

Efecto de la radiación UVC sobre la retención y la bioaccesibilidad de la aflatoxina M1
en leche bovina

Jeniffer Juliana González Vargas y Sergio Andrés Pinilla Velásquez

Trabajo de Grado para Optar el título de Química

Director:

Arley René Villamizar Jaimes

Químico, Msc

Codirector:

Luis Javier López Giraldo

Dr. Química, Bioquímica y ciencia de alimentos

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2025

Dedicatoria

A Dios, por creer en mí y mostrarme caminos donde no los veía. Por ser mi guía y refugio en todo momento. Sin él, este momento no habría sido posible.

A mi mamá, mi papá y mi hermano, por ser mi raíz, mi fuerza e inspiración. Aún en medio de la adversidad y la incertidumbre, nuestra unión fue mi principal motor para perseverar día a día.

A mis abuelitos, por ser unos segundos padres y orientarme con sus valores y cariño hacia la persona que soy hoy en día.

A mi tía Teresa, por abrirme las puertas de su casa y brindarme un segundo hogar en medio del caos y la aventura de perseguir este sueño. Su generosidad y cariño fueron fundamentales para seguir adelante.

A Manolito, cuya compañía silenciosa, consoló y alivió tristezas cuando más lo necesitaba.

A mi compañero de tesis, por su entrega, compromiso y apoyo constante. Gracias por compartir este proceso de aprendizaje, crecimiento académico y personal.

Jeniffer Juliana González Vargas

Dedicatoria

A Dios, por haberme dado salud y entendimiento, así como la fuerza necesaria para continuar incluso en los momentos más complejos. Por sostenerme cuando sentí que no podía más, y por permitirme culminar esta etapa.

A mis padres y a mi hermano, por su apoyo constante, por su comprensión, por la paciencia en los momentos de dificultad, y por brindarme el respaldo emocional y material necesario para seguir adelante. Su presencia y amor fue fundamental durante este camino.

A Tony y a Hanny, cuya compañía fue mucho más que solo presencia: fueron consuelo, estabilidad y refugio en medio del agotamiento, la frustración y las incertidumbres propias de este camino. A ellos, que sin palabras supieron acompañarme con lealtad y afecto incondicional.

A mi compañera de proyecto y a mí mismo, por la dedicación, el esfuerzo mutuo y la capacidad de apoyarnos mutuamente, incluso en los momentos más difíciles.

Sergio Andrés Pinilla Velásquez

Agradecimientos

A nuestros padres y hermanos, así como a nuestros familiares y amigos más cercanos, por su apoyo constante, comprensión y aliento durante este proceso.

Al grupo de investigación CICTA, en especial al profesor Arley René Villamizar, Luis Javier López, y Sergio Pico, por su orientación, acompañamiento técnico y compromiso en este proyecto. A las Ingenieras químicas Natalia González y Yuli Sandrith Rojas Ardila, por su disposición y apoyo en el desarrollo de uno de los objetivos de este trabajo.

A la Universidad Industrial de Santander, por la formación académica y profesional brindada.

Al profesor Julio Roberto Pinzón Joya, por su valiosa colaboración en momentos clave de la parte experimental.

Finalmente, a nuestros evaluadores, por tomarse su tiempo para evaluar este trabajo investigativo.

Tabla de contenido

	Pág.
Introducción.....	11
1. Objetivos	13
1.1. Objetivo general	13
1.2. Objetivos específicos	13
2. Marco teórico	14
2.1. La leche.....	14
2.2. Micotoxinas	16
2.3. Aflatoxinas	17
2.4. Verificación del método analítico.....	21
2.5. Análisis de AFM1 en leche.....	23
2.6. Radiación UV en leche.....	28
2.7. Bioaccesibilidad	31
3. Metodología	32
3.1. Verificación del método analítico.....	33
3.2. Análisis de AFM1.....	35
3.2.1. Extracción y determinación	35
3.2.2. Análisis por HPLC.	36
3.3. Efecto de luz UVC sobre la AFM1 en leche	36
3.4. Bioaccesibilidad.	37

3.4.1. Preparación de las soluciones electrolíticas estándar	38
3.4.2. Digestión oral <i>in vitro</i>	38
3.4.3. Digestión gástrica <i>in vitro</i>	38
3.4.4. Digestión intestinal <i>in vitro</i>	39
3.4.5. Recuperación de la forma detectable de las aflatoxinas	39
3.5. Tratamiento de datos.....	40
4. Resultados y discusión	40
4.1. Verificación del método analítico	40
4.2. Efecto de luz UVC sobre la AFM1 en leche	44
4.3. Bioaccesibilidad.	49
5. Conclusiones	51
Referencias bibliográficas	52

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Composición general de la leche.....	14
Tabla 2. Especies de hongos productores de micotoxinas y sus potenciales alimentos a contaminar.	16
Tabla 3. Antecedentes de extracción y purificación de AFM1 en leche mediante el método QuEChERS con sus diferentes modificaciones.	26
Tabla 4. Antecedentes de radiación UV a la leche con parámetros diferentes.	29
Tabla 5. Composición de las soluciones electrolíticas estándar empleadas para la digestión gastrointestinal.	37
Tabla 6. Datos obtenidos para la curva de calibración mediante el promedio del área.	42
Tabla 7. Concentraciones para el cálculo de la repetibilidad y repetibilidad intermedia.	44
Tabla 8. Concentración de AFM1 para las muestras control. Retención de AFM1 tras la radiación UVC.	45

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Estructuras químicas de las aflatoxinas B1, B2, G1, G2, M1 y M2.	18
Figura 2. Metodología QuEChERS y sus modificaciones.....	24
Figura 3. Estado inicial, retención y bioaccesibilidad.	30
Figura 4. Cromatogramas de la solución estándar certificada de AFM1 (SEC), muestra del grupo ML-1 y pseudo blanco (PsB).	41
Figura 5. Curva de calibración para la AFM1.	42
Figura 6. Porcentaje de reducción de AFM1 para cada leche tras irradiación con luz UVC.	45
Figura 7. Color de la leche tras irradiación con luz UVC.	47
Figura 8. Comparación del porcentaje de reducción de AFM1 para la leche entera UHT con el estudio realizado por Nguyen et al. (2022).....	47

Resumen

Título: Efecto de la radiación UVC sobre la retención y la bioaccesibilidad de la aflatoxina M1 en leche bovina *

Autor: Jeniffer Juliana González Vargas, Sergio Andrés Pinilla Velásquez **

Palabras Clave: Aflatoxinas, bioaccesibilidad, retención, radiación UV.

Descripción:

La aflatoxina M1 (AFM1) es el metabolito hidroxilado principal de la aflatoxina B1, y es expulsada por medio de la orina o de la leche (Rojo et al., 2014). Se ha demostrado que la aflatoxina M1 es cancerígena, y es responsable de generar enfermedades agudas o crónicas, afectando principalmente al hígado (Giovati et al., 2015). La radiación UV es un método físico con la capacidad de inactivar microorganismos y hongos, así como de degradar aflatoxinas (Stanley et al., 2020). En el presente estudio, se hizo la verificación de un método analítico para la detección y cuantificación de aflatoxina M1 en leche empleando la técnica de HPLC-FLD. Después de la verificación del método se obtuvo una linealidad de 0.9995, LOD y LOQ de 0.104 y 0.31 ug/L, respectivamente, %RSD de 9.945%, %RSDri de 7.816% y exactitud de 70.47%. Por otro lado, se implementó un tratamiento de degradación vía irradiación con luz UVC, obteniéndose porcentajes de reducción de AFM1 del 43.70% y 20.76% para la leche entera UHT y la leche cruda, respectivamente, demostrando así la capacidad que tiene la luz UV de degradar ésta toxina. Por último, se evaluó la bioaccesibilidad de AFM1 en la leche irradiada aplicando una simulación gastrointestinal *in vitro*; sin embargo, esta no fue cuantificable, ya que no se observó la señal atribuida a esta toxina en la región cromatográfica correspondiente al tiempo de retención de AFM1 en este estudio (4.68 min), así como en el intervalo de 3.5 a 6 min. Esto sugiere que el método analítico empleado podría no ser aplicable a matrices digestivas.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Arley René Villamizar Jaimes. Químico, Msc. Codirector: Luis Javier López Giraldo. Dr. Química, Bioquímica y ciencia de alimentos.

Abstract

Title: Effect of UVC radiation on the retention and bioaccessibility of aflatoxin M1 in bovine milk*

Author: Jeniffer Juliana González Vargas, Sergio Andrés Pinilla Velásquez **

Key Words: Aflatoxins, bioaccessibility, retention, UV radiation

Description:

Aflatoxin M1 (AFM1) is the main hydroxylated metabolite of aflatoxin B1 and is excreted through urine or milk (Rojo et al., 2014). Aflatoxin M1 has been shown to be carcinogenic and is responsible for causing acute or chronic diseases, mainly affecting the liver (Giovati et al., 2015). UV radiation is a physical method capable of inactivating microorganisms and fungi, as well as degrading aflatoxins (Stanley et al., 2020). In the present study, an analytical method for the detection and quantification of aflatoxin M1 in milk was verified using the HPLC-FLD technique. After verification of the method, a linearity of 0.9995, LOD and LOQ of 0.104 and 0.31 ug/L, respectively, %RSD of 9.945%, %RSDri of 7.816%, and accuracy of 70.47% were obtained. On the other hand, a degradation treatment via UVC light irradiation was implemented, obtaining AFM1 reduction percentages of 43.70% and 20.76% for UHT whole milk and raw milk, respectively, thus demonstrating the ability of UV light to degrade this toxin. Finally, the bioaccessibility of AFM1 in irradiated milk was evaluated by applying an *in vitro* gastrointestinal simulation; however, this was not quantifiable, as the signal attributed to this toxin was not observed in the chromatographic region corresponding to the retention time of AFM1 in this study (4.68 min), nor in the interval from 3.5 to 6 min. This suggests that the analytical method used may not be applicable to digestive matrices.

* Degree Work

** Faculty of Science. School of Chemistry. Director: Arley René Villamizar Jaimes. Chemist, MSc. Codirector: Luis Javier López Giraldo. PhD in Chemistry, Biochemistry and Food Science.

Introducción

Las aflatoxinas (AFs) son metabolitos secundarios tóxicos provenientes de especies fúngicas como el *Aspergillus flavus* y *parasiticus*, responsables de las aflatoxinas “B” y “G”, siendo sus principales representantes la AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2 (Wu et al., 2009). La AFB1 se considera la aflatoxina más tóxica y abundante clasificada en el grupo 1 como compuesto cancerígeno por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) (Dai et al., 2017). Su ingesta mediante alimentos contaminados por especies animales genera su activación y transformación en aflatoxina M1 (AFM1), uno de sus metabolitos hidroxilados más conocidos presente en secreciones animales (como la leche). Debido a su capacidad de causar enfermedades hepáticas crónicas y daños genéticos, la AFM1, al igual que la AFB1, está catalogada en el grupo 1 como compuesto cancerígeno por la IARC (Giovati et al., 2015).

En Colombia, la industria lechera acopió más de 3300 millones de litros de leche cruda en el 2024; además, su consumo aumentó un 0.9% respecto al 2023 (CONtexto ganadero, 2025). La producción de leche para el cuarto trimestre del 2024 aumentó un 13.2% respecto al mismo periodo en 2023, generando así un crecimiento en la exportación de productos lácteos en un 142% respecto al 2023 (Asociación Nacional de Productores de Leche, 2025).

Teniendo en cuenta el nivel de toxicidad de AFM1 en la leche y sus derivados, la FAO/OMS (JECFA) y la Unión Europea (UE) establecieron límites de AFM1 de 0.5 y 0.05 ug/L, respectivamente (Min et al., 2021). En Colombia el Minsalud estableció el límite máximo permitido para AFM1 mediante la Resolución 4506 del 2013, el cual corresponde a 0,5 µg/kg (Ministerio de Salud y Protección Social, 2013). En Boyacá, Colombia, Tarazona-Manrique et al. (2021) encontraron niveles de AFM1 superiores a los permitidos por Minsalud en el 28.12% de muestras de leche cruda analizadas. Un año después, Tarazona-Manrique et al. (2022) hicieron un

nuevo estudio en el mismo lugar, encontrando nuevamente niveles de AFM1 por encima del límite máximo permitido por Minsalud en el 35.15% de muestras de leche cruda, concluyendo que el verano es la estación del año más crítica para la contaminación de la leche con la toxina.

La AFM1 tiene una gran estabilidad térmica, lo que hace que no se genere su degradación en la leche, incluso tras el proceso térmico industrial de ultrapasteurización (UHT), pero presenta inestabilidad cuando interactúa con la luz UV, principalmente con la luz UVC y UVA, debido a la capacidad que poseen éstas para inactivar sustancias químicas tóxicas y microorganismos, así como de degradar aflatoxinas (Stanley et al., 2020). Este efecto se observa en varios estudios realizados en leche, donde se ha logrado una degradación mínima de AFM1 del 50%, y una degradación máxima del 100% (Hassan & Hussein, 2017; Kurup et al., 2021; Nguyen et al., 2022; Kluczkovski et al., 2023). Sin embargo, independientemente de la irradiación con luz UVC, la inestabilidad de la AFM1 en pH cercanos a 3 (Marchese et al., 2018) o similares a los del estómago, podría ocasionar variaciones en su concentración, provocando así posibles aumentos en la bioaccesibilidad de ésta, y a su vez, un riesgo mayor para la salud (Estévez & Peña, 2020)

En Colombia, no se ha realizado ningún estudio donde se evalúe al mismo tiempo el efecto de la luz UVC sobre la retención de AFM1 en leche antes y después de su consumo, empleando un modelo de digestión gastrointestinal *in vitro*. De esta manera, en el presente proyecto de investigación se evaluó el efecto de la luz UVC sobre leche cruda y entera UHT, al igual que la bioaccesibilidad de esta toxina, empleando un modelo de digestión gastrointestinal *in vitro*. Este estudio se realizó en el Grupo de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICTA) de la Universidad Industrial de Santander.

