UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

Determinación de aflatoxina M_1 en queso y leches cruda, ultrapasteurizada y orgánica que se comercializan en la Ciudad de México

T E S I S QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

P R E S E N T A

L P A JOSÉ JESÚS PÉREZ GONZÁLEZ

COMITÉ TUTORAL

DIRECTOR
DR. REY GUTIÉRREZ TOLENTINO

ASESORES
DR. GILBERTO DÍAZ GONZÁLEZ
DR. SALVADOR VEGA Y LEÓN

MÉXICO, D.F. DICIEMBRE 2007

Vivimos en una sociedad profundamente dependiente de la ciencia y la tecnología y en la que nadie sabe nada de estos temas. Ello constituye una fórmula segura para el desastre.

Virtualmente, cada gran avance tecnológico en la historia de la especie humana, desde el invento de las herramientas de piedra y la domesticación del fuego, han sido éticamente ambiguos.

Carl Sagan

Agradecimientos

Antes que nada quiero dejar escrito en estas líneas que para la terminación de este trabajo y los estudios de Maestría en Ciencias Agropecuarias siempre conté con el apoyo incondicional de mi familia, primordialmente de mi esposa Carmen así como de mis hijos Viviana y José.

A mi madre por el apoyo y el amor que siempre me ha brindado. A mis hermanas así como a mis suegros por sus palabras de aliento y el apoyo que recibí de ellos.

A la memoria de mi padre, de quien siempre recibí ánimo y consejos para seguir adelante en el camino del conocimiento y quien seguramente se sentiría orgulloso de ver concluida esta tesis.

Agradezco también el apoyo brindado por el Dr. Rey Gutiérrez Tolentino por su compromiso académico, orientación y estimulo en todo momento para que yo aprendiese. Al Dr. Salvador Vega y León por su gran calidad de persona y expertez en el conocimiento. Al Dr. Gilberto Díaz González por su orientación y apoyo para el manejo del equipo cromatográfico. Al Dr. Arturo Escobar Medina, investigador del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, de la Habana Cuba, por la interpretación de los cromatogramas y por su apoyo académico. A la M. en C. Beatriz Schettino y al M. en C. José H. Salas Morales por su apoyo académico y a todos mis compañeros del Laboratorio de Análisis Instrumental que hicieron posible la conclusión de esta tesis.

Índice

1. RESUMEN **1**

2. INTRODUCCIÓN **3**

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA **7**

3.1 DEFINICIÓN DE LECHE 7
3.2 DEFINICIÓN DE QUESO 7
3.3 PRODUCCIÓN DE LECHE EN MÉXICO 8
3.4 SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE LECHE CRUDA 9
3.4.1 Sistema de producción especializado o intensivo *9*
3.4.2 Sistema de producción semiespecializado *10*
3.4.3 Sistema de producción de doble propósito *10*
3.4.4 Sistema de producción familiar o traspatio *11*
3.4.5 Sistema de producción de leche orgánica *11*
3.5 PROCESO TÉRMICO EN LA LECHE (PASTEURIZACIÓN Y ULTRA PASTEURIZACIÓN) 12
3.6 MICOTOXINAS 14
3.6.1 Aflatoxinas *14*
3.6.1,1 Aflatoxina M1 ..... ***¡Error! Marcador no definido.***
3.6.2 Efectos en la salud animal *19*
3.6.3 Efectos de las aflatoxinas en la salud humana *20*
3,6,3,1 *Carcinogénesis hepática* 21
3.7 MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA AFLATOXINA M_1 EN LECHE Y DERIVADOS 22
3.8 REGULACIÓN 24
3.9 PRESENCIA DE AFLATOXINA M_1 EN LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS EN MÉXICO Y EN EL MUNDO 26

4. MATERIAL Y MÉTODOS **28**

4.1 EXPERIMENTO 1 VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINA M_1 EN LECHE 28
4.1.1 Introducción métodos de validación *28*
4.1.2 Validación del método para la determinación de AFM_1 en queso *31*
4.2 EXPERIMENTO 2. DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINA M_1 EN MUESTRAS DE LECHE POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (AOAC, 971.22, 1995) 33
7.2.1 INTRODUCCIÓN 33
4.3 EXPERIMENTO 3 DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINA M_1 EN MUESTRAS DE QUESO (AOAC, 986.16) 38

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN **42**

5.1 EXPERIMENTO 1 VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA DETERMINAR AFLATOXINA M_1 EN LECHE 42
5.1.1 Resultados y discusión de la validación del método para determinación de aflatoxina M_1 en queso *44*
5.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DEL EXPERIMENTO 2 DETERMINACIÓN DE AFM_1 EN MUESTRAS DE LECHE 45
5.3 EXPERIMENTO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LA DETERMINACIÓN DE AFM_1 EN MUESTRAS DE QUESO 49

6 DISCUSIÓN GENERAL **55**

7 RECOMENDACIONES **56**

8 BIBLIOGRAFÍA **57**

Índice de cuadros

Cuadro 1. Producción anual de leche de bovino en México.....09
Cuadro 2. Características Físicas de las aflatoxinas.....16
Cuadro 3. Leguslación Internacional para aflatoxina M_1 en leche y derivados destinados al consumo humano.....25
Cuadro 4. Frecuencias de ocurrencia de AFM_1 en leches cruda, Ultrapasteurizada y orgánica por intervalo de concentración (µg/kg).....46
Cuadro 5. Valores de las medianas, mínimos y máximos de los contenidos de AFM_1 (µg/kg) en muestras de leches cruda, ultrapasteurizada y orgánica comercializadas en el Altiplano Méxicano.....47
Cuadro 6. Contenido de aflatoxinas en diferentes marcas de queso.....50
Cuadro 7. Valores de las medianas, mínimos y máximos de los contenidos de Aflastoxina M_1 (µg/g) en muestras de queso que se comercializan en la Ciudad de México.....51

Índice de figuras

Fig. 1. Transformación de aflatoxina B_1 a aflatoxina M_1.....18
Fig. 2. Estructura química de la AFM_1.....19
Fig. 3. Perfil cromatográfico de la derivación de AFM_1 con ácido trifluoroacético.....44
Fig. 4. Curva de calibración empleando tres concentraciones diferentes.....45
Fig. 5. Diagrama de caja que muestra las concentraciones de AFM_1 en diferentes marcas de quesos.....52
Fig. 6. Niveles de concentración de AFM_1 en cada marca de queso.....53
Fig. 7. Concentración porcentual de AFM_1 en cada una de las marcas de quesos.....53

1. RESUMEN

La leche de bovino es uno de los alimentos más completos, debido a su contenido de nutrimentos entre los que destacan, las proteínas que contienen gran cantidad de aminoácidos indispensables para la nutrición humana, considerándose a nivel mundial como un alimento ideal y necesario para los humanos, ya sea ingerida en forma fluida o a través de derivados como el queso que es un alimento sólido elaborado a partir de la leche cuajada de vaca, cabra, oveja, búfalo, camella u otro mamífero con características propias en cada una de sus clases y además es uno de los principales derivados de la leche. Una problemática es que la leche así como los derivados que con ella se elaboran pueden estar contaminados con algunas sustancias tales como las aflatoxinas que son metabolitos secundarios producidos por algunas cepas de *Aspergillus flavus y A. parasiticus* en condiciones elevadas de temperatura y humedad. Las aflatoxinas son carcinógenos genotóxicos. Se sabe que no hay una dosis umbral por debajo de la cual no se ocasione daños a la salud. Solo un nivel cero de exposición puede corresponder a un riesgo nulo. El objetivo de este trabajo fue determinar y cuantificar los niveles de aflatoxina M_1 en leches cruda, ultrapasteurizada y orgánica así como en muestras de queso de 10 marcas comerciales. Las muestras de leche analizadas procedieron del Altiplano Mexicano (9 cruda, 20 ultrapasteurizada y 15 orgánica) así como 30 muestras de queso de diferentes marcas que se comercializan en la ciudad de México las cuales fueron analizadas para determinar la presencia de aflatoxina M_1 por cromatografía de líquidos de alta resolución, empleando una columna de fase reversa (C18) y detector de fluorescencia Los resultados mostraron que el 59% de las muestras de leche presentaron aflatoxina M_1 y todos los casos se

encontraron por encima del límite máximo de residuo de 0.05 µg/Kg propuesto por la Unión Europea. Las medianas de aflatoxina M_1 encontradas en muestras de leche cruda, ultrapasteurizada y orgánica fueron 16.21; 16.1 y 23.1 µg/Kg respectivamente. El porcentaje de muestras por encima del límite máximo de residuo fue menor en leche de producción orgánica (20%) comparada con las leches crudas y ultrapasteurizadas que estuvieron por encima del 50 y 60% respectivamente. El 69% de las muestras analizadas de queso fueron positivas a la presencia de aflatoxina $M_{1,}$ los niveles de concentración no fueron superiores al LMR (0.05 µg/Kg) solamente una marca presentó residuos de aflatoxina M_1 tuvo concentraciones altas pero no por arriba del LMR.

2. INTRODUCCIÓN

Actualmente el concepto de la calidad e inocuidad de los alimentos ha llegado ha ser un tema asociado con la salud humana (Stolker y Brinkman, 2005). La leche es un alimento indispensable en la dieta de los humanos y la contaminación de este alimento constituye un problema a nivel mundial (Himanish *et al*, 2006). En muchos países hay preocupación por alcanzar niveles de protección para que la leche y derivados sean productos inocuos y de alta calidad y así proteger la salud de sus pobladores (Elgerbi *et al*, 2004; Ghidini *et al*, 2005). El proceso de pasteurización el cual es uno de los métodos más comunes de conservación de alimentos mediante un tratamiento térmico que destruye microorganismos patógenos que pueden dañar la salud de los consumidores, ha ayudado a disminuir las infecciones en los humanos por bacterias patógenas presentes en la leche (Kessler, 1981), sin embargo los tratamientos térmicos no destruyen otras sustancias tóxicas como las aflatoxinas (Doyle *et al*, 1982). Se ha documentado que las aflatoxinas tienen efectos carcinogénicos en los humanos (Bolet y Socarrás, 2005).

La presencia de aflatoxinas en la leche se debe a que los rumiantes son alimentados con cereales y alimentos contaminados con aflatoxina B_1 (AFB_1), esta toxina es metabolizada y excretada como aflatoxina M_1 (AFM_1) en la leche (Garrido *et al*, 2003; Battacone *et al*, 2005), la presencia de estas sustancias en productos lácteos tales como los quesos puede tener diferentes orígenes, entre ellos la contaminación indirecta que se da cuando la leche que se emplea para elaborar derivados lácteos está contaminada debido a que los rumiantes productores de leche fueron alimentados con forraje contaminado con aflatoxina B_1; otra causa es la contaminación directa cuando intencional o

accidentalmente hay crecimiento de hongos que pueden producir toxinas tales como AFB_1 en los quesos. Algunas especies de hongos se emplean en la elaboración y maduración de algunos quesos los cuales se ha demostrado que producen varios tipos de micotoxinas por ejemplo: *Penicillium camemberti*, el cual se emplea en la producción de quesos (Kokkonen *et al*, 2005). Las aflatoxinas son metabolitos secundarios producidos principalmente por algunas especies de hongos *Aspergillus*, tales como *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nominus* (Ghidini *et al*, 2005). Estos hongos, se desarrollan en gran variedad de granos y cereales, pudiendo contaminar los alimentos cuando son cultivados, procesados, transformados o almacenados en condiciones adecuadas que favorecen su desarrollo (Tajkarimi *et al*, 2007). Cuando se habla de hongos se hace referencia a un grupo de organismos los cuales se pueden clasificar en levaduras y hongos filamentosos siendo estos últimos organismos eucariotas multicelulares y filamentosos, constituidos por micelios verdaderos, carentes de clorofila y formados por células alineadas llamadas hifas, el micelio es un conjunto de hifas ramificadas resultando visibles sobre el alimento, tanto en la superficie o en su interior (Bogantes *et al*, 2004).

Para su crecimiento los hongos utilizan una serie de sustancias químicas denominadas metabolitos primarios, como ácidos nucleicos, proteínas, hidratos de carbono y lípidos mayoritariamente, asociándose el uso de estos metabolitos con la fase de rápido crecimiento (Tarik *et al*, 2005). Los metabolitos secundarios son una serie de compuestos que no son indispensables para el crecimiento vegetativo del cultivo puro (Sassahara *et al*, 2005).

Las aflatoxinas se forman al final de la fase exponencial o al principio de la fase estacionaria del crecimiento del hongo (Stoloff, 1976). El crecimiento de los hongos y la producción de toxinas dependen de muchos factores como el grado de acidez del medio, la temperatura o humedad ambiental y la presencia de microflora competidora (García y Heredia, 2006). Las aflatoxinas producen un efecto tóxico denominado micotoxicosis, y son consideradas mutagénicas, teratogénicas y carcinogénicas, además provocan trastornos gastrointestinales (Perusia y Rodríguez, 2001; Bolet y Socarrás, 2005.).

Aunque las aflatoxinas pueden encontrarse en muchos productos agrícolas, los mayores niveles de contaminación se han encontrado en semillas de algodón, maíz, cacahuate, nueces, avellanas y frutos secos y en menores concentraciones en cereales como trigo, arroz, centeno o cebada (Offiah y Adesiyun, 2007).

La contaminación con AFM_1 de la leche no puede ser completamente prevenida porque la presencia de AFB_1 ocurre de forma natural en los granos que se suministran al ganado lechero. (Offiah y Adesiyun, 2007). Desde hace más de 30 años, en el ámbito mundial son múltiples los reportes sobre la presencia de AFM_1 en leche y derivados lácteos (Hesseltine,1976; Stoloff, 1976; Ouakinin y Martins, 1982; Carvajal *et al*, 2003a; Nakajima *et al*, 2004; García y Heredia, 2006; Tajkarimi *et al*, 2007; Zinedine *et al*, 2007; Guzmán, 2007), por lo que este tema no ha perdido su vigencia, si se considera que la inocuidad de los alimentos constituye en la actualidad la prioridad principal de muchos países y de organismos internacionales (FAO, 2000).

En países de América Latina y el Caribe en la última década se ha reportado la presencia de aflatoxina M_1 en leche y productos lácteos (quesos), algunos de ellos son Argentina (López *et al*, 2001), Brasil (Oliveira *et al*, 2006, Garrido *et al*, 2003); Colombia (Díaz y Espitia, 2006), México (Carvajal *et al*, 2003; Córdova *et al*, 2005; García y Heredia, 2006) y en Trinidad y Tobago (Ofiah y Adesivun, 2007). En la mayor parte de los informes se evidenció una incidencia de AFM_1 alta en muestras analizadas, pero con porcentajes bajos de muestras con niveles de concentración superiores al propuesto por la Unión Europea 0.05 µg/kg (EC, 2001).

