriano, JM; Moltó, JC; Mañes, J. 2007. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin (en línea). *Food and Chemical Toxicology* 45(1):1-18. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.07.030>.

VIII. ANEXOS

Anexo 1: Muestreo de leche cruda y encuestas.





Anexo 2: Análisis de AFM₁ por LFIA.



Anexo 3: Análisis de ZEA por ELISA.



Anexo 4: Encuesta Región Costa.



UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
DOCTORADO EN CIENCIA ANIMAL
ENCUESTA PARA PRODUCTORES - COSTA



ANEXO I:

Código

Fecha:

Hora:

Temperatura ambiente:

Humedad relativa:

1. Cuántas vacas en producción tiene su propiedad?

- a. Entre 1 a 20 vacas.....
- b. Entre 21 a 100 vacas.....
- c. Más de 100 vacas.....

2. Su sistema de producción es?

- a. Intensivo (animales estabulados).....
- b. Extensivo (animales en pastoreo).....
- c. Mixto (estabulados y al pastoreo).....

3. Qué tipo de alimentación recibió su ganado en la última semana?

- a. Pasto.....
- b. Ensilado.....
- c. Heno.....
- d. Balanceado.....

4. Si recibe PASTO, con cuál leguminosa se alimenta su ganado?

- | | |
|---|--|
| a. Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>)..... <input type="checkbox"/> | e. Soya (<i>Glycine wightii</i>)..... <input type="checkbox"/> |
| b. Centro (<i>Centrosema pubescens</i>)..... <input type="checkbox"/> | f. Pega-pega (<i>Desmodium sp.</i>)..... <input type="checkbox"/> |
| c. Kudzú (<i>Pueraria phaseoloides</i>)..... <input type="checkbox"/> | g. Leucaena (<i>L. leucocephala</i>)..... <input type="checkbox"/> |
| d. Siratro (<i>M. atropurpureum</i>)..... <input type="checkbox"/> | h. Otros (especifique) _____ |

5. Si recibe PASTO, con cuál gramínea se alimenta su ganado?

- a. Maíz (*Zea mays*).....
- b. Brachiaria (*Brachiaria decumbens*).....
- c. King grass (*Pennisetum typhoides*).....
- d. Guinea (*Panicum maximum*).....
- e. Pasto Elefante (*Pennisetum purpureum*).....
- f. Pasto Estrella (*Cynodon nleuensis*).....
- g. Pará (*Brachiaria mutica*).....
- h. Janeiro (*Eriochloa polystachia*).....
- i. Micay (*Axonopus micay*).....
- j. Napo 701 (*Brachiaria humidicola*).....
- k. Buffel (*Cenchrus ciliaris*).....
- l. Saboya (*Panicum maximum*).....
- m. Otros (especifique) _____



UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
DOCTORADO EN CIENCIA ANIMAL
ENCUESTA PARA PRODUCTORES - COSTA



6. Si ofrece **ENSILADO**, con qué tipo de ingredientes lo elabora?

- a. Maíz.....
- b. Melaza.....
- c. Alfalfa.....
- d. Otros (especifique) _____

7. Si ofrece **ENSILADO**, cómo se almacena el mismo?

- a. Silo de trinchera o zanja.....
- b. Silo de montón.....
- c. Silo de bolsa o microsilo.....
- d. Silo de cajón o bunker.....
- e. Silo de madera.....
- f. Silo press.....
- g. Silo de batería.....

8. Si ofrece **HENO**, con qué tipo de ingredientes lo elabora?

- a. Alfalfa.....
- b. Raygrass.....
- c. Avena.....
- d. Cebada.....
- e. Trigo.....
- f. Mixto.....
- g. Otros (especifique) _____

9. Si ofrece **ALIMENTO BALANCEADO**, cómo consigue el mismo?

- a. Se fabrica dentro de la planta.....
- b. Compra una marca comercial.....
- c. Compra formulaciones Ad-hoc.....
- d. Otra (especifique) _____

10. Si ofrece **ALIMENTO BALANCEADO**, cómo almacena el mismo?

- a. En una bodega cerrada.....
- b. En una bodega abierta.....
- c. No se almacena (se administra inmediatamente).....
- d. Otra (especifique) _____

Anexo 5: Encuesta Región Sierra o Interandina.



**UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
DOCTORADO EN CIENCIA ANIMAL
ENCUESTA PARA PRODUCTORES - SIERRA**



ANEXO II

Código

Fecha:

Hora:

Temperatura ambiente:

Humedad relativa:

1. Cuántas vacas en producción tiene su propiedad?

- a. Entre 1 a 20 vacas.....
- b. Entre 21 a 100 vacas.....
- c. Más de 100 vacas.....

2. Su sistema de producción es?

- a. Intensivo (animales estabulados).....
- b. Extensivo (animales en pastoreo).....
- c. Mixto (estabulados y al pastoreo).....

3. Qué tipo de alimentación recibió su ganado en la última semana?

- a. Pasto (continuar en pregunta 4 y 5).....
- b. Ensilado (continuar en pregunta 6 y 7).....
- c. Heno (continuar en pregunta 8).....
- d. Balanceado (continuar en pregunta 9).....

4. Si recibe PASTO, con cuál leguminosa se alimenta su ganado?

- a. Alfalfa (*Medicago sativa*).....
- b. Trébol blanco (*Trifolium repens*).....
- c. Otros (especifique) _____

5. Si recibe PASTO, con cuál gramínea se alimenta su ganado?

- a. Pasto azul (*Dactylis glomerata*).....
- b. Ray grass (*Lolium multiflorum*).....
- c. Kikuyo (*Pennisetum clandestinum*).....
- d. Holco o pasto lanudo (*Holcus lanatus*).....
- e. King grass (*Pennisetum typhoides*).....
- f. Avena forrajera (*Avena sativa*).....
- g. Setaria (*Setaria sphacelata*).....
- h. Pasto elefante (*Pennisetum purpureum*).....
- i. Maíz (*Zea mays*).....
- j. Brachiaria (*Brachiaria decumbens*).....
- k. Otros (especifique) _____



UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
DOCTORADO EN CIENCIA ANIMAL
ENCUESTA PARA PRODUCTORES - SIERRA



6. Si ofrece ENSILADO, con qué tipo de ingredientes lo elabora?

- a. Maíz.....
- b. Melaza.....
- c. Alfalfa.....
- d. Otros (especifique) _____

7. Si ofrece ENSILADO, cómo se almacena el mismo?

- a. Silo de trinchera o zanja.....
- b. Silo de montón.....
- c. Silo de bolsa o microsilo.....
- d. Silo de cajón o bunker.....
- e. Silo de madera.....
- f. Silo press.....
- g. Silo de batería.....

8. Si ofrece HENO, con qué tipo de ingredientes lo elabora?

- a. Alfalfa.....
- b. Raygrass.....
- c. Avena.....
- d. Cebada.....
- e. Trigo.....
- f. Mixto.....
- g. Otros (especifique) _____

9. Si ofrece ALIMENTO BALANCEADO, cómo consigue el mismo?

- a. Se fabrica dentro de la planta.....
- b. Compra una marca comercial.....
- c. Compra formulaciones Ad-hoc.....
- d. Otra (especifique) _____

10. Si ofrece ALIMENTO BALANCEADO, cómo almacena el mismo?

- a. En una bodega cerrada.....
- b. En una bodega abierta.....
- c. No se almacena (se administra inmediatamente).....
- d. Otra (especifique) _____

Anexo 6: Datos totales obtenidos en la investigación.

Código tesis	VARIABLES					AFLATOXINA M1			ZEARALENONA	
	Mes	Época	Provincia	Tipo de productor	Sistema Producción	Máximo Permitido (Ecuador - Perú) (µg/kg)	Máximo Permitido (Unión Europea) (µg/kg)	LFIA (µg/kg)	Máximo Permitido (Unión Europea) (ppm)	Técnica ELISA (ppm)
PM1	Noviembre	Lluviosa	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,085	0,1	0,0010
PM2	Noviembre	Lluviosa	Pichincha	Grande	Extensivo	0,5	0,05	0,046	0,1	0,0011
PM3	Noviembre	Lluviosa	Pichincha	Grande	Extensivo	0,5	0,05	0,04	0,1	0,0013
PM5	Noviembre	Lluviosa	Pichincha	Grande	Mixto	0,5	0,05	0,08	0,1	0,0013
PM7	Noviembre	Lluviosa	Pichincha	Grande	Mixto	0,5	0,05	0,067	0,1	0,0015
PM9	Noviembre	Lluviosa	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,043	0,1	0,0014
PM10	Noviembre	Lluviosa	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,054	0,1	0,0014
PM12	Noviembre	Lluviosa	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,044	0,1	0,0015
PM13	Noviembre	Lluviosa	Pichincha	Pequeño	Mixto	0,5	0,05	0,05	0,1	0,0011
PM14	Noviembre	Lluviosa	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,052	0,1	0,0012
PM15	Noviembre	Lluviosa	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,057	0,1	0,0012
PM16	Noviembre	Lluviosa	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,095	0,1	0,0013
PM17	Noviembre	Lluviosa	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,054	0,1	0,0012
PM18	Noviembre	Lluviosa	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,066	0,1	0,0016
PM19	Noviembre	Lluviosa	Pichincha	Grande	Extensivo	0,5	0,05	0,044	0,1	0,0015
PM20	Noviembre	Lluviosa	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,063	0,1	0,0015
PM21	Noviembre	Lluviosa	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,042	0,1	0,0011
PM22	Noviembre	Lluviosa	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,039	0,1	0,0011
PM23	Noviembre	Lluviosa	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,042	0,1	0,0010
PM24	Noviembre	Lluviosa	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,052	0,1	0,0011
PQ17	Noviembre	Lluviosa	Pichincha	Grande	Extensivo	0,5	0,05	0,069	0,1	0,0010
PQ18	Noviembre	Lluviosa	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,068	0,1	0,0013
PQ19	Noviembre	Lluviosa	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,061	0,1	0,0014
PQ20	Noviembre	Lluviosa	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,059	0,1	0,0016
PC22	Noviembre	Lluviosa	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,034	0,1	0,0014
PC23	Noviembre	Lluviosa	Pichincha	Grande	Extensivo	0,5	0,05	0,059	0,1	0,0010
PC24	Noviembre	Lluviosa	Pichincha	Pequeño	Extensivo	0,5	0,05	0,054	0,1	0,0010
PC25	Noviembre	Lluviosa	Pichincha	Grande	Mixto	0,5	0,05	0,066	0,1	0,0005
PC26	Noviembre	Lluviosa	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,043	0,1	0,0010
PC27	Noviembre	Lluviosa	Pichincha	Grande	Mixto	0,5	0,05	0,039	0,1	0,0010
PC28	Noviembre	Lluviosa	Pichincha	Pequeño	Extensivo	0,5	0,05	0,068	0,1	0,0010
PC29	Noviembre	Lluviosa	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,043	0,1	0,0011
PC30	Noviembre	Lluviosa	Pichincha	Pequeño	Extensivo	0,5	0,05	0,043	0,1	0,0011
PP31	Noviembre	Lluviosa	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,03	0,1	0,0012
PP32	Noviembre	Lluviosa	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,025	0,1	0,0015
PP33	Noviembre	Lluviosa	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,03	0,1	0,0015
PR34	Noviembre	Lluviosa	Pichincha	Grande	Mixto	0,5	0,05	0,068	0,1	0,0010
PR35	Noviembre	Lluviosa	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,051	0,1	0,0012