1. Objetivos

1.1. Objetivo general

Estudiar el efecto de la radiación UVC sobre la retención y la bioaccesibilidad de la aflatoxina M1 presente en leche bovina.

1.2. Objetivos específicos

Verificar la técnica de cuantificación de la aflatoxina M1 usando HPLC acoplado a fluorescencia.

Evaluar la retención de la aflatoxina M1 presente en leche UHT y cruda irradiada con luz UVC.

Analizar la bioaccesibilidad de la aflatoxina M1 en la leche irradiada tras una digestión gastrointestinal *in vitro*.

2. Marco teórico

2.1. La leche

La leche es un líquido producido y secretado por las glándulas mamarias de todas las hembras pertenecientes a cualquier especie de mamíferos luego del nacimiento de sus crías que posee una apariencia física opaca y de coloración blanca, así como un pH cercano a 7 (Alais, 1985). Está compuesta por lactosa, sales orgánicas e inorgánicas, y otras sustancias contenidas en la composición de su suero en forma de partículas coloidales tales como proteínas de suero a nivel molecular, caseínas (su proteína principal) distribuidas en grandes agregados coloidales, y lípidos emulsionados en grandes glóbulos. La leche producida por vacas, ovejas y cabras es la más empleada para la dieta de los humanos, siendo la leche de vaca la más producida e importante para la alimentación y distribución, representando alrededor de un 85% de todos los tipos de leche (Fox, 2008). La composición general de la leche de vaca para porciones de 100 gramos se ilustra en la **tabla 1**.

La leche es propensa a la contaminación con microorganismos haciendo que su almacenamiento prolongado sea riesgoso, por lo que las personas han desarrollado productos derivados con mayor estabilidad y de gran importancia nutricional; algunos de sus principales derivados son: leche líquida (40%), queso (35%), leche en polvo (15%), leches concentradas (2%), y productos lácteos fermentados (2%) (Fox, 2008). La producción de derivados lácteos proviene mayormente de la leche de vaca (Shahbandeh, 2023).

Tabla 1.

Composición general de la leche.

Nutrientes	Leche de vaca
Agua (g)	88
Energía (kcal)	61

Proteína (g)	3.2
Grasa (g)	3.4
Lactosa (g)	4.7
Minerales (g)	0.72

Nota. Adaptado de Agudelo y Bedoya (2005)

Las regiones que más produjeron leche en el año 2023 a nivel mundial fueron la Unión Europea, Estados Unidos, India, China, Rusia y Brasil, con 143, 104.1, 99.5, 40.9, 32.3 y 24.5 millones de toneladas métricas, respectivamente, siendo la India el país con mayor cantidad de vacas lecheras en el mundo (59.5 millones). La exportación de productos lácteos aumentó considerablemente en el 2022, con ganancias cercanas a los 68 mil millones de dólares, superando los 39 mil millones de dólares reportados en el 2015, obteniendo así un valor en el mercado de 893 mil millones de dólares en el 2022, con posibilidad de aumentar a los 1243 mil millones de dólares para el 2028 (Shahbandeh, 2023).

En el 2024 en Colombia, el PIB nacional aumentó 1.7%, donde el sector agropecuario subió al 8.1%. La ganadería en general creció 5.6% en su PIB, y la producción de leche creció un 13.2% entre octubre y diciembre respecto a ese mismo periodo del año 2023 (Asociación Nacional de Productores de Leche, 2025). De igual manera, en el 2024 la industria lechera acopió más de 3300 millones de litros de leche cruda, donde el consumo de esta misma fue de 153 litros promedio per cápita, aumentando 0.9% respecto al año 2023 (CONtexto ganadero, 2025). La exportación de productos lácteos en el 2024 creció en un 142%, exportando alrededor de 12329 toneladas, generando alrededor de 40 – 50 millones de dólares (Asociación Nacional de Productores de Leche, 2025)

2.2. Micotoxinas

Las micotoxinas son compuestos químicos obtenidos del metabolismo secundario de los hongos, siendo tóxicas para las personas y algunos animales al momento de su consumo (Steyn, 1995). Son producidas principalmente por especies de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* y *Alternaria*, contaminando alimentos como cereales, frutas y frutos secos, semillas oleaginosas, especias y piensos, tal como se muestra en la **tabla 2** (Ramos et al., 2020), y sus estructuras químicas varían considerablemente según el tipo de micotoxina, presentándose como anillos heterocíclicos individuales de bajo peso molecular, o incluso como anillos de hasta ocho miembros organizados de forma irregular con un peso molecular mayor a 500 Da (Pitt, 2000).

Tabla 2.

Especies de hongos productores de micotoxinas y sus potenciales alimentos a contaminar.

Micotoxina	Especies productoras	Alimentos a contaminar
Aflatoxinas (AF) B1, B2, G1 y G2	<i>Aspergillus</i> sección Flavi (<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomius</i>).	Cereales y derivados (principalmente maíz), frutos secos y derivados, frutas deshidratadas, especias
Ocratoxina A	<i>Aspergillus</i> sección <i>Circumdati</i> (<i>A. ochraceus</i> , <i>A. steynii</i> , <i>A. westerdijkiae</i>). <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> (<i>A. carbonarius</i>). <i>Penicillium verrucosum</i> , <i>P. nordicum</i> .	Cereales y derivados (principalmente trigo y arroz), café, cacao, vino, frutas deshidratadas, especias)
Patulina	<i>Penicillium expansum</i> . <i>Byssochlamys nivea</i> . <i>Aspergillus clavatus</i> .	Manzana, pera y derivados
Citrinina	<i>Monascus purpureus</i> , <i>M. ruber</i> . <i>Penicillium verrucosum</i> , <i>P. citrinum</i> .	Cereales y derivados (principalmente arroz), frutas
Alcaloides ergóticos	<i>Claviceps purpurea</i> , <i>C. fusiformis</i> , <i>C. africana</i> .	Cereales y derivados (principalmente centeno)

Fumonisin B1, B2 y B3	<i>B3 Fusarium</i> sección <i>Liseola</i> (<i>F. verticillioides</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>F. nygamai</i>).	Cereales y derivados (principalmente maíz)
Zearalenona	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. incarnatum</i> , <i>F. sporotrichioides</i>	Todos los cereales y derivados
Deoxinivalenol	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. Culmorum</i> , <i>F. sporotrichioides</i> .	Todos los cereales y derivados

Nota. Adaptado de Ramos et al. (2020).

Los alimentos pueden contaminarse más fácilmente con micotoxinas debido a sus mismas composiciones, así como por las condiciones del suelo o almacenamiento. La humedad excesiva en los campos de siembra o superficie de almacenamiento, cambios agresivos de temperatura, la falta de agua o sequía, cambios en los métodos empleados para la cosecha y la eliminación de insectos, y el contenido de humedad, son algunas de estas condiciones (Coulombe, 1993).

Efectos biológicos de tipo cancerígenos, mutagénicos, teratogénicos, estrogénicos, hemorrágicos, inmunotóxicos, nefrotóxicos, hepatotóxicos, dermatotóxicos, y neurotóxicos, pueden presentarse en personas y animales al llevar una dieta diaria de alimentos contaminados con micotoxinas (Steyn, 1995), afectando principalmente y de forma considerable al funcionamiento del hígado y riñón, pudiendo provocar la muerte (Pitt, 2000).

2.3. Aflatoxinas

Las aflatoxinas (AFs) se aislaron y caracterizaron por primera vez en el Reino Unido, en la década de 1960, donde más de cien mil pavos de corral murieron al comer harina de maní contaminada con moho (Klich, 2007); se consideran como las micotoxinas más relevantes a nivel mundial por su gran nivel de toxicidad en alimentos consumidos por personas y animales

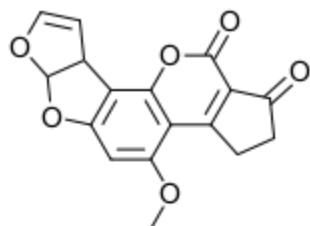
(Coppock et al., 2018), así como por su impacto en la economía para el sector ganadero, agrícola y avícola (Iqbal et al., 2018).

Son metabolitos secundarios producidos generalmente por el género *Aspergillus*, siendo el *A. flavus* el que produce generalmente aflatoxinas B, mientras que el *A. parasiticus* produce aflatoxinas B y G; las aflatoxinas más comunes en los alimentos son la AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2, así como la AFM1 y AFM2 presentes en la leche (Wu et al., 2009), donde la denominación “B” o “G” se relaciona con la coloración azul (blue, in inglés) o verde (green, en inglés) generada por las aflatoxinas al someterse a luz UV en placas de cromatografía de capa fina (TLC), y la numeración “1” y “2” corresponde a sus posiciones en la placa cromatográfica de esta técnica (Tahir et al., 2018).

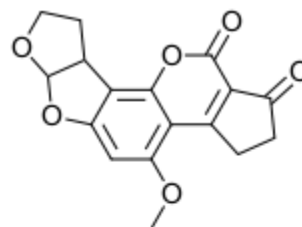
La estructura química de las aflatoxinas consiste en la unión entre una cumarina, familia de las benzopironas, una molécula de bifurano, y un anillo de pentanona para B o lactona para G (Pereira & Bernal, 2018), como se ilustra en la **figura 1**.

Figura 1.

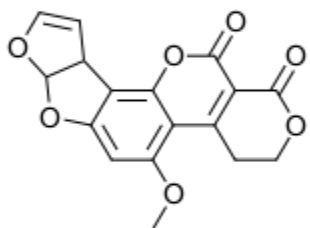
Estructuras químicas de las aflatoxinas B1, B2, G1, G2, M1 y M2.



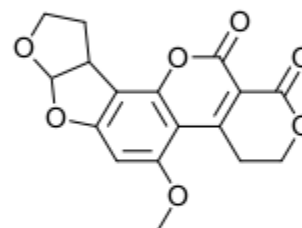
Aflatoxina B1



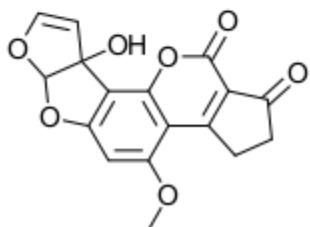
Aflatoxina B2



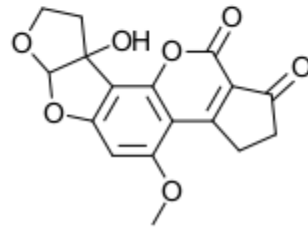
Aflatoxina G1



Aflatoxina G2



Aflatoxina M1



Aflatoxina M2

Nota. Adaptado de Tahir et al. (2018).

La aflatoxina B1 (AFB1) es considerada como la aflatoxina más tóxica y abundante, clasificada como compuesto cancerígeno del grupo I por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) (Dai et al., 2017). Diversos estudios han demostrado la capacidad que tiene la AFB1 de actuar como agente principal para la aparición del carcinoma hepatocelular (CHC), déficit en la hormona de crecimiento, problemas en el sistema inmunológico y desnutrición (Rushing & Selim, 2019). Como las moléculas de aflatoxina son lipofílicas (tienen afinidad por los lípidos), y el hígado es un órgano con comportamiento altamente lipofílico, al desplazarse por medio de la sangre se conservan y concentran en los hepatocitos, causando diferentes

enfermedades incluso hasta cáncer al presentarse una exposición constante (Campagnollo et al., 2016).

Si el alimento consumido por vacas se encuentra contaminado con *Aspergillus flavus* o *parasiticus*, se genera la activación de AFB1 y su transformación al reaccionar con enzimas hepáticas del citocromo P450 (CYP1A2 para la transformación, así como CYP1A2 y CYP3A4 para la activación), produciendo uno de sus metabolitos hidroxilados conocido como aflatoxina M1 (AFM1), M de milk (leche, en inglés), el cual es expulsado por medio de la leche o la orina. El rango de la conversión de AFM1 en leche respecto a la AFB1 consumida es de 0.32-6.2%, y el valor promedio de conversión es del 1.81% (Rojo et al., 2014). Ambas poseen similitudes en sus propiedades químicas debido a que la AFM1 es el metabolito hidroxilado principal de la AFB1, siendo así, ligeramente solubles en agua, solubles únicamente en solventes orgánicos polares, estables térmicamente (> 100 °C), e inestables a luz UV y $\text{pH} > 9$ o ≤ 3 ; su estabilidad térmica es la principal responsable de que no ocurra degradación ni descontaminación de éstas al momento de fabricar alimentos, como en el caso de la pasteurización para la leche o sus derivados (Marchese et al., 2018).