En México los primeros estudios sobre la determinación de aflatoxina M_1 fueron realizados en el año de 1995 en el Estado de Sonora por Esqueda y su grupo de investigadores en muestras de leche ultrapasteurizada y comercializada en ese Estado. Después, en el periodo entre 1996-1998 (Carvajal *et al*, 2003), posteriormente Cordova *et al*, (2005) hacen otra investigación acerca de la presencia de AFM_1 en leche, en México se desconoce como esta la situación en la actualidad; y toma gran importancia ya que se ha mencionado que más del 25% de la producción de las cosechas de alimentos a nivel mundial están contaminadas con algún tipo de micotoxinas (Battacone *et al*, 2005).

El objetivo de este trabajo consistió en validar la metodología propuesta por la AOAC para identificar y cuantificar AFM_1 y determinar sus niveles en leches ultrapasteurizadas (UHT) y orgánicas que se comercializan en la Ciudad de México, así como en quesos producidos en diferentes estados del país.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1 Definición de leche

De acuerdo con la norma oficial mexicana NOM-155-SCFI-2003, la leche es un líquido secretado por las glándulas mamarias de las hembras de los mamíferos, tras el nacimiento de la cría. Además de ser una emulsión de materia grasa, en forma globular, que presenta analogías con el plasma sanguíneo, este líquido es así mismo, una suspensión de materias proteicas en un suero constituido por una solución verdadera que contiene, principalmente, lactosa y sales minerales. Por lo tanto existen en la leche cuatro tipos de componentes importantes: grasa, proteínas (caseina y albuminoides) lactosa y sales. A ellos se añaden otros componentes numerosos, presentes en cantidades mínimas: lecitinas, vitaminas, enzimas, nucleótidos, gases disueltos, etcétera (Dahr y Foltz, 2005).

La leche de bovino es uno de los alimentos más completos, debido a su contenido de nutrimentos entre los que destacan, las proteínas, que contienen gran cantidad de aminoácidos indispensables para la nutrición humana, considerándose a nivel mundial como un alimento ideal y necesario para los humanos, ya sea ingerida de forma fluida o a través de derivados como el queso, yogurt y otros.

3.2 Definición de queso

Es un alimento sólido elaborado a partir de la leche cuajada de vaca, cabra, oveja, búfalo, camella u otro mamífero con características propias en cada una de sus clases, además es uno de los principales derivados de la leche, ya que

por sus contenidos altos en proteínas y calcio es un alimento considerado de composición nutrimental amplia (Sassahara *et al*, 2005).

La leche es inducida a cuajarse usando una combinación de cuajo (o algún sustituto) y acidificación. Las bacterias se encargan de acidificar la leche, jugando también un papel importante en la definición de la textura y el sabor en la mayoría de los quesos. Los quesos pueden contener hongos, tanto en su textura externa como en la parte interior algunos de ellos han mostrado que pueden producir varias micotoxinas, por ejemplo *Penicillium camemberti* (Vázquez, 2001). La leche con la que se elaboran estos derivados lácteos pudiera estar contaminada con AFM_1 y pasar a los queso (López *et al*, 2001).

3.3 Producción de leche en México

La producción de leche de bovino, es una de las ramas de la ganadería de mayor relevancia a nivel nacional, ya que no sólo se le confiere un alto valor por el tipo de alimento que aporta, sino que juega un papel fundamental dentro de la economía del sector primario e industrial, además de presentar el mayor potencial de expansión a fin de sustituir el importante componente de abasto procedente del exterior. La producción de leche en México se desarrolla en condiciones muy heterogéneas, tanto desde el punto de vista tecnológico como socioeconómico, y por la localización de las explotaciones. Además, dada la variabilidad de condiciones climatológicas, las explotaciones adquieren características propias por región, influyendo adicionalmente la idiosincrasia, tradición y costumbres de la población. De acuerdo a cifras del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), con información de la SAGARPA se presenta en el cuadro 1, la producción nacional de leche de bovino.

Cuadro No 1. Producción anual de leche de bovino en México

	Año 2004	Año 2005	Año 2006	Hasta agosto-2007	Pronostico para 2007
Volumen producción de leche de bovino (Miles de litros)	**9,864,302**	**9,868,302**	**10,088,558**	**915,160**	**10,183,545**

FUENTE: SIAP, 2007

3.4 Sistemas de producción de leche cruda

Características de las unidades de producción lechera. La producción de leche se realiza en todo el país, en sistemas que van desde el tecnificado, hasta los de subsistencia. Se distinguen de forma general, cuatro sistemas: el especializado, el semiespecializado, el de doble propósito y el familiar o de traspatio; de los cuales, por los volúmenes de producción, el primero es el más importante (García *et al*, 1997; Losada *et al*, 1998).

3.4.1 Sistema de producción especializado o intensivo

Es un sistema que se caracteriza porque cuenta con ganado especializado en la producción de leche, principalmente de las razas Holstein, Pardo Suizo y Jersey. Se emplea tecnología altamente especializada, y predomina el manejo de los animales en corrales (estabulado). Los animales se alimentan de forrajes y alimentos preparados. El proceso de ordeño se realiza a través de maquinaria especializada y la leche se destina a las principales plantas procesadoras y transformadoras del país. El número de cabezas en este tipo de sistemas es 100 o más, pudiendo ser en algunas unidades de producción más de mil cabezas de ganado. El volumen de producción diario es de 35 a 38 kg/vaca. Su participación dentro de la producción nacional es del 50.6%, se desarrolla principalmente en el Altiplano Mexicano y las zonas áridas y semiáridas del norte del país (Losada et al, 1998).

3.4.2 Sistema de producción semiespecializado

Este sistema cuenta principalmente con animales de las razas Holstein y Pardo Suizo. Se mantienen los animales en semiestabulación, es decir, pasan una parte del día en corrales y la otra en pastoreo. El ordeño se realiza de forma manual o con máquinas sencillas. Algunos productores cuentan con equipo necesario para almacenar y enfriar leche. La alimentación al ganado se realiza mediante el pastoreo además se ofrecen forrajes y alimento concentrado. Su participación dentro de la producción nacional es del 21.3%, el número de cabezas de ganado en este sistema es muy inferior al especializado, debido al manejo de los animales (de 50 a 200 animales). El volumen de producción es de 30 a 33 kg/vaca/día. (García *et al*,1997; Losada et al, 1998).

3.4.3 Sistema de producción de doble propósito

Este sistema se desarrolla principalmente en las regiones tropicales de México, aunque también se puede encontrar en regiones de clima árido, semiárido y templado. Se utilizan las razas cebuinas y sus cruces con Pardo Suizo, Holstein y Simmental. Se le llama de doble propósito porque con el ganado de estas explotaciones se produce carne o leche, dependiendo de lo que exija el mercado. Su alimentación se basa en el pastoreo y la ordeña se realiza generalmente de forma manual. La leche que se produce es vendida directamente al consumidor para la elaboración de quesos, así como a empresas industriales. Su participación dentro de la producción nacional es del 18.3%. El número de cabezas por unidad de producción es menor a 100 en promedio 30 ó 50 cabezas. El volumen de producción es de 20 a 25 kg/vaca. (García, 1997; Losada et al, 1998).

3.4.4 Sistema de producción familiar o traspatio

En este sistema el ganado se explota en pequeñas superficies de terreno, principalmente en las viviendas (por eso se le llama de traspatio). Se puede tener a los animales en corrales o en pastoreo dependiendo de las condiciones de sus campos de cultivo. Los animales son de las razas Holstein y Pardo Suizo (en menor cantidad), así como cruzas. Las instalaciones son rudimentarias y predomina el ordeño manual. La mayor parte de la leche que producen se destina a la fabricación de quesos artesanales, en segundo lugar a la venta directa al consumidor y el restante de la producción a empresas trasnacionales como Nestlé. En total la participación de este sistema en la producción nacional de leche es de 9.8%. El número de cabezas en estos sistemas de producción puede ir de 1 hasta 20. El volumen de producción es de 13 a 18 kg/vaca/día, el ordeño en algunos casos se efectúa una sola vez al día (García *et al*, 1997; Losada *et al*, 1998).

3.4.5 Sistema de producción de leche orgánica

La ganadería orgánica es un sistema holístico de gestión de la producción que mejora y fomenta la salud de los agroecosistemas y la salud de los animales así como la calidad de los productos de origen animal a través de prácticas que evitan el uso de productos de síntesis química como hormonas, antibióticos, reguladores del crecimiento medicamentos varios y plaguicidas, así como evitar el uso de aguas negras (Brunnet *et al*, 2003). Tiene por objetivo producir leche y productos lácteos libres de contaminación y de composición nutrimental elevada. Los sistemas de producción orgánica se basan en normas especificas y precisas, cuya finalidad es lograr un sistema óptimo de producción, sostenible desde el punto de vista social, ecológico y económico (Vallone *et al*., 2006). Sin

embargo, en la producción de alimentos de origen animal, se sabe que la ganadería lechera es la más difícil de cambiar a un sistema de producción orgánico, debido en gran parte a sus innovaciones tecnológicas. Sin embargo, existen en diferentes países diversas iniciativas y experiencias que han hecho posible la producción de leche orgánica (Ghidini et al., 2005).

En México y en el mundo, no existe hasta el momento un marco regulatorio para la producción de leche orgánica. Además las evidencias científicas actuales no muestran que la leche orgánica sea más sana y nutritiva que la leche convencional (Vega *et al*, 2002).

3.5 Proceso térmico en la leche (pasteurización y ultrapasteurización)

La leche y la mayor parte de los productos lácteos pueden contener sustancias tóxicas así como microorganismos patógenos para la especie humana y ser agentes de transmisión de enfermedades que afectan la salud de los consumidores. La pasteurización y ultrapasteurización de la leche son métodos comunes de conservación de los alimentos mediante un calentamiento que disminuye la cantidad de microorganismos que dañan la salud humana y además inactivan a las enzimas. El tratamiento térmico requerido no es único ya que se pueden emplear varias condiciones de tiempo-temperatura para lograr el objetivo, pero se prefieren los de temperaturas altas y tiempos cortos, seguidos de un descenso brusco de temperatura para garantizar la eficacia del procedimiento. Paralelamente a la destrucción de organismos patógenos, también se eliminan los microorganismos termosensibles, como los coliformes, y se inactiva la fosfatasa alcalina, pero no así las esporas, la enzima peroxidasa o las micotoxinas; es decir, la leche pasteurizada todavía puede contener una determinada cuenta tanto microbiana como de sustancias

potencialmente dañinas para la salud humana. Con temperaturas superiores a los 25 °C, mueren lo microorganismos psicrófilos (coliformes); arriba de los 42 °C, mueren los mesófilos aerobios; y superiores a 60 ° C, mueren los termoresistentes (*Salmonella*). La eficacia de los diferentes tratamientos térmicos se mide mediante la prueba de la fosfatasa alcalina, con la cual hay que tomar ciertas precauciones ya que se presenta el fenómeno de la reactivación enzimática.

La AFM_1 es, termoestable en el proceso de elaboración de algunos quesos, que usan leche pasteurizada. En procesos de pasteurización a 60ºC durante 30 minutos, o bien a 77ºC durante 20 minutos. Calentamientos a 64-90ºC durante 15-20 minutos, la concentración de AFM_1 original de la leche cruda permanece prácticamente inalterada (Yousef y Marth, 1989).

Por el contrario, en calentamientos a 71-120ºC durante 30 min. se han conseguido reducciones de contaminación del orden del 12 al 35% y hay algunos procesos de pasteurización, esterilización, evaporación, secados tipo Roller y Spray, en donde se han podido conseguir en leche disminuciones de contaminación con AFM_1 del orden del 32 al 86%. En algunos quesos y dentro de su proceso de elaboración y con calentamientos a 82-100 ºC entre 5 a 30 min. no se han conseguido reducir las tasas de contaminación. En algunos casos hubo una reducción de un 9% a 90ºC durante 30 minutos (Yousef y Marth, 1989).

3.6 Micotoxinas

Las micotoxinas son sustancias producidas en el metabolismo secundario de los hongos, que aparecen como contaminantes naturales en los alimentos cuando las condiciones climáticas son propicias (García y Martínez, 2006).

Se consideran como residuales en los alimentos y se encuentran distribuidas en diferentes familias tales como aflatoxinas, ocratoxinas, tricótesenos, fumonisinas y alcaloides de ergot entre otras (Escobar *et al*, 2005). Estos metabolitos están presentes en casi la totalidad de las materias primas y alimentos utilizados en la alimentación de animales productores de alimento. Se pueden encontrar en cualquier punto de la cadena alimentaria, desde la siembra y cosecha hasta en la carne y leche que se consumen. Los alimentos más susceptibles a la contaminación fúngica y consecuente producción de aflatoxinas son: granos y cereales (cacahuate, maíz, trigo, cebada, avena, sorgo, arroz, almendra, frijoles, semillas oleaginosas de algodón, girasol y soya), frutos secos, frutas deshidratadas, leche y productos lácteos, hierbas, especias, café, cacao, piensos, aceites vegetales, cerveza, entre otros (Guzmán, 2007).

3.6.1 Aflatoxinas

Las aflatoxinas (AFS) al igual que otras micotoxinas son metabolitos secundarios generalmente tóxicos producidos por algunas especies fúngicas (Zinedine *et al*, 2007). Las aflatoxinas son compuestos policetónicos resultantes de las reacciones de condensación que tienen lugar cuando en determinadas condiciones físicas, químicas y biológicas se interrumpe la reducción de los grupos cetónicos en la biosíntesis de los ácidos grasos

realizada por los hongos. Estos ácidos grasos son metabolitos primarios utilizados por los hongos como fuente de energía (Barbiroli *et al*, 2007).

Estos metabolitos adquieren importancia a partir de la muerte repentina en Escocia en 1960, de cien mil pavos alimentados con cacahuate contaminado con *Aspergillus flavus* proveniente de Brasil (Blount, 1961).

En 1963, Allcroft y Carnahan observaron que la leche de las vacas alimentadas con granos y forrajes contaminados con aflatoxina B_1 (AFB_1) contenían una sustancia que producía los mismos efectos tóxicos en los patos que la AFB_1 y la nombraron aflatoxina de la leche o M_1 (milk aflatoxin). Posteriormente, el grupo de Holzapfel *et al*, 1966 aislaron las aflatoxinas M_1 y aflatoxina M_2 y determinaban sus estructuras concluyendo que estas micotoxinas eran la forma hidroxilada de la AFB_1 y de la AFB_2 respectivamente.

Las AFS son inodoras, insípidas e incoloras. Químicamente, son estables en los alimentos y resistentes a la degradación bajo procedimientos de cocción normal. Es difícil eliminarlas una vez que se producen. Las aflatoxinas son un grupo de hepatocarcinógenos pertenecientes a la familia de las difurano-cumarinas, se clasifican en dos grandes grupos de acuerdo a su estructura química; la serie 1 difuro-cumaro-ciclo-pentanonas (AFB_1, AFB_2, AFB_{2A}, AFM_1, AFM_2, AFM_{2A} y aflatoxicol) y la serie 2 difuro-cumaro-lactonas (AFG_1, AFG_2, AFG_{2A}, $AFGM_1$, $AFGM_2$, $AFGM_{2A}$ y AFB_3) (cuadro 2).