PR36	Noviembre	Lluviosa	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,095	0,1	0,0010
PR37	Noviembre	Lluviosa	Pichincha	Pequeño	Extensivo	0,5	0,05	0,068	0,1	0,0012
MEC43	Noviembre	Lluviosa	Manabí	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,169	0,1	0,0014
MEC44	Noviembre	Lluviosa	Manabí	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,042	0,1	0,0010
MEC45	Noviembre	Lluviosa	Manabí	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,059	0,1	0,0015
MEC46	Noviembre	Lluviosa	Manabí	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,053	0,1	0,0010
MCH38	Noviembre	Lluviosa	Manabí	Mediano	Mixto	0,5	0,05	0,049	0,1	0,0080
MCH39	Noviembre	Lluviosa	Manabí	Mediano	Intensivo	0,5	0,05	0,055	0,1	0,0010
MCH40	Noviembre	Lluviosa	Manabí	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,054	0,1	0,0008
MCH41	Noviembre	Lluviosa	Manabí	Grande	Extensivo	0,5	0,05	0,035	0,1	0,0018
MEC42	Noviembre	Lluviosa	Manabí	Grande	Extensivo	0,5	0,05	0,037	0,1	0,0025
MEC47	Noviembre	Lluviosa	Manabí	Grande	Extensivo	0,5	0,05	0,051	0,1	0,0012
MEC48	Noviembre	Lluviosa	Manabí	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,058	0,1	0,0011
MEC49	Noviembre	Lluviosa	Manabí	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,098	0,1	0,0015
SD1	Noviembre	Lluviosa	Santo Domingo	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,055	0,1	0,0035
SD2	Noviembre	Lluviosa	Santo Domingo	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,04	0,1	0,0019
SD3	Noviembre	Lluviosa	Santo Domingo	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,051	0,1	0,0010
SD4	Noviembre	Lluviosa	Santo Domingo	Grande	Extensivo	0,5	0,05	0,04	0,1	0,0011
SD5	Noviembre	Lluviosa	Santo Domingo	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,06	0,1	0,0012
SD6	Noviembre	Lluviosa	Santo Domingo	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,055	0,1	0,0014
SD7	Noviembre	Lluviosa	Santo Domingo	Pequeño	Extensivo	0,5	0,05	0,042	0,1	0,0012
SD8	Noviembre	Lluviosa	Santo Domingo	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,049	0,1	0,0014
SD9	Noviembre	Lluviosa	Santo Domingo	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,052	0,1	0,0013
SD10	Noviembre	Lluviosa	Santo Domingo	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,041	0,1	0,0015
PM1	Agosto	Seca	Pichincha	Grande	Extensivo	0,5	0,05	0,049	0,1	0,0020
PM2	Agosto	Seca	Pichincha	Grande	Mixto	0,5	0,05	0,037	0,1	0,0016
PM3	Agosto	Seca	Pichincha	Grande	Extensivo	0,5	0,05	0,031	0,1	0,0012
PM4	Agosto	Seca	Pichincha	Grande	Extensivo	0,5	0,05	0,078	0,1	0,0014
PM5	Agosto	Seca	Pichincha	Grande	Extensivo	0,5	0,05	0,1	0,1	0,0020
PM6	Agosto	Seca	Pichincha	Grande	Extensivo	0,5	0,05	0,051	0,1	0,0017
PM7	Agosto	Seca	Pichincha	Grande	Mixto	0,5	0,05	0,134	0,1	0,0019
PM8	Agosto	Seca	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,039	0,1	0,0019
PM9	Agosto	Seca	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,048	0,1	0,0021
PM10	Agosto	Seca	Pichincha	Pequeño	Extensivo	0,5	0,05	0,049	0,1	0,0016
PM11	Agosto	Seca	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,048	0,1	0,0013
PM12	Agosto	Seca	Pichincha	Pequeño	Extensivo	0,5	0,05	0,032	0,1	0,0014
PM13	Agosto	Seca	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,074	0,1	0,0020
PM14	Agosto	Seca	Pichincha	Mediano	Mixto	0,5	0,05	0,023	0,1	0,0016
PM15	Agosto	Seca	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,096	0,1	0,0016
PM16	Agosto	Seca	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,043	0,1	0,0018
PQ17	Agosto	Seca	Pichincha	Grande	Extensivo	0,5	0,05	0,042	0,1	0,0017
PQ18	Agosto	Seca	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,034	0,1	0,0017
PQ19	Agosto	Seca	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,044	0,1	0,0017
PQ20	Agosto	Seca	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,036	0,1	0,0014
PQ21	Agosto	Seca	Pichincha	Pequeño	Extensivo	0,5	0,05	0,07	0,1	0,0014

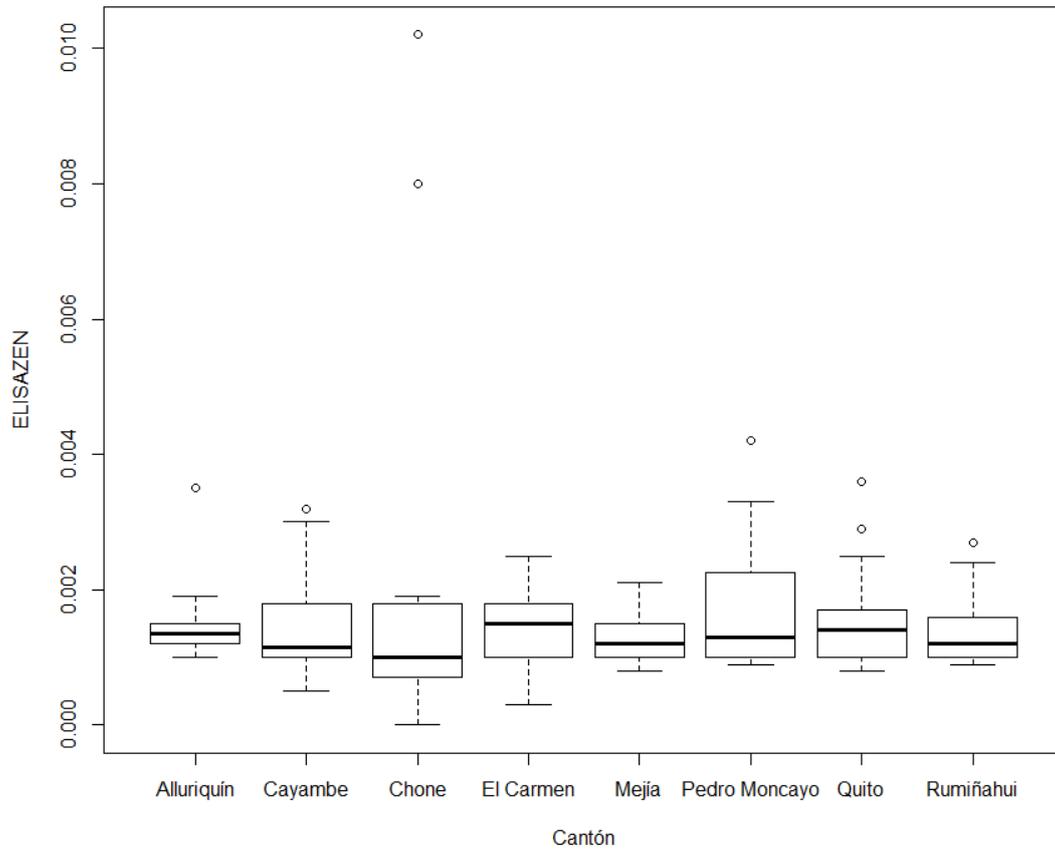
PC22	Agosto	Seca	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,048	0,1	0,0019
PC23	Agosto	Seca	Pichincha	Grande	Extensivo	0,5	0,05	0,047	0,1	0,0017
PC24	Agosto	Seca	Pichincha	Pequeño	Extensivo	0,5	0,05	0,056	0,1	0,0016
PC25	Agosto	Seca	Pichincha	Grande	Mixto	0,5	0,05	0,05	0,1	0,0013
PC26	Agosto	Seca	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,045	0,1	0,0014
PC27	Agosto	Seca	Pichincha	Grande	Mixto	0,5	0,05	0,027	0,1	0,0010
PC28	Agosto	Seca	Pichincha	Pequeño	Extensivo	0,5	0,05	0,049	0,1	0,0010
PC29	Agosto	Seca	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,038	0,1	0,0013
PC30	Agosto	Seca	Pichincha	Pequeño	Extensivo	0,5	0,05	0,052	0,1	0,0011
PP31	Agosto	Seca	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,071	0,1	0,0013
PP32	Agosto	Seca	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,067	0,1	0,0013
PP33	Agosto	Seca	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,038	0,1	0,0011
PR34	Agosto	Seca	Pichincha	Grande	Mixto	0,5	0,05	0,089	0,1	0,0017
PR35	Agosto	Seca	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,092	0,1	0,0015
PR36	Agosto	Seca	Pichincha	Mediano	Mixto	0,5	0,05	0,078	0,1	0,0013
PR37	Agosto	Seca	Pichincha	Pequeño	Extensivo	0,5	0,05	0,068	0,1	0,0014
MCH38	Agosto	Seca	Manabí	Mediano	Mixto	0,5	0,05	0,059	0,1	0,0015
MCH39	Agosto	Seca	Manabí	Mediano	Intensivo	0,5	0,05	0,066	0,1	0,0010
MCH40	Agosto	Seca	Manabí	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,06	0,1	0,0011
MCH41	Agosto	Seca	Manabí	Grande	Extensivo	0,5	0,05	0,127	0,1	0,0008
MEC42	Agosto	Seca	Manabí	Grande	Extensivo	0,5	0,05	0,1	0,1	0,0016
MEC43	Agosto	Seca	Manabí	Mediano	Mixto	0,5	0,05	0,049	0,1	0,0020
MEC44	Agosto	Seca	Manabí	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,153	0,1	0,0021
MEC45	Agosto	Seca	Manabí	Mediano	Mixto	0,5	0,05	0,064	0,1	0,0017
MEC46	Agosto	Seca	Manabí	Mediano	Mixto	0,5	0,05	0,226	0,1	0,0018
MEC47	Agosto	Seca	Manabí	Grande	Extensivo	0,5	0,05	0,051	0,1	0,0012
MEC48	Agosto	Seca	Manabí	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,058	0,1	0,0011
MEC49	Agosto	Seca	Manabí	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,127	0,1	0,0015
PM1	Abril	Lluviosa	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,076	0,1	0,0011
PM2	Abril	Lluviosa	Pichincha	Grande	Extensivo	0,5	0,05	0,072	0,1	0,0011
PM3	Abril	Lluviosa	Pichincha	Grande	Extensivo	0,5	0,05	0,08	0,1	0,0011
PM4	Abril	Lluviosa	Pichincha	Grande	Extensivo	0,5	0,05	0,046	0,1	0,0013
PM5	Abril	Lluviosa	Pichincha	Grande	Mixto	0,5	0,05	0,068	0,1	0,0010
PM6	Abril	Lluviosa	Pichincha	Grande	Extensivo	0,5	0,05	0,069	0,1	0,0011
PM7	Abril	Lluviosa	Pichincha	Grande	Mixto	0,5	0,05	0,091	0,1	0,0016
PM8	Abril	Lluviosa	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,029	0,1	0,0010
PM9	Abril	Lluviosa	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,029	0,1	0,0013
PM10	Abril	Lluviosa	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,045	0,1	0,0011
PM11	Abril	Lluviosa	Pichincha	Pequeño	Extensivo	0,5	0,05	0,058	0,1	0,0012
PM12	Abril	Lluviosa	Pichincha	Pequeño	Extensivo	0,5	0,05	0,037	0,1	0,0013
PM13	Abril	Lluviosa	Pichincha	Pequeño	Mixto	0,5	0,05	0,028	0,1	0,0013
PM14	Abril	Lluviosa	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,036	0,1	0,0015
PM15	Abril	Lluviosa	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,045	0,1	0,0013
PM16	Abril	Lluviosa	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,058	0,1	0,0011
PM17	Abril	Lluviosa	Pichincha	Mediano	Mixto	0,5	0,05	0,031	0,1	0,0010

