



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS**

**"Validación de un método para cuantificar la
aflatoxina M1, en leche en polvo industrializada para
lactantes humanos por cromatografía de líquidos."**

PERTENECE AL PROYECTO GENÉRICO

"Evaluación de productos relacionados con la salud "

SERVICIO SOCIAL

Equivalente a Tesis, para obtener el

Grado de Licenciatura de

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

Alumna

María Teresa Sánchez Estrada

Matrícula: 204205256

Lugar de realización: Lab de Micotoxinas C-119. Departamento de Botánica,
Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México

Asesora Externa: Dra. Magda Carvajal Moreno.

Asesora Interna: M. en C. María Luisa Margarita Vázquez Ramírez

Noviembre 2019

INDICE	Página
Lista de Tablas	3
Lista de Figuras	4
Resumen	5
Abstract	6
I. INTRODUCCIÓN.	7
II. MARCO TEÓRICO	8
2.1. Antecedentes	8
2.2. Aflatoxinas	8
2.2.1. Definición	8
2.2.2. Estructura química	9
2.2.3. Hongos productores	10
2.2.4. Propiedades fisicoquímicas	10
2.2.5. Biosíntesis	11
2.2.6. Distribución de las AF	12
2.2.7. Aflatoxina M ₁	13
2.3. Fórmulas infantiles	14
2.3.1. Clasificación de las fórmulas infantiles	15
2.3.1.1. Fórmulas de inicio	15
2.3.1.2. Fórmulas de continuación	15
2.3.1.3. Fórmulas especiales	16
2.3.1.4. Leche industrializada para lactantes (Fórmula)	17
2.4. Efectos de las AF	17
2.5. Legislación	19
2.6. Cromatografía	20
2.6.1. Clasificación	20
2.6.2. Cromatografía de Líquidos de Alta Presión	20
2.7. Validación de los métodos químicos analíticos	22
2.7.1. Parámetros de desempeño	23
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
IV. JUSTIFICACIÓN	24
V. OBJETIVOS	25
VI. HIPÓTESIS DE TRABAJO	25
VII. JUSTIFICACIÓN	25
VIII. METODOLOGÍA	26
8.1. Extracción de la AFM ₁	26
8.2. Equipos	26
8.3. Materiales	27
8.4. Extracción de AFM ₁ de las muestras de leche.	28
8.5. Validación del método para cuantificar la AFM ₁	30
8.5.1. Validación del Sistema	31
8.5.1. Validación del Método	32
8.5. Determinación de la concentración de AFM ₁ en muestras de leche	33

IX. RESULTADOS	34
9.1. Validación.	34
9.1.1. Límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ).	34
9.1.2. Linealidad del Sistema	37
9.1.3. Precisión del Sistema	38
9.1.4. Repetibilidad (repetitividad)	39
9.1.5. Porcentaje de recobro, Linealidad del método e Intervalo	39
9.1.6. Selectividad	41
9.2. Análisis de las Muestras	43
X. ANÁLISIS DE RESULTADOS	44
XI. OBJETIVOS Y METAS ALCANZADOS	45
XII. CONCLUSIONES	46
XIII. BIBLIOGRAFIA	47

Lista de Tablas		
N°	Contenido	Página
1	Propiedades fisicoquímicas de las aflatoxinas más comunes (OPS, 1983).	11
2	Determinación de AFM ₁ (µg/L) en muestras de leche en varios países y años de 1990 al 2000 (Henry <i>et al.</i> , 2001).	12
3	Determinación de AFM ₁ y otras AF en muestras de leche en varios países de 2003 al 2007.	13
4	Composición de la leche en fórmula para lactantes (WHO, 1999).	14
5	Disponibilidad en el mercado nacional de fórmulas infantiles de inicio.	15
6	Fórmulas de continuación disponibles en el mercado nacional.	16
7	Toxicidad de la AFM ₁ en animales (Henry, 2001).	18
8	Linealidad: Concentraciones para formar la curva de calibración de AFM ₁ (rango de TR 8.514-8.769 min).	31
9	Porcentaje de recuperación de AFM ₁ en leche en polvo	34

Lista de Figuras		
N°	Contenido	Página
1	Estructura química de las principales Aflatoxinas e hidroxilados) (Ellis <i>et al.</i> , 1991).	9
2	Hongo <i>Aspergillus</i> a) <i>A. flavus</i> en maíz, b) <i>A. parasiticus</i> en cacahuete.	10
3	Ruta biosintética de las aflatoxinas (Sweeney & Dobson, 1999).	11
4	Curva de calibración de AFM ₁ (ng mL ⁻¹).	31
5	Límite de detección (0.1 ng g ⁻¹) en tiempo de retención 8.570 min.	32
6	Pico cromatográfico evidente de la dilución 128 ng g ⁻¹ AFM ₁ estándar, en tiempo de retención 8.718 min de la curva de calibración.	32
7	Estándar de 100 ng de AFM ₁ sola con tiempo de retención 8.73 min	33
8	Muestra de leche en polvo sola con área de 74.65 que corresponde a una concentración basal natural de 60 ng mL ⁻¹ de AFM ₁	33
9	Muestra de leche en polvo con contaminación basal de 60 ng de AFM ₁ + marcaje de 100 ng de estándar de AFM ₁ , daría un total de 160 ng y se recuperó una concentración de 161.24 ng de AFM ₁ con tiempo de retención 8.956 min. Es un porcentaje de recuperación de 100%.	34

RESUMEN

El método de AOAC (2005) fue elegido para valorarlo ya que purifica y concentra la AFM₁ por columnas de inmutioafinidad y la cuantifica por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) además de ser aceptado a nivel internacional. Existen diferentes parámetros en la validación como son la Linealidad (Curvas de calibración), límite de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ), selectividad, y porcentaje de recuperación con base en estudios previos (Horwitz, 1982). Los criterios de validación fueron:

1. **Linealidad**, la curva de calibración de AFM₁ tuvo una pendiente de $y = 1.1719 - 4.1966x$ y un coeficiente de correlación de $R^2 = 0.9834$
2. **Límite de Detección (LOD)**. La AFM₁ se empezó a detectar a una concentración de 0.1 ng/g que daría un límite de cuantificación (LOQ) teórico de 0.4 ng mL⁻¹.
3. **Selectividad**. La muestra de leche en polvo para bebés (matriz) y el estándar de AFM₁ coinciden en los tiempos de retención sin traslape de picos.
4. **El porcentaje de recuperación** fue de 100%, pues la muestra o matriz tuvo 60 ng y cuando se le añadieron 100 ng de AFM₁ se recuperaron 161 ng, dado que el error del HPLC es de 2 ng estamos en el rango correcto del 100% de recuperación.

ABSTRACT

The AOAC (2005) method was chosen to validate because it purifies and concentrates AFM1 by immunoaffinity columns, and quantifies it by High Performance Liquid Chromatography (HPLC), in addition to being accepted internationally. There are different parameters in the validation such as, Lineality (Calibration curves), Limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), selectivity, and percentage of recovery based on reported studies (Horwitz, 1982). The results of the present study were:

1. **Lineality.** The calibration curve of AFM1 had a slope of $y = 1.1719 - 4.1966$ and a Correlation coefficient of $R^2 = 0.9834$.
2. **Limit of Detection (LOD).** The AFM1 began to be detected at a concentration of 0.1 ng mL^{-1} that would give a quantification limit (LOQ) theoretical of 0.4 ng mL^{-1} .
3. **Selectivity.** The milk sample in powder for babies (matrix) and the AFM1 standard had the same range of retention times without overlapping of the peaks.
4. **Recovery percentage.** The percentage of recovery was 100%, because the matrix had 60 ng, and when it was spiked with 100 ng of AFM1 the recovery was 161 ng, the amount of error of the HPLC is 2 ng so we were in the correct range of a recovery of 100%.

I. INTRODUCCIÓN

Las micotoxinas son toxinas de hongos y las más importantes son las aflatoxinas (AF). Las AF son metabolitos secundarios producidas principalmente por los hongos *Aspergillus flavus* Link, *A. parasiticus* Speare y *A. nomius* Kurtzman (Manonmani *et al.*, 2005), que se desarrollan y contaminan los alimentos, en el campo, durante el procesamiento y almacenamiento con condiciones adecuadas de luz, temperatura, humedad y pH. No se sabe con certeza la función de las AF para el hongo, algunos autores las consideran como venenos con la función de proteger al hongo contra la predación y la competencia (Kang'ethe *et al.*, 2009), otros consideran que son mecanismos de defensa contra otros hongos. Su nombre viene de A = *Aspergillus*, fla = *flavus* y toxina = veneno.

Se han identificado alrededor de 20 tipos de AF que químicamente corresponden a bis-dihidro-furanocumarinas. Las principales AF son la aflatoxina B₁ (AFB₁), aflatoxina B₂ (AFB₂), aflatoxina G₁ (AFG₁) y la aflatoxina G₂ (AFG₂), siendo la AFB₁ la más frecuente y tóxica.

Dichas AF se nombran por el color de su fluorescencia, la AFB₁ y AFB₂ presentan fluorescencia azul intenso bajo la luz ultravioleta de onda larga, mientras que la AFG₁ y AFG₂ presentan fluorescencia amarilla verdosa.

Las AFM₁ (AFM₁) y M₂ (AFM₂) provienen del metabolismo del hígado de mamíferos, como la vaca, cabras y humanos, y cuando consumen granos contaminados con la AFB₁ y AFB₂, el organismo les añade un grupo OH⁻ se forman los hidroxilados, y baja su toxicidad como mecanismo de detoxificación. El hígado forma las AF hidroxiladas que son secretadas en la leche como la AFM₁, la AFM₂, la aflatoxina P₁ (AFP₁) y el aflatoxicol (AFL) y pasan a los productos lácteos (Baltaci *et al.* 2012, Carvajal *et al.*, 2003 a,b).

II. MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES

Las aflatoxinas (AF) son un grupo de compuestos tóxicos que se descubrieron, en Gran Bretaña en 1960, tras la muerte de 100,000 pavos que fueron alimentados con harina de cacahuete proveniente del Brasil. Dicha harina se hallaba contaminada con *Aspergillus parasiticus* y *A. flavus* (Asao, *et al.*, 1965, Stroka, *et al.*, 2000). Diversos estudios permitieron determinar una serie de compuestos fluorescentes a los cuales se les denominó AF (Asao *et al.*, 1963). Se conocen casi 20 diferentes tipos de AF pero destacan cuatro de ellas B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁) y G₂ (AFG₂), por su frecuencia, abundancia y alta actividad cancerígena, mutágena y teratógena, y se derivan del metabolismo de la AFB₁ (Asao, *et al.*, 1963).