Cuadro. 2 Características químicas de las aflatoxinas

tipo de aflatoxina	Fórmula estructural	Peso molecular (g/mol)	Punto fusión °C
	Serie 1 difuro-cumaro-ciclo-pentanonas		
B_1	$C_{13}H_{12}O_6$	312	268-269
B_2	$C_{13}H_{14}O_6$	314	286-289
G_1	$C_{13}H_{12}O_6$	328	244-246
G_2	$C_{13}H_{14}O7$	330	237-240
M_1	$C_{13}H_{12}O_7$	328	299
M_2	$C_{13}H_{12}O_7$	330	293
	Serie 2 difuro-cumaro-lactonas		
G_1	$C_{13}H_{12}O_6$	328	244-246
G_2	$C_{13}H_{14}O_7$	330	237-240

Las dos principales especies de *Aspergillus sp.*, que producen aflatoxinas son *A. flavus* que origina únicamente aflatoxinas B_1 y B_2 y *A. parasiticus* que puede producir aflatoxinas B y G. Sin embargo, las más importantes son B_1, B_2, G_1 y G_2, distinguidos por su color fluorescente bajo la luz ultravioleta (B: "blue", azul y G: "green", verde). Las aflatoxinas M_1 y M_2 son respectivamente productos hidroxilados del metabolismo oxidativo de las aflatoxinas B_1 y B_2 estos metabolitos pueden eliminarse en la leche (tanto en humanos como en animales). Las aflatoxinas B_2, G_1 y G_2 son menos frecuentes y casi nulas en ausencia de AFB1. Las aflatoxinas pueden causar toxicidad aguda y crónica en los animales. Los efectos como daños de tipo agudo en hígado, cirrosis, inducción de tumores y efectos teratogénicos se han documentado en la literatura (Blount, 1961; Allcrofr y Carnaghan, 1963; Martins, 2004; Díaz y Espitia, 2006; Kaan y Gurkan, 2007; Seyed et al, 2007; Zinedine *et al*, 2007).

Las micotoxinas se forman al final de la fase exponencial o al principio de la fase estacionaria del crecimiento de los hongos toxicogénicos (Gimeno y Martins, 2004). Son producidos principalmente por algunas especies de *Aspergillus (A. flavus, A. parasiticus* y *A. nominus*). Los hongos toxigénicos son

capaces de desarrollarse en gran variedad de sustratos, pudiendo contaminar los alimentos cuando éstos son cultivados, procesados, transformados o almacenados en condiciones adecuadas que favorezcan su desarrollo. El crecimiento de los hongos y la producción de toxinas dependen de muchos factores como el sustrato, la temperatura, el pH, la humedad relativa y la presencia de microflora competidora, pueden encontrarse en muchos productos agrícolas. Se han identificado 18 tipos de aflatoxinas, de las cuales las más frecuentes en los alimentos son la B_1, B_2, G_1, G_2, M_1 y M_2.

3.6.1.1 Aflatoxina M_1

La aflatoxina M_1 (AFM_1) es un metabolito hidroxilado de la aflatoxina B_1 (AFB_1), secretada en la leche de los animales que consumen alimentos contaminados con AFB_1. La aflatoxina B_1 se absorbe fundamentalmente en el duodeno dentro del sistema portal sanguíneo y es llevada al hígado donde se metaboliza principalmente por el sistema microsomal de oxidasa de función mixta (MFO) formando diferentes metabolitos: AFM_1 y aflatoxina Q_1 (procesos de hidroxilación), aflatoxina P_1 (o-desmetilación); aflatoxicol (reducción de la ciclopentanona), 8-9 epóxido (epoxidación) siendo este último el más activo ya que se une al DNA o al RNA formando aductos (Ozdemir *et al*, 2007, García y Heredia, 2006). En la figura 1 se muestra la transformación de la AFB_1 a la AFM_1. La concentración de AFM_1 en la leche variará según la cantidad de AFB_1 ingerida y la duración del consumo del alimento contaminado. Debido al sistema metabolico de los animales poligástricos, las concentraciones de AFM_1 varían entre animales, de un día para otro y de una unidad de producción de leche a otra (Deveci, 2007).

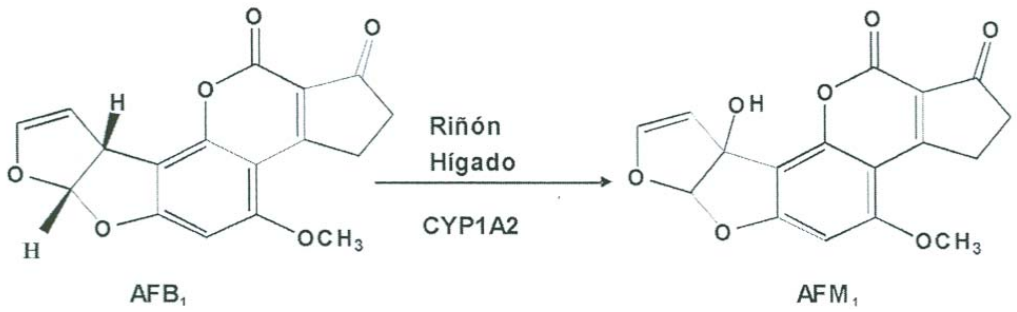


Figura 1. Transformación de aflatoxina B_1 a aflatoxina M_1

Algunos estudios han demostrado que la AFM_1 presenta una toxicidad aguda o ligeramente inferior a la AFB_1 en diferentes especies; se considera que el potencial carcinogénico de la AFM_1 es 10 veces menor que la AFB_1, la genotoxicidad de ambas sustancias es muy similar (García y Heredia, 2006).

La aflatoxina M_1 es un compuesto tóxico que presenta peso molecular bajo (328 Daltons), con estructura general bifurano y presenta un grupo hidroxilo en la posición 4 (ver figura 2). Su espectro de absorción en metanol muestra un máximo a 226, 265 y 357 nm con un coeficiente de extinción molar de 2.31, 1.16 a 1.19 $L.mol^{-1}$ (Holzapfel *et al*, 1966). No pierde su toxicidad ni por tratamiento térmico ni por la acción de las enzimas del subsistema digestivo, siendo consideradas por esto de mayor acción tóxica que las bacteriotoxinas (Oruc *et al*, 2007).

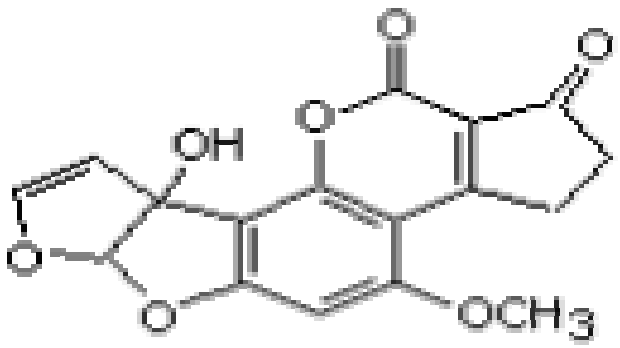


Figura 2. Estructura química de aflatoxina M_1

3.6.2 Efectos en la salud animal

Debido a las micotoxinas se han descrito un gran número de reacciones patológicas en animales domésticos productores de alimento. Los problemas que plantean estas moléculas son, de un lado, su efecto potente a muy bajas concentraciones junto con su resistencia elevada al calor con el que se esterilizan los alimentos. La actividad biológica de las aflatoxinas las habilita a funcionar como potentes toxinas carcinógenas, teratógenas y/o mutágenas. La aflatoxicosis es el nombre que recibe el efecto tóxico en los animales que han consumido alimentos contaminados con AFS. Los primeros síntomas clínicos de la aflatoxicosis crónica en las especies de mamíferos y aves estudiadas son: carencia del apetito, reducción del crecimiento y pérdida de peso (Hilal *et al*, 2006). Observaciones patológicas con niveles bajos de intoxicación manifiestan ictericia generalizada y cirrosis del hígado con proliferación de células en el conducto biliar y fibrosis periportal; envenenamientos agudos resultan en ictericia de la membrana mucosa, desarrollo de hemorragias y acumulaciones de grasa en el hígado (Oruc *et al*, 2006). La mayoría de los estudios de

metabolismo en mamíferos han sido concentrados sobre AFB_1 porque es la más potente y la más comúnmente encontrada de las toxinas producidas por hongos.

La respuesta del ganado productor de leche a la ingestión de AFS se ha caracterizado por letargo y anorexia, disminución de la producción de leche, temperatura normal o por debajo de lo normal, piel seca en el hocico, daño en el hígado. Además concentraciones elevadas en sangre de colesterol, bilirrubina, transaminasas
glutámica, oxaloacética, deshidrogenasa láctica y fosfatasa alcalina. Edema en la cavidad abdominal (Offiah y Adesivun, 2007).
La leche es probablemente el único alimento humano de origen mamífero que se conoce puede estar contaminado naturalmente con AFM_1. Esta reside principalmente con la fracción proteica de la leche (Nakajima *et al*, 2004).

3.6.4 Efectos de las aflatoxinas en la salud humana

El grado de exposición en los seres humanos a las aflatoxinas por ingesta depende de los alimentos disponibles y de los hábitos alimentarios, varía según los países, las condiciones locales (incluidas las tradiciones de los diferentes grupos étnicos) y las personas. En lugares donde el cacahuate o el maíz contaminado constituyen un elemento significativo de la dieta, la exposición será relativamente más alta que en los lugares donde se utilicen como alimentos básicos otros productos comúnmente menos contaminados, donde si la leche es el único elemento de la dieta que contiene AFM_1. Se cree importante identificar al lactante sobre todo bebes y niños, como sujetos potencialmente expuesto, ya que:

a) Los alimentos para bebés se pueden elaborar con leche desecada o incluso maíz, que como se sabe pueden fácilmente estar contaminados por AFS.

b) En términos de mayores cantidades de alimentos consumidos por kilogramo de peso corporal, cualquier cantidad de aflatoxina contaminante será más significativa en el niño que en el adulto.

Otro grupo de personas que está altamente expuesto es el de las personas que manipulan cereales, piensos, cacahuate, etc. contaminados; y las que trabajan con toxinas puras como patrones para análisis (Vallone, 2006).

3.6.3.1 Carcinogénesis hepática

Se ha observado una relación positiva entre ingestión de aflatoxinas y cáncer hepático en la especie humana, en estudios de población en los cuales se han formulado de manera concurrente cálculos de la ingesta de aflatoxinas y la incidencia de cáncer hepático primario (Bolet, 2005). (Perusia y Rodríguez (2001) informaron que en un estudio epidemiológico realizado en Uganda se observó que las mayores frecuencias de contaminación por aflatoxinas detectable en las muestras de tejido se vinculaban con una mayor incidencia de cáncer hepático primario (de 1.4 - 15.0 casos por 100,000 habitantes de la población total por año).

La hepatoxicidad de las aflatoxinas se ha confirmado en experimentos con animales y se han obtenido relaciones dosis-respuesta para diferentes especies. Aunque rara vez se han notificado casos de aflatoxicosis aguda en el humano; es posible que esos casos no siempre hayan sido reconocidos. El caso más seguro de relación de las aflatoxinas con la enfermedad hepática aguda se detectó por una epidemia de hepatitis tóxica en el noroeste de la India en 1974. En esta epidemia varios centenares de aldeanos que habían

consumido maíz, presumiblemente contaminado con cantidades de hasta 15 mg/kg de aflatoxinas exhibieron signos y síntomas de intoxicación, y más de un centenar de personas perdieron la vida (Navas *et al*, 2005).

Con una dieta deficiente en nutrimentos indispensables, el humano es más susceptible a los efectos tóxicos de las AFS, que pueden ejercerse directamente y provocar aflatoxicosis aguda o crónica subletal que tiene como manifestación el cáncer (Seyed *et al*, 2007). En estudios realizados en la década de los 90´s en Nigeria se hallaron aflatoxinas en el cerebro y los pulmones de niños fallecidos por Kwashiorkor y en niños control que habían muerto por otras enfermedades (Oyelami, 1997). Esto podría deberse, a un desequilibrio metabólico o al fracaso de los mecanismos excretorios en los niños con enfermedades como el sarampión (que precede al Kwashiorkor en 25 % de los casos), insuficiencia renal, estenosis pilórica o gastroenteritis, y a menor depuración de las aflatoxinas en las neuropatías (Almudena y Lizaso, 2001).

3.7 Métodos de análisis para aflatoxina M1 en leche y derivados

Los métodos analíticos constituyen un instrumento útil para comprender y conocer el destino metabólico de las aflatoxinas y sus residuos en alimentos de origen animal. En su concepción más amplia, los métodos de análisis se pueden clasificar en cualitativos, cuantitativos y de confirmación. Algunos métodos en la práctica pueden ser híbridos de las tres categorías anteriores, esto significa que algunos métodos cualitativos por diseño, pueden permitir efectuar estimados cuantitativos en una sustancia dada (Gallo *et al*, 2006). Los métodos cualitativos para análisis de residuos pueden ser descritos como

métodos de monitoreo o seguimiento. Estos métodos deben ser robustos y sencillos, empleando procedimientos comunes y equipamiento y reactivos baratos, que no requieran pasos de cuantificación. Los métodos de análisis cuantitativos deben tener muchas de las propiedades de un método de monitoreo, ser confiables al nivel de interés exactos, precisos, robustos, eficaces en función del costo, relativamente simples, transferibles y capaces de manipular un conjunto de muestras simultáneamente. Las características de eficiencia incluyen la capacidad de cuantificar confiablemente un compuesto a los niveles de interés o ligeramente por debajo de cierta concentración, que debe ser apropiado para establecer acciones o niveles de tolerancia.

Los métodos de confirmación ofrecen el máximo de la seguridad a menudo es requerido para asegurar inequívocamente la presencia de un compuesto. Una prueba de confirmación puede ser un segundo método cuantitativo.

En general todos los métodos se caracterizan por una serie de características que determinan su utilidad y que pueden diferir en cuanto a forma de acuerdo al organismo de normalización que lo especifica (Quattrocchi, 1992). Algunas de las características propuestas en las normas antes citadas son: especificidad, exactitud, precisión, límite de detección, límite de cuantificación practicabilidad y aplicabilidad y susceptibilidad respecto a interferencias. Las técnicas analíticas más empleadas en el análisis de micotoxinas son las siguientes: cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés) con uso previo de columnas de inmunoafinidad con anticuerpos monoclonales específicos para AFM_1 (Gimeno y Martins, 2001). Existen también métodos enzimáticos “ELISA” (enzyme-linked immunosorbent assay), es aconsejable confirmar por el método anteriormente mencionado cuando se

encuentren resultados positivos, ya que el “ELISA” utiliza anticuerpos policlonales que pueden dar “falsos positivos” (Dragacci y Grosso, 2001). Para leche fluida es recomendable utilizar el método de cromatografía de líquidos de alta resolución publicado por la AOAC oficial method 986.16.