PQ18	Abril	Lluviosa	Pichincha	Grande	Extensivo	0,5	0,05	0,064	0,1	0,0036
PQ19	Abril	Lluviosa	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,035	0,1	0,0025
PQ20	Abril	Lluviosa	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,041	0,1	0,0025
PQ21	Abril	Lluviosa	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,047	0,1	0,0029
PC22	Abril	Lluviosa	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,036	0,1	0,0032
PC23	Abril	Lluviosa	Pichincha	Grande	Extensivo	0,5	0,05	0,054	0,1	0,0029
PC24	Abril	Lluviosa	Pichincha	Pequeño	Extensivo	0,5	0,05	0,054	0,1	0,0030
PC25	Abril	Lluviosa	Pichincha	Grande	Mixto	0,5	0,05	0,046	0,1	0,0026
PC26	Abril	Lluviosa	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,042	0,1	0,0022
PC27	Abril	Lluviosa	Pichincha	Grande	Mixto	0,5	0,05	0,039	0,1	0,0016
PC28	Abril	Lluviosa	Pichincha	Pequeño	Extensivo	0,5	0,05	0,039	0,1	0,0025
PC29	Abril	Lluviosa	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,025	0,1	0,0020
PC30	Abril	Lluviosa	Pichincha	Pequeño	Extensivo	0,5	0,05	0,035	0,1	0,0028
PP31	Abril	Lluviosa	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,045	0,1	0,0030
PP32	Abril	Lluviosa	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,045	0,1	0,0042
PP33	Abril	Lluviosa	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,046	0,1	0,0033
PR34	Abril	Lluviosa	Pichincha	Grande	Extensivo	0,5	0,05	0,04	0,1	0,0011
PR35	Abril	Lluviosa	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,05	0,1	0,0023
PR36	Abril	Lluviosa	Pichincha	Mediano	Mixto	0,5	0,05	0,051	0,1	0,0024
PR37	Abril	Lluviosa	Pichincha	Pequeño	Extensivo	0,5	0,05	0,061	0,1	0,0027
MCH38	Abril	Lluviosa	Manabí	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,119	0,1	0,0005
MCH39	Abril	Lluviosa	Manabí	Mediano	Intensivo	0,5	0,05	0,052	0,1	0,0102
MCH40	Abril	Lluviosa	Manabí	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,059	0,1	0,0006
MCH41	Abril	Lluviosa	Manabí	Grande	Extensivo	0,5	0,05	0,064	0,1	0,0006
MEC42	Abril	Lluviosa	Manabí	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,563	0,1	0,0008
MEC43	Abril	Lluviosa	Manabí	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,303	0,1	0,0006
MEC44	Abril	Lluviosa	Manabí	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,049	0,1	0,0005
MEC45	Abril	Lluviosa	Manabí	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,074	0,1	0,0005
MEC46	Abril	Lluviosa	Manabí	Mediano	Mixto	0,5	0,05	0,072	0,1	0,0005
MEC47	Abril	Lluviosa	Manabí	Grande	Extensivo	0,5	0,05	0,75	0,1	0,0003
MEC48	Abril	Lluviosa	Manabí	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,251	0,1	0,0009
MEC49	Abril	Lluviosa	Manabí	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,076	0,1	0,0010
PM1	Junio	Seca	Pichincha	Mediano	Mixto	0,5	0,05	0,041	0,1	0,0009
PM2	Junio	Seca	Pichincha	Grande	Extensivo	0,5	0,05	0,136	0,1	0,0009
PM3	Junio	Seca	Pichincha	Grande	Mixto	0,5	0,05	0,048	0,1	0,0008
PM4	Junio	Seca	Pichincha	Grande	Intensivo	0,5	0,05	0,077	0,1	0,0008
PM5	Junio	Seca	Pichincha	Grande	Intensivo	0,5	0,05	0,105	0,1	0,0009
PM6	Junio	Seca	Pichincha	Grande	Extensivo	0,5	0,05	0,143	0,1	0,0008
PM7	Junio	Seca	Pichincha	Grande	Mixto	0,5	0,05	0,117	0,1	0,0009
PM8	Junio	Seca	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,055	0,1	0,0009
PM9	Junio	Seca	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,04	0,1	0,0009
PM10	Junio	Seca	Pichincha	Pequeño	Extensivo	0,5	0,05	0,072	0,1	0,0008
PM11	Junio	Seca	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,068	0,1	0,0008
PM12	Junio	Seca	Pichincha	Mediano	Mixto	0,5	0,05	0,751	0,1	0,0008
PM13	Junio	Seca	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,136	0,1	0,0009

PM14	Junio	Seca	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,058	0,1	0,0011
PM15	Junio	Seca	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,098	0,1	0,0009
PM16	Junio	Seca	Pichincha	Mediano	Mixto	0,5	0,05	0,039	0,1	0,0013
PQ17	Junio	Seca	Pichincha	Grande	Extensivo	0,5	0,05	0,059	0,1	0,0008
PQ18	Junio	Seca	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,289	0,1	0,0009
PQ19	Junio	Seca	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,078	0,1	0,0010
PQ20	Junio	Seca	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,066	0,1	0,0012
PQ21	Junio	Seca	Pichincha	Pequeño	Extensivo	0,5	0,05	0,17	0,1	0,0009
PC22	Junio	Seca	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,045	0,1	0,0009
PC23	Junio	Seca	Pichincha	Grande	Extensivo	0,5	0,05	0,051	0,1	0,0013
PC24	Junio	Seca	Pichincha	Pequeño	Extensivo	0,5	0,05	0,063	0,1	0,0012
PC25	Junio	Seca	Pichincha	Grande	Mixto	0,5	0,05	0,045	0,1	0,0010
PC26	Junio	Seca	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,064	0,1	0,0008
PC27	Junio	Seca	Pichincha	Grande	Mixto	0,5	0,05	0,054	0,1	0,0009
PC28	Junio	Seca	Pichincha	Pequeño	Extensivo	0,5	0,05	0,05	0,1	0,0009
PC29	Junio	Seca	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,05	0,1	0,0008
PC30	Junio	Seca	Pichincha	Pequeño	Extensivo	0,5	0,05	0,056	0,1	0,0009
PP31	Junio	Seca	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,057	0,1	0,0009
PP32	Junio	Seca	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,055	0,1	0,0009
PP33	Junio	Seca	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,039	0,1	0,0009
PR34	Junio	Seca	Pichincha	Grande	Mixto	0,5	0,05	0,063	0,1	0,0009
PR35	Junio	Seca	Pichincha	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,069	0,1	0,0009
PR36	Junio	Seca	Pichincha	Mediano	Mixto	0,5	0,05	0,124	0,1	0,0009
PR37	Junio	Seca	Pichincha	Pequeño	Extensivo	0,5	0,05	0,076	0,1	0,0010
MCH38	Junio	Seca	Manabí	Mediano	Mixto	0,5	0,05	0,066	0,1	0,0010
MCH39	Junio	Seca	Manabí	Mediano	Mixto	0,5	0,05	0,117	0,1	0,0000
MCH40	Junio	Seca	Manabí	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,206	0,1	0,0018
MCH41	Junio	Seca	Manabí	Grande	Extensivo	0,5	0,05	0,053	0,1	0,0019
MEC42	Junio	Seca	Manabí	Grande	Mixto	0,5	0,05	0,066	0,1	0,0018
MEC43	Junio	Seca	Manabí	Mediano	Mixto	0,5	0,05	0,053	0,1	0,0020
MEC44	Junio	Seca	Manabí	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,745	0,1	0,0018
MEC45	Junio	Seca	Manabí	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,109	0,1	0,0019
MEC46	Junio	Seca	Manabí	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,048	0,1	0,0017
MEC47	Junio	Seca	Manabí	Grande	Extensivo	0,5	0,05	0,047	0,1	0,0019
MEC48	Junio	Seca	Manabí	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,059	0,1	0,0018
MEC49	Junio	Seca	Manabí	Mediano	Extensivo	0,5	0,05	0,127	0,1	0,0018

Anexo 7: Resultados estadísticos obtenidos de ZEA.

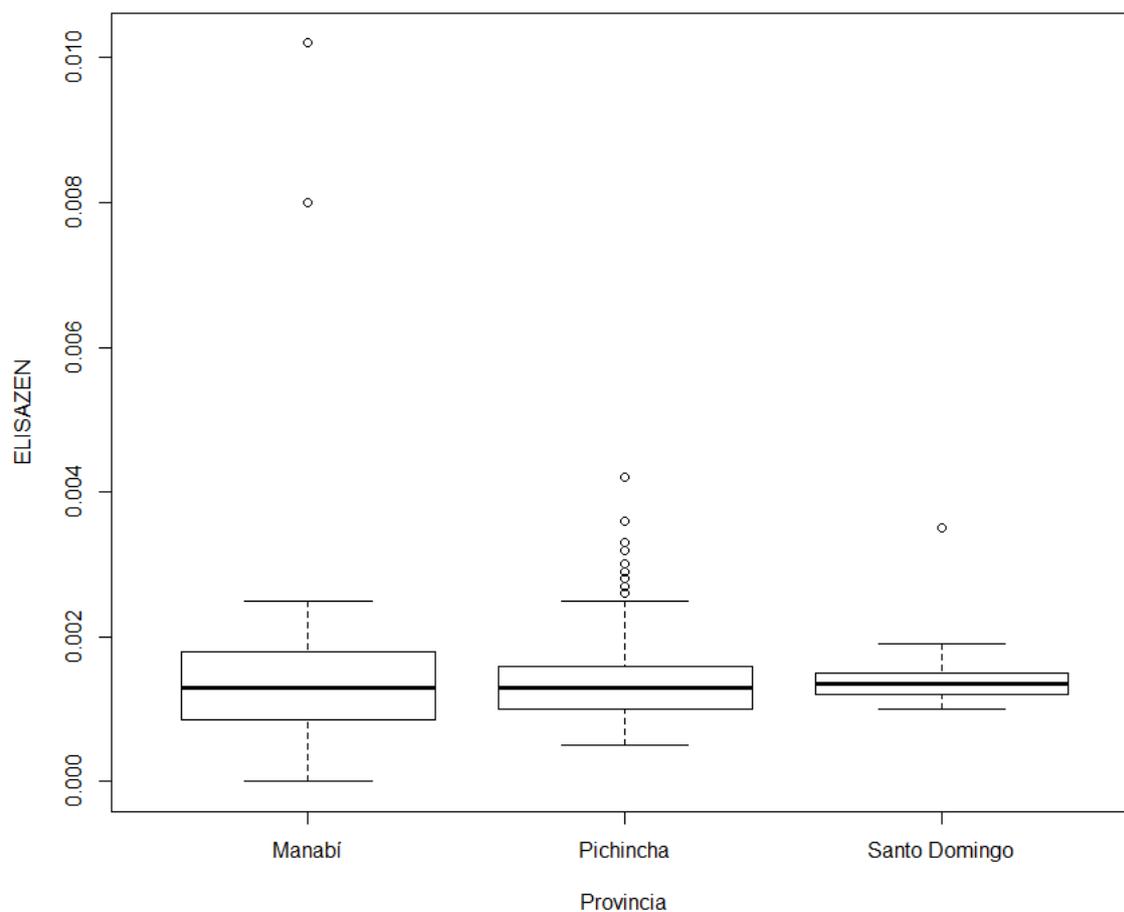
Diagrama de caja de los resultados de ZEA, por cantón.



Valores resumen de ZEA, desglosado por cantones.