La contaminación de alimentos por AF ha sido asociada a diversas enfermedades en humanos tales como el Síndrome de Reye, Kwashiorkor y cáncer hepatocelular (Oyelami *et al.*, 1998).

Las AFs se identificaron en 1961 en cacahuete contaminado con el hongo *Aspergillus* (Sargeant *et al.*, 1961). La FAO reportó en el año 1977 a las AFs como las micotoxinas más importantes por sus implicaciones en salud humana y animal junto con los tricotecenos, la ocratoxina A (OTA), las fumonisinas y la zearalenona (Duarte-Vogel & Villamil-Jiménez, 2006).

2.2. AFLATOXINAS

2.2.1. Definición

Las aflatoxinas (AF) son metabolitos secundarios tóxicos, producidas principalmente por hongos del género *Aspergillus*, químicamente corresponden a las bis-dihidro-furanocumarinas, con características hepatotóxicas, cancerígenas, teratógenas y mutágenas.

Son compuestos policetónicos formados por los mohos en ciertas condiciones físicas, químicas y biológicas donde se reducen los grupos cetónicos de los ácidos grasos. Los ácidos grasos son metabolitos primarios utilizados por los mohos como fuente de energía. Las AF se forman al final de la fase exponencial o al principio de la fase estacionaria del crecimiento de los mohos toxigénicos (Gimeno & Martins, 2000).

2.2.2. Estructura química

Se han identificado alrededor de 20 tipos de AF, y al menos 13 son producidas en la naturaleza. La aflatoxina B₁ (AFB₁) es considerada la más tóxica y es producida principalmente por los hongos *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius*. Las AFG₁ y la AFG₂ son producidas exclusivamente por *A. parasiticus*. Las AF más comunes son la AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, AFM₁ y AFM₂, siendo las cuatro primeras las más relacionadas con los efectos tóxicos (**Figura 1**) (Ellis et al., 1991; Pier, 1987). Las AFM₁, AFM₂, AFP₁ y Aflatoxicol (AFL) son metabolitos hidroxilados que se excretan en la leche y orina de mamíferos que consumen AFB₁, algunas levaduras también las producen. Las AFs B y G emiten luz ultravioleta de onda larga, excitándose a 225-365 nm y emitiendo a 425-450 nm, con la cual pueden ser observadas con una lámpara fluorescente, produciendo fluorescencia azul o verde, de donde toman el nombre de B (blue) y G (green) según el caso (Baltaci et al., 2012). La AFM₁ viene de "Milk" y tiene fluorescencia azul violáceo. Las principales AFs son:

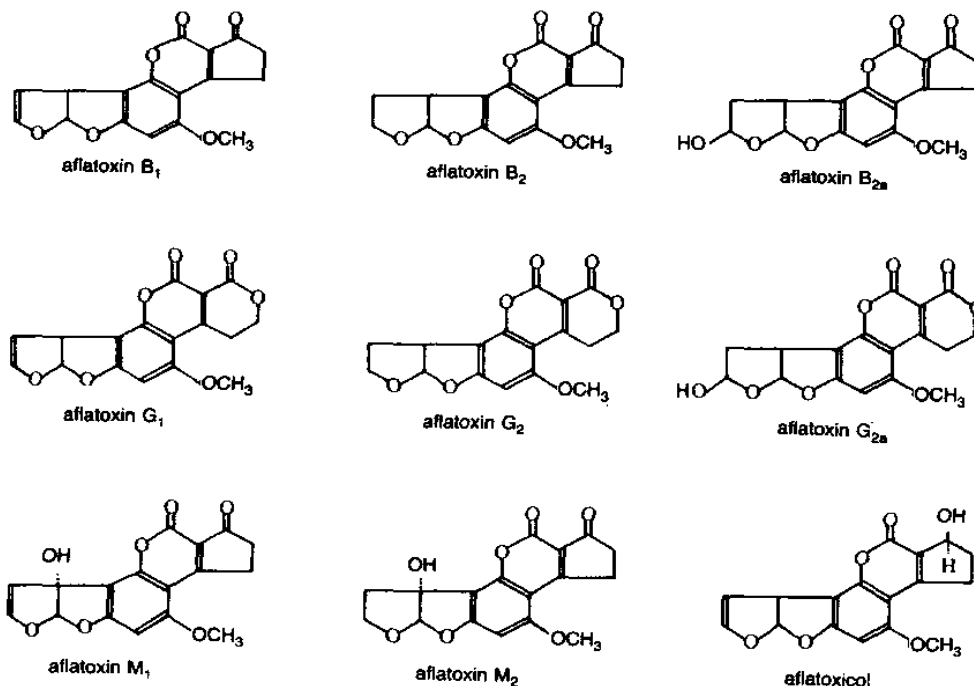


Figura 1. Estructura química de las principales Aflatoxinas e hidroxilados) (Ellis et al., 1991).

2.2.3 Hongos productores

Las AF químicamente corresponden a bisdihidro furano-cumarinas, y son producidas por hongos *Aspergillus* principalmente por *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius*. Dichos hongos requieren condiciones especiales para su crecimiento y la producción de AFs. El hongo *A. flavus* es que más produce AF, de ahí el nombre de aflatoxina; siguiendo en importancia el *A. parasiticus*, **Figura 2**. Sin embargo, *A. nomius* ha sido descrito junto con otras especies como productor de toxinas potentes con capacidad insecticida y quimio-esterilizante contra una gran cantidad de insectos pero no se ha probado daño en animales o humanos. Los *Aspergillus* no producen conidióforos septados, tienen esclerocios que son estructuras de resistencia para sobrevivir en climas adversos, sequía, congelamiento, o carencia de nutrientes (Ellis *et al.*, 1991).

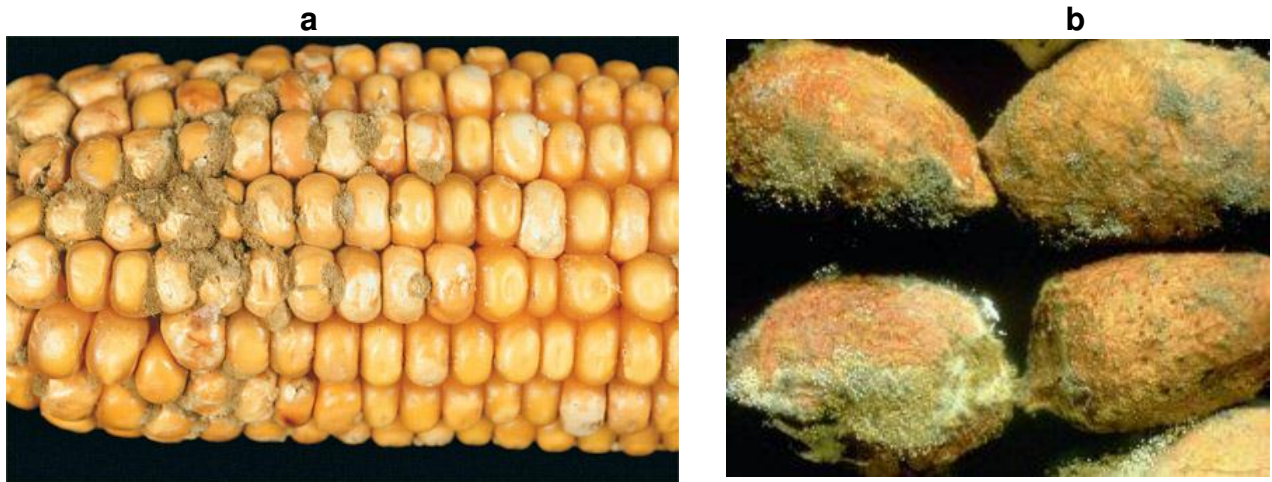


Figura 2: Hongo *Aspergillus* a) *A. flavus* en maíz, b) *A. parasiticus* en cacahuate

2.2.4. Propiedades fisicoquímicas

Las AF no tienen color, olor ni sabor, son termo-resistentes se decomponen a 260 °C las AFB de alimentos y las AFM₁ y AFM₂ de la leche a 320° C. No se disuelven en agua y se disuelven en solventes orgánicos como el cloroformo, acetonitrilo, metanol, acetona, etc. son sensibles a la luz. **Tabla 1.**

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de las aflatoxinas más comunes (OPS, 1983).

Características	Tipo de Aflatoxina				
	AFM1	B1	B2	G1	G2
Origen del Nombre					
Fluorescencia	Azul-Violáceo	Azul	Azul	Verde	Verde
Punto de fusión (°C)	299	268	288	245	238
Fórmula	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	C ₁₇ H ₁₄ O ₇
Peso molecular	328.3	312.3	314.3	328.3	330.3

2.2.5. Biosíntesis

La condensación de Acetil CoA reacciona con tres o más grupos malonatos produciendo malonil CoA, se forma un compuesto policetónico, que por ciclización y aromatización forma una antrona y al ácido norsolorínico que formará a las AFs (Bhatnagar et al., 2003). **Figura 3.**