3.8 Regulación

Desde 1981 se han dado propuestas sobre los Límites Máximos Permisibles (LMR) y la regulación para micotoxinas en diferentes alimentos para consumo humano y animal. Varios países han indicado que las medidas legislativas para micotoxinas deben revisarse constantemente. Las diferencias entre los LMR para aflatoxinas varía, ya que existen dos tendencias en lo que respecta a establecimiento del LMR de AFM_1 en leche. La legislación de la Unión Europea (UE) establece para alimentos completos y alimentos complementarios destinados a ganado bovino, ovino y caprino lechero una concentración máxima permitida de 0,005 mg de AFB_1/Kg de alimento con una humedad del 12%. Para leche cruda, leche destinada a la fabricación de productos con base en leche y leche de consumo tratada térmicamente, la concentración máxima permitida de AFM_1 es de 0.05 µg/L (Official Journal of the European Union, 2003). En el caso de alimentos preparados para antes o luego del destete (incluidas la leche para lactantes) y alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales dirigidos específicamente a los lactantes, la concentración máxima permitida de AFM_1 es de 0.025 µg/Kg (Official Journal of the European Union, 2004). En la revisión bibliográfica que se realizó no se encontró legislación para quesos y para mantequilla; sin embargo, en algunos países de Europa como Holanda y Austria, la concentración máxima permitida para AFM_1 es de 0.200 y 0.250 µg/Kg para quesos, y de 0.02 y 0.02 µg/Kg para

mantequilla respectivamente (Kaan y Gurkan, 2007; Mendoca y Venancio, 2005; CAST, 2003), en Estados Unidos y los países participantes en el MERCOSUR y otros en vías de desarrollo establecen un LMR de 0.5 µg/L para leche, (Escobar *et al*, 2004). Ver cuadro No 3. La base científica para establecer los límites máximos permisibles para la AFM_1, es su toxicidad, que proviene principalmente de la cercana similitud a la estructura de la AFB_1, por lo que la Agencia Internacional de investigación sobre el cáncer la ubica en la lista del grupo 2B como posible carcinógeno humano (IARC, 1997).

Cuadro 3. Legislación internacional para aflatoxina M_1 en leche y derivados destinados al consumo humano

Ciudad	Leche cruda (µg/kg)	Productos lácteos (µg/kg)
Unión Europea	0.05	
Austria	0.05, 0.01 (leche infantil pasteurizada)	0.02 (mantequilla), 0.25 (queso), 0.4 (leche fortificada)
Francia	0.05, 0.03 (para niños <3 años)	
Suiza	0.05	0.025 (leche y derivados y suero), 0.25 (queso), 0.02 (mantequilla)
Bulgaria	0.5	0.10 (leche fortificada)
Rumania	0	
Republica Checa	0.5	
USA	0.5	
Brasil	0.50 (leche fluida)	5.0 (leche fortificada)
Argentina	0.05	0.50 (productos lácteos)
Honduras	0.05	0.25 (queso)
Nigeria	1	
Egipto	0	
Turquía	0.05	0.25 (queso)

Fuente: Hilal et al, 2006

3.9 Presencia de aflatoxina M_1 en leche y productos lácteos en México y en el mundo

Desde hace tres décadas se han estado realizando diversos estudios en todo el mundo con la finalidad de determinar la presencia de aflatoxina en leche y productos lácteos, por ejemplo: en Portugal en 1981 fueron analizadas 74 muestras de leche cruda, 39% fueron positivas a AFM_1 en concentraciones comprendidas entre 0.06 y 0.065 µg/Kg, y alguna muestra con 0.180 µg/Kg. (Colak *et al*, 2006). Ouakinin y Martins (1982) indican que en leches pasteurizadas y UHT comercializadas en Brasil fueron encontrados intervalos de contaminación semejantes, aunque el número de muestras analizadas (n=30) fue menor (Ouakinin y Martins, 1982). En Italia entre los años 1991 y 1994 se realizó un estudio donde fueron analizadas 223 muestras de quesos, de las cuales 91% estaban contaminados con AFM_1 en concentraciones comprendidas entre 0.005 y 0.100 µg/Kg, y solo el 6.7% presentaba intervalos de contaminación entre 0.100 y 0.250 µg/Kg (Peitri *et al*, 1997). También en Italia en 1995 Galvano *et al*, analizaron 159 muestras de leche fluida, 97 de leche en polvo para niños y 114 de yogur. El 86% de muestras de leche fluida presentó un intervalo de contaminación con AFM_1 de 0.001 a 0.108 µg/Kg, con una media de 0.0102 µg/Kg; la eche en polvo tuvo un intervalo de 0.001 a 0.103 µg/Kg, con una media de 0.0218 µg/Kg, en los yogures el 80% de las muestras estuvieron contaminadas entre 0.001 y 0.496 µg/Kg, con una media de 0.018 µg/Kg (Galvano *et al*, 1998). En ese mismo país en 1996 fueron analizadas 161 muestras de leche fluida, 92 de leche en polvo para niños y 120 de yogur. El 78% de la leche fluida presentó contaminación con AFM_1 entre 0.001 y 0.0235 µg/Kg con una media de 0.0063 µg/Kg. En el 53% de la leche en polvo el intervalo fue de 0.001 a 0.0796 µg/Kg con una media de 0.0322

µg/Kg, y en el 65% de las muestras de yogur los niveles de contaminación se situaron entre 0.001 y 0.0321 µg/Kg con una media de 0.009 µg/Kg (Galvano *et al*, 2001). Jonker y colaboradores en Alemania durante 1996 encontraron en 284 muestras de leche líquida niveles de AFM_1 inferiores a 0.01 µg/Kg. (Jonker *et al*, 1999). En Holanda durante 1994, quince muestras (n=60) de derivados de leche presentaron contaminaciones inferiores a 0.02 µg/Kg y 19 muestras (n=40) de alimentos para niños con base en leche estaban contaminadas con AFM_1 entre 0.02 y 0.06 µg/Kg (Jonker *et al*., 1999).

En cuanto a quesos, estudios efectuados en Francia e Italia en los años 1991 a 1995 reflejaron contaminaciones entre 0.005 y 0.25 µg/Kg en un total de 311 muestras analizadas; sin embargo, el mayor porcentaje (65%) presentó contaminaciones entre 0.005 y 0.10 µg/Kg respectivamente (Jonker *et al*, 1999). A partir de 1996 en algunos países de Europa como Francia, Italia, Alemania, Holanda y Portugal los niveles de contaminación con AFM_1, han sido entre 0.001 y 0.060 µg/Kg para leche fluida comercial; 0.001 y 0.080 µg/Kg para leche en polvo; 0.001 y 0.098 µg/Kg para yogures y 0.005-0.500 µg/Kg para quesos (Gimeno y Martins, 2003; CAST, 2003). En Portugal (1999) fueron analizadas 101 muestras de leche fluida, de éstas, 31 fueron de leche cruda y 70 de leche comercial UHT (18 muestras de leche entera, 22 de semidescremada y 30 de leche descremada). La incidencia de contaminación con AFM_1 fue de 80.6% para leche cruda con intervalos menores de 0.005 µg/Kg (el 19.4%), 0.005-0.010 µg/Kg (el 54.8%), 0.011-0.020 µg/Kg (el 6.5%) y entre 0.021 y 0.05 µg/Kg (el 19.3%). En la leche UHT, el 14.28% de las muestras presentaron contaminación inferior a 0.005 µg/Kg. Niveles de contaminación comprendidos entre 0.005 y 0.010 µg/Kg fueron encontrados

para un 12.85% de las muestras. Un 35.7% tuvieron niveles entre 0.011 y 0.020 µg/Kg, el 34.28% entre 0.021 y 0.050 µg/Kg y solo un 2.85% entre 0.059 y 0.061 µg/Kg. El reparto porcentual de contaminación fue de 94.4% para leche entera, 90.9% para semidescremada y 76.7% para leche descremada (Martins y Martins, 2000).

En otro estudio efectuado en Portugal sobre la contaminación de yogures con AFM_1 fueron analizadas 96 muestras (48 naturales y 48 yogures conteniendo pedazos de fresa). Un 18.8% (18 muestras) estuvieron contaminadas en un intervalo que osciló entre 0.019 y 0.098 µg/Kg. En los yogures naturales, solo dos muestras presentaron un intervalo de contaminación de 0.043 a 0.045 µg/Kg. Las otras 16 muestras pertenecieron a yogures con pedazos de fresa, y la mayor contaminación fue encontrada en 4 muestras en un intervalo de 0.090 a 0.098 µg/Kg (Martins y Martins, 2004). En México hay pocos estudios referentes a AFM_1 en leche (Esqueda *et al*, 1995; Carvajal *et al*, 2003a; Carvajal *et al*, 2003b; Cordova *et al*, 2005) sin embargo no se han efectuado estudios recientemente para conocer la situación actual referente a la presencia de aflatoxina M_1 en muestras de leche y queso que se producen y comercializan en la Ciudad de México.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Experimento 1 validación del método para la determinación y cuantificación de aflatoxina M_1 en leche

4.1.1 Introducción métodos de validación

Para garantizar la calidad de métodos de prueba, diferentes instituciones nacionales e internacionales de normalización y certificación como las siguientes: Comisión de las Comunidades Europeas en la norma 2002/6557/CE; Organización internacional para la estandarización (ISO por sus

siglas en inglés) en la norma ISO 5725-2:1994; Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC por sus siglas en inglés) en el volumen 74, No 5, pp. 835-855, 2002; en México el Instituto Mexicano de Normalización en las normas NMX-EC17025-IMNC-2006 y la norma NMX-CH-5725-2-IMNC-2006 se han encargado de elaborar y emitir las directrices necesarias para la selección y validación de un método analítico. Para la correcta selección de un método analítico, entendiendo como método el conjunto sucesivo de las fases indicadas de extracción, purificación y determinación (detección y/o cuantificación), es preciso considerar todos aquellos factores que pueden influir en la validez del resultado, con relación a los motivos que han originado su demanda.

La vigilancia de la seguridad química de los alimentos es la obtención de datos acerca de los niveles de determinadas sustancias que pueden estar presentes en los alimentos (residuos, aditivos y nutrimentos), la obtención de estos datos es el resultado de un proceso que comienza con la selección y validación de un método analítico (Palermo *et al*, 2001). Dentro de los métodos analíticos se encuentran los métodos cromatográficos su validación puede ser por comparación de resultados, los porcentajes de las pruebas de adecuación y de análisis en paralelo de al menos, dos muestras homogéneas de concentraciones conocidas dentro del intervalo de aceptación del producto o dentro del intervalo de aplicación de la metodología (Quattrocchi, 1992; Dragacci y Grosso, 2001).

Protocolo de validación

1. Objetivo Validar el método propuesto por la AOAC oficial method 986.16 (AOAC, 1995) para la determinación y cuantificación de aflatoxina M_1 en leche y poder así documentar que los resultados por él producidos son confiables.

Características de validación

Linealidad: La linealidad de un método analítico se refiere a la proporcionalidad entre la concentración del analito y su respuesta.

Para evaluar la eficacia del método analítico, se procesaron cuatro concentraciones en un intervalo de 0.1-1 µg/mL del patrón de referencia por triplicado para determinar la pendiente, el intercepto y el coeficiente de determinación entre el área y la concentración del analito. (ecuaciones 1 y 2) (Díaz *y E*spitia, 2006).

Límite de detección: Corresponde a la menor concentración del analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse en una muestra en las condiciones establecidas y se expresa en unidades de concentración (%, mg/Kg, µg/Kg, etc.). **Limite de detección** = (Ybl + 3 Sbl) /b

Donde Y= valor medio del área de la recta

Ybl= media del número de repeticiones del blanco

Sbl= desviación estándar del número de repeticiones del blanco

b= volumen de inyección de la muestra

Límite de cuantificación: Corresponde a la menor concentración del analito que puede determinarse con precisión y exactitud razonable en las condiciones establecidas y se expresa también en unidades de concentración

Límite de cuantificación = (Ybl + 10 Sb)/b

Donde Y= valor medio del área de la recta

Ybl= media del número de repeticiones del blanco

Sbl= desviación estándar del número de repeticiones del blanco

b= volumen de inyección de la muestra

Para la determinación del límite de detección y cuantificación (LD, LC) se procesaron curvas en el intervalo de la determinación (0.1, 0.25, 0.5 y 1 µg/mL) y en una cercana al límite de detección (0.05, 0.1 y 0.2 µg/mL) por triplicado en cada uno de los puntos. Se procedió a determinar los valores de LD y LC y se consideraron tres y diez desviaciones estándares del blanco para (n) medidas individuales

Exactitud: la exactitud de un método es también conocida como error sistemático, corresponde a la diferencia entre el valor obtenido (media) y el valor vardadero para ello en este experimento se preparó un nivel de concentración de 40 µg/L. por triplicado para el análisis de recobrado

Exactitud: R= (/MD)100

Donde = valor medio

MD= valor verdadero

4.1.2 Validación del método para la determinación de AFM_1 en queso

Protocolo de validación

1. **Objetivo**

El objetivo fue la validación del método propuesto por la AOAC oficial method 986.16 (AOAC**,** 1995) para la determinación de AFM_1 en queso por cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa con detección

por fluorescencia (HPLC). Cumpliendo los requisitos de la norma ISO 17025 y de las normas Mexicanas NMX-EC17025-IMNC-2006 y la norma NMX-CH-5725-2-IMNC-2006 para laboratorios de ensayo.

Características de validación

Para determinar la linealidad del método propuesto se procesaron tres concentraciones en los intervalos de 0.25, 0.5 y 1 µg/mL del patrón de referencia por triplicado para determinar la pendiente, el intercepto y el coeficiente de correlación entre el área y la concentración del analito. (ecuaciones 1 y 2 para límite de detección y límite de cuantificación respectivamente) (NMX-CH-5725-2-IMNC-2006).

Para la determinación del límite de detección y cuantificación se procesaron curvas en el intervalo de la determinación (0.25, 0.5 y 1 µg/mL). Se procedió a determinar los valores de límite de detección y límite de cuantificación y se consideraron tres y diez desviaciones estándares del blanco para (n) medidas individuales.

Limite de detección = (Ybl + 3 Sbl) /b

Donde Y= valor medio del área de la recta

Ybl= media del número de repeticiones del blanco

Sbl= desviación estándar del número de repeticiones del blanco

b= volumen de inyección de la muestra

Límite de cuantificación = (Ybl + 10 Sb)/b

Donde Y= valor medio del área de la recta

Ybl= media del número de repeticiones del blanco

Sbl= desviación estándar del número de repeticiones del blanco

b= volumen de inyección de la muestra

Exactitud: para determinar el valor de la exactitud del método propuesto se preparó un nivel de concentración de 1 µg/mL. por triplicado para el análisis de recobrado, empleando la siguiente ecuación

Exactitud: R= (/MD)100

Donde = valor medio

MD= valor verdadero

Análisis de resultados

Se hizo un análisis exploratorio de datos, un análisis descriptivo y una regresión lineal. Se usó el paquete estadístico para ciencias sociales SPSS™ Versión 8.5 para Windows.