Cantón	Mínimo (ppm)	Mediana (ppm)	Media (ppm)	Máximo (ppm)	Kruskal Wallis (p valor)
Mejía	0.00080	0.00120	0.00127	0.00210	0.5683
Quito	0.00080	0.00140	0.00164	0.00360	
Cayambe	0.00050	0.00115	0.00147	0.00320	
Pedro Moncayo	0.00090	0.00130	0.00176	0.00420	
Rumiñahui	0.00090	0.00120	0.00141	0.00270	
Chone	0.00000	0.00100	0.00204	0.01020	
El Carmen	0.00030	0.00150	0.00138	0.00250	
Alluriquín	0.00100	0.00135	0.00155	0.00350	
TOTAL	0.00000	0.001300	0.001461	0.010200	

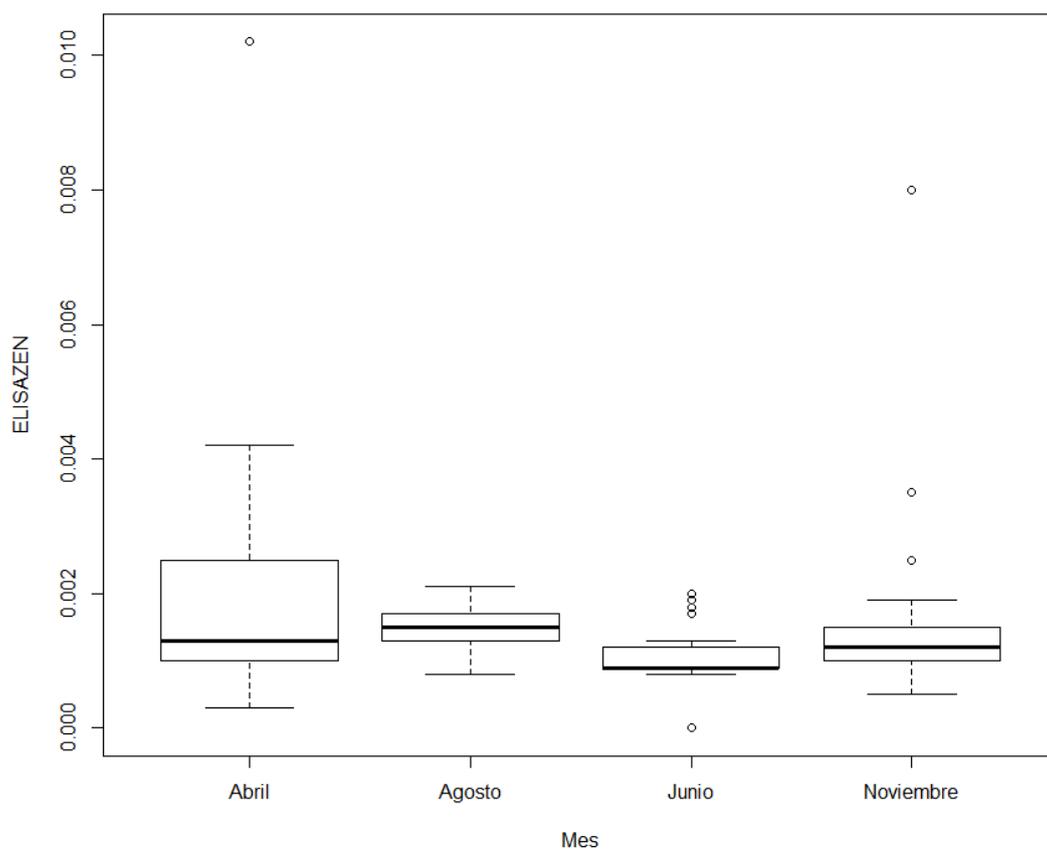
Diagrama de caja de los resultados de ZEA por Provincias.



Valores resumen de ZEA desglosado por provincias.

Provincia	Mínimo (ppm)	Mediana (ppm)	Media (ppm)	Máximo (ppm)	Kruskal Wallis (p valor)
Pichincha	0.000500	0.001300	0.001413	0.004200	0.6541
Manabí	0.000000	0.001300	0.001600	0.010200	
Santo Domingo	0.001000	0.001350	0.001550	0.003500	

Diagrama de caja de los resultados de ZEA por meses.



Valores resumen de ZEA desglosado por meses.

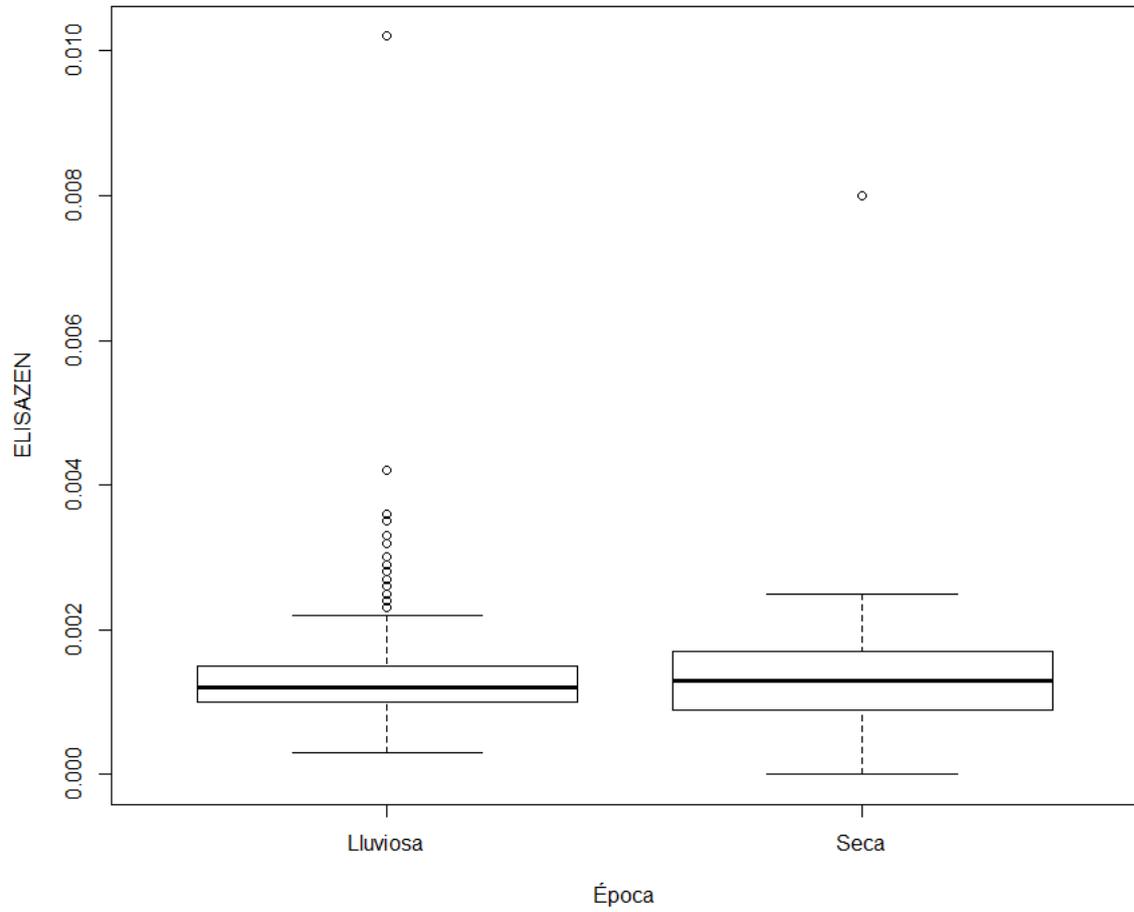
Meses	Mínimo (ppm)	Mediana (ppm)	Media (ppm)	Máximo (ppm)	Kruskal Wallis (p valor)
Abril	0.00030	0.00130	0.00185	0.01020	2.253e-07
Junio	0.0000	0.0009	0.0011	0.0020	
Agosto	0.00080	0.00150	0.00152	0.00210	
Noviembre	0.00050	0.00120	0.00140	0.00800	

Valores de ZEN por la prueba de Mann-Whitney (con corrección Bonferroni), por meses.

	Abril	Agosto	Junio
Agosto	1.0000	-	-
Junio	0.00404*	1.8e ⁻⁰⁶ *	-
Noviembre	1.0000	0.00055*	0.00018*

* Diferencias significativas

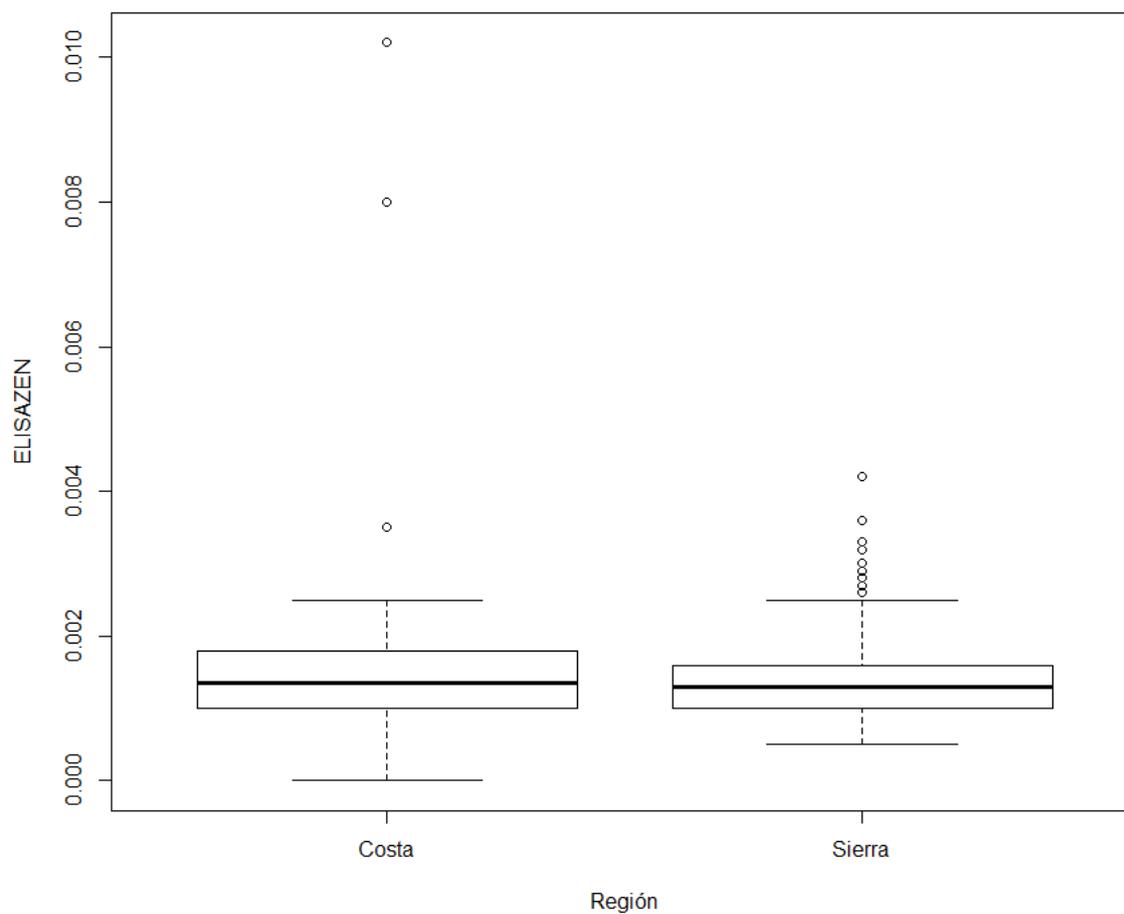
Diagrama de caja de los resultados de ZEA por época climática.



Valores resumen de ZEA desglosado por época climática.