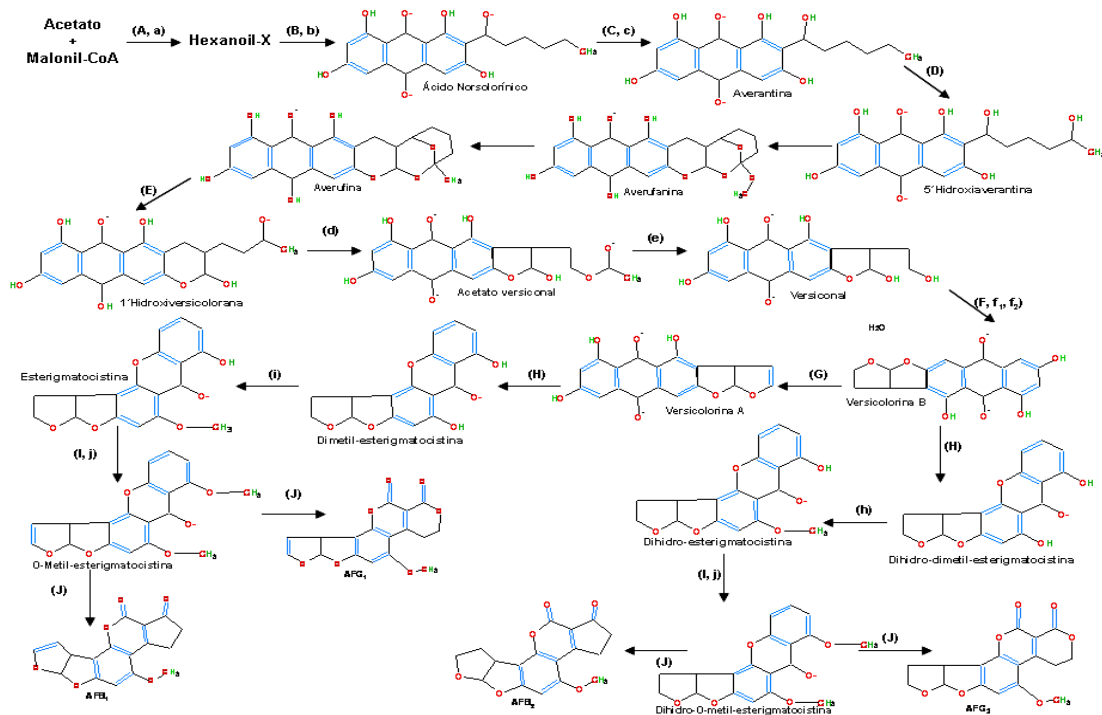


Figura 3. Ruta biosintética de las aflatoxinas. Enzimas involucradas: (a) lipasa sintetasa, (b) policétido sintetasa, (c) ác. norsolorínico reductasa, (d) acetato hemicetal versiconal reductasa, (e) esterasea, (f₁) versicolorina B sintetasa, (f₂) versiconil ciclasa, (g) desaturasa, (h) O-metiltransferasa (MT-II), (i) O-metiltransferasa, (j) O-metiltransferasa (MT-I). Genes involucrados: (A) *fas-1A* y *fas-2A*, (B) *pksA*, (C) *nor1*, *norA*, (D) *avnA*, (E) *avf1* (*avf1B* y *avf1W*), (F) *vbs*, (G) *verB*, (H) *ver1A* y *af1S*, (I) *omtA* y (J) *ord1* (Sweeney & Dobson, 1999).

2.2.6. Distribución de las AF

Las condiciones tropicales con temperaturas altas (20- 35°C) y 85% de humedad relativa son mejores para el crecimiento del hongo y el desarrollo de AFs, y contaminan cualquier producto del agro, especialmente cereales como maíz, algodón, arroz y cacahuates (Ellis *et al.*, 1991). Las AFs causan un problema crónico difícil de controlar, aunque las zonas con climas más templados ó fríos no están exentas de ellas y por la importación de alimentos contaminados (Bucio-Villalobos *et al.*, 2001; Boudra *et al.*, 2007). Las AFs son mundialmente prevalentes (Fernández-Oller, 2014).

Entre 1990 y 1995 Francia fue el país que analizó mayor número de muestras, con resultados muy diferentes, ya que mientras en un reporte sólo se detectaron 9/853 muestras contaminadas, en otro en todas las muestras (n= 165), se rebasaban los límites regulatorios (Periaca *et al.*, 1999). Hay numerosos reportes de contaminación de leche por AFM₁ (Carvajal *et al.*, 2003 a,b) **Tablas 2 y 3.**

Tabla 2. Determinación de AFM₁ (µg/L) en muestras de leche en varios países y años de 1990 al 2000 (Henry *et al.*, 2001).

País	Año	Muestras totales	Bajo el límite de detección		Cantidad de AFM ₁ superior al nivel de tolerancia			
			Número de muestras analizadas.	% de muestras analizadas	0.05 µg/L		0.5 µg/L	
					Nº muestras analizadas	AFM ₁ (µg/L)	Nº muestras analizadas	AFM ₁ (µg/L)
Argentina	1998	6	1	17	2	33	2	33
Austria	1990-93	479	479	100				
Bélgica	1993-94	153	98	64	55	36		
Brasil	1998-99	50	10	20	36	72	4	8
Canadá	1997-98	81	81	100				
España	1989-92	307	234	76	73	24		
Estados Unidos	1999	877	853	97			24	3
	2000	477	462	97			15	3
Finlandia	1992-95	122	122	100				
Francia	1990-95	165	0	0	163	99	2	1
Francia	1990-91	853	844	99	6	0.7	3	0.35
India	1992-93	504	415	82	No reportado			
Italia	1995	159	23	14			136	86
México *	1995	85	85	100	-	0.2	-	0.5
Noruega	1998	54	3	6	51	94		
Países Bajos	1990-93	1903	331	17	1241	65	331	17
Polonia	1993-94	187	144	77	43	23		
Reino Unido	1988-89	331	255	77	67	20	9	2.7
Uruguay	1993-95	22	15	68			6	27

* En el caso de México, Esqueda y colaboradores publicaron en 1995 un estudio en el que al analizar 85 muestras de leche, todas las muestras se encontraron entre 0.2 y 0.5 µg/L.

Tabla 3. Determinación de AFM₁ y otras AF en muestras de leche en varios países de 2003 al 2007.

País	Alimento	Año	Muestras Totales	No. de muestras analizadas	% de Muestras	AF	Niveles
Japón (1)	Leche cruda a granel	Ene, Feb y Jun de 2004	No establecido	200	-----	AFM ₁	0.005 µg mL ⁻¹
Trinidad (2)	Leche y alimentos lácteos	2007	438	212 de leche	48.4 %	AFM ₁	No establecido
México (3)	Leche pasteurizada y ultrapasteurizada	2003	580 L.	580	± 50%	AFL	13 % > 0.005 µg L ⁻¹ 8 % > 0.05 µg L ⁻¹ .

[(1) Sugiyama et al., 2008. (2) Offiah et al., 2007 (3) Carvajal et al. 2003b]

2.2.7. Aflatoxina M₁

La AFM₁ es el principal metabolito mono-hidroxilado derivado de la ingestión de la AFB₁, formada en el hígado y excretada en la leche (Abdulrazzaq et al., 2003). A pesar de que la AFM₁ es menos tóxica que la AFB₁, ha sido clasificada en el Grupo 2B, posible cancerígeno para seres humanos, por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) (Motawee *et al.*, 2009).

La AFM₁ se forma cuando la AFB₁ es absorbida vía tracto gastrointestinal a través de los alimentos contaminados, dentro del sistema portal sanguíneo y es llevada para el hígado donde se metaboliza. Una porción de AF es activada (oxidada) y fijada en los tejidos hepáticos. La AFB₁ se hidroxila y da otros metabolitos, como las AFM₁, AFM₂, AFP₁ y AFL para hacerlos solubles en agua y que sean excretados por orina, en la bilis y por las heces fecales. Otros compuestos hidroxilados solubles en agua, que son productos de degradación de la AFB₁ y metabolitos no conjugados de ésta, son excretadas en el sistema circulatorio sanguíneo y se distribuyen de forma sistémica. Eventualmente, esos residuos mencionados van a la leche, huevos, músculo y tejidos comestibles. El AFL es 18 veces menos tóxico que la AFB₁, y la aflatoxina B_{2a} es una forma intermedia no tóxica (Caloni et al., 2006).

El organismo animal produce generalmente esos productos metabólicos como un sistema de autodestoxificación. La reacción que tiene lugar a partir de la micotoxina original no tiene forzosamente que ser completa ni irreversible. Los altos niveles de

AFM₁ en la leche y otros productos lácteos se consideran indeseables (Battacone et al., 2005; Tekinşen y Semih, 2008; Unusan, 2006; Zinedine et al., 2007).

2.3. Fórmulas infantiles

Las recomendaciones de los diferentes nutrientes que deben formar parte de las fórmulas para lactantes para cubrir las necesidades de la mayoría de los niños, sin que existan carencias o excesos nutricionales (WHO, 1999) se presentan en la **Tabla 4**.

Tabla 4: Composición de la leche en fórmula para lactantes (WHO, 1999).

Concepto	En porcentaje %
Energía (Kcal/100 mL)	60-75*
Proteínas (%)	7.2 – 10*
Hidratos de carbono (%)	20- 55*
Proteínas (%)	30- 50*
Por cada 100 mL	
Proteínas (g / 100 mL)	1.2 – 1.8*
Relación C / SP	50 / 50*
Hidratos de carbono (g / 100 mL)	5-9.8*
Grasas (g / 100 mL)	2-9.5*
Hidratos de carbono (g / 100 mL)	5-9.8*
Carbohidrato mayoritario	Lactosa*
Carbohidrato minoritario	Sacarosa < 20%*; Almidón*; Dextrinomaltosa*
Grasas (g / 100 mL)	5-9.8
Ácido Linoleico/ Alfa Linoléico	5- 15
Minerales (mg)	
Calcio	60
Fósforo	30
Magnesio	6
Hierro	0.15 No debe exceder de 2.5
Yodo	5 No exceder de 25
Zinc	0.5
Cobre	60
Manganeso	20 No exceder de 60
Potasio	80 No exceder de 200
Cloro	55 No exceder de 150
Selenio	3

* La composición de los requerimientos varía según la formulación de cada tipo de leche y etapa.

Las recomendaciones para las fórmulas adaptadas permiten una relativa variación en la cantidad de los componentes. No conviene olvidar que la leche de mujer no tiene una composición constante a lo largo de la lactancia. La disponibilidad de algunos minerales como calcio, hierro y zinc suele estar aumentada en la leche materna (WHO, 1999; Pharmacopoeia Convention, 2007).

2.3.1. Clasificación de las fórmulas infantiles

2.3.1.1. Fórmulas de inicio

Se emplean desde el nacimiento hasta los 4 a 6 primeros meses de vida (de 0 a 6 meses), etapa caracterizada por requerir alimentación láctea exclusiva y por ser un período de altos requerimientos nutricionales en relación a su peso, como así también de inmadurez digestiva y metabólica.

Las fórmulas de inicio son derivadas de la leche de vaca. Esta es modificada en cantidad, calidad y tipo de nutrientes con el fin de asemejarla tanto como sea posible a la leche humana (de allí el antiguo término de fórmulas maternizadas), y adaptarla a la condiciones de inmadurez digestiva y renal del recién nacido, mejorar su digestibilidad y tolerancia, disminuyendo la carga renal de solutos. Por todo ello, estas fórmulas deben ser la primera opción cuando sea necesario complementar o sustituir la lactancia materna, siempre que las condiciones socioeconómicas lo permitan (LSRO, 1998). La **Tabla 5** muestra las fórmulas infantiles de inicio del mercado nacional.