La AFM1, aproximadamente 10 veces menos cancerígena que la AFB1, es responsable de generar enfermedades agudas o crónicas producidas generalmente por el consumo de leche o sus derivados, motivo por el que fue clasificada inicialmente por la IARC como cancerígeno humano en el grupo 2B, sin embargo estudios más recientes generaron su reasignación al grupo 1 (Giovati et al., 2015). Considerando el nivel de toxicidad de AFM1 en la leche y sus derivados, la FAO/OMS (JECFA) y la Unión Europea (UE) establecieron límites de AFM1 de 0.5 y 0.05 $\mu\text{g/L}$, respectivamente (Min et al., 2021). En Colombia el Minsalud estableció el límite máximo

permitido para AFM1 mediante la Resolución 4506 del 2013, el cual corresponde a 0.5 µg/kg (Ministerio de Salud y Protección Social, 2013)

Se han realizado estudios con el objetivo de verificar el nivel de contaminación de la leche y sus derivados con AFM1. Tarazona-Manrique et al. (2021) trabajaron con 384 muestras de leche cruda de tanques de enfriamiento tomadas de Boyacá, de las cuales 108 fueron positivas con presencia de AFM1 (28.12%) con niveles de 0.5 - 2.0 ug/kg, los cuales fueron superiores a los permitidos por Minsalud, la FAO/OMS y la UE. Un año después, Tarazona-Manrique et al. (2022) hicieron un nuevo estudio con otras 384 muestras recolectadas en el mismo lugar de su anterior estudio, reportando en esta ocasión un total de 135 muestras positivas (35.15%) con niveles de 0.6 - 2.4 ug/kg, lo que significó un aumento en resultados positivos y contaminación por AFM1, la cual fue nuevamente superior a la contaminación máxima establecida por Minsalud, la FAO/OMS y la UE, siendo el verano la estación del año más crítica para contaminación de AFM1 en el departamento de Boyacá.

2.4. Verificación del método analítico

Según la ISO 9000 del 2015, la verificación del método analítico se define como una “confirmación” obtenida por medio de la aportación de información objetiva que indique el cumplimiento de requisitos o parámetros específicos (ICONTEC, 2015). La selectividad, linealidad, sensibilidad, precisión y exactitud son algunos de los parámetros a cumplir (González, 2016).

La selectividad se puede definir como la capacidad del método para ser empleado en la determinación de analitos específicos en mezclas o matrices que no presentan interferencias por parte de otros compuestos con comportamientos similares a los compuestos de interés.

Generalmente se investiga con ensayos a muestras alteradas intencionalmente con interferencias similares a posibles compuestos presentes en estas mismas

La linealidad es la capacidad que tiene el método de obtener una respuesta instrumental directa o indirecta (por medio de arreglos matemáticos) a la concentración del analito de interés contenido en una muestra dentro de un rango dado, existiendo una relación lineal entre la concentración y la unidad de medición (Cordero Figueroa, 2019). La confiabilidad de la linealidad se puede evaluar mediante el coeficiente de correlación (R^2), donde valores para R^2 cercanos a 1 indican mayor linealidad de la curva (Núñez, 2018).

La precisión, en muestras homogéneas, puede definirse como la dispersión de los resultados obtenidos en cada medición respecto a su valor promedio, y puede expresarse como la desviación estándar, porcentaje de la desviación estándar relativa, o como el coeficiente de variación. La determinación de la precisión depende del análisis a realizar, ya sea a un sistema o método, y puede ser considerada como repetitiva, intermedia o reproducible (Valls, 2004).

La exactitud representa lo cerca que se encuentra un resultado individual a un valor referenciado, y se estudia analizando efectos sistemáticos y aleatorios correspondientes a dichos resultados, los cuales pueden llevarse a cabo por medio de la veracidad, la precisión, y recientemente por la incertidumbre de medición. La veracidad no puede medirse, pero es posible evaluarla mediante una evaluación cuantitativa conocida como “sesgo”, el cual puede obtenerse por medio de estudios de recuperación con muestras adicionales (Eurachem, 2016). Valores cercanos al 100% pueden indicar un efecto insignificante de los posibles errores (Valls, 2004).

La sensibilidad se define como los cambios en la respuesta del instrumento correspondiente a variaciones en la magnitud de medida (Eurachem, 2016). En el caso de una regresión lineal, se representa (en magnitud) mediante la pendiente de la ecuación de la recta en la curva de

calibración (Moreno, 2018). Los límites de detección (cualitativo) y cuantificación (cuantitativo) son las concentraciones más bajas de analito presente en la muestra, que pueden detectarse o cuantificarse, respectivamente, y cumplen con las condiciones experimentales establecidas, así como con una precisión y exactitud adecuada (Moreno, 2018). Shrivastava y Gupta (2011) proponen expresiones matemáticas para el cálculo de estos límites, donde el valor de la pendiente (m) y la desviación estándar de la respuesta del equipo (S_y) son datos importantes para estos cálculos.

2.5. Análisis de AFM1 en leche

La cuantificación y detección de AFM1 en leche puede realizarse mediante diferentes métodos químicos, al igual que su extracción y purificación. Los métodos cromatográficos correspondientes a capa fina (TLC) y líquida de alta resolución (HPLC), al igual que el ensayo de inmunoabsorción conocido como ELISA, son métodos ideales al momento de estudiar cualquier tipo de aflatoxina, debido a su rapidez y sencillez (Quevedo, 2014). La extracción y purificación de aflatoxinas se realiza generalmente con columnas de inmunoafinidad; sin embargo, se ha venido aplicando un método rentable y asequible conocido como método QuEChERS (Vaz et al., 2020).

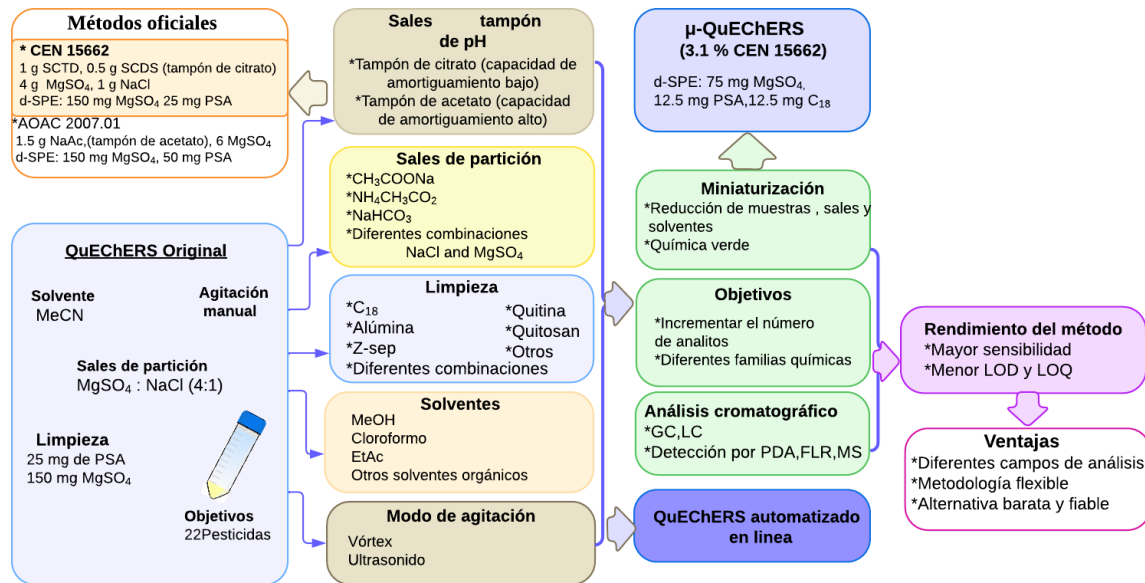
El método QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, y Safe, en inglés) permite la extracción simple y directa que conlleva a una partición inicial, seguida por la limpieza del extracto a través de una extracción dispersiva de fase sólida (d-SPE), basándose principalmente en el uso de sales extractoras para matrices complejas, las cuales se dispersan por estas matrices para causar un efecto de salinización, permitiendo aislar al o a los analitos de interés, así como la limpieza/purificación de estos mismos (Perestrelo et al., 2019). Fue desarrollado la primera vez por Anastassiades et al. (2003), siendo considerado inicialmente como alternativa para

determinación de pesticidas en frutas y verduras, demostrando una considerable versatilidad en los últimos años, al utilizarse en otros tipos de matrices y analitos con una gran capacidad de extracción y purificación (Santana-Mayor et al., 2019), demostrando un porcentaje de recuperación de analito y rendimiento analítico mayor comparado con los métodos convencionales (Perestrelo et al., 2019).

El método QuEChERS original consiste en emplear acetonitrilo como solvente de extracción, sulfato de magnesio con cloruro de sodio como sales de partición, y PSA (Primary Secondary Amine) con sulfato de magnesio como agentes de limpieza, agitando manualmente luego de la adición de cada grupo de sales, pero se han realizado modificaciones tanto en los reactivos empleados como en la agitación debido a su versatilidad para diferentes matrices, tal cual como se observa en la **figura 2**.

Figura 2.

Metodología QuEChERS y sus modificaciones.



Mejoras relevantes en el protocolo QuEChERS. Abreviaturas: d-SPE-extracción en fase sólida dispersiva, EtAc- acetato de etilo, FLR-detector de fluorescencia, GC-cromatografía de gases, LC-cromatografía líquida, LOD-límite de detección, LOQ-límite de cuantificación, MeCN-acetonitrilo, MeOH-metanol, MS-espectrometría de masas, PDA-detector de matriz de fotoiodos, PSA-amina secundaria, SCDS-citrato de sodio dibásico sesquihidratado, SCTD-citrato de sodio tribásico dihidratado, Z-Sep-sorbentes a base de dióxido de circonio.

Nota. Adaptado de Perestrello et al., 2019.

Se han realizado estudios para el análisis de AFM1 en leche bovina aplicando el método QuEChERS con sus diferentes modificaciones (**figura 2**), donde algunos autores suelen omitir el proceso de limpieza en la extracción y purificación de esta toxina (mientras que otros lo conservan), pero manteniendo en su mayoría los procesos de extracción y partición, obteniendo aun así buenos resultados, tal cual como se observa en la **tabla 3**. Karaseva et al. (2014), Gonçalves et al. (2018), Marimón Sibaja et al. (2019), Hassouna et al. (2023) y Morais et al. (2024) trabajaron usando la técnica HPLC-FLD para el análisis de AFM1 y el método QuEChERS para la extracción y purificación de esta misma; por otro lado, Gonçalves et al. (2017) emplearon la técnica de UHPLC-FLD para el análisis de AFM1, empleando de igual manera el método QuEChERS para la extracción y purificación de la toxina.

Tabla 3.

Antecedentes de extracción y purificación de AFM1 en leche mediante el método QuEChERS con sus diferentes modificaciones.

AUTORES	MODIFICACIONES
Karaseva et al. (2014)	<p>Extracción: agua y acetonitrilo.</p> <p>Sales de partición: cloruro de sodio, citrato de sodio tribásico dihidratado y citrato de sodio 1.5 hidrato.</p> <p>Limpieza: sulfato de sodio, PSA y C18.</p> <p>Agitación: manual</p>
Gonçalves et al. (2017)	<p>Extracción: hexano y acetonitrilo acidificado (1% ácido acético).</p> <p>Sales de partición: sulfato de magnesio y cloruro de sodio.</p> <p>Agitación: manual</p>
Gonçalves et al. (2018)	<p>Extracción: hexano y acetonitrilo acidificado (1% ácido acético).</p> <p>Sales de partición: sulfato de magnesio y cloruro de sodio.</p> <p>Agitación: vortex</p>
Marimón et al. (2019)	<p>Extracción: hexano y acetonitrilo acidificado (1% ácido acético).</p> <p>Sales de partición: sulfato de magnesio y cloruro de sodio.</p> <p>Agitación: vortex</p>
Hassouna et al. (2023)	<p>Extracción: hexano, agua desionizada y acetonitrilo.</p> <p>Sales de partición: sulfato de magnesio, cloruro de sodio, DSHCSH y TSCDH.</p> <p>Agitación: vortex</p>

Morais et al. (2024) Extracción: acetoneitrilo acidificado (1% ácido acético).
Sales de partición: sulfato de magnesio y cloruro de sodio.
Limpieza: sulfato de magnesio y Celite®
Agitación: vortex

Karaseva et al. (2014) emplearon leche y productos lácteos, reportando valores para el límite de cuantificación de 0.01 ug/kg, %RDS menor al 6%, y recuperaciones entre el 50 – 70% para muestras dopadas a 0.3 ug/kg.

Gonçalves et al. (2017) usaron leche bovina fresca en la región de Santa Catarina en Brasil, donde el 40.4% de las muestras analizadas arrojaron una contaminación mayor al límite máximo permitido por Brasil (0.5 ug/L), con recuperaciones del 60% para leches dopadas a 0.3 ug/L, y límites de detección y cuantificación de 0.09 y 0.25, respectivamente.

Gonçalves et al. (2018) evaluaron la leche entera, desnatada, semidesnatada y en polvo en la ciudad de Assomoda en la Isla de Cabo Verde y el sur de Brasil, obteniendo un LOD de 13 ng/L, un LOQ de 40 ng/L y una correlación lineal de 0.96 para éstas matrices, además de una recuperación entre 100 - 105% para la leche líquida, evidenciando así que el tipo de matriz empleada para el análisis de AFM1 en leche puede afectar la cuantificación de esta aflatoxina, por lo que se recomienda emplear la respectiva curva de calibración correspondiente a cada matriz.

Marimón et al. (2019) analizaron 51 muestras de leche en polvo obtenidas en la región Caribe de Colombia, reportando niveles de contaminación en el 100% de las muestras (0.20 - 1.19 ug/kg), porcentajes de recuperación del 97 – 110%, y %RDS menores al 15%, donde el 55% de las muestras superó el máximo nivel permitido por Minsalud, la FAO/OMS y la UE.

Hassouna et al. (2023) recogieron muestras de leche bovina cruda en las regiones de Beja y Mahdia en Túnez, evidenciando la presencia de la toxina en el 97% de las muestras, donde algunas de éstas se encontraban por encima del límite máximo permitido por la UE y la FDA, obteniendo recuperaciones del 97 – 103 %, y un LOD y LOQ de 0.003 y 0.01 ug/L, respectivamente.