Época climática	Mínimo (ppm)	Mediana (ppm)	Media (ppm)	Máximo (ppm)	Wilcoxon (p valor)
Lluviosa	0.00030	0.00120	0.00155	0.01020	0.4469
Seca	0.00000	0.00130	0.00138	0.00800	

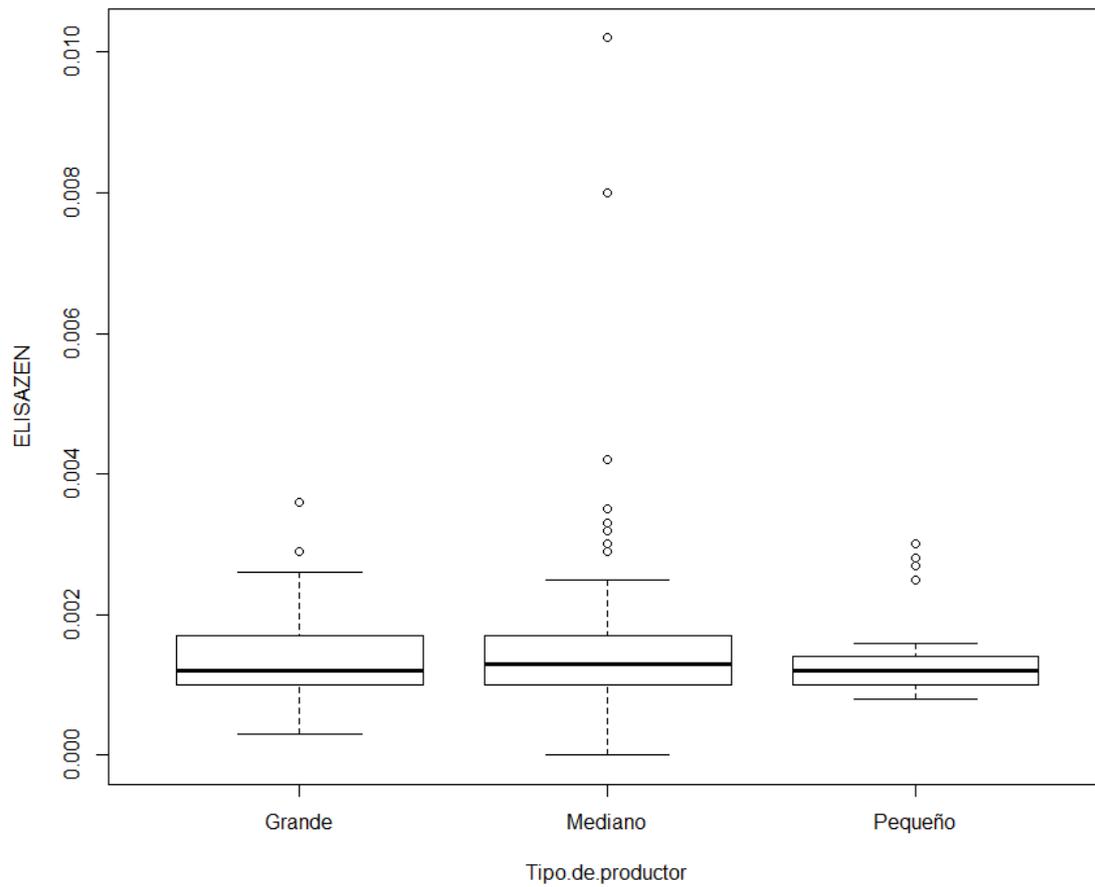
Diagrama de caja de los resultados de ZEA por región climática.



Valores resumen de ZEA desglosado por región climática.

Región climática	Mínimo (ppm)	Mediana (ppm)	Media (ppm)	Máximo (ppm)	Wilcoxon (p valor)
Costa	0.00000	0.00135	0.00159	0.01020	0.8426
Sierra	0.000500	0.00130	0.001413	0.00420	

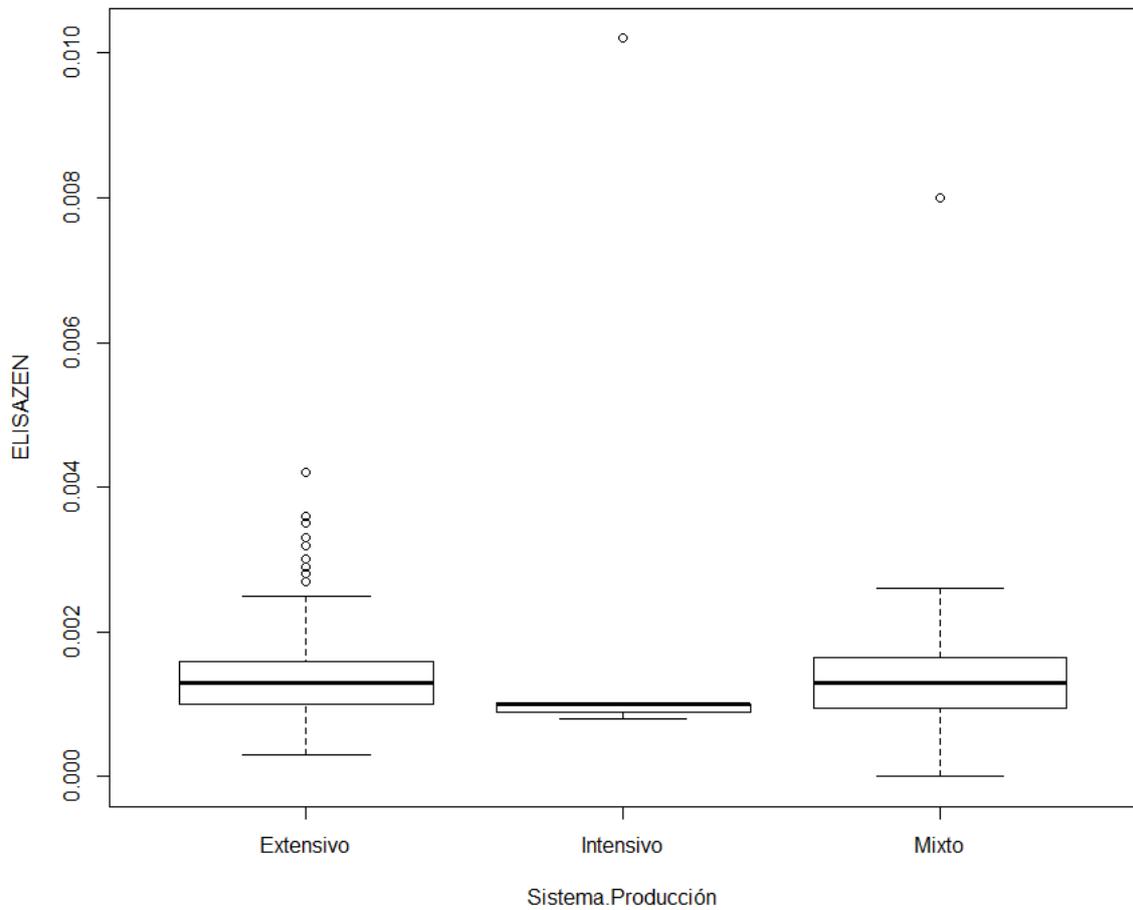
Diagrama de caja de los resultados de ZEA por Tipo de productor.



Valores resumen de ZEA desglosado por tipo de productor.

Tipo de productor	Mínimo (ppm)	Mediana (ppm)	Media (ppm)	Máximo (ppm)	Kruskal Wallis (p valor)
Pequeños	0.00080	0.00120	0.00141	0.00300	0.8225
Medianos	0.00000	0.00130	0.00152	0.01020	
Grandes	0.00030	0.00120	0.00136	0.00360	

Diagrama de caja de los resultados de ZEA por los sistemas de producción.

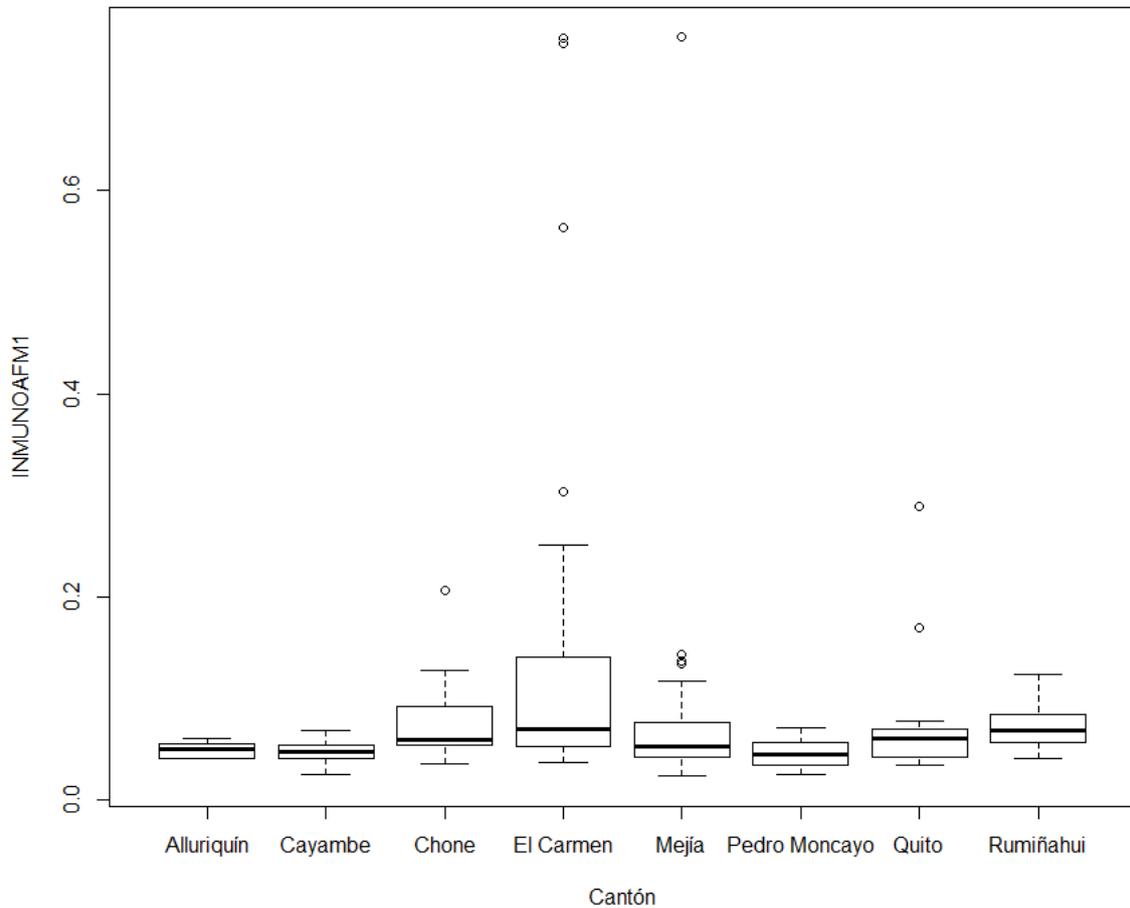


Valores resumen de ZEA desglosado por sistemas de producción.

Sistemas de producción	Mínimo (ppm)	Mediana (ppm)	Media (ppm)	Máximo (ppm)	Kruskal Wallis (p valor)
Extensivo	0.000300	0.001300	0.001421	0.004200	0.4368
Intensivo	0.00080	0.00100	0.00278	0.01020	
Mixto	0.00000	0.00130	0.00146	0.00800	

Anexo 8: Resultados estadísticos de AFM₁.

Diagrama de caja de los resultados de AFM₁ por cantones.



Valores de AFM₁ desglosado por los cantones.