Tabla 5: Disponibilidad en el mercado nacional de fórmulas infantiles de inicio.

Empresa	Fórmula de inicio
Sancor	Sancor Bebe
Mead Johnson	Enfamil 1 Enfamil LS Enfamil AR
Nestlé	Nan 1 Nidina infantil 1 Nan AR Nan 1 UHT
Nutricia Bagó Serenísima	Nurilon Premium 1 c/ Prebióticos Vital Infantil 1 Crecer (para menos de 6 m)
Wyeth	S-26 GOLD

2.3.1.2. Fórmulas de continuación

Las fórmulas modificadas de continuación son promocionadas para ser indicadas a partir de los 6 meses de vida, etapa en la que comienza la introducción de

alimentos de consistencia semi-sólida y luego sólida, brindando nutrientes para complementar los aportados con el biberón.

Estas fórmulas surgen como una mejor alternativa que la leche de vaca, a un costo razonable. Han sido reguladas por la FAO-OMS para adecuarlas a las características biológicas del lactante mayor de 6 meses, más maduro, orgánica y funcionalmente en sus aparatos digestivo y renal. Reciben el nombre “de continuación” porque pueden remplazar o complementar la lactancia materna después de las “de inicio” (LSRO, 1998). **Tabla 6.**

Tabla 6: Fórmulas de continuación disponibles en el mercado nacional.

Empresa	Fórmula de continuación
Mead Johnson	Enfamil 2
Nestlé	Nan 2 Nan2 UHT (Fluida) Nidina Infantil 2
Nutricia/ Bagó	Nutrilon Premium 2, con prebiótico Vital Infantil 2
Sancor	Sancor Infantil
Serenísima	Crecer (p mayores de 6 meses, fluida)

2.3.1.3. Fórmulas especiales

Son fórmulas para lactantes y niños pequeños con problemas o limitaciones en los procesos de absorción, digestión o incapacidad para metabolizar determinadas sustancias. Para su elaboración se parte de fórmulas normales y se modifican (LSRO, 1998) algunas de las más comunes son:

- Leches sin lactosa
- Fórmulas hipo-alérgicas FH (hidrolizados de proteínas)
- Fórmulas hipo-antigénicas HA
- Fórmulas a base de proteínas vegetales
- Fórmulas anti- regurgitación AR.
- Fórmulas para recién nacidos con bajo peso (prematuros)
- Fórmulas para errores metabólicos (LSRO, 1998).

2.3.1.4. Leche industrializada para lactantes (Fórmula)

La fórmula infantil se define como un alimento para lactantes que es adecuado para sustituir total o parcialmente a la leche humana, satisfaciendo las necesidades nutritivas normales del lactante (Klein, 2002).

La leche materna es el alimento ideal durante los primeros meses de vida, sin embargo existen circunstancias especiales que hacen necesario buscar otras alternativas de alimentación tales como la leche en fórmula, dichas situaciones son:

- Rechazo absoluto o incapacidad de la madre para la lactancia materna.
- Necesidad de disminuir el contenido de proteínas, fósforo y sodio, por dilución.
- Necesidad de sustituir la crema de leche por mezclas de grasas y aceites, para mejorar la absorción y aportar ácidos grasos esenciales
- Necesidad de adicionar minerales y vitaminas dentro de márgenes establecidos para satisfacer la ingesta recomendada de nutrientes
- Lograr una densidad calórica comparable a la de la leche materna (de 65 a 70 cal/dL)
- Aumentar el contenido de hidratos de carbono por adición de lactosa (Klein, 2002).

2.4. Efectos de las AF

Las AF provocan una toxicidad aguda y crónica en animales y humanos, y poseen actividad mutágena y cancerígena (Ghazani y Hosein, 2009.)

Cuando las AF se introducen en el organismo y son transformadas por el sistema enzimático del Citocromo P450, forman metabolitos hidroxilados, los cuales pueden fijarse en el ADN, ARN o en las proteínas por años. Las AF se unen al ADN principalmente en la posición N⁷ guanina en células hepáticas, lo que provoca daño por toxicidad aguda en hígado y riñones, se altera la función hepática, la homeostasis del glutatión, el metabolismo del calcio, fósforo y vitamina D (Khoshpey et al., 2011).

Además de reaccionar directamente con la membrana celular, con ácidos nucleicos o con proteínas, provocan interferencia del metabolismo energético en la síntesis del ARN, afectando el ciclo y la mitosis celular, por lo cual han sido clasificadas por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC, 2002) dentro del grupo 1 como sustancias cancerígenas probadas para los humanos (Khoshpey et al., 2011).

Como efectos de la AFM₁, en algunos trabajos experimentales se ha logrado la inducción de lesiones hepáticas en patitos, tumores hepáticos en ratas y truchas similares a las causadas por la AFB₁ (Kuiper-Goodman, 1990; Van Egmond, 1989; Wakhisi, 1980; Tomerak et al, 2011). Pier (1987), reportó que después de la inyección de pequeñas dosis de AFM₁ se desarrolló aplasia de timo. Existe evidencia molecular acerca de la mutagenicidad de la AFM₁ en ratas, ya que tras su administración oral, la molécula se fijaba al DNA, de donde se concluyó que es un cancerígeno potente para estos roedores (Lutz et al., 1980) **Tabla 7**. Sin embargo, la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC, 2002), la tiene clasificada como una sustancia posiblemente cancerígena que aunque deriva de una sustancia capaz de provocar neoplasias, no existe evidencia para asegurar que pueda provocar cáncer en los seres humanos. A partir de un estudio en ratas, se calculó que la toxicidad de la AFM₁ tiene un orden de magnitud menor que la AFB₁ (WHO, 2001; Turconi et al. 2004).

La contaminación por AF no es exclusiva de los productos agrícolas, cereales u oleaginosas también se presenta en leche entera y derivados, huevos y cárnicos, debido a los alimentos contaminados que consumen los animales.

Tabla 7. Toxicidad de la AFM₁ en animales (Henry, 2001).

Especie	Ruta exposición	Forma de administración	Observaciones
Patos de 40-50 g	Oral	No reportada	Dosis letal 50, similar a la de la AFB ₁ (0.34 mg/kg de peso vivo).
Truchas arco iris	Oral	Dosis: 0, 4, 16, 32 y 64 µg/kg x 12 meses. Después dieta control hasta los 20 meses y posteriormente a algunas 20 µg/kg por 5 a 30 días y dieta control por otros 12 meses	Las hembras que desarrollaron tumores tuvieron una tasa de mortalidad mayor que la de los machos afectados. Del 3 al 12% de las truchas a las que se administró nuevamente AFM ₁ presentaron cáncer hepático.
Truchas arco iris	Oral	Dosis: 0, 5,9 y 27.3 µg/kg x 16 meses.	A los 12 meses hubo degeneración hepática en todos los grupos. A los 15 meses, hubo 2% de hepatoma celular y 6% de nódulos hepáticos hiperplásicos en el grupo con dosis de 27.3 µg/kg
Ratas Fischer lactantes	Sonda gástrica	25 µg/kg x 5 días/semana x 8 semanas	1 rata (3%) desarrolló hepatoma y el 28% de las restantes tuvieron lesiones preneoplásicas.
Ratas Fischer	Oral	0, 0.5, 5 y 50 µg/kg, se sacrificaron entre los 18 y 22 meses	5% presentaron tumores y 15% tuvieron nódulos entre los meses 19 y 22 en el grupo que recibió 50 µg/kg

Se ha encontrado una relación lineal entre la cantidad de AFM₁ excretada en la leche respecto a la AFB₁ ingerida en piensos contaminados, varía entre 1:50 a 1:100 y puede ser tan alto como 1:16 en las vacas productoras de leche (Veldman et al., 1992). Se considera que cerca del 0.3 a 6.2% de la AFB₁ en la alimentación animal se transforma en AFM₁ en la leche y se excreta dentro de las 12 horas de la administración del alimento. Además se han encontrado residuos de AF en los productos cárnicos derivados de animales como pollos, reses, ovejas entre otros (Ghidini et al., 2005).

2.5. Legislación

Las AFs (B₁, B₂, G₁ y G₂) en alimentos para consumo humano están regulados en Europa por el Reglamento Europeo RD 475/198883 (RC, 2009) con los siguientes límites: 10 µg kg⁻¹ para AFs B₁, B₂, G₁ y G₂, o sea aflatoxinas totales (AFt), y 5 µg kg⁻¹ para AFB₁.

El reglamento de la Comisión Europea 165/2010/EC establece límites para AFB₁ y AFt de 8 y 15 µg kg⁻¹, respectivamente en las avellanas, las nueces de Brasil, cacahuates y otras semillas oleaginosas que vayan a someterse a selección u otro tratamiento físico antes del consumo humano o su utilización como ingrediente en productos derivados. Por otro lado en Codex Alimentarius 2006, el límite legal de AFB₁ y AFt en el cacahuete y otras semillas oleaginosas destinados al consumo humano están entre 2 y 4 µg kg⁻¹, mientras que en avellanas y las nueces de Brasil son 5 y 10 µg kg⁻¹, respectivamente (Baltaci et al. 2012).

Los límites de tolerancia para las AF en la leche lo establecen las autoridades de cada país y varían según por el tipo de micotoxinas y alimento analizado.

En muchos países se han fijado contenidos máximos de AFM₁ en leche y otros productos lácteos, oscilando las tolerancias entre 0.05 y 0.5 µg kg⁻¹. Actualmente la Comunidad Europea ha establecido que los niveles máximos de AFM₁ en leche líquida y productos lácteos secos o procesados no deben exceder de 50 µg kg⁻¹ y cuando se establece el nivel máximo para la leche procesada, hay que tener en cuenta los cambios en la concentración del contaminante, provocados por el tratamiento (Comisión Europea, 2010). El nivel máximo de concentración de AFM₁ establecido por la FDA es de 500 µg kg⁻¹ (= 0.5 ng g⁻¹) en la leche, y el Comité Mixto de Expertos FAO

/OMS en Aditivos Alimentarios han aceptado este límite. En México se tolera una cierta contaminación de AF en alimentos de consumo humano, siempre y cuando no se sobrepasen los $20 \mu\text{g kg}^{-1}$, según la Norma Oficial Mexicana en el Diario oficial de la federación (2000) (Caloni *et al.*, 2006; Battacone *et al.*, 2012).