4.2 Experimento 2. Determinación y cuantificación de aflatoxina M_1 (AFM1) en muestras de leche por cromatografía de líquidos de alta resolución (AOAC 971.22, 1995)

7.2.1 Introducción

Numerosos estudios y programas de monitoreo se han realizado para intentar conocer el nivel de contaminación por AFM_1 en leche y productos lácteos. En muchos de ellos, sobre todo en los países en vías de desarrollo, se observa que la presencia de AFM_1 está relacionada con determinadas condiciones ambiéntales de humedad y temperatura que facilitan el crecimiento de los hongos en los piensos (Garrido *et al*, 2003). Además durante el buen tiempo, en muchas zonas el ganado se alimenta de los pastos, pero con el frío existe el riesgo de que los piensos que se utilicen para alimentarlos estén almacenados durante un largo periodo y por lo tanto contaminados (Gimeno, 2004).

Principio del método

La AFM_1 es extraída por aplicación de una porción de muestra de prueba de leche fluida en un cartucho C18, el cual contiene reactivos específicos (silica gel y sulfato de sodio anhidro) ligados a un material de soporte sólido. La muestra pasa a través de la columna. Los otros componentes de la matriz de la muestra son removidos del cartucho con agua destilada. La AFM_1 es eluida del cartucho C18 con acetonitrilo y cuantificada por HPLC en fase reversa con detector de fluorescencia.

Criterios de selección y ubicación física de los sitios para la toma de muestras de leche

Se obtuvieron 35 muestras de leche ultrapasteurizadas de la cuales 15 fueron orgánicas, obtenidas en diferentes supermercados durante el periodo de octubre del 2006 ha febrero del 2007, mientras 9 muestras de leche cruda se colectaron en las zonas de la Ciudad de México y Texcoco en el mismo periodo. Las muestras de leche cruda se colectaron en un recipiente limpio e inerte desde el punto de vista químico, para protegerlas de la contaminación y de daños durante el transporte. Tomando en consideración los criterios de la norma NMX-F-718-COFOCALEC-2006 sobre la guía de toma de muestras.

Traslado de las muestras

El traslado de las muestras de leche cruda hacia el Laboratorio de Análisis Instrumental de la UAM-X, se hizo en cajas térmicas con una temperatura aproximada de 4º C hasta su análisis sin utilizar sustancias conservantes. Todas las muestras de leche UHT fueron analizadas antes de su fecha de caducidad.

Las muestras de leche fueron colectadas siguiendo las pautas establecidas en la Norma Mexicana NMX-F-718-COFOCALEC-2006.

Equipo

- Mezclador tipo vórtex.
- Balanza Analítica Mettler H31AR
- Balanza granataria con una precisión de 0,1 g.
- Evaporador rotatorio, con control de vacío.
- Equipo de filtración Millipore o similar.
- Baño de vapor con temperatura controlada.
- Bomba manual (cuerpo de jeringa de vidrio de 50 mL unida a través de un conector de plástico a un suministro de aire) o manifold para extracción por vacío en fase sólida.

- Características del Sistema HPLC de la marca comercial Merck-Hitachi , que incluye:
  - Bomba.
  - Inyector automático o manual de muestras.
  - Columna HPLC C18 de 4,6 x 250 mm, 5 µm de tamaño partícula de la marca Merck (Darmstadt Germany).
  - Detector de fluorescencia.
  - Integrador de datos.

Condiciones del equipo

Se empleó el cromatógrafo de líquidos de la firma comercial Merck-Hitachi con detector fluorescente con las siguientes condiciones longitud de excitación y emisión de 365 y 425 nm respectivamente; una columna de fase reversa (Lichrocart100, C18, 5µm, 250x0,4 cm).

Los cromatogramas fueron procesados y registrados usando una interfase Perkin Elmer NCI 900 y procesados en una computadora personal con el software TOTALCHROM (Versión 6.2).

Fase móvil

Mezcla de acetonitrilo:metanol:agua en una proporción de 20:20:60 v/v/v. el flujo fue de 1 mL/min, con un tiempo de corrida de 30 minutos.

Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron de calidad grado reactivo de la firma comercial Burdick & Jackson y los disolventes metanol y acetonitrilo fueron grado HPLC. El ácido trifluoroacético fue de JT Baker calidad HPLC El patrón comercial de aflatoxina M_1 fue suministrado por Sigma-Aldrich. El material, equipo de instrumentación, cristalería y material en general fue el mismo que se empleó en el experimento anterior referente a la validación del método.

Preparación de soluciones patrón de AFM_1

El estándar de aflatoxina M_1 fue suministrado por Sigma-Aldrich (Sigma, St Louis MO, USA) se diluyó en acetonitrilo benceno (90:10 v/v) y se comprobó su concentración midiendo su densidad óptica a 350 nm acorde con lo planteado en la AOAC 1995 (Method 971.22 a-Preparación de soluciones y b-Determinación de la concentración). Se midieron 120 µL del estándar y se aforó a 1000 µL con metanol siendo su concentración de 1µg/mL.

Extracción de aflatoxinas M_1 en leche

Las muestras de leche fueron analizadas acorde con lo establecido en el método 986.16 de la AOAC 1995, las muestras de leche se calentaron a una temperatura de 80ºC en un baño de agua termo regulable. La AFM_1 se eluye calentada usando una columna de extracción de fase sólida C18, se lavó la

columna con una solución agua:acetonitrilo (95:5v/v) y se eluyó la aflatoxina M_1 con éter dietílico sobre otra columna de sílica gel (40-120 mesh), seguidamente se eluyó con diclorometano:metanol (95:5 v/v). La aflatoxina M_1 fue extraída con cloroformo y se llevó a sequedad por roto evaporación.

Derivatización

Al extracto seco se le adicionaron 100 µL de hexano y se agitó en vortex por un minuto, posteriormente se agregaron 50 µL de ácido trifluoroacético (TFA), se agitó nuevamente en vortex por un minuto y se colocó en baño térmico a 40 ºC por 30 minutos. Posteriormente se evaporó bajo nitrógeno y se resuspendió en 500 µL de la fase móvil para su análisis por HPLC. Para la preparación del estándar de aflatoxina M_1 se tomaron 50 µL del estándar y se derivatizó de la forma en que se hizo con las muestras.

Cuantificación por HPLC

Se determinó la cantidad de AFM_1 de las muestras utilizando la ecuación de la recta obtenida en la curva de calibración como sigue:

$$Y = m x + b$$

En donde:

Y = área del pico correspondiente a la AFM_1 en la muestra.

m = pendiente.

x = concentración en ng/µL de AFM_1 en la muestra.

b = ordenada al origen.

Análisis de resultados

Se hizo un análisis exploratorio de datos, un análisis descriptivo, un análisis de la varianza y una regresión lineal. Se usó el paquete estadístico para ciencias sociales SPSS™ Versión 8.5 para Windows.

4.3 Experimento 3 determinación y cuantificación de aflatoxina M_1 en muestras de queso (AOAC, 1995)

Las aflatoxinas se han detectado como contaminantes en un gran número de productos agropecuarios, habiéndose confirmado su presencia en prácticamente todas las zonas del mundo y en mayor o menor grado en casi todos los alimentos. La AFM_1 es un carcinógeno genotóxico, su carcenogenicidad se estima en unas 10 veces por debajo de la AFB_1. Debido a la alta toxicidad de la AFM_1, la Comunidad Europea exige niveles máximos de 0.05 µg/kg para la AFM_1 en leche, este límite es aplicable también a productos lácteos procesados (EC. 2001).

Principio del método para extracción de AFM_1 en queso (AOAC, 1995)

La aflatoxina M_1 es extraída de los alimentos con cloroformo y purificada en una columna de sílica gel. La separación final y determinación es realizada por cromatografía líquida de alta resolución empleando una columna de fase reversa, la detección de la toxina previamente derivatizada con ácido trifluoroacético se realiza mediante un detector de fluorescencia.

Toma de muestras de queso tipo panela

Las muestras de queso fueron colectadas de la siguiente forma:

De un total de 30 muestras de queso tipo panela, 27 fueron de 9 diferentes marcas, cada marca procedía de una región diferente del país: Fr9, de Tijuana; Co3, Texcoco, Edo de Mex; Ga5, San luís Potosí; Es10, San Miguel Hidalgo; Vi2, Lago de Morelos Jalisco; Ca4, San Nicolás de la Garza, Nuevo León; Vo6, Torreón Coahuila; Ri7, Durango; Al1, Edo de Mex. Tres muestras de cada marca se obtuvieron en diferentes supermercados durante el periodo de junio del 2007 ha agosto del 2007, otras tres muestras correspondieron a queso panela artesanal que se obtuvo de una unidad de producción ubicada

en la Delegación Iztapalapa. Las muestras de queso tanto de marca como el artesanal se depositaron en un recipiente limpio e inerte desde el punto de vista químico, para protegerlas de la contaminación y de daños durante el transporte hasta el Laboratorio de Análisis Instrumental ubicado de la UAM-X, procurando mantener una temperatura de 4º C hasta su análisis sin utilizar sustancias conservantes. Todas las muestras fueron analizadas antes de la fecha de su caducidad (Pinto, 1996).

Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron de calidad grado reactivo de la firma comercial Burdick & Jackson y los disolventes metanol y acetonitrilo fueron grado HPLC. El ácido trifluoroacético fue de JT Baker calidad HPLC El patrón comercial de aflatoxina M_1 fue suministrado por Sigma-Aldrich. El material, equipo de instrumentación, cristalería y material en general fue el mismo que se empleó en el Experimento 1 referente a la validación del método.

Soluciones para extracción de aflatoxina M_1 en queso.

Solución 1 Tolueno-ácido acético. Proporción (9+1). Cada muestra requirió un volumen de 25 mL.

Solución 2 Hexano-éter-acetonitrilo. Proporción (5+3+2). Cada muestra requirió 25 mL de volumen.

Solución 3 Cloroformo-acetona. Proporción (4+1). Cada muestra necesitó un volumen de 40 mL.

Solución salina saturada En 100 mL de agua destilada se disolvieron 40g de NaCl, empleando un agitador magnético y una parrilla.

Preparación de solución patrón de aflatoxina M_1

A partir de una solución estándar, con una concentración de 8.33 µg/mL se preparó una solución madre en concentración 1 µg/mL; para ello se mezclaron 120 µL de la solución estándar con 880 µL de metanol.

Fase móvil para HPLC

Agua:metanol:acetonitrilo (60:20:20). Se filtró a través de filtro de membrana de 0,45 µm y se desgasificó.

Procedimiento de extracción de aflatoxina M_1 en queso

1. Se pesaron 15 g de muestra de queso finamente picado y se colocaron en un vaso de licuadora y se adicionó 1 mL de solución salina saturada.
2. Se agregaron 100 mL de cloroformo ($CHCL_3$) y se agitó por 1 minuto.
3. La mezcla se pasó a través de papel filtro del No 40, siendo colectado el filtrado en un matraz erlenmeyer de 125 mL.

Extracción y purificación

Se adicionaron 2 g de silica gel a una columna de cristal y se compactó ayudado por 3 ó 4 mL de cloroformo, sin drenar. Se adicionaron 2 g de sulfato de sodio y se compactó con cloroformo, se drenó hasta un cm por encima del sulfato de sodio.

Se agregó el extracto filtrado a la columna, se eluyó y se lavó la columna con 25 mL de la solución #1, después se volvió a lavar con 25 mL de n hexano, se efectuó un lavado más con 25 mL de la solución #2, se eluyó y posteriormente se retiró el recipiente con los desechos de las soluciones 1, n-hexano y la solución 2 y se colocó bajo la columna un matraz bola con cuello esmerilado de 125 mL para colectar los 40 mL de la solución #3 que se eluyeron después de la solución 2.

Cada muestra se evaporó casi a sequedad con ayuda de un rotoevaporador a baja presión, el extracto recuperado se extrajo con una pipeta Pasteur y se transfirió a un tubo cónico para centrífuga, se enjuagó el matraz bola con 2 porciones de 500 µL cada enjuague fue recuperado y traspasado al tubo cónico donde se colocó el extracto. Se evaporó a sequedad bajo nitrógeno y se guardó tapado en congelación (-20 ºC).

Derivatización

Al residuo seco se le adicionaron 100 µl de hexano, se agitó con el vortex por 1 minuto, posteriormente se agregaron 50 µL de ácido trifluoroacetico TFA, el tubo fue tapado y se mezcló nuevamente en el vortex por 1 minuto posteriormente se colocó en baño María a 40 ºC por 30 minutos. Una vez transcurrido este tiempo se evaporó con nitrógeno y se dejó reposar toda la noche en el congelador. Posteriormente se resuspendió con 500 µL de la fase móvil para su análisis por HPLC. Para derivatizar el patrón del estándar de aflatoxina M_1 se tomaron 50 µL de la concentración conocida y se procedió de la forma en que se derivatizó al residuo seco de cada una de las muestras de queso.

Condiciones del equipo

Se empleó un cromatógrafo líquido de la firma comercial Merck-Hitachi con detector fluorescente (longitud de excitación y emisión de 365 y 425 nm respectivamente) y una columna de fase reversa (Lichrocart100 C18 5µm 250x0,4 cm.), como fase móvil se empleó una mezcla de acetonitrilo:metanol:agua en una proporción de 20:20:60 v/v/v, el flujo fue 1 mL/min. Se aplicaron 50 µL de estándar de referencia o de la muestra previamente filtrada por membrana millipore con 0,45 µm de diámetro de poro.

Los cromatogramas fueron registrados usando una interfase Perkin Elmer NCI 900 y procesados con el software TOTALCHROM (Versión 6.2).

Cuantificación

Se determinó la cantidad de AFM_1 en la muestra utilizando la siguiente ecuación como sigue:

[ ] AFM_1= (Am/Astd)(Vistd/Vim)[]std(vol. afro/pm)

En donde:

Am = área del pico correspondiente a cada muestra.

Astd = área del pico del estándar.

Vistd = volumen de inyección del estándar en µL

Vim = volumen de inyección de la muestra en µL

[]std= concentración del estándar en µL/mL

Vol. Afro= volumen de aforo de la muestra en mL

Pm= peso de la muestra en gramo (g)

Análisis de resultados

Se hizo un análisis exploratorio de datos, un análisis descriptivo y un análisis de la varianza. Se usó el paquete estadístico para ciencias sociales SPSS™ Versión 8.5 para Windows.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Experimento 1 validación del método para determinar aflatoxina M_1 en leche

En la figura 2 se presenta el perfil cromatográfico de la AFM_1 cuando la muestra es prederivatizada con acido trifluoroacético, con tiempos de retención de 3.08±0.10 minutos. El recobrado de aflatoxina M_1 en leche fue de 91% para un nivel de 40 µg/Kg. con una precisión del 5%. El límite de detección y

cuantificación fue de 26.5 y 30.1 ng/µL respectivamente. La curva de calibración mostró una linealidad significativa ($p<0.05$) en un intervalo de 0.1 a 1 µg/Kg con un coeficiente de regresión de 0.9982. Trabajos similares donde se ha empleado este método oficial para la determinación de aflatoxina M_1 en leche muestran valores de recobrados por encima del 90%, valores de precisión entre 7-9% y limite de detección de 15 ng/Kg (Dragacci y Grosso 2001). Las mayores diferencias encontradas fueron en los tiempos de retención debido a cambios en la composición de la mezcla de la fase móvil, las características de la fase reversa empleada en la columna y el flujo empleado, estos resultados muestran que el método fue eficiente para evaluar la presencia de aflatoxina M_1 en los niveles que exige la UE y la FDA para 0.05 y 0.5 µg/Kg. Otros trabajos realizados para validar la metodología empleada para la determinación de AFM1 en leche tuvieron diferentes resultados, tal fue el caso de Esqueda *et al,* que en (1995) que informaron una precisión de 97% y un límite de detección de 0.05 µg/kg lo cual fue como consecuencia de emplear una técnica diferente a la que se empleó en este trabajo.