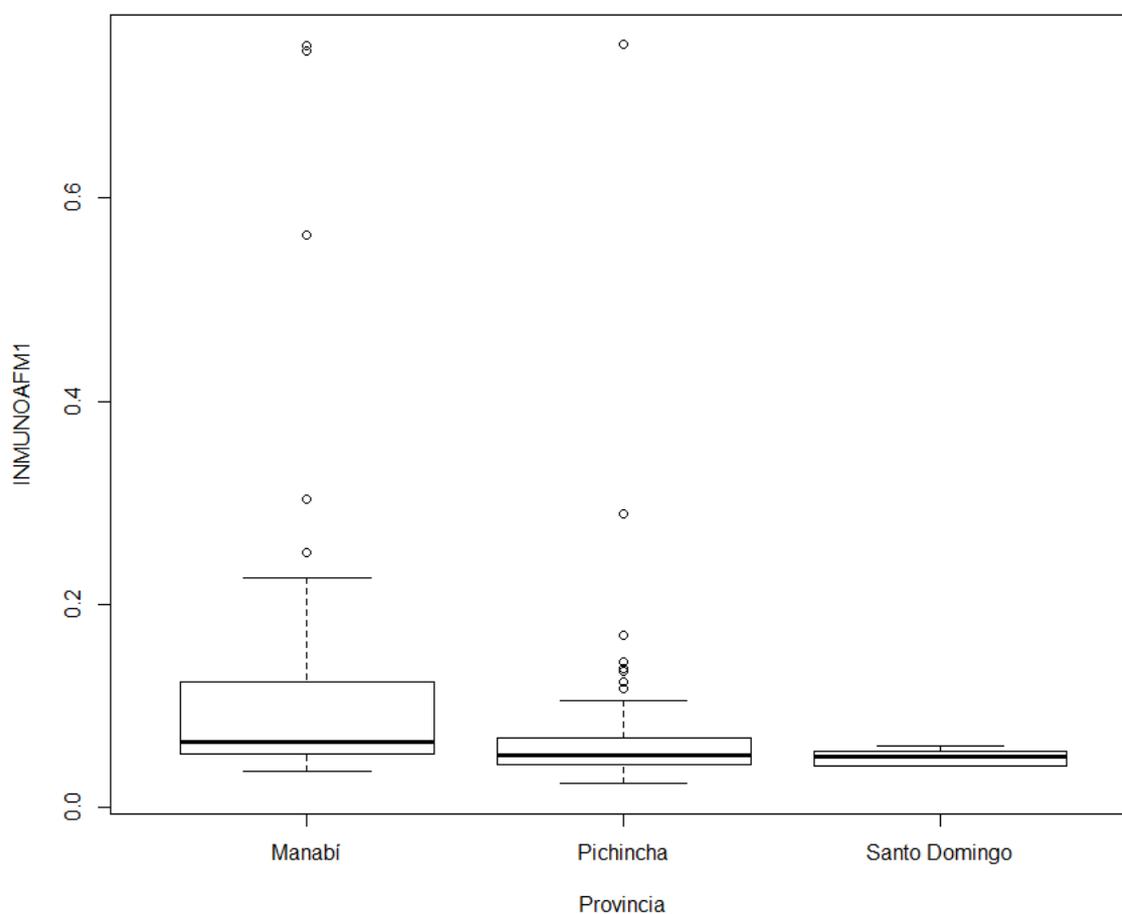
Cantón	Mínimo (µg/kg)	Mediana (µg/kg)	Media (µg/kg)	Máximo (µg/kg)	Kruskal Wallis (p valor)
Mejía	0.02300	0.05200	0.07143	0.75100	2.258e-06
Quito	0.03400	0.06000	0.07400	0.28900	
Cayambe	0.02500	0.04750	0.04747	0.06800	
Pedro Moncayo	0.02500	0.04500	0.04567	0.07100	
Rumiñahui	0.04000	0.06800	0.07144	0.12400	
Chone	0.03500	0.05950	0.07756	0.20600	
El Carmen	0.0370	0.0690	0.1496	0.7500	
Alluriquín	0.04000	0.05000	0.04850	0.0600	
TOTAL	0.02300	0.05400	0.07739	0.75100	

Valores de AFM₁ utilizando la prueba de Mann-Whitney (con corrección Bonferroni), por cantones del muestreo.

	Alluriquín.	Cayambe.	Chone	El Carmen.	Mejía	Pedro Moncayo	Quito
Cayambe	1.00000	-	-	-	-	-	-
Chone	0.23231	0.00883*	-	-	-	-	-
El Carmen	0.07954	8.9e-05*	1.00000	-	-	-	-
Mejía	1.00000	0.80226	1.00000	0.04798*	-	-	-
Pedro Moncayo	1.00000	1.00000	0.29727	0.01477*	1.00000	-	-
Quito	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	-
Rumiñahui	0.07954	0.00072	1.00000	1.00000	1.00000	0.04080*	1.00000

*Diferencias significativas

Diagrama de caja de los resultados de AFM₁ por provincias.



Valores resumen de AFM₁ desglosado por provincias.

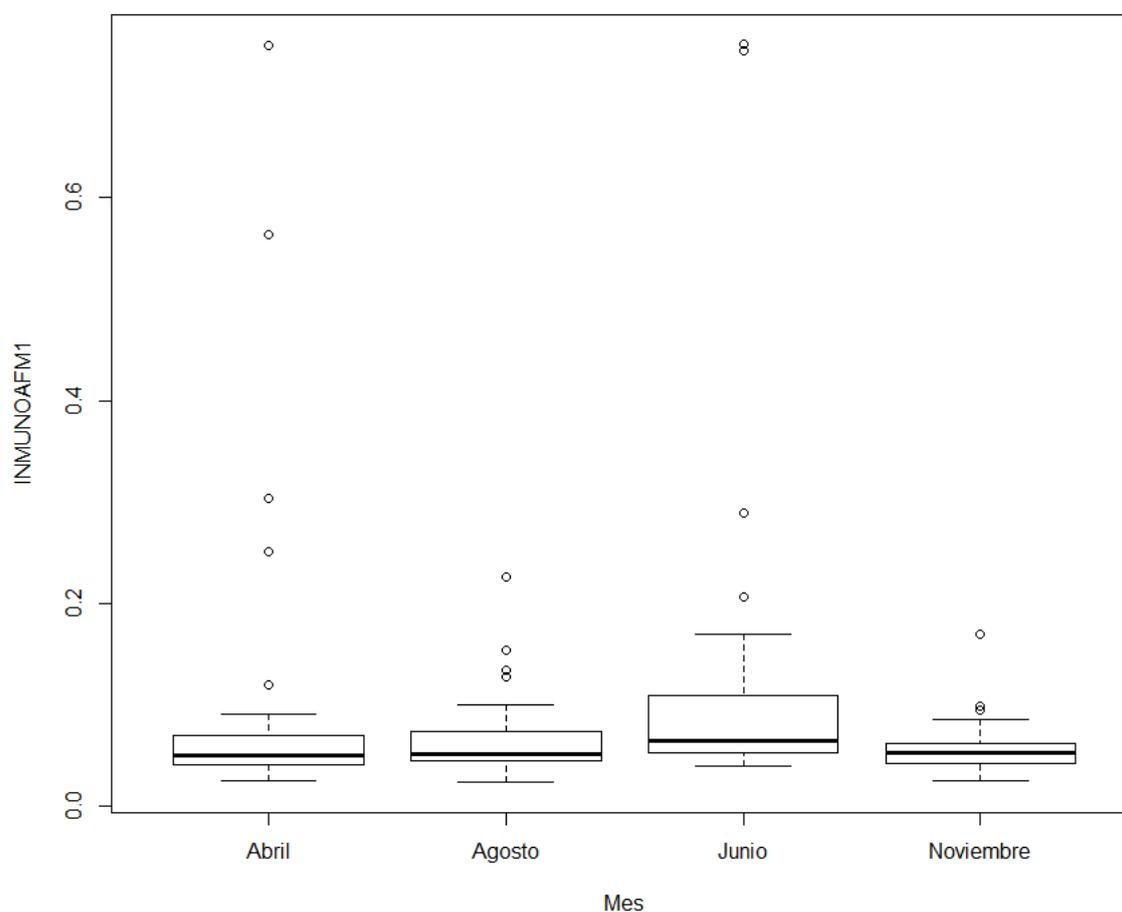
Provincia	Mínimo (µg/kg)	Mediana (µg/kg)	Media (µg/kg)	Máximo (µg/kg)	Kruskal Wallis (p valor)
Pichincha	0.02300	0.05100	0.06398	0.75100	5.332e-05
Manabí	0.0350	0.0640	0.1256	0.7500	
Santo Domingo	0.04000	0.05000	0.04850	0.06000	

Valores de AFM₁ utilizando la prueba de Mann-Whitney (con corrección Bonferroni), por provincias del muestreo.

	Manabí	Pichincha
Pichincha	0.00011*	-
Santo Domingo	0.00541*	1.00000

*Diferencias significativas

Diagrama de caja de los resultados de AFM₁ por meses.



Valores resumen de AFM₁ desglosado por meses.

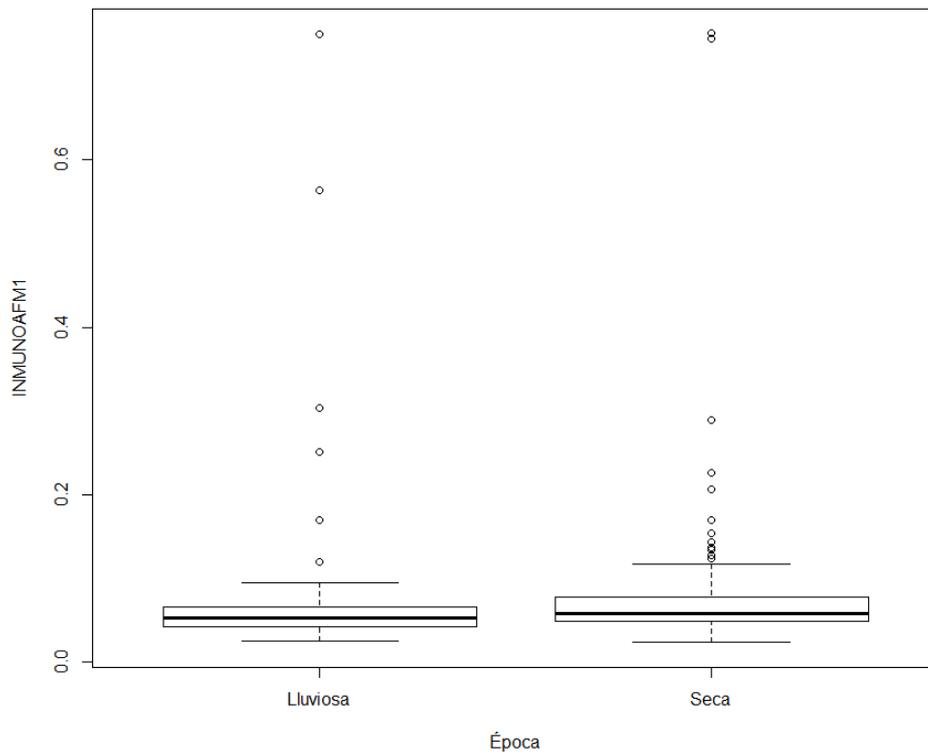
Meses	Mínimo (µg/kg)	Mediana (µg/kg)	Media (µg/kg)	Máximo (µg/kg)	Kruskal Wallis (p valor)
Abril	0.02500	0.05000	0.08622	0.75000	0.001406
Junio	0.0390	0.0640	0.1082	0.7510	
Agosto	0.02300	0.05100	0.06557	0.22600	
Noviembre	0.02500	0.05200	0.05537	0.16900	

Valores de AFM₁ utilizando la prueba de Mann-Whitney (con corrección Bonferroni), por meses del muestreo.