2.6. Cromatografía

La cromatografía es una técnica que separa solutos a través de un proceso dinámico de migración diferencial en un sistema que consta de dos o más fases, una de las cuales se mueve continuamente en una dirección dada y en la que las sustancias individuales presentan diferentes movilidades a causa de diferencias de adsorción, partición, solubilidad, presión de vapor, tamaño molecular o densidad de carga iónica. Las sustancias así separadas se pueden identificar o determinar mediante procedimientos analíticos (Amaro *et al.*, 2008).

La técnica cromatográfica en general requiere que un soluto se distribuya entre dos fases, una fija (fase estacionaria) y otra móvil (fase móvil), la fase móvil transfiere el soluto a través del medio, hasta que éste finalmente emerge separado de otros solutos que eluyen antes o después. La fase estacionaria puede actuar mediante adsorción, o por dilución del soluto (Amaro *et al.*, 2008).

2.6.1. Clasificación

Con base en la naturaleza de las fases involucradas y a los mecanismos de separación, la cromatografía se divide en:

- a) Cromatografía de gases. En este tipo de cromatografía la fase móvil es un gas y la estacionaria en un sólido (Cromatografía gas-sólido) o un líquido (Cromatografía gas-líquido) (Amaro *et al.*, 2008).
- b) Cromatografía de líquidos donde la fase móvil es líquida y la estacionaria un sólido.

2.6.2. Cromatografía de Líquidos de Alta Precisión

La cromatografía de líquidos de alta precisión (HPLC), por sus siglas en inglés, a veces llamada cromatografía de líquidos de alta resolución, es una técnica de separación basada en una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida. Las separaciones se logran por procesos de partición, adsorción o intercambio iónico,

según el tipo de fase estacionaria empleada. La HPLC tiene ventajas características sobre la cromatografía de gases para el análisis de compuestos orgánicos. Los compuestos que se van a analizar se disuelven en un disolvente adecuado y la mayoría de las separaciones tienen lugar a temperatura ambiente (Amaro et al., 2008).

Equipo. Un cromatógrafo de líquidos es un recipiente con fase móvil, una bomba para forzar el paso de la fase móvil a través del sistema a alta presión, un inyector para introducir la muestra en la fase móvil, una columna cromatográfica, un detector y un dispositivo de recolección de datos (Amaro et al., 2008).

Sistemas de Bombeo. Los sistemas de bombeo de HPLC administran cantidades exactas de fase móvil desde los recipientes hasta la columna mediante una tubería y uniones adecuadas para altas presiones. Los sistemas modernos constan de una o varias bombas reguladoras controladas por computadora que pueden programarse para variar la relación entre los componentes de la fase móvil según se requiera para la cromatografía en gradiente. Las presiones operativas son típicamente de hasta 5000 psi o más, con velocidades de flujo de hasta 10 mL por minuto (Amaro et al., 2008).

Inyectores. Los compuestos que se van a cromatografiar se disuelven y inyectan en la fase móvil, en nuestro caso usando inyectores automáticos. Estos pueden programarse para controlar el volumen de muestreo, el número de inyecciones y los ciclos de enjuague del espiral, el intervalo entre las inyecciones y otras variables operativas (Amaro et al., 2008).

Columnas. Para los análisis farmacéuticos, la separación se logra por la partición de los compuestos presentes en la solución de prueba entre la fase móvil y la fase estacionaria. Los sistemas que constan de fases estacionarias polares y fases móviles no polares se describen como de fase normal, mientras que por el contrario cuando se emplean fases móviles polares y fases estacionarias no polares se denomina cromatografía en fase reversa. La cromatografía de partición casi siempre se emplea para compuestos solubles en hidrocarburos de peso molecular menor de 1000 (Amaro et al., 2008).

Las fases estacionarias para la cromatografía de líquidos moderna en fase reversa constan normalmente de una fase orgánica químicamente unida a sílice u otros materiales. Las partículas son generalmente de 3 μm a 10 μm de diámetro, hasta 50 μm o más para las columnas preparativas (Amaro et al., 2008).

Detectores. El tipo de detector de UV consta de una celda de flujo colocada en el extremo de la columna. Un haz de radiación UV pasa a través de la celda de flujo y se introduce en el detector. A medida que los compuestos eluyen de la columna, pasan a través de la celda y absorben la radiación, lo que da lugar a cambios cuantificables en el nivel de energía.

En nuestro caso se usó un detector de longitud de onda múltiple con una fuente de luz continua, como una lámpara de deuterio o de xenón, a presión y longitudes de onda simultáneas seleccionadas por el operador. Estos detectores adquieren la absorbancia a lo largo del intervalo total UV-visible y, por lo tanto, proporcionan al analista cromatogramas a múltiples longitudes de onda seleccionadas y espectros de ultravioleta de los picos eluidos (Amaro et al., 2008).

Dispositivos de recolección de datos. Las unidades procesadoras de datos modernas, reciben y almacenan la señal de los detectores e imprimen el cromatograma completo con las alturas y áreas de los picos, la identificación de la muestra y las variables del método (Amaro et al., 2008).

2.7. Validación de métodos químicos analíticos (Horwitz, 1982).

Un método analítico es la descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir, para llevar a cabo el análisis de AF de la muestra.

La validación de métodos analíticos es el proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada (CNQFB, 2000). Cualquier método analítico está constituido por técnicas de separación, extracción, y de medición (espectrofotometría, volumetría, colorimetría, potenciometría, etc.) que permiten medir la respuesta del analito en la muestra (CNQFB, 2000).

2.7.1. Parámetros de desempeño

Un parámetro de desempeño es un parámetro específico a estudiar en un protocolo de validación (CNQFB, 2000).

a) Linealidad. Habilidad para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática definida, son proporcionales a la concentración del analito, dentro de un intervalo determinado (CNQFB, 2000).

b) Precisión. Grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto o de una referencia (CNQFB, 2000).

- Repetibilidad ó precisión de un método analítico, es la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos instrumentos y método (CNQFB, 2000).

- Reproducibilidad es la precisión de un método analítico, concordancia entre determinaciones independientes realizadas por diferentes laboratorios (CNQFB, 2000).

c) Exactitud. Concordancia entre un valor obtenido empleando el método y el valor de referencia (CNQFB, 2000).

d) Selectividad. Habilidad de un procedimiento analítico para diferenciar entre varias sustancias en la muestra, es decir el grado al cual el método puede determinar al analito, sin interferencia de la matriz (CNQFB, 2000).

e) Limite de detección (LOD). Concentración mínima del analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas (CNQFB, 2000).

f) Limite de cuantificación (LOQ). Concentración mínima del analito, que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones de operación establecidas (CNQFB, 2000).

g) Porcentaje de recuperación. Es la eficiencia del método para detectar todo el analito presente en una muestra (CNQFB, 2000).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se han desarrollado diversos métodos para identificar las AFs en alimentos como cereales, frutos secos, productos agrícolas, especias, entre otros.

Se ha determinado la presencia de AFs en la leche de vaca para consumo humano (Carvajal et al., 2003 a,b; Kang'ethe & Lang'a, 2009), y en productos lácteos, y se han establecido límites de tolerancia legales para las AF en la leche. Hay reportes de contaminación de AF en la leche humana (Galvano et al., 2008; Ghiasian & Maghsood, 2012; Gong et al., 2003).

Se desconoce la contaminación de AF en la leche en polvo industrializada para lactantes (fórmulas Infantiles) en México, y la ingesta de grandes cantidades de AFs repercutiría en su salud, ya que sólo se alimentan de leche (Meucci et al., 2010). Se ha encontrado contaminación de AF en la leche de vaca y la leche materna podría presentar niveles considerables de AFs.

Por lo anterior, es importante desarrollar y validar un método analítico para la cuantificación de AFs en leche industrializada para lactantes humanos.

Las AFs están en cantidades trazas y deben cuantificarse e identificarse con precisión por una metodología analítica adecuada que es la HPLC. La HPLC compara las AF de las muestras con estándares conocidos y los identifica según su tiempo de retención.

IV. JUSTIFICACIÓN

El desarrollo de métodos precisos, específicos y sensibles para la determinación de AFM₁ en la leche para lactantes humanos requiere de métodos de análisis validados para proporcionar resultados confiables.

V. OBJETIVOS

General

La validación del método AOAC (2005) de extracción y cuantificación de AFM₁ con objeto de tener datos confiables acerca de la contaminación de AFM₁ en leches para lactantes.

Específico

Comprobación de los parámetros de validación: Linealidad (curvas de calibración de la aflatoxina M₁ (AFM₁), coeficiente de correlación (R^2), Límite de detección (LOD) del equipo, selectividad y porcentaje de recuperación

VI. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Si la leche en polvo para bebés proviene de leche de vaca y es conocido que ésta contiene al cancerígeno llamado AFM₁, es probable que la leche en polvo para bebés también contenga a esta micotoxina cancerígena.

VII. JUSTIFICACIÓN

Es importante conocer la cantidad de AFM₁ presente en la leche en polvo para bebés humanos ya que de 0 a 6 meses de edad beben leche como su único alimento y de 6 a 12 meses como el alimento más frecuente, de modo que si ésta contiene a la AFM₁ que es un cancerígeno y mutágeno, el riesgo de enfermedad aumenta.

VIII. METODOLOGÍA

8.1. Extracción de la AFM₁

La AFM₁ se extrae por aplicación de la muestra o porción de prueba (leche líquida o leche deshidratada reconstituida) a una columna de inmunoafinidad con anticuerpos monoclonales específicos ligados a un material de soporte sólido (agarosa). Así como la muestra pasa a través de la columna, los anticuerpos selectivamente se ligan a la AFM₁ presente para formar un complejo antígeno-anticuerpo. Los otros componentes de la matriz de la muestra son removidos de la columna con agua destilada. La AFM₁ es eluida de la columna con acetonitrilo (ACN) y cuantificada por HPLC en fase reversa con detección de fluorescencia.

Se tuvieron en cuenta, 0.5 µg de AFM₁ por litro como nivel máximo de tolerancia como lo establece la legislación de Estados Unidos, Canadá y México, y 0.05 µg L⁻¹ de AFM₁ como límite máximo, según lo establecido por los países de Europa Occidental.

8.2. Equipos

Sistema de cromatografía de líquidos (HPLC) incluyó equipo Agilent 1200 con Bomba (1200 DE 6295-7044), Inyector automático, Automuestreador (DE 6476-1666), Detector de fluorescencia (DE 6055-6380), columna HPLC (Agilent Eclipse X08 C18) de 4.6 x 250 mm, con 5 µm de tamaño partículas y Software (Chem Station 32) en computadora personal para el control del equipo y procesamiento de datos.