Por último, Morais et al. (2024) trabajaron en un método para determinar diferentes toxinas en leche desnatada en la ciudad de Medianeira (Paraná) en Brasil, reportando para la AFM1, una correlación lineal de 0.998, una recuperación del 101%, una precisión entre 4.44 - 7.34%, y el LOD y LOQ de 0.0022 y 0.007 ug/kg, respectivamente.

2.6. Radiación UV en leche

La radiación con luz UV se considera un método físico con la capacidad de inactivar sustancias químicas tóxicas y microorganismos mediante la fotólisis y daño del ADN, respectivamente, siendo así una tecnología no térmica que permite la degradación de aflatoxinas (Stanley et al., 2020). La luz UV en el espectro electromagnético se ubica en la región no ionizante a un rango de 100 - 400 nm y se divide en tres categorías: Región UV de onda corta (UVC) (1) que va de 100 - 280 nm, ideal para inactivación de microorganismos, bacterias, virus y hongos, región UV de onda media (UVB) (2) correspondiente a 280 - 315 nm, y región UV de onda larga (UVA) (3) con longitud de onda de 315 - 400 nm (Nguyen et al., 2022). La concentración obtenida luego de realizar una irradiación con luz UVC se conoce como retención, que corresponde a la concentración retenida (o disponible) de un compuesto presente en una matriz alimentaria tras someterse a cualquier proceso de transformación o tratamiento (Granados Hernández, 2020), tal cual como se ilustra en la **figura 3**.

Hassan & Hussein (2017), Kurup et al. (2021), Nguyen et al. (2022) y Kluczkovski et al. (2023) trabajaron con luz UV, pero empleando diferentes parámetros los cuales pueden verse en la **tabla 4**.

Tabla 4.

Antecedentes de radiación UV a la leche con parámetros diferentes.

AUTORES	CONDICIONES
Hassan & Hussein (2017)	Longitud de onda: 365 nm. Cantidad muestra: 25 y 50 mL. Matriz: leche. Distancia fuente UV: 30, 60 y 90 cm. Tiempos: 15 y 30 min.
Kurup et al. (2021)	Longitud de onda: 365 nm. Cantidad muestra: 5 mL. Matriz: leche. Tiempos: hasta 6.4 min.
Nguyen et al. (2022)	Longitud de onda: 254 nm. Cantidad muestra: 3, 5 y 10 mL. Matriz: leche descremada. Profundidad: 3, 4 y 6 mm. Tiempos: 5, 10, 15 y 20 min.
Kluczkovski et al. (2023)	Longitud de onda: 365 nm. Cantidad muestra: 50 mL. Matriz: leche. Profundidad: 5 mm. Tiempos: 3, 6 y 9 min.

Hassan & Hussein (2017) emplearon UVA en leche, obteniendo disminución de AFM1 en un 100% para muestras con distancias de 60 y 90 cm entre la lámpara UV y éstas mismas, y tiempos de exposición de 15 y 30 minutos, evidenciando que no es de gran relevancia la cantidad de muestra a irradiar, así como la importancia de la distancia entre la fuente de luz UV y las muestras, donde a mayor distancia entre éstas mayor es el efecto de la radiación UV, generando una mayor disminución de AFM1.

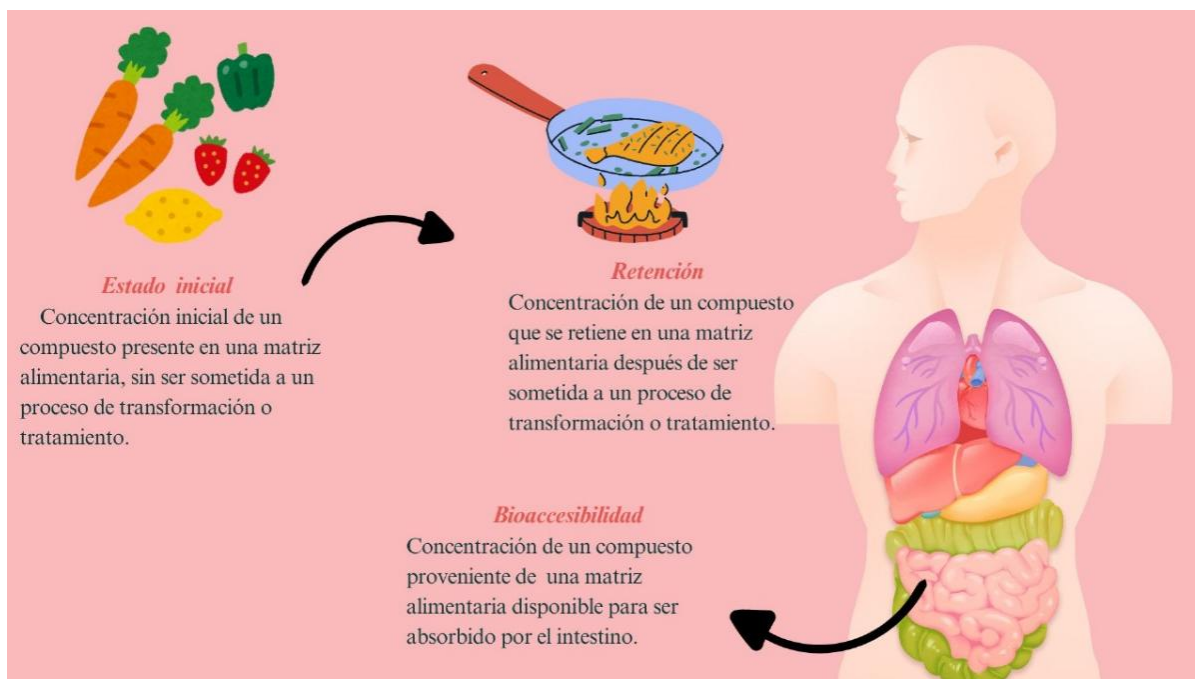
Kurup et al. (2021) emplearon luz UVA para reducir la AFM1 presente en leche obtenida en Nashville, Tennessee, reportando reducciones de hasta $65.7 \pm 1.65\%$ para el tiempo de 6.4 minutos.

Nguyen et al. (2022) trabajaron con luz UVC para la reducción de AFM1 en leche descremada, consiguiendo una disminución de hasta 60% para AFM1 a una profundidad de muestra de 3 mm, y tiempo de incidencia de 20 minutos, sin importar la concentración de la toxina en la muestra, mostrando la importancia de la profundidad de las muestras y la longitud de onda, donde a más profundidad y una longitud de onda dentro del rango de UVC (200 - 280 nm) la disminución de AFM1 es mayor.

Finalmente, Kluczkovski et al. (2023) trabajaron con luz UVA para leche producida en el estado del Amazonas en Brasil, logrando una reducción del 75.5%, 97.3% y 94.1% de AFM1 a los 3, 6 y 9 minutos, respectivamente.

Figura 3.

Estado inicial, retención y bioaccesibilidad.



2.7. Bioaccesibilidad

La bioaccesibilidad de las aflatoxinas puede definirse como la fracción de toxina ingerida que se libera de la matriz alimentaria en el tracto gastrointestinal, quedando así disponible para su posterior absorción intestinal (Panwar et al., 2019). Los métodos de bioaccesibilidad *in vitro* ofrecen información relevante sobre el comportamiento entre nutrientes y componentes presentes en un alimento, el efecto del pH y las enzimas, la manipulación y procesamiento de alimentos respecto al potencial de absorción de un nutriente (Thakur et al., 2020). La bioaccesibilidad de los alimentos puede determinarse normalmente empleando métodos de simulación de digestión gastrointestinal *in vitro* (Yaman et al., 2021). La digestión gastrointestinal *in vitro* se considera útil al momento de estimar eventos preabsortivos como la estabilidad o bioaccesibilidad de nutrientes/fitonutrientes de diversas matrices alimentarias (Thakur et al., 2020), pero no reemplaza una simulación completa del proceso en estudios *in vivo* (Yaman et al., 2021).

Minekus et al. (2014) propusieron un método de digestión estática general, basado en condiciones fisiológicas relevantes, a las que se les pueda aplicar diversos criterios de valoración que puedan ser modificados y adaptados a requisitos específicos adicionales. Para alimentos en estado sólido y líquido proponen una metodología para la parte oral, así como para la gástrica y la intestinal, empleando soluciones electrolíticas estándar para la simulación de fluidos gástricos e intestinales durante el estudio. Para la fase oral *in vitro* proponen un tiempo recomendado para la interacción entre el alimento líquido y la enzima de 2 minutos a 37 °C, así como 5 mL de muestra líquida. Para la fase gástrica *in vitro* proponen un tiempo aproximado de 2 horas, una temperatura de 37 °C y un pH=3, y el volumen obtenido de la fase oral. Para la fase intestinal *in vitro* proponen el mismo tiempo y temperatura, pero a un pH=7, y el volumen de muestra líquida corresponde al obtenido en la fase gástrica.

Kabak & Ozbey (2012) realizaron la primera simulación gastrointestinal *in vitro* para AFM1 en leche, empleando muestras de leche ultra pasteurizada enriquecidas y contaminadas naturalmente con AFM1 recuperadas en Turquía, obteniendo una bioaccesibilidad del 80.5 y 83.8% para las muestras enriquecidas, y un 81.7 y 86.3% para las muestras contaminadas naturalmente, representando así una alta bioaccesibilidad por parte de la AFM1, y una leve diferencia de estos resultados entre leche enriquecida y leche contaminada naturalmente, siendo esta última la más bioaccesible. Es importante mencionar que el estudio mencionado anteriormente se realizó sin tener en cuenta el intestino grueso, debido a que las aflatoxinas son absorbidas principalmente por el intestino delgado (Kabak & Ozbey, 2012).

Un año más tarde, Serrano-Niño et al. (2013) evaluaron leche dopada con AFM1, con y sin cepas probióticas por medio de un modelo digestivo *in vitro* con el fin de reducir la bioaccesibilidad de la AFM1, reportando resultados de bioaccesibilidad de 54.83% y 100% para la leche con y sin cepas probióticas, respectivamente.

Por último, Sevim et al. (2024) trabajaron con leche en polvo dopada con AFM1, con y sin agentes biológicos por medio de una simulación gastrointestinal *in vitro* con el fin de mitigar la bioaccesibilidad de la AFM1, obteniendo valores de bioaccesibilidad de $29.30 \pm 2.29\%$ y $90.35 \pm 1.15\%$ para la leche en polvo con y sin agentes biológicos, respectivamente.

3. Metodología

Las muestras de leche que se analizaron en este estudio eran de tipo entera ultrapasteurizada (UHT) y cruda comercializadas en el departamento de Santander, y se dividieron en diferentes grupos de muestras, las cuales se doparon usando una solución estándar certificada de AFM1

(HPLC-AFM1-2 de MICOTOX LTDA) de concentración conocida. Para la verificación del método analítico se utilizó la leche entera UHT con el grupo MLE-1. Para el efecto de luz UVC se trabajó con la leche entera UHT y cruda con los grupos MLE-2 y MLC-2, respectivamente, dejando dos subgrupos de muestras (MLE-2C y MLC-2C) a las cuales no se les aplicó luz UVC, para así poder ver los cambios en la concentración de AFM1 antes y después de la irradiación. Por último, para la bioaccesibilidad se trabajó con la leche entera UHT y cruda con los grupos MLE-3 y MLC-3, respectivamente, dejando dos subgrupos de muestras (MLE-3C y MLC-3C) a las que solo se les aplicó luz UVC, con el objetivo de poder comparar los cambios en la concentración de AFM1 entre éstas y el grupo que fue sometido a la bioaccesibilidad. Todos los subgrupos se utilizaron como muestras control.

3.1. Verificación del método analítico

La verificación del método analítico para el análisis de AFM1 en leche mediante HPLC-FLD se realizó determinando los parámetros de linealidad, selectividad, precisión, exactitud, y sensibilidad, con el fin de obtener resultados de confianza para el método trabajado según las condiciones, equipo y materiales del laboratorio. Las mediciones para cada parámetro se hicieron por triplicado.

La linealidad de las lecturas se verificó con el valor del coeficiente de correlación (R^2) mediante la proporcionalidad de la concentración conocida de las soluciones patrón y la lectura de ellas por parte del equipo. Para esto, a partir de una solución estándar certificada de AFM1 (HPLC-AFM1-2 de MICOTOX LTDA) con concentración conocida se preparó una serie de 6 disoluciones patrón con concentraciones de 0.31, 0.63, 1.25, 2.50, 5.00 y 10.00 $\mu\text{g/L}$ de AFM1. Con los datos obtenidos se reemplazó la **ecuación 1**, donde “y” es la respuesta instrumental, “b” es la respuesta

analítica de blanco, “m” es la sensibilidad y “x” es la concentración del analito (Valls, 2004). También se obtuvo el R^2 para la AFM1, donde solo se aceptan valores de R^2 cercanos a 1 (Núñez, 2018).

$$y = mx + b \quad (1)$$

La selectividad se determinó a partir de la comparación entre los tiempos de retención de las señales registradas por muestras del grupo MLE-1 y la solución estándar certificada de AFM1 (HPLC-AFM1-2 de MICOTOX LTDA), midiendo previamente la señal del blanco con la intención de obtener la correcta lectura del equipo, sin interferencias por parte de los reactivos empleados.