	Abril	Agosto	Junio
Agosto	1.00000	-	-
Junio	0.01252*	0.09223	-
Noviembre	1.00000	1.00000	0.00097*

*Diferencias significativas

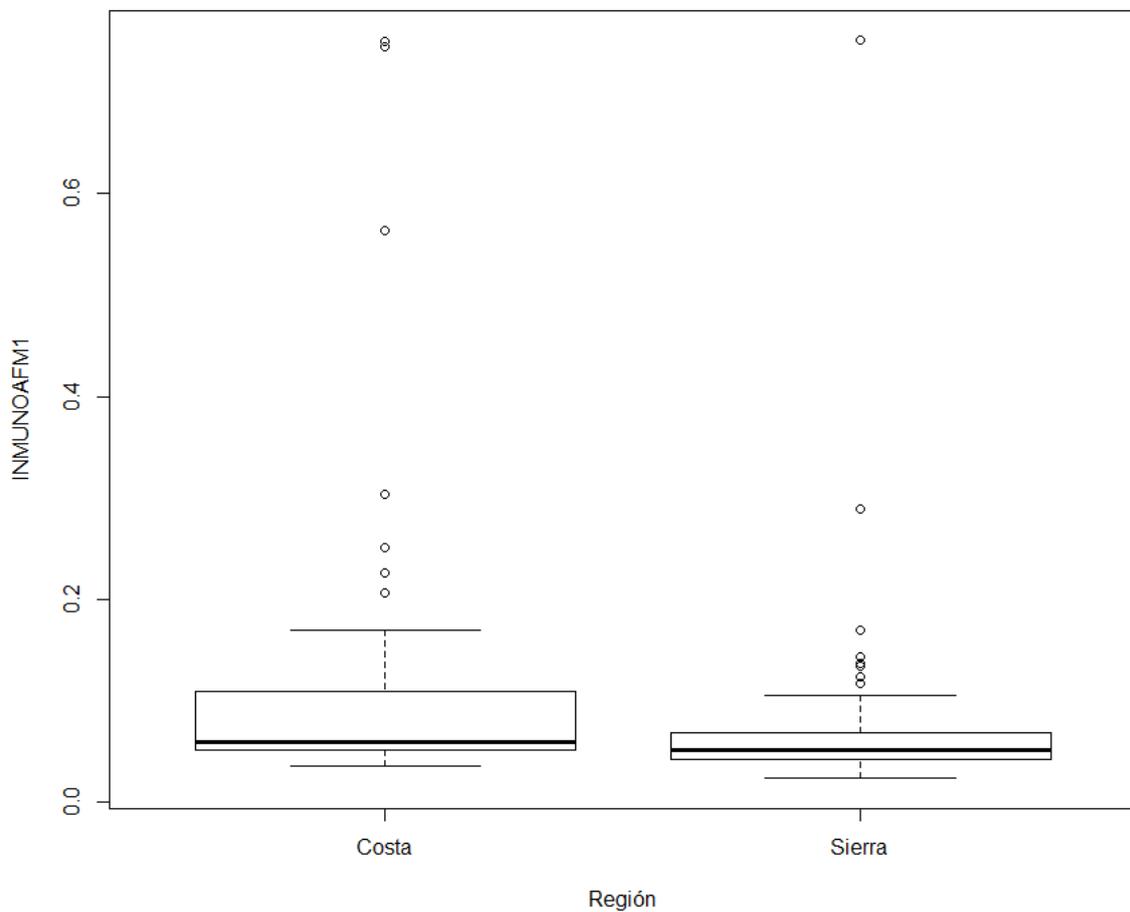
Diagrama de caja de los resultados de AFM₁ por época climática.



Valores resumen de AFM₁ desglosado por época climática.

Época climática	Mínimo (µg/kg)	Mediana (µg/kg)	Media (µg/kg)	Máximo (µg/kg)	Wilcoxon (p valor)
Lluviosa	0.02500	0.05200	0.07011	0.75000	0.005509
Seca	0.02300	0.05800	0.08446	0.75100	

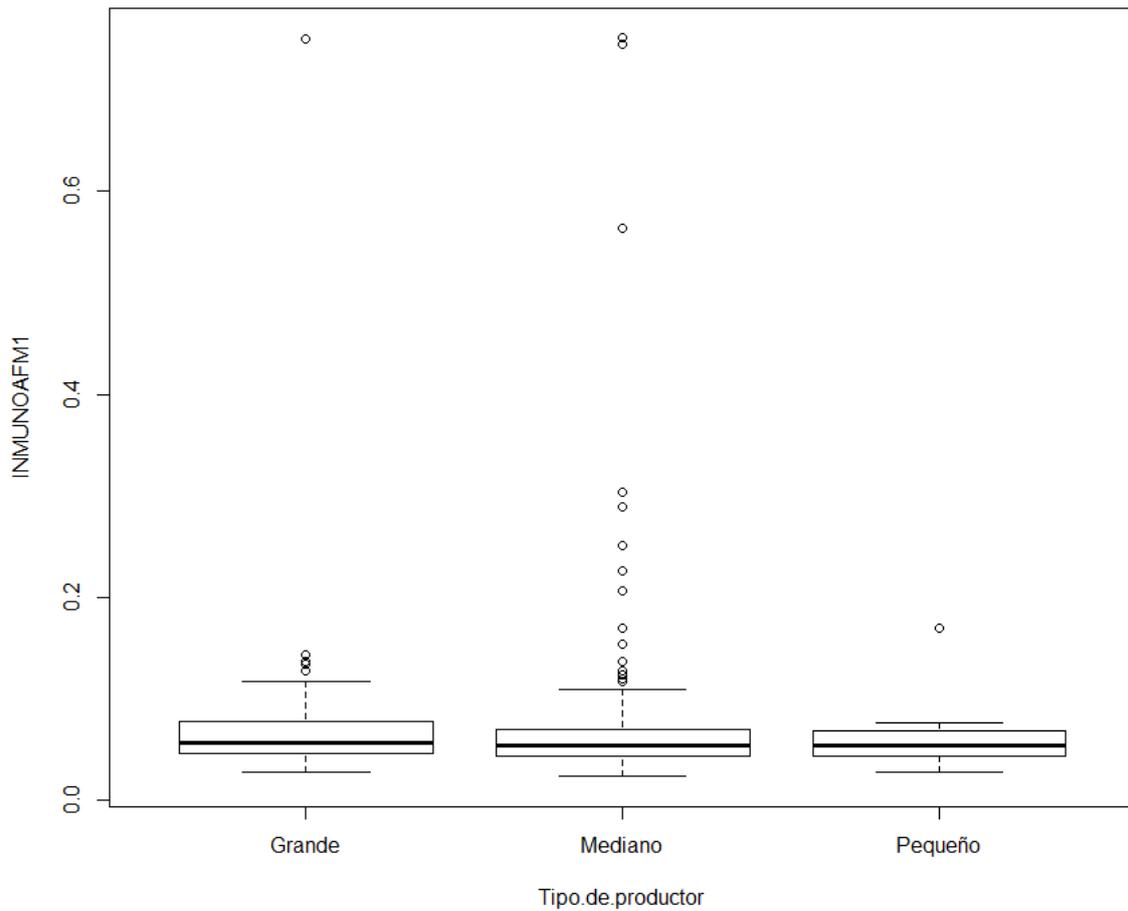
Diagrama de caja de los resultados de AFM₁ por región climática.



Valores resumen de AFM₁ desglosado por región climática.

Región climática	Mínimo (µg/kg)	Mediana (µg/kg)	Media (µg/kg)	Máximo (µg/kg)	Wilcoxon (p valor)
Costa	0.0350	0.0590	0.1123	0.7500	0.0008957
Sierra	0.0230	0.05100	0.06398	0.75100	

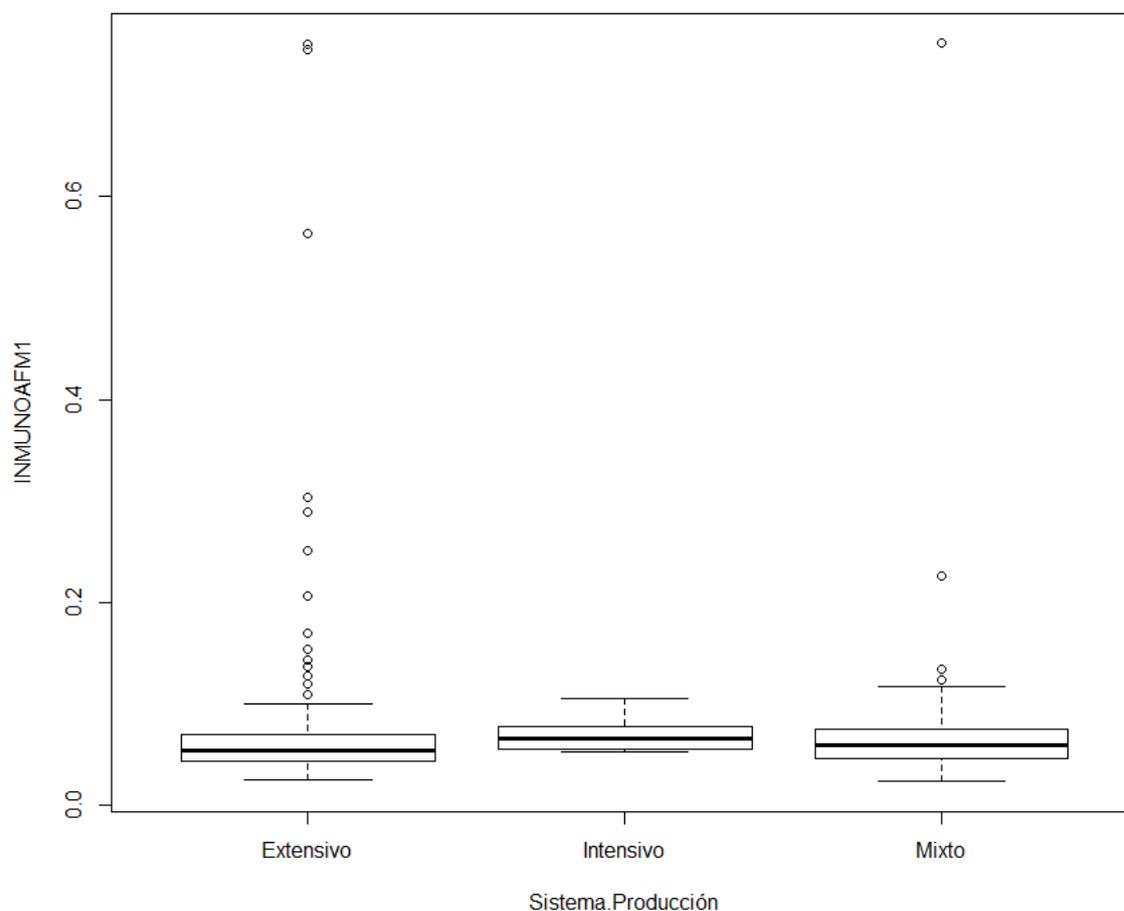
Diagrama de caja de los resultados de AFM₁ por Tipo de productor.



Valores resumen de AFM₁ desglosado por tipo de productor.

Tipo de productor	Mínimo (µg/kg)	Mediana (µg/kg)	Media (µg/kg)	Máximo (µg/kg)	Kruskal Wallis (p valor)
Pequeños	0.02800	0.05400	0.05769	0.17000	0.5976
Medianos	0.02300	0.05400	0.08168	0.75100	
Grandes	0.02700	0.05650	0.07680	0.75000	

Diagrama de caja de los resultados de AFM₁ por los sistemas de producción.



Valores resumen de AFM₁ desglosado por sistemas de producción.

Sistemas de producción	Mínimo (µg/kg)	Mediana (µg/kg)	Media (µg/kg)	Máximo (µg/kg)	Kruskal Wallis (p valor)
Extensivo	0.02500	0.05400	0.07608	0.75000	0.3493
Intensivo	0.05200	0.06600	0.07100	0.10500	
Mixto	0.02300	0.05900	0.08372	0.75100	

Anexo 9: Resultados estadísticos de la asociación de factores de riesgo de la presencia de AFM₁.