Centrífuga (ALC 4235 CWS, Milano, Italy), vórtex (Genie 2 Scientific Industries Inc. New York, USA), balanza granataria (Ohaus Triple Beam Balance, New Jersey, USA) y de precisión (Denver Instrument Co DE Series Model 100A, USA), espectrofotómetro (Genesys 10 UV Thermo Corp. Wisconsin, USA), Evaporador rotatorio, con control de vacío (Rotavapor Büchi RE111, Switzerland); Equipo de filtración Millipore o similar; Baño de vapor con temperatura controlada (BM-40T, BG México).

8.3. Materiales

Columnas de inmunoafinidad (Easi-Extract RP71/RP70N, R. Biopharm Rhône LTD, Glasgow, UK) para Aflatoxinas totales, tubos de centrifuga de 50 mL, vasos de precipitados de 100 mL; pipetas volumétricas de 50 mL, pipetas graduadas de 10 mL, propipeta auxiliar de macropipeteado, jeringas de vidrio de 50 mL y desechables de 5 mL con aguja, micropipetas (BIOHIT Proline CE Gottingen, Germany) de 10 a 5 mL, puntas para micropipeta, filtros para solventes orgánicos de 47 mm y poro de 0.45 μm ; Filtros para solventes acuosos de 47 mm y poro de 0.45 μm , matraces aforados color ámbar de 5, 25 y 100 mL, viales ámbar de 5 mL con tapón, matraces Erlenmeyer de 250 mL, celdas de cuarzo para espectrofotómetro de 1 cm de paso de luz, pipetas Pasteur; papel filtro Whatman No. 4 o equivalente.

Reactivos. ACN ($\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$) grado HPLC, 2-Propanol (isopropanol) grado HPLC, agua (H_2O) destilada y grado HPLC, ácido acético glacial y estándares de AFs certificados (Sigma-Aldrich, Edomex, México). Los reactivos de pureza HPLC.

Condiciones. Para llevar a cabo el método se fijaron los siguientes parámetros cromatográficos de acuerdo con (OPS, 1983): Velocidad de flujo a 1 mL min^{-1} , volumen de inyección de 60 μL ; Detector de fluorescencia Excitación: 360 nm. Emisión: 425 y 450 nm. Temperatura 22 $^\circ\text{C}$. tiempo de corrida 30 minutos, Columna Zorbax Eclipse C-18 5 μm

Preparación de la solución base de 1000 ng de estándares de AF. Se transfirió una alícuota de 0.5 mL del estándar de AFM_1 a una celda de cuarzo y se registró en el espectrofotómetro a 357 nm, usando metanol para completar 1 mL. Se midió la absorbancia de la solución a la longitud de onda de 357 nm. Se hizo una concentración de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (= 1000 ng) de AFM_1 empleando la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración } (\mu\text{g/mL}) = \frac{\text{Absorbancia a 362 nm} \times \text{Peso molecular} \times 1000}{\text{Coeficiente de extinción}}$$

Donde: El peso molecular de la AFM_1 (328 mg/mL) y el coeficiente de extinción para la AFM_1 (21,250). Almacenar esta solución en el congelador por un máximo de 2 años, pero verificar su concentración cada 6 meses. Antes de usar esta solución permitir que

alcance la temperatura ambiente. Esta solución tiene una concentración de aproximadamente $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (= 1000 ng).

Preparación de la solución derivatizante. El estándar de AFM₁ se evaporó a sequedad y se resuspendió con 200 μL de acetonitrilo (ACN), y con objeto de aumentar su fluorescencia se adicionaron 800 μL de solución derivatizante. La solución derivatizante consistió en 5 mL de ácido trifluoroacético (ATF) (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA) + 2.5 mL ácido acético glacial (Merck, Naucalpan, Edo. Mex., México) + 17.5 mL de agua desionizada, para obtener una concentración final de TFA de 20% (v/v), se agitó la mezcla en un agitador orbital (Vortex G-560, Bohemia, NY, EUA) por 30 segundos.

Los viales con la solución derivatizante se mantuvieron en un baño María a 65 °C por 10 minutos según describen Akiyama *et al.* (2001) y Kok (1994). Posteriormente se llevaron a temperatura ambiente y se inyectaron 60 μL en el cromatógrafo de líquidos (HPLC) con loop de 20 μL para su análisis.

Preparación de Solución Buffer de Fosfatos: Se pesaron 0.2 g de cloruro de potasio, 0.2 g de fosfato de potasio monobásico, 1.6 g de fosfato de sodio monobásico anhidro, 8 g de cloruro de sodio y 0.05 g de azida de sodio, se transfirió a un matraz volumétrico de 1000 mL con aproximadamente 950 mL de agua destilada, mezclaron y disolvieron, usando agitador magnético. Llevar a volumen de 4 L con agua y ajustar el pH a 7.4.

8.4. Extracción de AFM₁ de las muestras de leche.

El análisis se realizó únicamente con tres tipos diferentes de leche industrializada para lactantes (fórmula), las cuales se muestran en la tabla 8.

Debido a que el estudio de cada una de las marcas de tipo de formulas infantiles es extenso y debido al tiempo requerido, el análisis completo de las aproximadamente 20 marcas de leche se continua en otro proyecto.

Tabla 8. Marcas de leche en polvo industrializada para lactantes (fórmula) utilizadas para el estudio.

Formula Infantil	Marca	Edad	Clasificación
Enfamil formula infantil	Enfamil	0-6 meses	Formula de inicio
Nutricia Aptamil	Danone®	0-6 meses	Formula de inicio
Nursoy gold	Wyeth®	0-9 meses	Formula de inicio

Se colocaron 50 g de la muestra de leche en polvo para lactante con 200 mL de metanol/ agua (80:20 v/v), se licuó durante 2 min a velocidad alta. La muestra licuada se centrifugó por 10 min a 4300 rpm. El sobrenadante (extracto) se colocó en un matraz volumétrico de 10 mL y la fase acuosa se desechó. Se tomaron 4 mL del sobrenadante y se diluyeron con 28 mL de PBS, lo que corresponde a 1 g de la muestra.

- **Dilución.** Para estabilizar la AF contenida en la matriz alimenticia, se tomaron 4 mL (= 1 g) del extracto y se diluyeron con 28 mL de buffer salino fosfatado (PBS) pH 7.4 para proteger a los anticuerpos de la columna.
- **Elución/adsorción.** Para equilibrar la columna de Inmunoafinidad EASI EXTRACT®, previamente se aplicaron 20 mL de PBS y posteriormente todo el extracto diluido a una velocidad de flujo de 5 mL/min (Anónimo, 2012). La columna se lavó con 20 mL de agua destilada y se dejó pasar aire a través de ésta para eliminar el agua del eluido. Las AF se eluyeron lentamente con 1.5 mL de metanol HPLC (100% puro) dejando pasar aire a través de la columna hasta recoger las últimas gotas del eluido en viales ámbar.
- **Detección.** El eluido de AF se evaporó a sequedad a 40°C en horno durante 2 días y después se derivatizó para incrementar la fluorescencia. La derivatización comprende añadir 200 µL de Acetonitrilo y 800 µL de ácido trifluoroacético. Las muestras se agitan en vortex por 30 seg y se colocan los viales cerrados en baño María a 65 °C durante 10 min, se llevan a temperatura ambiente y se inyectan 200 µL en el HPLC por triplicado, poniendo el eluido en un inserto.

8.5. Validación del método para cuantificar la AFM₁

Para el análisis de la AFM₁ se utilizó inicialmente un método por HPLC que está basado en el Reglamento-184-SSA-1-2000 de México para AFM₁ en leche, fórmula láctea, o producto lácteo combinado con columna de inmunoafinidad y cuantificada por cromatografía de líquidos (HPLC), ajustado con el método Oficial de AOAC (AOAC, 2005) para leche en polvo.

Debido a que el método de la AOC no especifica un coeficiente de variación para los parámetros a evaluar, y al trabajar con concentraciones trazas. Se estableció el coeficiente de variación según Hortwits.

Este coeficiente de variación (CV) puede ser justificado por la baja concentración del analito mediante la ecuación de Hortwitz se permite un CV hasta de 10.48.

$$CV=2^{((1-0.5\log C))}$$

Donde C es la concentración expresada en %

Concentración en mg/mL= 0.001 mg/MI

Concentración en %= 0.0001%

Por lo tanto: $CV=2^{((1-0.5\log^{0.0001}))} = 8.0$

El coeficiente de variación debe ser ≤ 8.0

Los parámetros requeridos para la validación de la AFM₁ según el método Oficial de AOAC fueron: Linealidad, Porcentaje de Recuperación, Límite de Detección (LOD) y de cuantificación (LOQ), precisión, repetibilidad y selectividad.

Para la validación se realizaron dos curvas de calibración; la primera se realizó para determinar el LOD y LOQ por lo que se utilizaron concentraciones bajas desde 0.05 hasta 128 ng/mL (0.05, 0.1, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 ng/mL) a partir de una solución stock de 1000 ng/mL se tomaron alícuotas para hacer soluciones de 100 y 128 ng/mL, a partir de la solución de 100 ng/mL se tomaron alícuotas de 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 y 6.4 en matraces volumétricos de 10 mL para las concentraciones de 1, 2, 4, 8, 16, 32 y 64 ng/mL respectivamente, se prepara además una solución de concentración de 10 ng/mL para tomar dos alícuotas de 0.1 y una de 0.5 en matraces volumétricos de 10 mL para hacer las concentraciones de 0.1, 0.5 y 0.05 ng/mL.

La segunda curva de calibración se realizó haciendo diluciones de la misma solución estándar de 1000 ng/mL. De la concentración stock se hicieron las siguientes diluciones; se toma una alícuota de 1 mL y se aforo en un matraz volumétrico de 50 mL para la concentración de 20 ng/mL, posteriormente se tomaron alícuotas de 0.4, 0.6, 1.0, 1.4 y 2.0 y se aforaron en matraces de 10 mL para las concentraciones de 40, 60, 100, 140 y 200 ng/mL respectivamente, dicha curva se utilizó para la determinación de la Linealidad del sistema y el porcentaje de recuperación. Las diluciones se secaron en la estufa a 40°C. Posteriormente se resuspendieron con 200 µL de ACN y 800 µL de ácido trifluoroacético, se agitaron en vortex por 30 seg. Y se calentaron en baño María a 65°C por 10 min se dejaron enfriar a temperatura ambiente, para finalmente inyectar 60 µL al HPLC por triplicado.