La precisión de las lecturas proporcionadas por el equipo se obtuvo evaluando la concordancia entre los resultados de diferentes ensayos que tenían las mismas condiciones de ensayo a ensayo. Para este caso, se usaron muestras del grupo MLE-1 dopadas con concentraciones de 2.5 ug/L de AFM1, evaluando la repetibilidad y repetibilidad intermedia en las lecturas obtenidas para un mismo día y en diferentes días, respectivamente. Los resultados obtenidos se analizaron por medio de un análisis de varianza, determinando los porcentajes de las desviaciones estándar de la repetibilidad y repetibilidad intermedia, %RSDr y %RSDri, respectivamente, donde solamente se aceptaron valores menores a 22% (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013).

La exactitud del método se estimó teniendo en cuenta el porcentaje de recuperación de AFM1, empleando dos muestras del grupo MLE-1, una dopada con concentración 2.5 ug/L de AFM1 y una sin dopar. El porcentaje de recuperación se calculó mediante la **ecuación 2** (Jurado, 2008), donde la concentración observada corresponde a la de la muestra del grupo MLE-1, concentración inicial corresponde a la de la leche sin enriquecer, y la concentración añadida es la

concentración con la que se enriqueció la muestra del grupo MLE-1. Es ideal obtener porcentajes de recuperación cercanos al 100%, ya que esto puede indicar un efecto insignificante de los posibles errores (Valls, 2004); sin embargo, se estiman recuperaciones entre el 70 – 110%, las cuales son aceptables para valores de enriquecimiento entre 1 – 10 ug/L (Núñez, 2018).

$$R(\%) = \frac{\text{concentración observada} - \text{concentración inicial}}{\text{concentración añadida}} \times 100\% \quad (2)$$

La sensibilidad se definió a partir de la regresión lineal de las curvas de calibración para calcular el LOD y LOQ aplicando las **ecuaciones 3 y 4**, utilizando los valores de pendientes (m) y desviación estándar de la respuesta del equipo (S_y).

$$LOD = 3,3 \times \frac{S_y}{m} \quad (3)$$

$$LOQ = 10 \times \frac{S_y}{m} \quad (4)$$

3.2. Análisis de AFM1

3.2.1. Extracción y determinación

Para la extracción y determinación de AFM1 presente en leche se empleó el método propuesto por Gonçalves et al. (2018), el cual consiste en una extracción tipo QuEChERS modificado, seguida de la determinación de AFM1 mediante la técnica HPLC-FLD.

Se agregaron 5 mL de leche, 10 mL de hexano y 15 mL de acetonitrilo:ácido acético (99:1 v/v) a un tubo falcon de 50 mL, el cual se agitó en un vortex a máxima velocidad durante 30 segundos. Seguidamente, se añadieron al tubo 6 g de $MgSO_4$ y 1.5 g de NaCl para producir una separación de fases, y se llevó a vortex nuevamente por 1 minuto. Luego, se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Se removió la fase orgánica que contenía hexano, y se tomó una alícuota de 5 mL de la fase que contenía acetonitrilo y se llevó a sequedad completa empleando corriente de nitrógeno a 45°C. El residuo obtenido se disolvió en 1 mL de la fase móvil, se centrifugó a 9000 rpm, y se guardó hasta el momento de su análisis en el equipo de HPLC-FLD.

3.2.2. Análisis por HPLC.

El análisis cromatográfico se realizó por medio de un equipo ultimate 3000 de Thermo Scientific HPLC con detector de fluorescencia Dionex Ultimate 3000 RS Fluorescence Detector, y una columna C-18 Teknokroma mediterránea sea18 5µm TR-010006. La fase móvil fue agua tipo HPLC-acetonitrilo-metanol (60:25:15) a flujo de 1 mL/min, la temperatura de columna de 40°C, el volumen de inyección de 20 µL, y la longitud de onda de excitación y emisión de 370 nm y 410 nm, respectivamente.

3.3. Efecto de luz UVC sobre la AFM1 en leche

Para el estudio del efecto de la luz UVC sobre la AFM1 en leche se trabajó con la metodología planteada por Nguyen et al. (2022) con algunas variaciones, donde se aplicó luz UVC a las muestras del grupo MLE-2 y MLC-2 que fueron cuantificadas, para así medir la retención de AFM1 en éstas. La fuente de luz UVC que se utilizó para este estudio fue la de Spectroline® MODEL ENF - 260C de 115 V, 60 Hz y 0.20 A.

Se utilizaron cajas de petri para disponer muestras con una profundidad de 4 mm, las cuales fueron irradiadas por luz UVC a 254 nm, donde la distancia máxima entre las cajas de petri y la fuente de luz UV fue de 20 cm. Se encendió la fuente de luz UV por 2 minutos previamente a la exposición. Una vez calentada la fuente, las muestras se irradiaron durante 1 hora.

Por último, se determinó la AFM1 en las muestras irradiadas, siguiendo el método de extracción y determinación de AFM1 descrito en la sección 3.2.1, así como el análisis por HPLC explicado en la sección 3.2.2. Para el análisis de AFM1 en las muestras MLE-2C y MLC-2C se siguió el mismo procedimiento.

3.4. Bioaccesibilidad.

Se implementó un método de digestión gastrointestinal *in vitro*, con el fin de verificar que persistan los cambios generados en la concentración de la AFM1 tras aplicar irradiación con luz UVC durante el proceso de ingesta. Este método constó de tres fases importantes: fase oral, fase gástrica y fase intestinal (Minekus et al., 2014). Teniendo en cuenta lo anterior, se realizó el método de digestión gastrointestinal *in vitro* mediante la metodología propuesta por Minekus et al. (2014) para las muestras de leche MLE-3 y MLC-3 dopadas con AFM1 después de la exposición a luz UVC.

Tabla 5.

Composición de las soluciones electrolíticas estándar empleadas para la digestión gastrointestinal.

Reactivos químicos	Concentración mM en solución de fluido oral (SFO), pH 7	Concentración mM en solución de fluido gástrico (SFG), pH 3	Concentración mM en solución de fluido intestinal (SFI), pH 7
KCl (0.5 M)	15.1	6.9	6.8
KH ₂ PO ₄ (0.5 M)	3.7	0.9	0.8
NaHCO ₃ (1 M)	13.6	25	85
NaCl (2 M)	-	47.2	38.4
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	0.15	0.1	0.33

(0.15 M)			
(NH ₄) ₂ CO ₃ (0.5 M)	0.06	0.5	-
NaOH (1 M)	-	-	-
HCl (6 M)	1.1	15.6	8.4

Nota. Adaptado de Minekus et al. (2014).

3.4.1. Preparación de las soluciones electrolíticas estándar

Las soluciones electrolíticas estándar utilizadas para simular los fluidos gástricos e intestinales durante la digestión gastrointestinal *in vitro* se prepararon de acuerdo con los valores de la **tabla 5**. Para regular el pH de las soluciones estándar preparadas en las digestiones se dispuso de NaOH 1 M y HCl 1 M.

3.4.2. Digestión oral *in vitro*

La fase oral duró alrededor de 2 minutos a una temperatura de 37 °C. Se tomaron 2.5 mL de una muestra MLE-3 o MLC-3 y se mezclaron con 1.75 mL de SFO, se adicionó 0.25 mL de solución de α -amilasa salival de 1500 U/mL (la α -amilasa salival se disolvió en SFO y no con agua), 12.5 μ L de CaCl₂ 0.3 M y 487.5 μ L de agua.

3.4.3. Digestión gástrica *in vitro*

La fase gástrica duró alrededor de 2 horas a una temperatura de 37 °C a pH 3. Se tomó el bolo oral de la fase anterior y se mezcló con 3.75 mL de SFG, se adicionó 0.8 mL de solución de pepsina porcina de 25000 U/mL (la pepsina se disolvió en SFG y no con agua), 2.5 μ L de CaCl₂ 0.3 M, 0.1 mL de HCl 1 M para llevar al pH deseado y 0.3475 mL de agua.

3.4.4. Digestión intestinal *in vitro*

La fase intestinal duró alrededor de 2 horas a una temperatura de 37 °C a pH 7. Se mezcló el quimo gástrico obtenido de la fase anterior con 5.5 mL de SFI, se adicionó 2.5 mL de solución de pancreatina de 800 U/mL (la pancreatina se disolvió en SFI y no con agua), 1.25 mL de bilis fresca, 20 µL de CaCl₂ 0.3 M, 75 µL de NaOH 1 M para llevar al pH deseado y 655 µL de agua. Por último, se centrifugó y filtró la matriz digestiva obtenida, separando así la fracción no soluble (Pellet) de la fracción bioaccesible (sobrenadante).

Se cuantificó la concentración de AFM1 en la fracción bioaccesible de las muestras MLE-3 y MLC-3 tras la digestión gastrointestinal *in vitro*, al igual que las muestras MLE-3C y MLC-3C, siguiendo el método de extracción y determinación de AFM1 descrito en la sección 3.2.1, así como el análisis por HPLC explicado en la sección 3.2.2. Este análisis se realizó con el objetivo de obtener los resultados para el porcentaje de la bioaccesibilidad de las muestras MLE-3 y MLC-3 empleando la **ecuación 5**.

$$\% \text{ bioaccesibilidad} = \frac{[AFM1 \text{ DGI}]}{[AFM1 \text{ control}]} * 100 \quad (5)$$

3.4.5. Recuperación de la forma detectable de las aflatoxinas

Se determinó la recuperación de la AFM1 en las muestras MLE-3 y MLC-3 después de aplicar el método de digestión gastrointestinal *in vitro* usando la **ecuación 6**, con el fin de verificar si persisten los cambios en la concentración de AFM1 vista luego de realizar el estudio con luz UVC.

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{[AFM1 \text{ digestión}] - [AFM1 \text{ tratamiento UV}]}{[AFM1 \text{ control}]} * 100 \quad (6)$$

3.5. Tratamiento de datos

Se aplicó un análisis estadístico tipo ANOVA de un factor para analizar las variaciones de concentración de AFM1 en las curvas de calibración realizadas, con el fin de verificar valores cercanos entre ellas y poder trabajar con el promedio obtenido. Posteriormente, se aplicó como criterio la t-Student entre los grupos de muestras MLE-2 y MLC-2 con los subgrupos MLE-2C y MLC-2C, para de esta manera observar diferencias significativas en las concentraciones de AFM1 en cada leche, probando la efectividad del estudio que se realizará.

4. Resultados y discusión

4.1. Verificación del método analítico

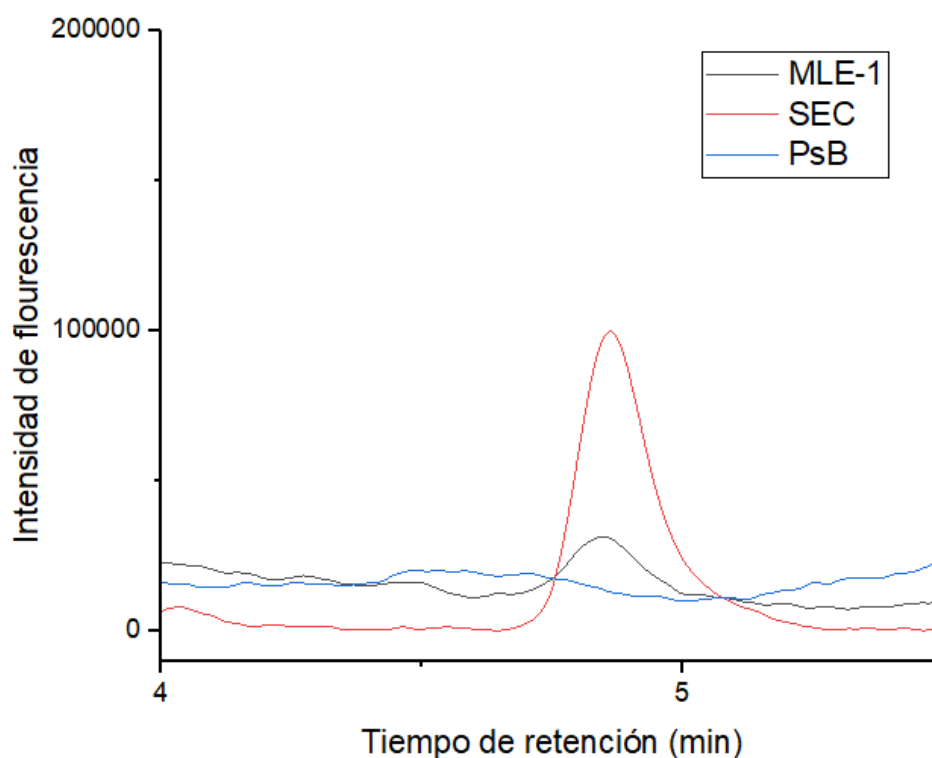
Se verificó el método analítico desarrollado en este trabajo (Gonçalves et al., 2018) usando los parámetros de selectividad, linealidad, límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ), precisión y exactitud, confirmando así la capacidad que tiene éste método para ser reproducible (Eurachem, 2016).

La selectividad se evaluó comparando los tiempos de retención de elución de la aflatoxina M1, tomando como referencia la solución estándar certificada de AFM1 (HPLC-AFM1-2 de MICOTOX LTDA), las muestras del grupo ML-1, y un pseudo blanco de leche (Maggira et al., 2021). De igual manera, se tomó en consideración el porcentaje de recuperación obtenido, el cual fue superior al 70%, indicando así que la selectividad del método fue buena (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013). En la **figura 4** se muestran los cromatogramas de cada sustancia analizada, observando que los tiempos de retención de las señales correspondientes a la elución de AFM1 coinciden para la solución estándar (10 ug/L) y la muestra de leche dopada (2.5

ug/L), siendo este un valor alrededor de los 4.86 minutos, atribuyéndole así esta señal a la AFM1. Por otro lado, en el pseudo blanco no se observaron señales atribuibles a la toxina ni interferencias derivadas de compuestos endógenos.