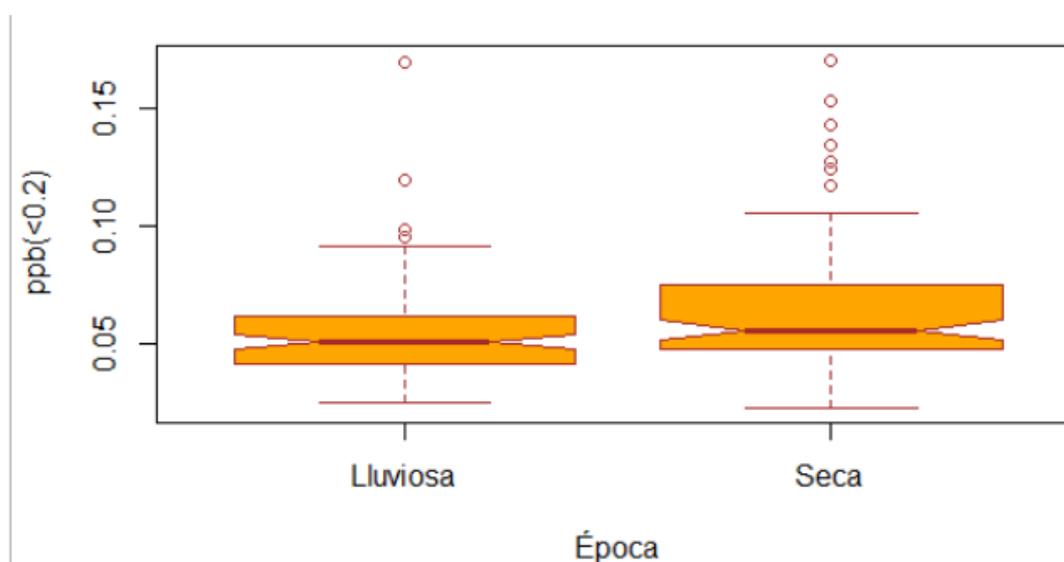
Tabla de Anova (Prueba Tipo III) para asociación de la presencia de AFM₁.

Unidad de medida: µg/kg (ppb)				
	Suma Sq	Df	Valor F	P(>F) (Tukey)
(Intercepto)	603.03	1	213.1492	< 2.2e-16 ***
Época	7.52	1	2.6577	0.104749
Tipo de productor	45.95	2	8.1218	0.000416 ***
Sistema producción	59.42	2	10.5018	4.786e-05 ***
Leguminosas	25.55	1	9.0309	0.003023 **
Gramíneas	0.02	1	0.0063	0.936863
Silo	9.88	1	3.4923	0.063237 .
Heno	0.07	1	0.0240	0.877101
Balanceado	3.62	2	0.6391	0.528951
Almacenaje	5.33	2	0.9421	0.391659
Residuales	523.39	185		

Resultados de AFM₁ por época climática

Epoca	Media	SE	df	Más bajo.CL	Más alto.CL
Lluviosa	0.0757	0.0137	185	0.0447	0.107
Seca	0.0846	0.0131	185	0.0552	0.114

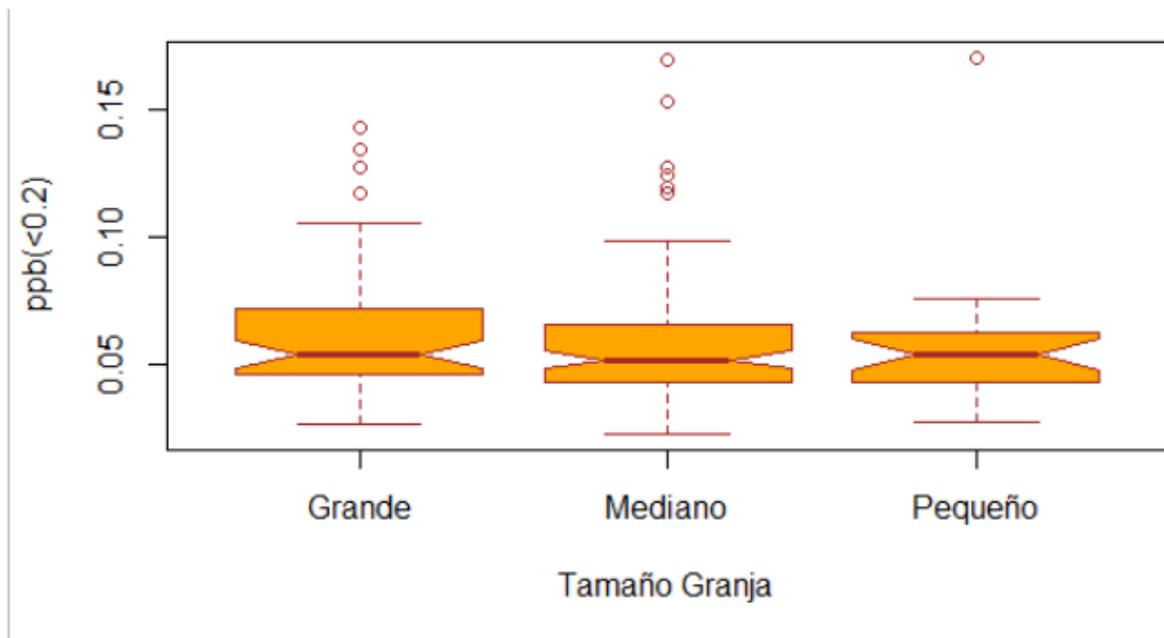
Diagrama de caja de los resultados de AFM₁ por los sistemas de producción.



Resultados de AFM₁ por tipo de productor.

Tipo de productor	Media	SE	df	Más bajo.CL	Más alto.CL
Grande	0.0892	0.0133	185	0.0572	0.121
Mediano	0.0753	0.0132	185	0.0436	0.107
Pequeño	0.0760	0.0137	185	0.0431	0.109

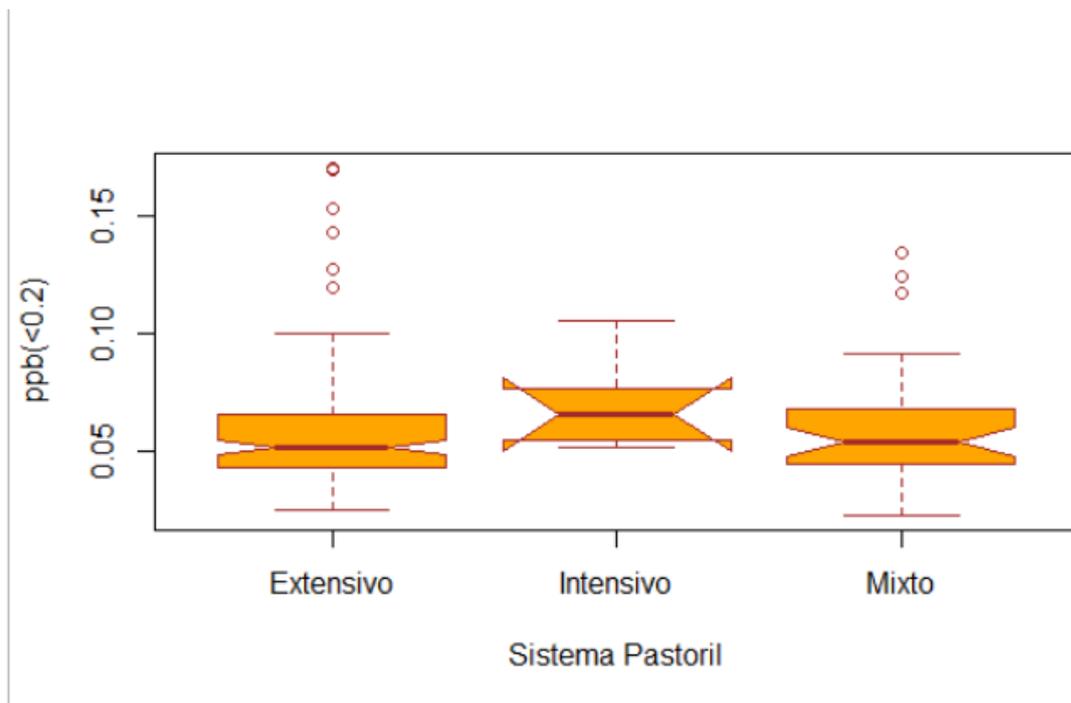
Diagrama de caja de los resultados de AFM₁ por tipo de productor.



Resultados de AFM₁ por sistema de producción.

Sistema de producción	Media	SE	df	Más bajo.CL	Más alto.CL
Extensivo	0.0832	0.0129	185	0.0520	0.114
Intensivo	0.0896	0.0142	185	0.0553	0.124
Mixto	0.0677	0.0134	185	0.0355	0.100

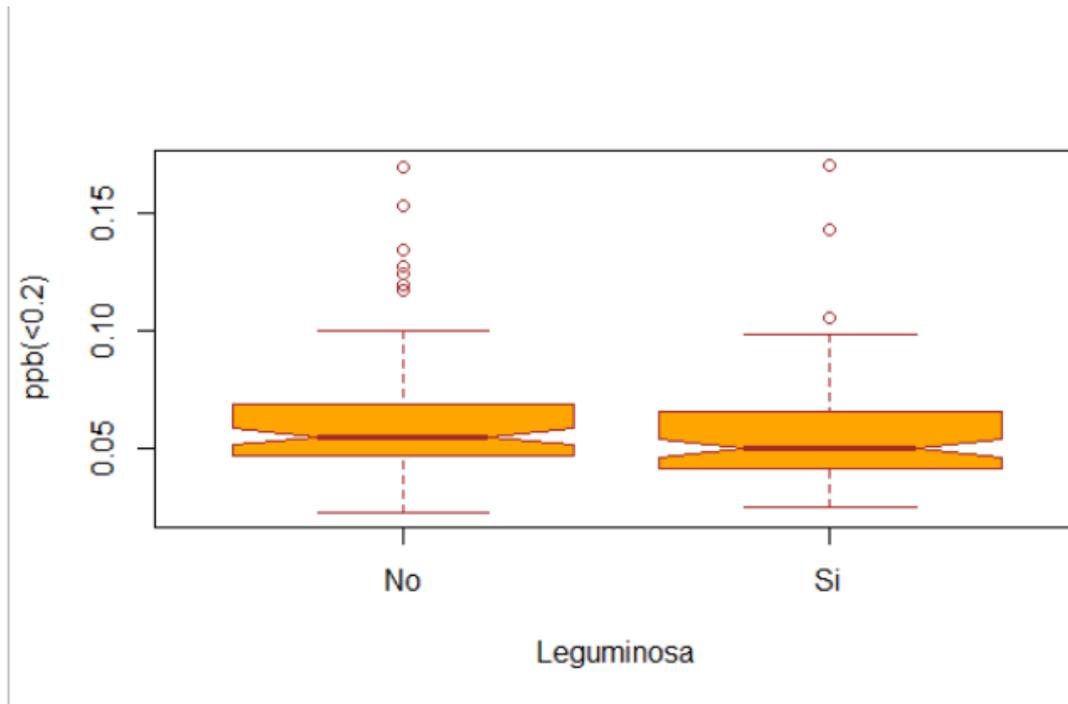
Diagrama de caja de los resultados de AFM₁ por sistema de producción.



Resultados de AFM₁ por leguminosas.

Leguminosas	Media	SE	df	Más bajo.CL	Más alto.CL
No	0.0884	0.0131	185	0.0588	0.118
Si	0.0719	0.0137	185	0.0410	0.103

Diagrama de caja de los resultados de AFM₁ por leguminosas.



Resultados de AFM₁ por leguminosas.

Silaje	Media	SE	df	Más bajo.CL	Más alto.CL
No	0.0696	0.0137	185	0.0388	0.100
Si	0.0908	0.0149	185	0.0571	0.124

Diagrama de caja de los resultados de AFM₁ por uso de ensilaje.