8.5.1. Validación del Sistema.

Límites de Detección (LOD) y de Cuantificación (LOQ). Para la determinación, se realiza con preparaciones de muestras a concentraciones bajas conocidas a diferentes niveles de concentración y por triplicado, se prepara un blanco y se miden las señales de las soluciones preparadas.

A partir de la concentración de 1000 ng/mL del estándar de AFM₁, se hacen concentraciones desde 0.05 hasta 128 ng/mL (0.05, 0.1, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 ng/mL) para obtener una curva de calibración de AFM₁ de donde se obtendrá el Límite de detección (LOD) mínimo que da el equipo y que será confiable, abajo del cual ya los

análisis no son confiables y se ponen como <LOD que equivale a cero. EL LOD corresponde a la concentración mínima a la cual el analito es detectado con una relación señal-ruido 3:1. El LOQ se calcula de 4 a 10 veces el LOD.

Linealidad del sistema. Para el estudio de la linealidad del sistema se preparó una curva de calibración en un intervalo de concentración desde 20 hasta 200 ng/mL (20-200 %) que incluyó 6 niveles de concentración, el análisis se realizó por triplicado. Con los resultados obtenidos se construyó una gráfica de área vs concentración y se determinaron los siguientes parámetros: pendiente (b_1), ordenada al origen (b_0), coeficiente de determinación (r^2), promedio (\bar{y}), la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV).

Precisión del sistema. Se preparó por dilución una solución que corresponde al 100% de la concentración del analito en la curva, se tomaron 200 μ L de la solución, se colocó en un vial y se inyectó por sextuplicado. Posteriormente se determinó el promedio (\hat{y}), la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV).

Repetibilidad. Este estudio se realizó por quintuplicado a una muestra de concentración única que representó el 100.0 % de la cantidad teórica. Se determinan los mismos parámetros que en la Precisión de Sistema.

8.5.2. Validación del método.

Porcentaje de recuperación, Linealidad del método e intervalo. La determinación se realizó mediante la preparación de muestras enriquecidas o adicionadas, utilizando la mitad de la muestra analítica que originalmente requiere el método y se adicionó el analito (AFM₁) hasta completar el 100% de éste en la muestra. Se seleccionaron 5 niveles de concentración y las muestras adicionadas se prepararon por triplicado a cada nivel manteniendo constante la cantidad de muestra. Los niveles corresponden al 40, 60, 100, 140 y 200%.

Se determinaron los siguientes parámetros: el % de recobro, el promedio aritmético (\bar{y}), la desviación estándar (S), el coeficiente de variación (CV) y el intervalo de confianza para la media poblacional (IC μ) del % de recobro

Selectividad. Para verificar la habilidad del procedimiento de diferenciar entre varias sustancias de la muestra, se analizaron los cromatogramas blanco, del estándar y de los extractos obtenidos de la matriz (leche en polvo) después de enriquecerla con AFM₁, por el proceso de extracción de AF descrito y se compararon los cromatogramas obtenidos.

- a. Se seleccionó la muestra más contaminada marca Nursoy gold, Wyeth®, como matriz, se pesó un gramo y se enriqueció con 100 ng de AFM₁, se tomaron 200 µL en un inserto para su análisis por HPLC en el automuestreador por triplicado
- b. Del estándar de 100 ng AFM₁ se tomaron 200 µL en un vial para realizar el análisis
- c. Se mezclaron 100 µL de la muestra Nursoy derivatizada y 100 µL del estándar de 100 ng de AFM₁, y se pusieron en el inserto de un vial para su análisis de HPLC.

8.6. Determinación de la concentración de AFM1 en las muestras de leche

Antes de realizar la determinación de la concentración de AFM1 en las muestras de leche se procedió primero a realizarles el tratamiento previo para la extracción de la aflatoxina el cual se describe en el apartado 8.4 y después se realizó el análisis cromatográfico.

En el cromatograma obtenido para las muestras, se identificó el pico que correspondía a la AFM1 esto se hizo con el cromatograma obtenido para la solución estándar de 100 ng/mL de AFM1 que se inyectó. Se compararon las áreas de los picos para determinar la concentración de AFM1 presente en la muestra.

Todos los resultados obtenidos fueron evaluados estadísticamente con la ayuda del programa Origin Versión 5.0 para Windows.

IX. RESULTADOS

9.1. Validación

9.1.1. Límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ). La solución base de 1 $\mu\text{g/mL}$ (=1000 ng/mL) se obtuvo con precisión y se realizó la curva de calibración con 10 concentraciones (0.1, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 y 128 ng/mL)

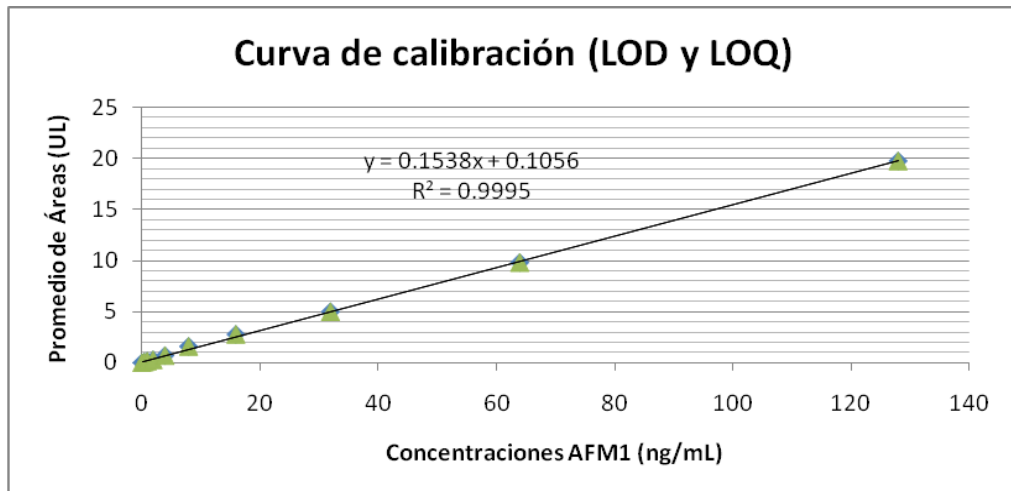
No obstante que se usaron diluciones de 0.01, 0.05 ng/mL , el LOD estuvo en 0.1 ng/mL (**Figura 5**), que es cuando ya se detectó el pico de la AFM_1 que se hizo más evidente con 128 ng/mL (**Figura 6**). Además considerando que El LOQ equivale de 4 a 10 veces el LOD por tanto es de 0.4 ng/g (MSCR, 2002).

En la tabla 9 se muestran las concentraciones usadas para la determinación del Límite de detección y cuantificación, se realiza la curva a por lo menos 10 concentraciones bajas cada una por triplicado, sin embargo solo se reportan los valores promedios de las tres repeticiones para la determinación del gráfico (grafica 1), así como sus tiempos de retención.

Tabla 9. Concentraciones para formar la curva de calibración de AFM_1 (rangos en tiempos de retención 8.514-8.769 min)

Concentración de AFM_1 (ng/mL)	Promedio	
	Área (UL)	Tiempo de retención (min)
0.1	0.0160	8.514
0.5	0.0891	8.556
1	0.1716	8.525
2	0.3023	8.563
4	0.7121	8.638
8	1.6158	8.691
16	2.7981	8.745
32	5.0142	8.769
64	9.8421	8.757
128	19.8034	8.685

A continuación se muestra el gráfico de regresión de la curva de calibración formada para la determinación del límite de detección (LOD) y cuantificación (LQ), el valor de la pendiente y la ecuación de la recta



Grafica 1. Curva estándar para la determinación del Límite de detección y Límite de cuantificación

Tabla 10. Determinación Límite de Detección (LOD)

Muestra	Área	Concentración (ng/mL)	Área
Blanco o Ruido	0.0051	0.1	0.016
3*Ruido	0.0153		

Tabla 11. Determinación Límite de Cuantificación (LOQ)

Muestra	Área	Concentración (ng/mL)	Área
Blanco o Ruido	0.0051	0.4	0.057
10*Ruido	0.051		

Figuras 4, 5 y 6: Se muestra la comparación de los cromatogramas de un blanco, cuando ya se comienza a detectar la AFM1 y la señal de aflatoxina a la mayor concentración de la curva.

Figura 4. Cromatograma blanco

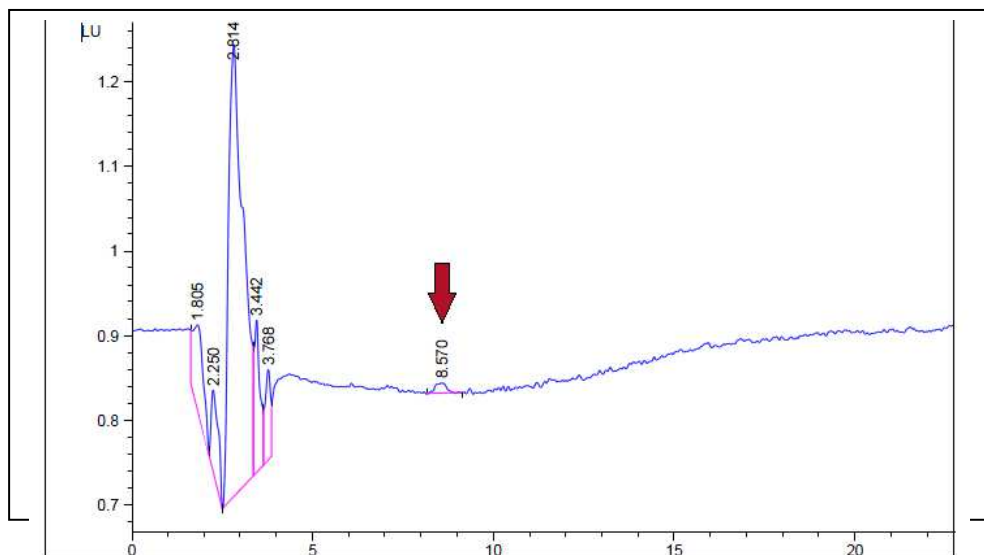
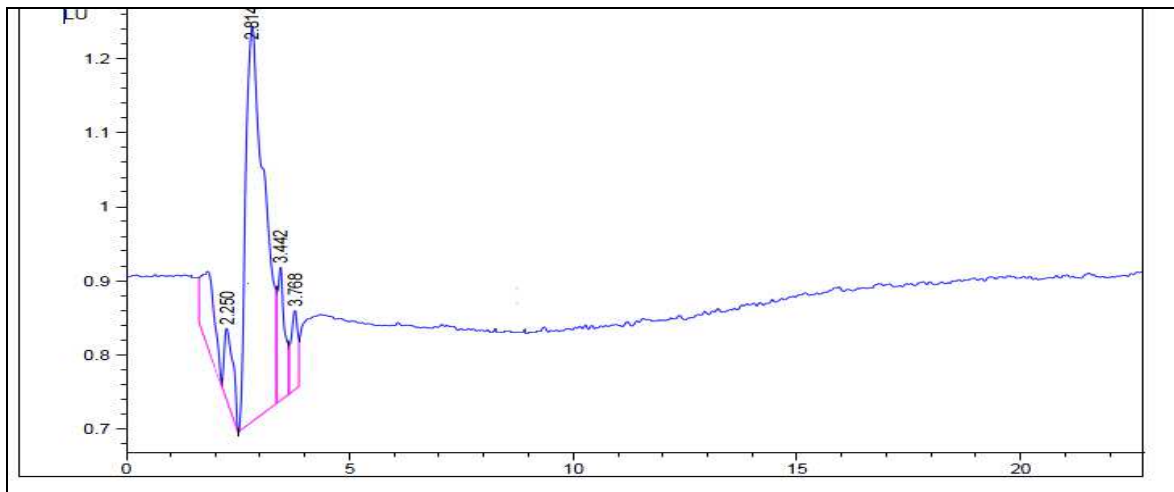