Figura 4.

Cromatogramas de la solución estándar certificada de AFM1 (SEC), muestra del grupo ML-1 y pseudo blanco (PsB).



La linealidad se trabajó con una curva de calibración tomando el promedio de las áreas obtenidas en el análisis con HPLC (**tabla 6**), al igual que con la pendiente e intercepto obtenido de esta misma para el cálculo de los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ). Para esto, se analizaron las áreas resultantes por cada disolución patrón para la curva de calibración de AFM1 mediante un ANOVA de un factor, con el fin de evaluar si estas diferían significativamente,

obteniendo un valor de F experimental (0.01170) por debajo del valor F de criterio (2.533), y un valor de P (0.9999) mayor al valor alfa (α) (0.05), lo que indicó que la hipótesis nula se cumple para este método analítico. La hipótesis nula establece que no existen diferencias significativas entre las medias de los grupos comparados, es decir, todas las áreas medias obtenidas para cada concentración evaluada pueden ser consideradas estadísticamente iguales.

Tabla 6.

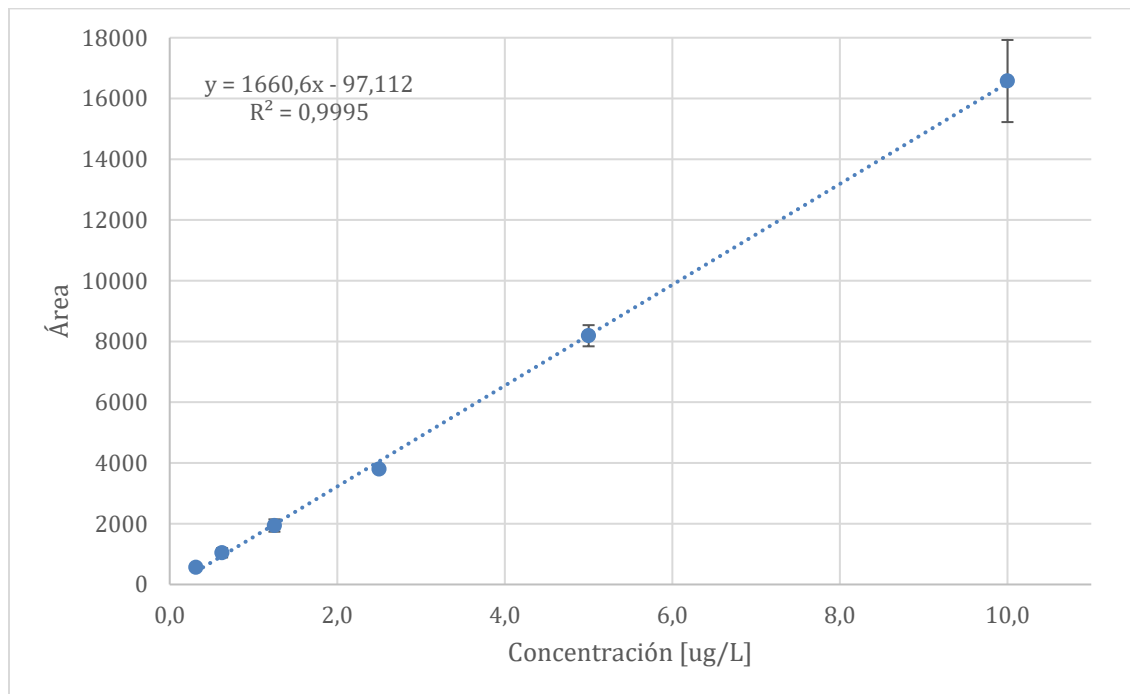
Datos obtenidos para la curva de calibración mediante el promedio del área.

[ug/L]	Área 1	Área 2	Área 3	Área 4	Área 5	Área 6	Área promedio	%RSD
10.00	1.47E+04	1.51E+04	1.69E+04	1.69E+04	1.80E+04	1.78E+04	1.66E+04	8.16
5.00	7.59E+03	8.29E+03	8.12E+03	8.34E+03	8.64E+03	8.16E+03	8.19E+03	4.25
2.50	3.71E+03	3.73E+03	3.82E+03	3.84E+03	3.86E+03	3.85E+03	3.80E+03	1.73
1.25	2.03E+03	1.80E+03	1.67E+03	1.85E+03	2.21E+03	2.09E+03	1.94E+03	10.46
0.63	1.27E+03	1.10E+03	8.75E+02	1.12E+03	8.77E+02	1.02E+03	1.04E+03	14.55
0.31	5.54E+02	6.14E+02	4.91E+02	5.94E+02	5.84E+02	5.43E+02	5.63E+02	7.84

Mediante la curva de calibración para la AFM1 se obtuvo la ecuación lineal y el coeficiente de correlación (R^2) dado que correspondió a 0.9995, donde valores de R^2 cercanos a 1 indican que el método es lineal, comprobando así la linealidad del método analítico trabajado (Eurachem, 2016). La curva de calibración para la AFM1 se observa en la **figura 5**.

Figura 5.

Curva de calibración para la AFM1.



Los límites de detección y cuantificación del método analítico se evaluaron mediante la medición por triplicado de un pseudo blanco de leche dopado con la solución estándar certificada de AFM1 (HPLC-AFM1-2 de MICOTOX LTDA), a una concentración no mayor de 5 veces el LOD esperado, y la regresión lineal de la curva de calibración obtenida (**figura 5**) (Oficina de Publicaciones de la Unión Europea, 2016). A partir de la pendiente de la curva de calibración y la desviación estándar de la respuesta en el equipo por parte del pseudo blanco, se determinaron valores de 0.104 y 0.31 ug/L para el LOD y el LOQ, respectivamente. Teniendo en cuenta que el valor del LOQ obtenido es menor al nivel máximo de residuo permitido de AFM1 en Colombia (0.5 ug/L), el método se considera apto para la determinación y cuantificación de la aflatoxina de interés en la matriz de estudio.

La precisión se calculó mediante la repetibilidad y repetibilidad intermedia a partir de las concentraciones mostradas en la **tabla 7**, obteniendo porcentajes de 9.945% y 7.816% para la

repetibilidad y repetibilidad intermedia, respectivamente, concluyendo así que el método es preciso debido a que estos valores fueron menores a 22% (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013).

Tabla 7.

Concentraciones para el cálculo de la repetibilidad y repetibilidad intermedia.

[ug/L] repetibilidad	[ug/L] repetibilidad intermedia
1.2178	1.1697
1.1697	1.0061
1.0097	1.1084

La exactitud del método se determinó teniendo en cuenta el porcentaje de recuperación de AFM1 calculado para el valor promedio de un grupo de muestras de leche dopada a 2.5 ug/L, cuyo valor de 70.47% es acorde al rango establecido como porcentajes aceptables (70-110%) para valores de enriquecimiento entre 1-10 ug/L (Núñez, 2018), razón por la cual el método se considera exacto.

4.2. Efecto de luz UVC sobre la AFM1 en leche

La retención de AFM1 obtenida en las muestras irradiadas con luz UVC (MLE-2 y MLC-2) y la concentración de AFM1 correspondiente para las muestras control (MLE-2C y MLC-2C) se observan en la **tabla 8**. A partir de estos datos se hizo la prueba t-Student, con el objetivo de verificar que las diferencias entre las concentraciones de las muestras control y las muestras que se sometieron a luz UVC eran significativamente diferentes para cada leche. Los valores de P fueron de 0.02855 para la leche entera y 0.03586 para la leche cruda, los cuales fueron menores al valor crítico de P (0.05), demostrando de manera estadística la diferencia significativa entre cada leche antes y después de la luz UVC.

En la **figura 6** se ilustra el porcentaje de reducción de AFM1 tras la irradiación con luz UVC para cada leche, siendo este del 43.70% y 20.76% para la leche entera UHT y cruda, respectivamente, demostrando nuevamente que la luz UVC tiene la capacidad de degradar esta toxina. Adicionalmente, se observó a simple vista que el color de cada tipo de leche no se vio afectado luego de la exposición a la luz UVC (**figura 7**). Si bien no se realizaron mediciones empleando un colorímetro, el aspecto en el color de la leche indicó que no hubo alteraciones perceptibles en las propiedades organolépticas de esta matriz (Diao et al., 2015).

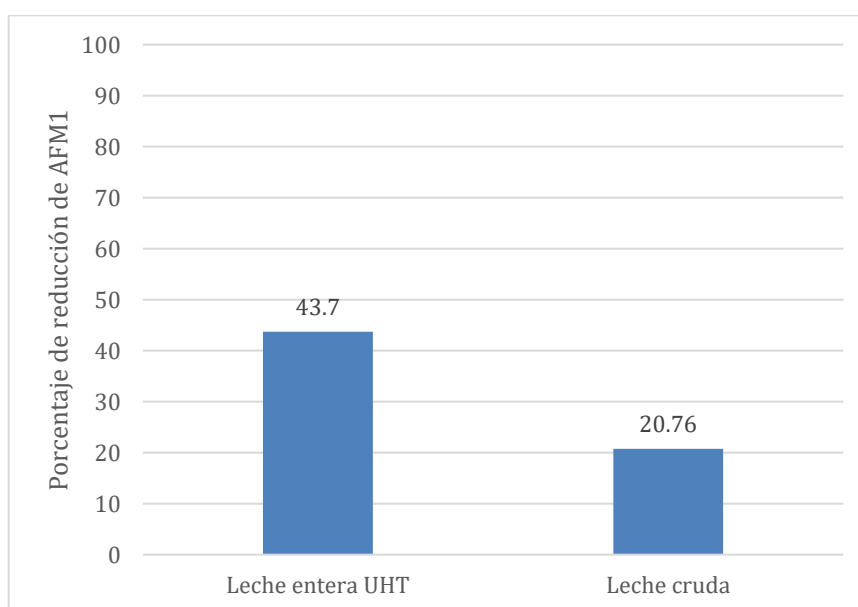
Tabla 8.

Concentración de AFM1 para las muestras control. Retención de AFM1 tras la radiación UVC.

Tipo de leche	Muestras	[ug/L]
Entera UHT	MLE-2C	0.6789 ± 0.0010
	MLE-2	0.3823 ± 0.0277
Cruda	MLC-2C	0.6927 ± 0.0787
	MLC-2	0.5489 ± 0.0624

Figura 6.

Porcentaje de reducción de AFM1 para cada leche tras irradiación con luz UVC.



Los dos tipos de leche utilizada en este estudio fueron sometidas a las mismas condiciones experimentales durante la fase de irradiación con luz UVC, así como en la fase de extracción y purificación mediante el método propuesto por Gonçalves et al. (2018), obteniendo finalmente un porcentaje de reducción de AFM1 menor para la leche cruda (**figura 6**), tras su análisis mediante la técnica HPLC-FLD; la diferencia en estos resultados puede ser debido a las características fisicoquímicas de cada tipo de leche. La leche es una matriz coloidal de apariencia física opaca y turbia, contiene micelas de caseína, glóbulos de grasa y proteínas del suero (estos dos últimos se encuentran dispersos en fase acuosa) (Fox, 2008), los cuales causan un limitante en la penetración de la luz UV en esta matriz cuando se encuentran en su forma nativa, generando así una reducción en la eficacia de la irradiación con luz UV para degradar la toxina (Kurup, 2021). Cabe resaltar que la leche entera UHT, a diferencia de la leche cruda, es sometida previamente a un proceso de ultra alta temperatura (mejor conocido como ultrapasteurización), el cual ha demostrado que causa una desnaturalización de proteínas presentes en el suero, así como la modificación estructural de las micelas de la caseína, haciendo que cambie la interacción de éstas con la AFM1. Por otro lado, la homogeneización es necesaria durante el proceso de ultrapasteurización y afecta principalmente a los glóbulos de grasa, reduciéndolos de tamaño y haciendo que se dispersen de manera uniforme en el resto de la matriz (Granados-Chinchilla, 2016). De lo anterior, es válido considerar que la diferencia en el porcentaje de degradación de AFM1 entre la leche entera UHT y cruda (**figura 6**) se debe al tratamiento industrial de ultrapasteurización, ya que la leche cruda no ha sido sometida a un tratamiento térmico previo, por lo que la caseína, glóbulos de grasa y proteínas del suero permanecen de manera nativa, limitando así la penetración de la luz UV a la leche cruda y el impacto de esta sobre la AFM1 presente en dicha matriz.

Figura 7.

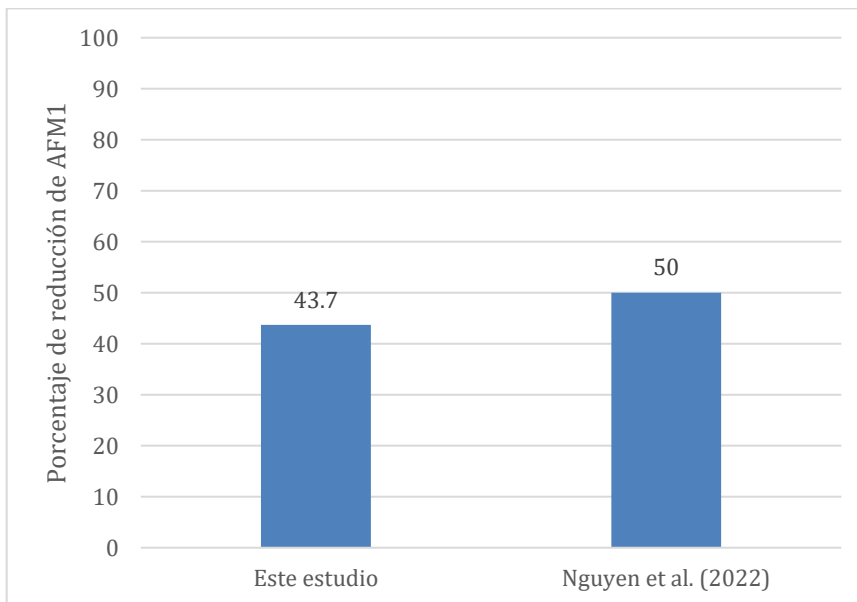
Color de la leche entera UHT tras irradiación con luz UVC.