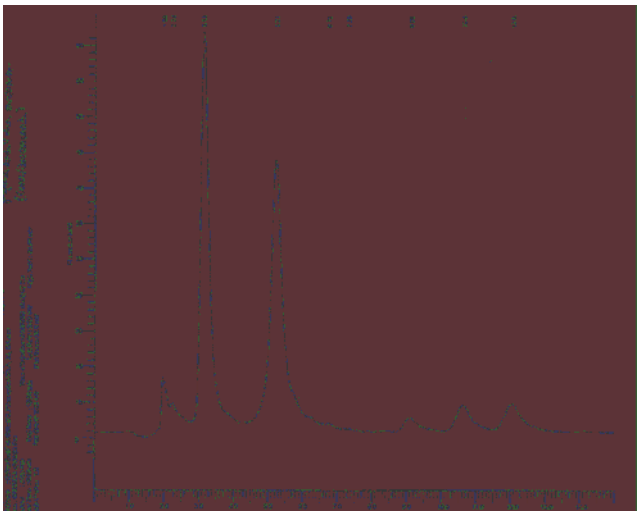


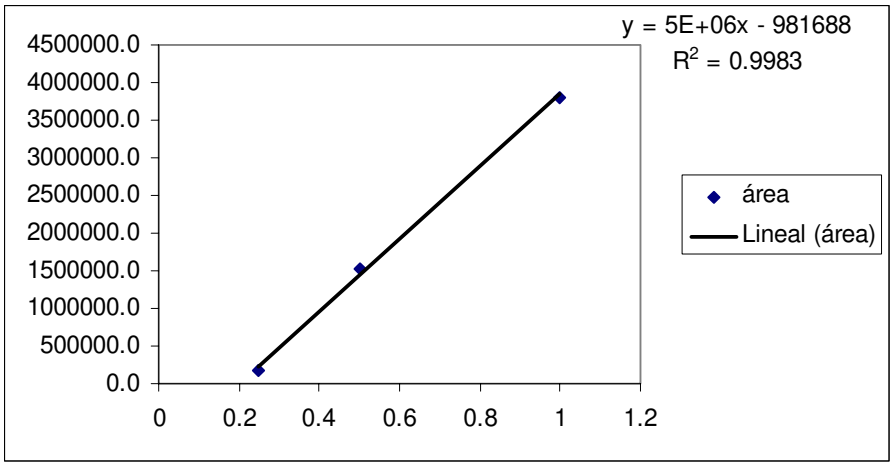
Figura 3. Perfil cromatográfico de la derivatización de Aflatoxina M_1 con ácido trifluoroacético.

5.1.1 Resultados y discusión de la validación del método para determinación de aflatoxina M_1 en queso

Para los tres niveles ensayados (0.25, 0.5, y 1.00 µg/mL) se cumplieron los requisitos de exactitud y linealidad 83.6% y 0.99 respectivamente, propuestos por la norma mexicana NMX-CH-5725-2-IMNC-2006. El intervalo de trabajo se estableció entre 0.25, 0.5 y 1.00 µg/kg, siendo los límites de detección y cuantificación 221 y 560 ng/µL respectivamente. La linealidad del método fue estadísticamente significativa ($p<0.05$) (ver curva de calibración. fig. 4).

En otros trabajos semejantes a este, en donde se empleó este método para la determinación de aflatoxina M_1 en queso muestran valores de recobrado del 94% y límite de detección de 10 pg/mL (Kim *et al.*, 2000), algunos otros obtuvieron valores de 86.7% de recuperación, y límite de detección y cuantificación de 0.10 y 5.20 ng/Kg respectivamente (Kaan y GurKan, 2007). Las mayores diferencias que se determinaron estuvieron en los tiempos de retención debido posiblemente cambios en la composición de la mezcla de la fase móvil, las características de la fase reversa empleada en la columna y el flujo empleado, estos resultados muestran que el método fue eficiente para evaluar la presencia de aflatoxina M_1 en los niveles que exige la norma de COFOCALEC y norma mexicana NMX-CH-5725-2-IMNC-2006.

Figura 4. Curva de calibración empleando tres concentraciones diferentes.



5.2 Resultados y discusión del experimento 2, determinación de AFM_1 en muestras de leche

En el cuadro cuatro se muestra un resumen del contenido de aflatoxina M_1 en las diferentes muestras de leche cruda, ultrapasteurizada y orgánica producidas y comercializadas en el Altiplano Mexicano, donde el 59.1% de todas las muestras presentaron niveles de aflatoxina M_1 superior al LMR establecido por la UE (Flores, 2002). El 20% de las muestras de leche orgánica presentaron niveles superiores al valor establecido por la UE y la FDA, mientras que los porcentajes de las muestras de leche cruda y ultrapasterurizada fueron 66 y 50% respectivamente (ver cuadro 5).

De acuerdo a estudios realizados en los últimos 7 años en países como Brasil (Garrido *et al.*,2003; Oliveira et al., 2006); Colombia (Díaz *et al.*, 2006); Italia (Galvano et al., 2001; Gallo *et al.*, 2006; Vallone *et al.*, 2006); Grecia (Roussi *et al.*, 2002) y Corea (Nakajima *et al*, 2004), encontraron incidencia alta de aflatoxinas M_1 en muestras de leche y productos lácteos (>75%), sin embargo, los niveles de concentración (ng/Kg) fueron bajos y no sobrepasaron en muchos de los casos los limites establecidos por la UE. No siendo así para las

normas establecidas para algunos países, tal es el caso de Rumania y Egipto en donde los LMR para AFM_1 son cero para leche cruda y derivados lácteos, y de acuerdo a Colak *et al*, en el 2006, no hay una dosis por debajo de la cual no se ocasione daños a la salud. Solo un nivel cero de exposición puede corresponder a un riesgo nulo para la salud de los consumidores.

Los resultados registrados en el presente trabajo también difieren de los mencionados anteriormente por otros autores, ya que a pesar de haber una incidencia del 50% AFM_1, las medianas obtenidas para las muestras de leche cruda y ultrapasteurizada fueron mayores al LMR. Como explicación de los resultados encontrados en estas muestras puede atribuirse a las variaciones de la humedad relativa en el ambiente, que favorecen la presencia y formación de hongos toxigénicos en los alimentos destinados al consumo animal. Otro efecto expresado en los resultados obtenidos, pudo tener como origen el consumo de granos y concentrados, donde existe una probabilidad de la presencia de estas toxinas en los mismos. La presencia de dichas micotoxinas en los alimentos de consumo animal y humano ha sido reportada por varias décadas (Srivastaba 2001; Hilal *et al*., 2006; Shundo et al., 2006; Kaan y Gurkan 2007).

Cuadro 4 Frecuencias de ocurrencia de aflatoxina M_1 en leches cruda, ultrapasteurizada y orgánica por intervalo de concentración (µg/Kg).

	nd-0.05	**0.051-0.49**	**0.5-9.9**	**10-50**	**>50**
L. ultrapasteurizada (n=20)	8	1	1	7	3
L. orgánica (n=15)	9	1	2	2	1
L. cruda (n=9)	1	1	1	5	1
SUMA	18	3	4	14	5
Porcentaje (%)	40.9	6.8	9.0	3.2	11.3

nd : no detectado

Cuadro 5 Valores de las medianas, mínimos y máximos de los contenidos de aflatoxina M_1 (µg/Kg) en muestras de leches cruda, ultrapasteurizada y orgánica comercializadas en el Altiplano Mexicano.

Parámetros	**L. pasteurizada**	**L. orgánica**	**L. cruda**
Mediana	16.1	23.1	16.2
Mínimo	0.2	0.2	0.4
Máximo	76.6	88.6	92.3

En los estudios anteriores se ha podido constatar que concentraciones bajas de AFM_1 pueden deberse a la dilución de lotes de leche altamente contaminados con numerosos lotes libres o con bajos niveles de contaminación con la micotoxina, que hace que aparezca una incidencia alta con bajos niveles.

Los análisis realizados en muestras de leche orgánica mostraron un valor de su mediana superior a los registrados para las leches cruda y pasteurizada (cuadro 5), esto pudo deberse a que el factor de dilución a que fue sometido la muestra es mucho menor, sin embargo su incidencia solo fue del 20% de las muestras analizadas. Los hallazgos están en correspondencia con los encontrados por otros autores, donde se plantea que la frecuencia de aparición de leche orgánica debe ser menor al resto de la leche, siempre y cuando se cumplan las buenas prácticas agropecuarias. Por otra parte este estudio demuestra que no por ser una producción orgánica, la producción de leche está exenta de contaminarse con micotoxinas. En otros estudios en México Carvajal et al, (2003a) reportaron en un trabajo hecho con 624 muestras de 1 litro de leche durante un periodo de 2 años, las cuales fueron adquiridas en centros comerciales de la Ciudad de México. 13% de estas muestras prresentaron niveles de contaminación con aflatoxina superiores al

LMR de 0.05 µg/mL establecido en la UE; el 7% de ellas con niveles mayores a 0.5 µg/mL superando el límite máximo permisible para los países del MERCOSUR. Estos resultados coinciden con los obtenidos en este trabajo y en otro realizado por Carvaja *et al*, (2003), en donde analizaron muestras de leche (n=290) con 2 diferentes tratamientos térmicos, determinaron que el 40% de las muestras presentaron niveles de contaminación por arriba del LMR 0.05 µg/mL y 10% de las muestras tuvieron niveles superiores a 0.5 µg/mL además concluye que los tratamientos térmicos no disminuyen los niveles de aflatoxina M_1.

Es probable que la alta incidencia de contaminación en la leche con aflatoxina sea ocasionada por factores que favorecen el crecimiento de hongos productores de micotoxinas las cuales contaminan los alimentos que se ofrecen al ganado lechero. Este trabajo coincide con los resultados que obtuvieron Córdova et al, 2005 en el cual, en 5 muestras de leche colectada directamente de un tanque de almacenamiento en diferentes días se determinó que en 3 de las 5 muestras de leche, es decir, 60% de las muestras presentaron AFM_1 por arriba del LMR establecido tanto para la Unión Europea como para los países de MERCOSUR 0.05 µg/kg y 0.5 µg/kg respectivamente. Los resultados obtenidos en este trabajo pueden haber sido influidos por la estación del año en la que se llevó a cabo el muestreo y su relación con el consumo de alimento contaminado con AFB_1 ya que ello tiene como consecuencia un aumento en el nivel de AFM_1 en la leche.

Debido a la alta incidencia de aflatoxina M_1 encontrada en el presente estudio en muestras de leche comercializadas en el Altiplano Mexicano se recomienda desarrollar un programa de seguimiento y análisis permanente con la meta de

prevenir lotes de leche contaminadas con niveles de aflatoxina M_1 por encima del nivel regulatorio establecido en México (0.5 µg/Kg) que evite que la misma pase a la cadena alimentaria.

5.3 Experimento 3 resultados y discusión de la determinación de AFM_1 en muestras de queso

Los niveles de residuos de aflatoxina M_1 determinados en cada una de las marcas de queso analizadas se muestran en el cuadro seis. Se realizó la cuantificación de AFM_1 en las muestras de queso de diferentes marcas comerciales. Los resultados mostrados en el cuadro seis se expresan en ng/g. El 69% de las muestras de queso presentaron niveles de aflatoxinas M_1, solamente en el 31% no se encontró AFM_1. Los niveles de AFM_1 estuvieron por abajo de LMR establecido por la UE (0.05 µg/kg). La concentración más elevada de AFM_1 se detectó en la marca Co3 con una media de 4.21, es decir 66.9% mas la concentración de AFM_1 que se detectó en las muestras de la marca Ca4 que tuvo 2.87 en promedio. Las otras marcas presentaron concentraciones inferiores al contenido promedio de la muestra artesanal 1.69. La muestra con la concentración más baja fue la marca Es10 con una media de 0.14 ng/g; la marca en la que no se detectó AFM_1 fue la Fr9 ya que los cromatogramas no presentaron pico en los tiempos de retención para aflatoxina M_1. El resultado del coeficiente de variación muestra que hay variabilidad entre las distintas marcas, así también entre los resultados de los muestreos en cada marca.

Cuadro No 6. Contenido de aflatoxinas en diferentes marcas de queso

Muestras de queso	Toma de muestrra 1	Toma de Muestra 2 ng/g	Toma de Muestra 3	Media	Desviación Estándar	CV %
Al1	0.74	0	0.25	0.33	0.38	114.86
Vi2	0.91	0	0	0.30	0.53	173.21
Co3	9.14	2.26	1.23	4.21	4.30	102.08
Ca4	0	0	8.60	2.87	4.97	173.21
Ga5	0.45	0.25	0	0.23	0.23	97.01
Vo6	0.26	1.60	0.55	0.80	0.70	87.43
Ri7	0	0.37	0.22	0.20	0.19	94.34
Ar8	4.92	0	0.16	1.69	2.79	164.89
Fr9	0	0	0	—	—	—
Es10	0.26	0.01	0.03	0.10	0.14	136.01

A pesar de que el 69% de las muestras presentaron niveles de AFM_1, las medianas obtenidas para las muestras de queso no fueron mayores al LMR 0.05 µg/kg. Una explicación de los resultados encontrados en estas muestras puede deberse a las propiedades hidrofílicas de la AFM_1 y al proceso de elaboración de los quesos en donde una parte importante de estos metabolitos se queda en el suero mismo que se separa del queso y por lo tanto las concentraciones de AFM_1 son bajas, lo cual coincide con los resultados obtenidos por Elgerbi et al., 2004, al analizar 49 muestras de leche y 20 muestras de queso, la incidencia de AFM_1 en las muestras de leche fue del 71.4% en un intervalo de 0.03 a 3.0 ng/g^{-1} mientras que en las muestras de queso, 15 de ellas es decir el 75% presentaron concentraciones de aflatoxina M_1 en un intervalo de 0.11 a 0.52 ng/g^{-1} las concentraciones bajas en las muestras de queso se pudieron deber a que una fracción de la concentración de aflatoxina presente en la leche se pierde en el proceso de elaboración de los quesos (ver cuadro 7). Otro efecto expresado en los resultados obtenidos, pudo tener como origen el consumo de granos y concentrados, donde existe una probabilidad de la presencia de estas toxinas en los alimentos a causa de

temperatura y humedad relativa en el ambiente, que favorecen la presencia y formación de hongos toxigénicos en los alimentos destinados al consumo animal.

Cuadro 7. Valores de las medianas, mínimos y máximos del contenido de los contenidos de AFM_1 (µg/g) en muestras de queso que se comercializan en la Ciudad de México.

Marca de queso	MEDIANA	MIN	MAX
Al1	0.25	0.00	0.74
Vi2	0.00	0.00	0.91
Co3	2.26	1.23	9.14
Ca4	0.00	0.00	8.60
Ga5	0.25	0.00	0.45
Vo6	0.55	0.26	1.60
Ri7	0.22	0.00	0.37
Ar8	0.16	0.00	4.92
Fr9	0.00	0.00	0.00
Es10	0.03	0.01	0.26

El análisis de varianza aplicado al contenido de aflatoxina M_1, mostró que hay una variabilidad entre las diferentes marcas así como entre los muestreos para cada una de las marcas, es decir, las diferencias fueron significativas entre marcas ($P<0.05$). Sin embargo a pesar de este dato estadístico las marcas que presentaron las concentraciones más altas fueron queso Ar8, Ca4 y Co3. (ver figura 5). Se observa que las marcas con mayor concentración fueron queso Ar8, Ca4 y Co3

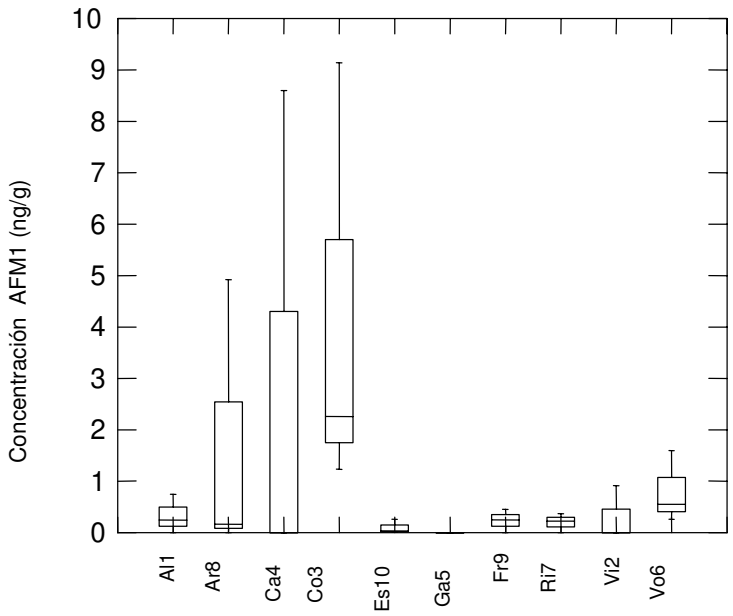


Figura 5. Diagrama de caja que muestra las concentraciones de AFM_1 en diferentes marcas de quesos.

En la figura 6. Puede observar la distribución por barras del contenido de AFM_1 en cada marca de queso. La marca de queso Fr9 no presentó concentración de AFM_1, mientras que la marca con mayor concentración de AFM_1 fue Co3. En la figura 7. Se muestran los contenidos de AFM_1 por marca en porcentaje.

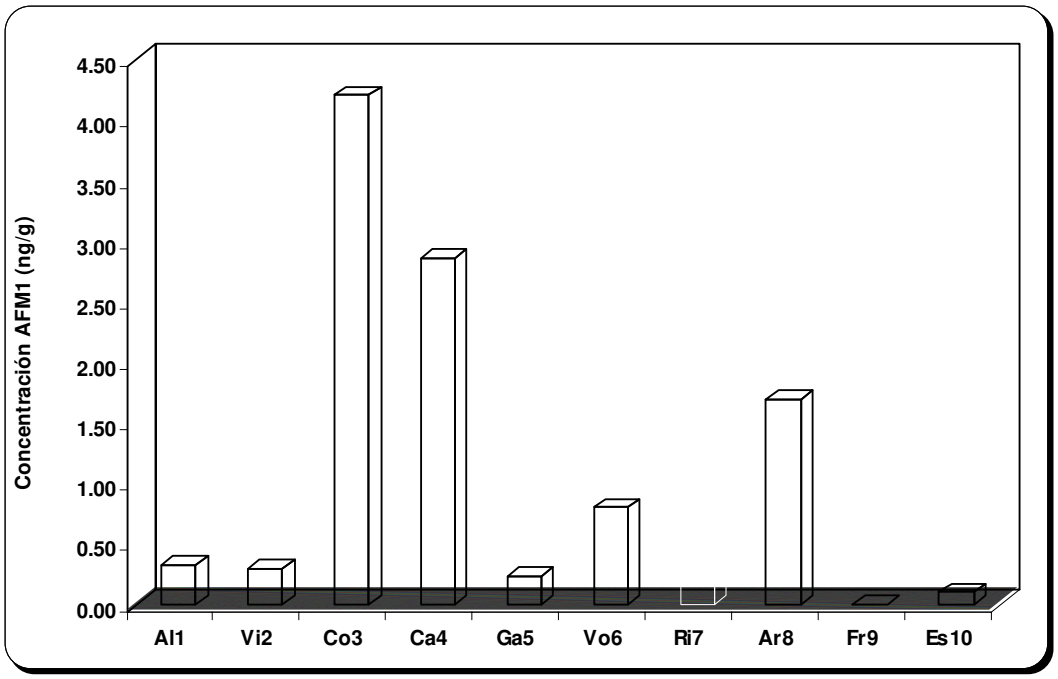


Figura 6. Niveles de concentración de AFM_1 en cada marca de queso.

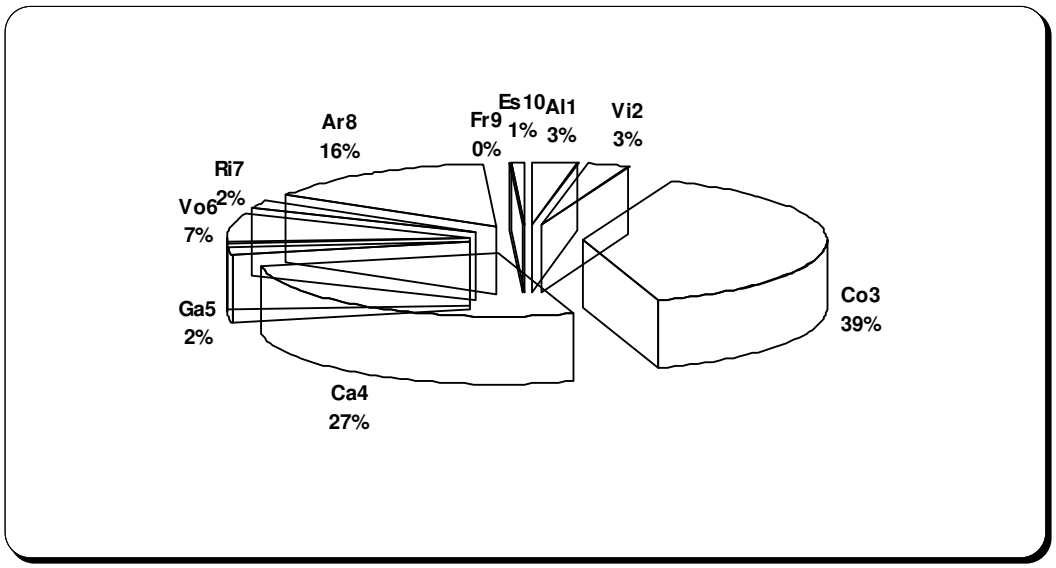


Figura 7. Concentración porcentual de AFM_1 en cada una de las marcas de quesos.

Las concentraciones más altas de AFM_1 se presentaron en 3 muestras de queso procedentes de diferentes regiones del país, Distrito Federal, Estado de México y San Nicolás de la Garza, Nuevo León, siendo posible que en esas regiones del país las condiciones de humedad y temperatura fueron propicias para el crecimiento de hongos toxigénicos, mientras que las otras marcas al presentar niveles más bajos de aflatoxinas las condiciones ambientales no fueron las adecuadas para que estas sustancias crecieran en los piensos. Las concentraciones de AFM_1 obtenidas en este trabajo no difieren de las encontradas en otros estudios hechos recientemente (Kokkonen *et al*, 2005;; Kaan y Gurkan, 2007; Govaris *et al*, 2001) en los cuales hubo incidencia alta de AFM_1 pero en ninguno casos rebasó el LMR de 0.05 µg/kg establecido por la UE para derivados lácteos. En cuanto a la baja concentración de AFM_1 que fue determinada en las muestras de queso, pudo ser debido a que un porcentaje de la concentración de aflatoxina que esté presente en la leche antes del proceso, se pierde en la parte proteica del suero derivado del desuerado de la cuajada al obtenerse el quesolo cual fue demostrado por Mendoza y Venancio en el 2005, cuando contaminaron intencionalmente muestras de leche para ser procesada para elaborar queso, y determinaron que un 60% de la AFM_1 se perdía en el suero y solo un 40% se retenía en el queso. Lo mismo concluyeron Oruc *et al*, 2006 al fortificar muestras de leche cruda en Turquía para elaborar queso en tres distintas concentraciones. Determinaron que un porcentaje de AFM_1 no se recuperaba y esa fracción se perdía durante el desuerado. Por otra parte el porcentaje de recuperación obtenido (83.6%) asi como los límites de detección y límites de cuantificación 22 ng/g y 56 ng/g respectivamente, presentan diferencias respecto a los valores reportados por otros autores

(Cavaliere *et al*, 2006; Oruc *et al*, 2006) pudo deberse a que los métodos empleados fueron diferentes al determinar la presencia de AFM_1.

Las diferencias encontradas en los niveles de AFM_1 en los muestreos de cada marca de queso se pueden atribuir al proceso de elaboración, en donde quizás la leche empleada para este fin, no proceda siempre de la misma unidad de producción y tal vez al provenir de diferentes hatos la concentración de AFM_1 varió. La alta incidencia de AFM_1 en las muestras analizadas se pudo deber a que el muestreo se llevó a cabo durante la época de lluvia en donde las condiciones de humedad y temperatura son propicias para el desarrollo de hongos toxígénicos. Aun cuando la concentración en ningún caso revasó el LMR establecido por el Codex para la UE. A pesar que las marcas fueron de origen diverso no hubo una diferencia significativa en los niveles de AFM_1 encontrados entre ellas lo cual se pudo deber a que las condiciones ambientales en la mayor parte del País en ese tiempo fueron similares razón por la cual las concentración de AFM_1 no varían entre una región y otra.

6 DISCUSIÓN GENERAL

Es valido el método de HPLC para determinación de AFM_1 tanto en muestras de leche como en queso. La linealidad, precisión así como los límites de detección y cuantificación fueron satisfactorios. Las bajas concentraciones de AFM_1 en queso se debieron a que se pierde una fracción importante de este analito durante el proceso de elaboración de queso.

La alta incidencia de AFM_1 en las muestras de leche pudo ser debido a que el muestreo se llevó a cabo durante el periodo estacional de lluvia lo que trae como consecuencia que las condiciones ambientales para el desarrollo y crecimiento de hongos tóxicos sean ideales y a su vez la contaminación de

alimentos destinados a la alimentación de rumiantes productores de leche sea mayor. Las concentraciones obtenidas en las muestras de leche orgánica que estuvieron por arriba del LMR se debió a que las prácticas en los sistemas orgánicos no permiten el uso de sustancias químicas tales como fungicidas los cuales en las unidades de producción de leche convencional permiten tener cierto control sobre el crecimiento de hongos tóxicos o también al origen diverso de las muestras de queso. Es importante hacer mención que en cuanto a la determinación de AFM_1 en queso, las concentraciones no rebasaron el LMR establecido por el Codex, lo cual de acuerdo a diversos autores (Kokkonen *et al*, 2005; Kaan y Gurkan, 2007; Govaris *et al*, 2001) pudo deberse a que durante el proceso de elaboración de los quesos un porcentaje del contenido de AFM_1 en la leche se pierda en la parte del suero. La importancia de este trabajo es que puede ser un aporte para comenzar a elaborar una norma referente al contenido de AFM_1 en leche y derivados. Es también el primer trabajo que se ha hecho en México acerca de la determinación de AFM_1 en queso.

7 RECOMENDACIONES

Establecer un programa de verificación y detección de la presencia de residuos de AFM_1 en leche y derivados es el único instrumento útil para promover la calidad necesaria y constituye una necesidad actual. Es importante determinar los niveles de residuos AFM_1 en leche y derivados para conocer las cantidades en que están presentes en estos productos, además de prohibir o restringir la alimentación con alimentos contaminados con aflatoxina AFB_1 al ganado lechero ya que esto genera un peligro potencial para la salud humana.

8 BIBLIOGRAFÍA

Allcroft, A., Carnaghan. 1963. An examination for toxin in human food products from animals fed toxic groundnut meal. Veterinary and Research. 74: 863-864.

Almudena A, Lizaso J. Hongos y micotoxinas. Madrid: Fundación Ibérica para la Seguridad Alimentaria; 2001.p.11-23.

AOAC 1995 Aflatoxins M_1 y M_2 in fluid milk. Liquid Chromatographic Method. Method 986.16 En: *Official Method of Analysis of* AOAC International 16th Edition Volumen II Ed. Patricia Cunniff Cap. 49 Natural Toxin Peter M. Scott. Pag.34-35

Barbiroli, A., Bonomi, F., Benedetti, S., Mannino, S., Monti, L., Cattaneo, T., Iametti, S. 2007. Binding of aflatoxin M1 to different protein fractions in ovine and caprine milk. Journal of Dairy Science. 90(2):532-540

Battacone G., Nudda A., Palomba M., Pascale M., Nicolussi P., Pulina G. 2005. Transfer of aflatoxin B1 from feed to milk and from milk to curd and whey in dairy sheep fed artificially contaminated concentrates. Journal of Dairy Science. 88(9):3063-9.

Blount, W. 1961. Turkey X disease. Journal British Turkey and Fed. 1: 52-61.

Bolet, M., Socarrás, S. 2005. Micotoxinas y cáncer. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas. 24 (1): 54-59.

Brunnet L., García L., Vega S., De León F. y Castillo H. 2003. La producción de leche orgánica, una primera aproximación documental. En: Cavallotti B., Palacios B. En: Ganadería mexicana en el nuevo milenio.

Situación, alternativas productivas y nuevos mercados. Universidad Autónoma Chapingo, Estado. de México. pp. 231-239.

Bogantes, P., Bogantes, D., Bogantes, S. 2004. Aflatoxinas. Acta Médica. Costarricence, 46(4): 174-178..

Carvajal, M., Rojo F., Méndez I. y Bolaños A. 2003a Aflatoxin B1 and its interconverting metabolite aflatoxicol in milk: the situation in Mexico. Food Additives and Contaminants. 20(11):1077-86.

Carvajal, M., Bolaños A., Rojo F. y Méndez I. 2003b Aflatoxin M1 in pasteurizad and ultrapasteurized milk with different fat content in Mexico. Journal of Food Protection. 66 (10) 1885-92.

Cavaliere, C., Foglia, P., Guarino, C., Marcioni, F., Nazzari, M., Samperi, R., Lagana, A. 2006. Aflatoxin M1 determination in cheese by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Journal chromatography. 1135:135-141

CAST (Council for Agricultural Science Technology). 2003. Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, Human Systems. Task Force Report, nº 139, Ames, Iowa, January 2003, pp.1-199.