Los resultados ilustrados en la **figura 6** para la leche entera UHT son similares a los obtenidos por Nguyen et al. (2022) (**figura 8**), quienes lograron una degradación mayor al 50% al trabajar con leche entera y leche descremada dopada con AFM1, usando condiciones similares a las de este trabajo.

Figura 8.

Comparación del porcentaje de reducción de AFM1 para la leche entera UHT con el estudio realizado por Nguyen et al. (2022).



La penetración de la luz UV en la leche puede verse limitada debido a que esta matriz tiene una baja transmisividad de luz UV por su alto coeficiente de absorción; en este sentido, la reducción de AFM1 tras irradiación UV podría aumentar de forma gradual al prolongar el tiempo de exposición y disminuir la profundidad de la muestra (Nguyen et al., 2022). Sin embargo, Nguyen et al. (2022) observaron que el nivel de concentración de AFM1 presente en la leche no requería modificaciones en el tiempo de exposición, debido a que la reducción obtenida luego de los 20 minutos de irradiación UV no mostró diferencias significativas entre concentraciones bajas, medias y altas de AFM1. Es importante mencionar, que tanto el tiempo de irradiación como la intensidad de luz UV son factores determinantes en la degradación de AFM1, donde a mayor intensidad y mayor tiempo, mayor es la reducción de la toxina, pero también se incrementan los efectos negativos sobre las propiedades fisicoquímicas y organolépticas de la leche (como el cambio de color) (Diao et al., 2015). Por lo tanto, es posible suponer que la diferencia en el color de la leche, y tiempo de exposición – porcentaje de reducción de AFM1, entre este estudio y el

estudio desarrollado por Nguyen et al. (2022) (**figura 8**), puede deberse al tipo de fuente de luz UV empleada.

4.3. Bioaccesibilidad.

Para la determinación de la bioaccesibilidad de AFM1 se realizó una digestión gastrointestinal *in vitro* a muestras de leche irradiadas con luz UVC (MLE-3 y MLC-3), dopadas a concentración de 2.5 ug/L, las cuales no presentaron la señal atribuida a la toxina en la región cromatográfica correspondiente al tiempo de retención de AFM1 en este estudio (4.68 min), ni en el intervalo de 3.5 a 6 min. A partir de esto, se realizó nuevamente el anterior procedimiento para una concentración mayor (5 ug/L), obteniendo al final la misma respuesta; con el fin de comprobar si el resultado obtenido era un efecto de la irradiación sobre la leche o la toxina, se realizó el mismo procedimiento para muestras de leche dopadas (2.5 ug/L y 5 ug/L) que no fueron irradiadas, obteniendo el mismo resultado que se obtuvo para las muestras irradiadas, concluyendo así que la bioaccesibilidad de AFM1 en este estudio fue no cuantificable. Esto podría explicarse por una posible transformación de la toxina durante las etapas del proceso de digestión, al igual que de una posible pérdida de AFM1 durante la extracción y purificación, atribuida a la complejidad de la matriz resultante post-digestión (Llorens et al., 2022).

Se han realizado investigaciones para estudiar la bioaccesibilidad de AFM1 en leche empleando métodos para la digestión gastrointestinal *in vitro*; sin embargo, la mayoría de los estudios se han enfocado en utilizar agentes biológicos, sin reportarse investigaciones que evalúen esta matriz y toxina tras irradiación con luz UVC, ni que apliquen el método de extracción y purificación de AFM1 utilizado en este estudio. Kumar et al. (2022) evaluaron la bioaccesibilidad de AFM1 en muestras dopadas de leche pasteurizada, donde encontraron AFM1 únicamente en

las muestras de leche pasteurizada que no fueron digeridas, es decir, aquellas que no se sometieron a la digestión gastrointestinal *in vitro*. Sus resultados indicaron que la toxina desapareció en la fase intestinal, posiblemente por la acción catalítica de las enzimas presentes en la pancreatina, en especial las lipasas, las cuales podrían actuar sobre el anillo de lactona de AFM1, generando su apertura, así como la formación de un acil-enzima, seguido de la polimerización de lactonas, lo que daría lugar a un nuevo metabolito (Kumar et al., 2022).

Durante los procesos de digestión gastrointestinal *in vitro*, como el propuesto por Minekus et al. (2014), desarrollado por la red COST Infogest, se genera una fuerte actividad enzimática causada principalmente por la pancreatina y sales biliares, lo que provoca cambios significativos en los componentes de la leche.

En la leche, la fuerte actividad enzimática puede causar desnaturalización de proteínas, hidrólisis de lípidos y formación de micelas coloidales (González-Arias et al., 2013). Estos cambios en la leche pueden hacer que una fracción significativa de la toxina permanezca ligada a componentes no solubles o se sedimente con residuos insolubles de la matriz post-digestión (Llorens et al., 2022), generando así una reducción de la AFM1 disponible para el proceso de extracción y purificación, así como su análisis por medio de la técnica HPLC-FLD (González-Arias et al., 2013). Por lo anterior, Llorens et al. (2022) hacen énfasis en la complejidad de la cuantificación de la bioaccesibilidad de aflatoxinas presentes en cualquier matriz luego de procesos de digestión, ya que generalmente se obtiene una solución que contiene componentes de la matriz inicial, sales biliares, productos de digestión, enzimas, etc.

Es importante mencionar que la extracción y purificación de AFM1 luego de la digestión gastrointestinal *in vitro* en este estudio se realizó mediante el método propuesto por Gonçalves et

al. (2018), el cual es un método específico para matrices como la leche, pero podría no ser aplicable para matrices digestivas.

5. Conclusiones

La verificación del método analítico empleado para la detección y cuantificación de AFM1 en leche fue satisfactoria, donde se evaluaron los parámetros propuestos según Eurachem (Eurachem, 2016), obteniendo valores aceptables para la selectividad, linealidad, LOD y LOQ, %RSD y %RSDri, y exactitud, demostrando así su aplicabilidad para la determinación de esta toxina en leche entera UHT y leche cruda, incluso luego de someter esta matriz a irradiación con luz UVC.

Respecto a la irradiación con luz UVC, se logró evidenciar una degradación de AFM1 en la leche entera UHT (43.70%) y leche cruda (20.76%), demostrando así la capacidad y la variación que tiene éste método físico de degradar ésta toxina en los dos tipos de leche. De igual manera, no se observó a simple vista cambios en el color de las leches, indicando así que no se presentaron alteraciones perceptibles en las propiedades organolépticas en esta matriz.

Por último, la bioaccesibilidad de AFM1 fue no cuantificable en las muestras de leche irradiadas ni en las no irradiadas, debido posiblemente a la actividad enzimática sobre la toxina y la matriz, especialmente la lipasa, durante el proceso de digestión, y a la complejidad de la matriz post-digestión, dando así la necesidad del uso de un método de extracción y purificación específico para matrices digestivas.

6. Recomendaciones

Para futuros estudios complementarios, se recomienda adaptar etapas de limpiezas adicionales o el uso de sorbentes en el método de extracción y purificación de AFM1 utilizado con el fin de adecuar una metodología acorde a la complejidad de matrices digestivas.

De igual forma, con el fin de hacer un mayor seguimiento a la bioaccesibilidad de la AFM1, se recomienda la toma de alícuotas en cada fase de la simulación gastrointestinal para la detección y caracterización de condiciones o reactivos responsables en la variación de su comportamiento durante el estudio in vitro. Finalmente, se recomienda el uso de técnicas instrumentales complementarias como HPLC-MS/MS que permitan identificar y evaluar los posibles productos de degradación obtenidos.

Referencias bibliográficas

Agudelo, D., & Bedoya, O. (2005). Composición nutricional de la leche de ganado vacuno.

REVISTA LASALLISTA DE INVESTIGACIÓN, 2(1).

Alais, C. (1985). *CIENCIA DE LA LECHE: Principios de técnica lechera* (Industrielles et C.

Société d'Édition et de Promotion Agro-alimentaires, Ed.; Editorial REVERTÉ, Trans.; 4ta ed.).

Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Štajnbaher, D., & Schenck, F. J. (2003). Fast and easy

multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*, 86(2), 412–431. <https://doi.org/10.1093/jaoac/86.2.412>

Asociación Nacional de Productores de Leche. (2025). *BOLETÍN DE INDICADORES*.

<https://analac.org/wp-content/uploads/2025/02/ENE-2025-BOLETIN-DE-INDICADORES-ANALAC.pdf>

- Campagnollo, F. B., Ganev, K. C., Khaneghah, A. M., Portela, J. B., Cruz, A. G., Granato, D., Corassin, C. H., Oliveira, C. A. F., & Sant'Ana, A. S. (2016). The occurrence and effect of unit operations for dairy products processing on the fate of aflatoxin M1: A review. In *Food Control* (Vol. 68, pp. 310–329). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.04.007>
- CONtexto ganadero. (2025, February 1). *Perspectivas del sector lácteo colombiano para 2025*.
<https://www.contextoganadero.com/economia/Perspectivas-del-sector-lacteo-colombiano-para-2025>
- Coppock, R. W., Christian, R. G., & Jacobsen, B. J. (2018). Aflatoxins. *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles: Third Edition*, 983–994. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811410-0.00069-6>
- Cordero Figueroa. (2019). *Guía para la validación de métodos analíticos de jarabes por cromatografía líquida de alta resolución en un laboratorio farmacéutico* [Tesis de maestría]. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Coulombe, R. A. (1993). SYMPOSIUM: BIOLOGICAL ACTION OF MYCOTOXINS
Biological Action of Mycotoxins 1. *Journal of Dairy Science*, 76.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77414-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77414-7)
- Dai, Y., Huang, K., Zhang, B., Zhu, L., & Xu, W. (2017). Aflatoxin B1-induced epigenetic alterations: An overview. *Food and Chemical Toxicology*, 109, 683–689.
<https://doi.org/10.1016/J.FCT.2017.06.034>

- Diao, E., Li, X., Zhang, Z., Ma, W., Ji, N., & Dong, H. (2015). Ultraviolet irradiation detoxification of aflatoxins. *Trends in Food Science & Technology*, 42(1), 64–69. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2014.12.001>
- Estévez Angarita, K., & Peña Quiroga, J. (2020). *EFECTO DEL PH EN LAS AFLATOXINAS DEL MAÍZ NIXTAMALIZADO* [Tesis de pregrado]. Universidad Industrial de Santander.
- Eurachem. (2016). *Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados*. www.eurachem.org
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2013). *CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION PROCEDURAL MANUAL* (Food and Agriculture Organization of the United Nations & World Health Organization, Eds.; 28th ed.). JOINT FAO/WHO FOOD STANDARDS PROGRAMME. <https://doi.org/10.4060/cc5042en>
- Fox, P. F. (2008). Milk: an overview. *Milk Proteins*, 1–54. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374039-7.00001-5>
- Giovati, L., Magliani, W., Ciociola, T., Santinoli, C., Conti, S., & Polonelli, L. (2015). AFM1 in Milk: Physical, Biological, and Prophylactic Methods to Mitigate Contamination. *Toxins* 2015, Vol. 7, Pages 4330-4349, 7(10), 4330–4349. <https://doi.org/10.3390/TOXINS7104330>
- Gonçalves, K. D. M., Sibaja, K. V. M., Feltrin, A. C. P., Remedi, R. D., de Oliveira Garcia, S., & Garda-Buffon, J. (2018). Occurrence of aflatoxins B1 and M1 in milk powder and UHT consumed in the city of Assomada (Cape Verde Islands) and southern Brazil. *Food Control*, 93, 260–264. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2018.06.010>

- Gonçalves, L., Dalla Rosa, A., Gonzales, S. L., Feltes, M. M. C., Badiale-Furlong, E., & Dors, G. C. (2017). Incidence of aflatoxin M1 in fresh milk from small farms. *Food Science and Technology*, 37(Special Issue), 11–15. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.06317>
- González, B. (2016). *Validación y comparación de dos métodos analíticos por espectrofotometría visible para determinar boro en suelos* [Tesis de pregrado, Universidad de San Carlos de Guatemala]. <http://www.repositorio.usac.edu.gt/4823/>
- González-Arias, C. A., Marín, S., Sanchis, V., & Ramos, A. J. (2013). Mycotoxin bioaccessibility/absorption assessment using in vitro digestion models: a review. *World Mycotoxin Journal*, 6(2), 167–184. <https://doi.org/10.3920/WMJ2012.1521>
- Granados Hernández, C. (2020). *EFECTO DE LA COCCIÓN SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE CAROTENOIDES PRO-VITAMINA A EN EL PLÁTANO (Musa paradisiaca) EN DIFERENTES ESTADOS DE MADURACIÓN: UNA REVISIÓN DE LA LITERATURA* [Tesis de pregrado, PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA]. <https://apidspace.javeriana.edu.co/server/api/core/bitstreams/5aad4c2e-9529-4c84-984b-ee31642ca457/content>
- Granados-Chinchilla, F. (2016). Insights into the Interaction of Milk and Dairy Proteins with Aflatoxin M1. *Milk Proteins - From Structure to Biological Properties and Health Aspects*. <https://doi.org/10.5772/63433>
- Hassan, F., & Hussein, H. (2017). Detection of Aflatoxin M1 in Pasteurized Canned Milk and Using of UV Radiation for Detoxification. *International Journal of Advances in Chemical Engineering and Biological Sciences*, 4(1). <https://doi.org/10.15242/IJACEBS.C0317031>

- Hassouna, K. Ben, Salah-Abbès, J. Ben, Chaieb, K., Abbès, S., Ferrer, E., Martí-Quijal, F. J., Pallarés, N., & Berrada, H. (2023). The Occurrence and Health Risk Assessment of Aflatoxin M1 in Raw Cow Milk Collected from Tunisia during a Hot Lactating Season. *Toxins* 2023, Vol. 15, Page 518, 15(9), 518. <https://doi.org/10.3390/TOXINS15090518>
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas (ICONTEC). (2015). *NTC-ISO 9000:2015(es), Sistemas de gestión de la calidad — Fundamentos y vocabulario* (ICONTEC, Trans.). <https://www.iso.org/obp/ui/es/#iso:std:iso:9000:ed-4:v1:es>
- Iqbal, M., Abbas, M., Adil, M., Nazir, A., & Ahmad, I. (2018). Aflatoxins Biosynthesis, Toxicity and Intervention Strategies: A Review. *SSRN Electronic Journal*. <https://doi.org/10.2139/SSRN.3407341>
- Jurado, J. M. (2008). Aplicación de Microsoft Excel a la Química Analítica: validación de métodos analíticos. Sevilla: Universidad de Sevilla-Departamento de Química Analítica
- Kabak, B., & Ozbey, F. (2012). Aflatoxin M1 in UHT milk consumed in Turkey and first assessment of its bioaccessibility using an in vitro digestion model. *Food Control*, 28(2), 338–344. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2012.05.029>
- Karaseva, N. M., Amelin, V. G., & Tret'Yakov, A. V. (2014). QuEChERS coupled to dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of aflatoxins B1 and M1 in dairy foods by HPLC. *Journal of Analytical Chemistry*, 69(5), 461–466. <https://doi.org/10.1134/S1061934814030071/METRICS>
- Klich, M. A. (2007). *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. *Molecular Plant Pathology*, 8(6), 713–722. <https://doi.org/10.1111/J.1364-3703.2007.00436.X>

- Kluczkovski, A. M., Góes, A., Santos, K., Diogenes, L. C. G., Corrêa, L., Araújo, C. F., & Junior, A. K. (2023). UV LED Light Efficiency in Aflatoxin M1 Reduction in Bovine Milk. *Journal of Agricultural Studies*, *11*(2), 40–47. <https://doi.org/10.5296/JAS.V11I2.20745>
- Kumar, L. K., Kapri, A., Chandel, R., Kumar, V., Verma, S., Vedamurthy, G. V., Singh, D., & Onteru, S. K. (2022). Digestive propensity of Aflatoxin M1 (4-Hydroxyaflatoxin B1), an indication from in vitro digestion model system. *Journal of Food Processing and Preservation*, *46*(5). <https://doi.org/10.1111/JFPP.16577>
- Kurup, A. H. (2021). Effect of High Intensity Ultraviolet Light (UV-A) Emitting Diodes Technology on the Reduction of Mycotoxins in Whole Milk: Kinetic and Cytotoxicity Study. *ETD Collection for Tennessee State University*.
<https://digitalscholarship.tnstate.edu/dissertations/AAI28775771>
- Kurup, A. H., Patras, A., Pendyala, B., Vergne, M. J., & Bansode, R. R. (2021). Evaluation of UV-A LED technology on the reduction of spiked aflatoxin B1 and aflatoxin M1 in whole milk: toxicity analysis using liver hepatocellular cells. *BioRxiv*, 2021.03.14.435353.
<https://doi.org/10.1101/2021.03.14.435353>
- Llorens, P., Pietrzak-Fiećko, R., Moltó, J. C., Mañes, J., & Juan, C. (2022). Development of an Extraction Method of Aflatoxins and Ochratoxin A from Oral, Gastric and Intestinal Phases of Digested Bread by In Vitro Model. *Toxins 2022*, *Vol. 14*, Page 38, *14*(1), 38.
<https://doi.org/10.3390/TOXINS14010038>
- Maggira, M., Ioannidou, M., Sakaridis, I., & Samouris, G. (2021). Determination of Aflatoxin M1 in Raw Milk Using an HPLC-FL Method in Comparison with Commercial ELISA

- Kits—Application in Raw Milk Samples from Various Regions of Greece. *Veterinary Sciences* 2021, Vol. 8, Page 46, 8(3), 46. <https://doi.org/10.3390/VETSCI8030046>
- 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* 2018, Vol. 10, Page 214, 10(6), 214. <https://doi.org/10.3390/TOXINS10060214>
- Marimón Sibaja, K. V., Gonçalves, K. D. M., Garcia, S. D. O., Feltrin, A. C. P., Nogueira, W. V., Badiale-Furlong, E., & Garda-Bufferon, J. (2019). Aflatoxin M1 and B1 in Colombian milk powder and estimated risk exposure. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 12(2), 97–104. <https://doi.org/10.1080/19393210.2019.1567611>
- Min, L., Fink-Gremmels, J., Li, D., Tong, X., Tang, J., Nan, X., Yu, Z., Chen, W., & Wang, G. (2021). An overview of aflatoxin B1 biotransformation and aflatoxin M1 secretion in lactating dairy cows. *Animal Nutrition*, 7(1), 42–48. <https://doi.org/10.1016/J.ANINU.2020.11.002>
- Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., ... Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food and Function*, 5(6), 1113–1124. <https://doi.org/10.1039/c3fo60702j>
- Ministerio de Salud y Protección Social. (2013). *Resolución 4506 de 2013 : Por la cual se establecen requerimientos sanitarios y de seguridad alimentaria para leche y productos lácteos.*

<https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/resolucion-4506-de-2013.pdf>

Morais, D. N., Massarolo, K. C., Ardohain, E. N. G., Lima, J. F., Ferreira, F. D., & Drunkler, D. A. (2024). Method for Determination of Multi-mycotoxins in Milk: QuEChERS Extraction Modified Followed by HPLC-FL Analysis. *Food Analytical Methods*, 17(1), 47–60.
<https://doi.org/10.1007/S12161-023-02550-0/METRICS>

Moreno Lobato, B. (2018). *Gestión de calidad y verificación de métodos analíticos en un laboratorio de investigación bajo normativa de Buenas Prácticas de Laboratorio* [Tesis Doctoral, Universidad de Extremadura].
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=189765&info=resumen&idioma=ENG>

Nguyen, T., Palmer, J., Loo, T., Shilton, A., Petcu, M., Newson, H. L., & Flint, S. (2022). Investigation of UV light treatment (254 nm) on the reduction of aflatoxin M1 in skim milk and degradation products after treatment. *Food Chemistry*, 390, 133165.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2022.133165>

Núñez, C. (2018). *Determinación de Aflatoxina M1 en Lecherías de La Región Metropolitana y de Valparaíso de Chile* [Tesis de postgrado, Universidad de Chile].
<https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/168623>

Oficina de Publicaciones de la Unión Europea. (2016). *Guidance document on the estimation of LOD and LOQ for measurements in the field of contaminants in feed and food*.
<https://doi.org/10.2787/8931>

Panwar, R., Kumar, N., Kashyap, V., Ram, C., & Kapila, R. (2019). Aflatoxin M1 Detoxification Ability of Probiotic Lactobacilli of Indian Origin in In vitro Digestion Model. *Probiotics*

and Antimicrobial Proteins, 11(2), 460–469. <https://doi.org/10.1007/S12602-018-9414-Y/METRICS>

Pereira, A., & Bernal, Ó. (2018). Aflatoxinas. Una revision. *Perspectivas En Nutrición Humana*, 0(4), 65–85. <https://doi.org/10.17533/udea.penh.336534>

Perestrelo, R., Silva, P., Porto-Figueira, P., Pereira, J. A. M., Silva, C., Medina, S., & Câmara, J. S. (2019). QuEChERS - Fundamentals, relevant improvements, applications and future trends. *Analytica Chimica Acta*, 1070, 1–28. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2019.02.036>

Pitt, J. I. (2000). Toxigenic fungi and mycotoxins. *British Medical Bulletin*, 56(1), 184–192. <https://doi.org/10.1258/0007142001902888>

Quevedo, P. (2014). Ocurrencia y estimación de la exposición humana a aflatoxina M1 en muestras de leche procedentes de Monterrey (México) [Tesis Doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona]. In *TDX (Tesis Doctorals en Xarxa)*. <https://www.tdx.cat/handle/10803/286289>

Ramos, A., Marín, S., Molino, F., Vila, P., & Sanchis, V. (2020). Las micotoxinas: el enemigo silencioso. *Arbor*, 196(795), a540–a540. <https://doi.org/10.3989/ARBOR.2020.795N1004>

Rojo, F., Martínez, S., Espinoza, V., Nathal, M., De Lucas, E., & Reyes, W. (2014). Evaluación de adsorbentes para la reducción de aflatoxina M1 en leche de vacas alimentadas con dietas contaminadas artificialmente con AFB1. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 5(1), 1–16. <https://cienciaspecuarias.inifap.gob.mx/index.php/Pecuarias/article/view/3062>

- Rushing, B. R., & Selim, M. I. (2019). Aflatoxin B1: A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods. *Food and Chemical Toxicology*, *124*, 81–100. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2018.11.047>
- Santana-Mayor, Á., Socas-Rodríguez, B., Herrera-Herrera, A. V., & Rodríguez-Delgado, M. Á. (2019). Current trends in QuEChERS method. A versatile procedure for food, environmental and biological analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *116*, 214–235. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2019.04.018>
- Serrano-Niño, J. C., Cavazos-Garduño, A., Hernandez-Mendoza, A., Applegate, B., Ferruzzi, M. G., San Martín-González, M. F., & García, H. S. (2013). Assessment of probiotic strains ability to reduce the bioaccessibility of aflatoxin M1 in artificially contaminated milk using an in vitro digestive model. *Food Control*, *31*(1), 202–207. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2012.09.023>
- Sevim, S., Macit, A., Sancak, B., & Kizil, M. (2024). Aflatoxin M1 mitigation by novel biological agents and evaluation of bioaccessibility with enzymatic digestion in milk. *Food Bioscience*, *59*, 103998. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2024.103998>
- Shahbandeh, M. (2023, December 18). *Global dairy industry - statistics & facts* | Statista. <https://www.statista.com/topics/4649/dairy-industry/#editorsPicks>
- Shrivastava, A., & Gupta, V. (2011). Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles of Young Scientists*, *2*(1), 21. <https://doi.org/10.4103/2229-5186.79345>
- Stanley, J., Patras, A., Pendyala, B., Vergne, M. J., & Bansode, R. R. (2020). Performance of a UV-A LED system for degradation of aflatoxins B1 and M1 in pure water: kinetics and

cytotoxicity study. *Scientific Reports* 2020 10:1, 10(1), 13473-.

<https://doi.org/10.1038/s41598-020-70370-x>

Steyn, P. S. (1995). Mycotoxins, general view, chemistry and structure. *Toxicology Letters*, 82–83(C), 843–851. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(95\)03525-7](https://doi.org/10.1016/0378-4274(95)03525-7)

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

Tarazona-Manrique, L. E., Andrade-Becerra, R. J., & Vargas-Abella, J. C. (2021). Detección de aflatoxina M1 en muestras de leche cruda de vacas en tanques de enfriamiento en Boyacá (Colombia). *Revista de La Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 67(3), 219–229. <https://doi.org/10.15446/rfmvz.v67n3.93929>

Tarazona-Manrique, L. E., Andrade-Becerra, R. J., Vargas-Abella, J. C., Tarazona-Manrique, L. E., Andrade-Becerra, R. J., & Vargas-Abella, J. C. (2022). Frecuencia de la contaminación de leche cruda de vaca por aflatoxina M1 en tanques de enfriamiento en Boyacá, Colombia. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 23(2), 2058. https://doi.org/10.21930/RCTA.VOL23_NUM2_ART:2058

Thakur, N., Raigond, P., Singh, Y., Mishra, T., Singh, B., Lal, M. K., & Dutt, S. (2020). Recent updates on bioaccessibility of phytonutrients. *Trends in Food Science & Technology*, 97, 366–380. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2020.01.019>

Valls, J. (2004, January). *Validación de metodologías de cromatografía líquida de alta resolución en alimentos*. Seminario I de Doctorado. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.26411.85289>

Vaz, A., Cabral Silva, A. C., Rodrigues, P., & Venâncio, A. (2020). Detection Methods for Aflatoxin M1 in Dairy Products. *Microorganisms* 2020, Vol. 8, Page 246, 8(2), 246.

<https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8020246>

Wu, Q., Jezkova, A., Yuan, Z., Pavlikova, L., Dohnal, V., & Kuca, K. (2009). Biological degradation of aflatoxins. *Drug Metabolism Reviews*, 41(1), 1–7.

<https://doi.org/10.1080/03602530802563850>

Yaman, M., Çatak, J., Uğur, H., Gürbüz, M., Belli, İ., Tanyıldız, S. N., Yıldırım, H., Cengiz, S., Yavuz, B. B., Kışmıroğlu, C., Özgür, B., & Yaldız, M. C. (2021). The bioaccessibility of water-soluble vitamins: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 109, 552–563.

<https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2021.01.056>