Colak, H., Hampikyan, H., Ulusoy B., Erguí, O. 2006. Comparison of a competitive ELISA with an HPLC method for the determination of aflatoxin M1 in Turkish White, Kasar and Tulum cheeses. European Food Research and Technology. 223: 719–723.

Consejo para el Fomento de la Calidad de la Leche y sus Derivados A.C. COFOCALEC NMX-F-718-COFOCALEC-2006 Sistema Producto Leche

Sistema Producto Leche Alimentos Lácteos. Guía para el muestreo de Leche y Productos Lácteos.

Cordova, A., Muñoz, R., Peña, S., Perez, J., Saltijeral, J. 2005. Identification of M1 aflatoxin in milk. Journal Warchaw, Poland. 2:380-283.

Dahr, T., Foltz, J. 2005. Milk by any other name … Consumer benefits from labeled milk. American Journal Agricultural Economics 87(1)214-228.

Deveci, O. 2007. Changes in the concentration of aflatoxin M1 during manufacture and storage of White Pickled cheese. Food Control 18: 1103–1107.

Diario Oficial de las Comunidades Europeas. 2002. Norma de la comunidad Europea 2002/6557/CE Funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. CE

Diaz, G., Espitia, E. 2006. Occurrence of aflatoxin M1 in retail milk samples from Bogota, Colombia. Food Additives and Contaminants. 23(8):811-5.

Dirección General de Normas. 2003. NOM-155-SCFI-2003, leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado-denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba. SECOFI. México.

Dragacci, S., Grosso, F. 2001. immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography for determination of aflatoxin M_1 in liquid milk: Collaborative study. Journal of AOAC International. 84(2):437-443.

Doyle, m., Applebaum, R., Braacket, R., Marth, E. 1982. Physical, chemical and biological degradation of micotoxins in foods and agricultural commodities. Journal Food Protection 45: 965-971.

EC reg N466/01 *Official Journal of the European Communities* L313:30 November 2001.

Elgerbi, M., Aidoo, E., Candlish, G., Tester, F. 2004. Occurrence of aflatoxin M1 in randomly selected North African milk and cheese samples Food Additives and Contaminants 21 (6), p.592-597.

Escobar, A., Vega, S., Gutiérrez, R., Coronado, M., Díaz, G. 2005. Aflatoxina M_1 en leche y derivados lácteos. Actualidad y perspectivas en América latina. Carnilac. 4(2): 21-27.

Esqueda, M., Higuera, I., Nieblas, J. 1995. Aflatoxina M_1 en leche comercializada en Hermosillo, Sonora, México. Revista Mexicana de Micología. 11(30):179- 183.

FAO, 2000. Inocuidad y calidad de los alimentos en relación con la agricultura orgánica 22ª Conferencia Regional de la FAO para Europa. Oporto, Portugal, 24-28 de julio de 2000.

Flores, J. 2002. Importancia de la inocuidad de los alimentos en México. Tecnología de Alimentos. 3(1):25-34.

García, G., Martínez, R. 2006. Mohos y aflatoxinas en mazapán. Revista mexicana de micología. 23:49-52.

García, L., Del Valle, C., Álvarez, A. 1997. Los sistemas Nacionales lecheros de México, Estados Unidos Y Canadá y sus interrelaciones, México, Editorial Instituto de Investigaciones Económicas, UNAM. p.p. 29-32.

García, S., y Heredia N. 2006. Mycotoxins in Mexico: Epidemiology, management, and control strategies**.** Mycopathologia 162: 255 264.

Galvano, F., Galofaro, V., De Angeles, A., Galvano, M., Bognanno, M., Galvano, G. 1998. Survey of the occurrence of aflatoxin M1 in dairy products marketed in Italy". Journal of Food Protection, 61: 738-741.

Galvano, F., Galofaro, V., Ritieni, A., Bognanno, M., De Angeles, A., Galvano, G. 2001. Survey of the occurrence of aflatoxin M_1 in dairy products marketed in Italy: second year of observation. Food Additives and Contaminants, 18: 644-646.

Gallo, P., Zalzillo, A., Rossini, C., Urbani, V., Serpe, L. 2006. Aflatoxin M_1 determination in milk: method validation and contamination levels in simples from southern Italy. Italian Journal of Food Science. 3(18):251-259.

Garrido,S., Iha, H., Santos, O., Duarte, F. 2003. Ocurrence of aflatoxins M1 and M2 in milk commercialized in Ribeirao Preto SP Brazil. Food Additives and Contaminants, 20(1):70-73.

Ghidini, S., Zanardi, E., Battaglia, A., Varisco, G., Ferretti, E., Campanini, G., Chizzolini, R. 2005. Comparison of contaminant and residue levels in organic and conventional milk and meat products from Northern Italy. Food Additives and Contaminants. 22(1): 9-14.

Gimeno, A.; Martins, M. 2003. Micotoxinas y Micotoxicosis en Animales y Humanos. Special Nutrients, Inc. USA (Ed.). Talleres graficos del SRL, Buenos Aires (Argentina).

Gimeno, A. (2004). occurrence of aflatoxin M_1 in dairy products, Talleres graficos del SRL, Buenos Aires (Argentina).

Govaris, A., Roussi, V., Koidis, P., Botsoglou, N. 2001. Distribution and stability of aflatoxin M1 during processing, ripening and storage of telemes cheese. Food Additives and Contaminants. 18(5):437-443.

Guzmán, D. 2007. La exposición a la aflatoxina B1 en animales de laboratorio y su significado en la salud públlica. Salud Pública México. 49:227-235.

Hesseltine, C. 1976. Conditions Leading to Mycotoxin Contamination of Foods feeds in Mycotoxins Other Fungal Related Food Problems. Joseph V. Rodricks (Ed), American Chemical Society, Washington DC, pp.122.

Hilal, C., Hamparsun, H., Beyza, U., Ozer, Ergun. 2006. Comparison of a competitive ELISA with an HPLC method for the determination of aflatoxin M1 in Turkish White, Kasar and Tulum cheeses. European Food Research and Technology. 223:719-723.

Himanish, D., Jayaraman, S., Mahadeva, N., Bawa, A. 2006. Effect of chemical contaminants on preservation of milk a comparative study. Journal of Food Science and Technology. 43(4):425-429.

IARC (International Agency for Research on Cancer). (1997). Naturally occurring aflatoxins (Group1), aflatoxin M1 (Group 2B) 08/21/1997. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some Naturally Occurring Substances: Food Tems and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. Vol. 56 (Lyon: IARC), 5.1-5.5.

Instituto Mexicano de Normalización y Certificación. 2006. Norma Mexicana ISO/IEC17025:2005COMPANT-ISO/IEC17025:200 NMX-EC-

17025IMNC-2006. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración. IMNC. México.

Instituto Mexicano de Normalización y Certificación. 2006. Norma Mexicana ISO5725--2:1994NMXCH-5725-2-IMNC-2006. Exactitud (veracidad y precisión) de resultados y métodos de medición –parte 2: Método Básico para la determinación de la repetibilidad y la reproducibilidad de un método de medición normalizado. IMNC. México.

International Union of Pure and Applied Chemistry. 2002. Harmonized Guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical report). Pure Applied Chemical. 74 (5):835-855.

Holzapfel, C. Steyn, P., Purchase, I 1966. Isolation and structure of aflatoxin M_1 y M_2. Tetrahedron Letters. 25: 2799-2803

Jonker, M., Van Egmond, H., Stephany, R. 1999. Mycotoxins in food of animal origin: a review in CRL, document 389002 095 from European Commission, European Union Community Reference Laboratory and National Institute of Public Health and the Environment. pp.1-39.

Kaan, K., Gurkan, U. 2007. Aflatoxin M1 levels in butter and cream cheese consumed in Turkey. Food Control. 19(1): 27-30.

Kessler, H. G. 1981. Food engineering and dairy technology, ed; Verlag A Kessler.

Kokkonen, M., Jestoi, M., Rizzo, A. 2005. determination of selected mycotoxins in mould cheeses with liquid chromatography coupled to

tandem with mass spectrometry. Food Additives and Contaminants. 22(5):449-456.

López, C., Ramos, L., Ramadán, S., Bulacio, L., Perez, J. 2001. Distribution of aflatoxin M1 in cheese obtained from milk artificially contaminated. *International Journal of Food Microbiology*. 64: 211-215.

Losada, H., Bennett, R., Cortes, J., Vieyra, J., Arias, L., Soriano, R., Avaleta, Z. 1998. The production of milk from dairy herds in the suburban conditions of Mexico City: II. The case of the Region of Xochimilco in the South-East of the City. Livestock Research for Rural Development. 10(2):34-40.

Martins, M., Martins, H. 2000. Aflatoxin M1 in raw and ultra high temperature-treated milk commercialized. Food Additives and Contaminants, 17: 871-874.

Martins, M., Martins, H. 2004. Aflatoxin M1 in yoghurts in Portugal. International Journal of Food Microbiology, 91: 315-317.

Mendoca, C., Venancio, A. 2005. Fate of aflatoxin M1 in cheese whey processing. Journal of the Science of Food and Agriculture. 85:2067-2070.

Nakajima, M., Tabata, S., Akivama, H., Itoh, Y., Tanaka, T., Sunagawa, H., Tyona, T., Yoshizawa, T. y Kumagai S. 2004. Ocurrence of aflatoxin M1 in domestic milk in Japan during the winter season. Food Additive and Contaminant. 21 (5): 472-8.

Navas, S., Sabino, M., Rodríguez-Amava D. 2005 Aflatoxin M(1) and ochratoxin A in a human milk bank in the city of Sao Paulo, Brazil. Food Additive and Contaminant. 22(5): 457-462.

Official Journal of the European Union. 2003. Amending regulation (EC) 466/2001 as regard aflatoxins. 12 december 2003. Commision Regulation (EC) No. 2174/2003. L326/12.

Official Journal of the European Union. 2004. Amending regulation (EC) 466/2001 as regard aflatoxins and ochratoxin a in foods for infants and young children 12 13 april 2004. Commision Regulation (EC) No. 683/2004. L106/3.

Offiah, N., Adesivun, A. 2007. Occurrence of aflatoxins in peanuts, milk and animal feed in Trinidad. Journal of Food Protection. 70(3): 771-775.

Oruc, H., Huseyin., Cibik, R., Yilmaz, E., Gunes, E. 2007. Fate of aflatoxin M1 in kashar cheese. Journal of Food Safety. 27(9): 82-90.

Oliveira, C., Rosmaninho, J., Rosim, R. 2006. Aflatoxin M_1 and cyclopiazonic acid in fluid milk traded in Sao Paulo, Brazil Food Additives and Contaminants. 23(2):196-201.

Ouakinin, J., Martins, M. 1982. Presença de Aflatoxina M1 em Leites de Consumo. Repositorio de Trabalhos do laboratorio Nacional de Investigação Veterinaria, (XIV): 75-78.

Oruc, H., Cibik, R., Yilmaz, E., Kalkanli, O. 2006. Distribution and stability of Aflatoxin M1 during processing and ripening of traditional white pickled cheese. Food Additives and Contaminants. 23(2): 190–195

Oyelami OA. Aflatoxins in the lungs of children with Kwashiorkor and children with miscellaneous diseases in Nigeria. J. Toxicol Environm Health,

1997.

Ozdemir, M. 2007, Determination of aflatoxin M1 levels in goat milk consumed in Kilis province. Ankara Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi 54 (2): 99-103.

Palermo, D., Palermo, C., Rotunno, T. 2001. Survey of aflatoxin M1 level in cow milk from Puglia Italy. Journal Food Science. 13(4): 435-442.

Perusia, O., Rodríguez, R. 2001. Micotoxicosis. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. 12(2):1-38.

Peitri, A., Bertuzzi,T., Bertuzzi, P., Piva, G. 1997. Aflatoxin M1 occurrence in samples of Grana Padano cheese .Food Additives and Contaminants, 14: 341-344.

Pinto, M., Vega, S., Pérez, N. 1996. Métodos de análisis de la leche y derivados. Garantia de Calidad. Ed. Universidad Austral de Chile, 1ª ed. Chile.

Quattrocchi O. A.; Abelaira Sara I. y Felipe R (1992). Validación de métodos En: Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica. Ed en artes gráficas Farro SA. Buenos Aires, Cáp. 12. Pág.: 301-328

Secretaría de Agricultura Ganadería y Recursos Pesqueros (SAGARPA) Sistema de Información Agrícola y Pecuario (2007) http://www.siap.gob.mx

Sassahara, M., Pontes, D., Yanaka, E. 2005. Aflatoxin occurrence in foodstuff supplied to dairy cattle and aflatoxin M1 in raw milk in the north of Parana state. Food Chemical and Toxicology. 43(6): 981-984

Seyed, A., Amir, H., Tirang, N., Seyed, H. 2007. occurrence of aflatoxin M1 in raw milk during the summer and winter seasons in hamedan, Iran. Journal of Food Safety. 27:188-198.

Shundo, L., Sabino, M. 2006. Aflatoxin M_1 in milk by immunoaffinity column cleanup with TLC/HPLC determination. Brazilian Journal of Microbiology 37:164-167.

Srivastaba, V., Bu-Abbas, A., Al-Johar, W., Al-Mufti, S., Siddiqui, K. 2001. Aflatoxin M1 contamination in comercial simples of milk and dairy products in Kuwait. Food Additives and Contaminants. 18(11): 993-997.

Stolker, A., Brinkman, U. 2005. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and Growth-promoting agents in food-producing animals-a review. Journal of Chromatography A. 1067:15-53.

Stoloff, L. 1976. Mycotoxins and Other Fungal Related Food Problems, J.V.Rodricks Ed., American Chemical Society, Washington, D.C., pp.23-50.

Tajkarimi, M., Shojaee, F., Sala, M., Purssoltani, H., Montallebi, A. 2007. Seasonal study of aflatoxina M1 contamination in milk in five regions in Iran. 116(3) 346-349.

Tarık, H., Belgin, S., Özlem, K. 2005. Aflatoxin M1 contamination in pasteurised milk. Veterinaski Archive. 75(1): 57-65

Vallone, L., Boscariol, y Dragoni, I. 2006. Aflatoxins in Organic Milk and Dairy Products. Veterinary Research Communications. 30(1) 369-370.

Vázquez, B. 2001. P*enicillum y Aspegillus* spp en queserías de la zona de Arzúa (Galicia, España). Ciencia y Tecnología Alimentaria. 3(2):96-101.

Vega, S., García, L. Brunett, L. Castillo, H., De León. 2002. Elementos por considerar en el proceso de verificación de la calidad e inocuidad de la leche orgánica. Revista Chapingo, Serie ingeniería Agropecuaria 5 (1-2): 117-120,

Yousef, E., Marth, H. 1989. Stability and Degradation of Aflatoxin M1" in Mycotoxins in Dairy Products. Hans P.Van Egmond (Ed.) Elsevier Applied Science, London and New York. Chapter 5, pp.127-161.

Zinedine, A., González, A., Soriano, J., Moltó, J., Idrissi, L., Mañes, J. 2007. Presence of aflatoxin M1 in pasteurized milk from Morocco. Internacional Journal Food Microbiology. 114(1):25-29.