Figura 5: L

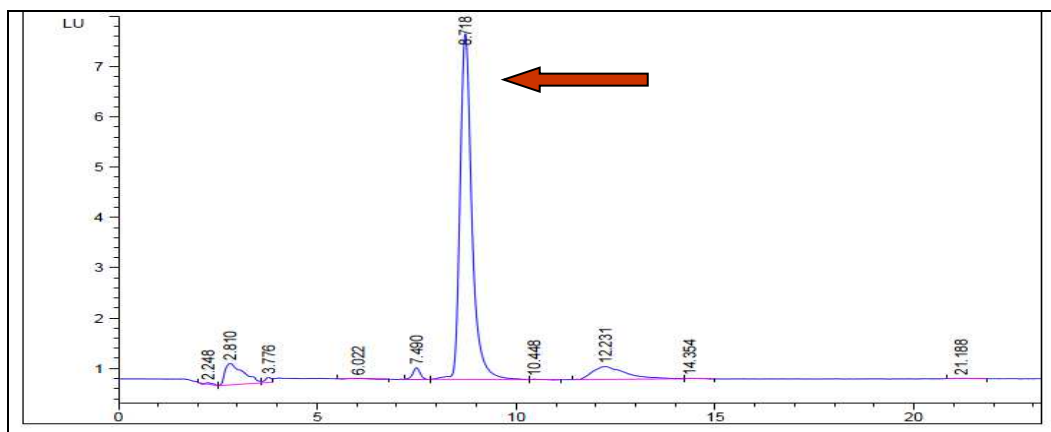


Figura 6. Pico cromatográfico evidente de la dilución 128 ng/mL AFM1 estándar, en tiempo de retención 8.718 min de la curva de calibración.

9.1.2. Linealidad del sistema.

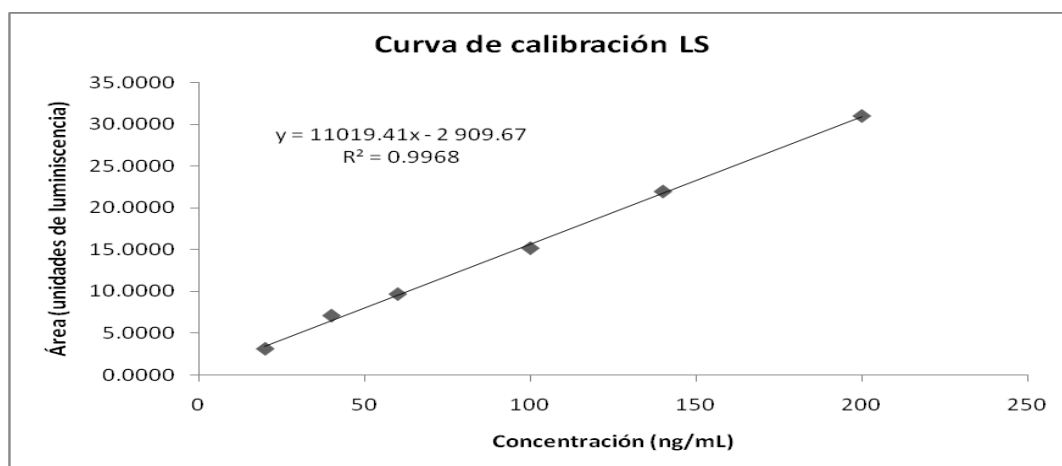
Para la determinación de la Linealidad del sistema se realizó una segunda curva de calibración con 6 niveles de concentración con tres niveles inferiores y dos niveles superiores de la concentración del analito que incluyen al 100%.

En la tabla 12 se presentan las concentraciones para formar la curva de calibración de AFM₁, así como los valores de Área, promedio (\bar{y}), desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV) para determinar la linealidad del sistema. Además se comprueba que el coeficiente de variación entre cada nivel es menor del 2%.

Tabla 12: Linealidad: Concentraciones para formar la curva de calibración de AFM₁ (rango de TR 8.514-8.769 min)

Concentración AFM ₁ (ng/mL)	Área	Promedio (\bar{y})	Desv. Estándar (S)	Coef. de variación (CV)
20	3.0151	3.0822	0.0594	1.9268
20	3.1035			
20	3.1280			
40	7.2018	7.0600	0.1235	1.7487
40	7.0018			
40	6.9764			
60	9.7890	9.6430	0.1356	1.4062
60	9.6190			
60	9.5210			
100	15.319	15.1420	0.1673	1.1050
100	15.1207			
100	14.9864			
140	21.9560	21.9357	0.1287	0.5868
140	21.7980			
140	22.0530			
200	30.4260	30.9906	0.5086	1.6412
200	31.4130			
200	31.1327			

En la gráfica 2 se muestra la curva de calibración obtenida para la linealidad del sistema, se reporta además la ecuación y el coeficiente de determinación (r^2), éste último parámetro determina si el sistema es lineal o no.



Gráfica 2. Curva de calibración estándar para determinar la Linealidad del sistema

9.1.3. Precisión del Sistema.

Para la determinación de la precisión del Sistema se medirá la variabilidad de la respuesta a una concentración específica de la sustancia de referencia. Y se realiza con la concentración de 100 ng/mL

En la tabla 13 se muestran los valores de área, a una concentración de AFM1 de 100 ng/mL, así como también se presentan los valores de promedio (\bar{y}), desviación estándar (S) y coeficiente de variación (CV) que al ser menor al coeficiente propuesto anteriormente con la fórmula de Horwits indica que existe precisión en el sistema.

Tabla 13. Valores de área obtenidas para la determinación de la Precisión del Sistema

Concentración (ng/mL)	Área
100	14.0887
100	14.2659
100	15.3190
100	14.6127
100	15.3190
100	15.2813
Promedio	14.8144
(S)	0.5649
C.V	3.81 %

9.1.4. Repetibilidad (Repetitividad)

La determinación de Repetibilidad se realizó con la misma prueba de precisión del sistema a una concentración única que representa el 100% de la concentración teórica, sin embargo únicamente se realizó por quintuplicado. Y se determinan los mismos parámetros de la Precisión que se muestran en la tabla 14

Tabla 14. Resultados de área y valores obtenidos para determinar la Repetibilidad del sistema

Concentración (ng/mL)	Área	Repetibilidad	
100	14.0887		
100	14.2659		
100	15.3190		
100	14.6127	Prom (\bar{y})=	14.7211
100	15.3190	(S)=	0.5775
100	15.2813	C.V.=	3.92 %
Promedio (\bar{y})	14.8144		
(S)	0.5649		
C.V.	3.81 %		

9.1.5. Porcentaje de recobro, linealidad del método e intervalo

Para determinar éste parámetro se ocuparon los mismos niveles de concentración que se utilizaron para la Linealidad del Sistema, pero únicamente se adicionaron muestras a partir del nivel del 40% para así formar la curva que nos servirá en la determinación de la Linealidad del Método y seleccionando al menos 2 niveles superior e inferior de la cantidad del analito (Intervalo), preparando las muestras adicionadas por triplicado a cada nivel y manteniendo constante la cantidad de la muestra.

En la tabla 15 se muestran los valores tomados para la determinación de la cantidad adicionada a cada muestra y la cantidad teórica que se pretende obtener considerando que se realiza el análisis utilizando la mitad de la muestra que originalmente ocupa el método

Tabla 15. Determinación de la cantidad adicionada (muestras enriquecidas) en cada nivel para formar la curva y determinar el porcentaje de recuperación

Nivel	Concentración (ng/mL)	Cantidad de muestra (gr)	Contenido de AFM1 en la muestra (ng/mL)	Cantidad Adicionada de AFM1 (ng/mL)
40	40	0.5	30	10
60	60	0.5	30	30
100	100	0.5	30	70
140	140	0.5	30	110
200	200	0.5	30	170

Los valores de porcentaje de recobro para determinar la linealidad del método se presentan en la tabla 16. La gráfica de cantidad adicionada contra cantidad recuperada así como los parámetros requeridos y especificaciones para la determinación de éste parámetro (**tabla 17**).

Tabla 16. Valores de porcentaje de recobro obtenidos para la linealidad del método, por cada nivel de concentración.

Nivel (%)	Cantidad Adicionada (ng/mL)	Cantidad Recuperada (ng/mL)	% Recobro
40	10	9.98651	99.87
40	10	10.1356	101.36
40	10	10.0230	100.23
60	30	30.3121	101.04
60	30	30.4650	101.55
60	30	29.9810	99.94
100	70	70.8750	101.25
100	70	69.9653	99.95
100	70	68.8530	98.36
140	110	108.8652	98.97
140	110	109.7540	99.78
140	110	108.8653	98.97
200	170	168.6530	99.21
200	170	170.7643	100.45
200	170	166.9643	98.21

La Grafica 3. Curva obtenida de cantidad adicionada contra cantidad recuperada para la determinación del porcentaje de recobro y Linealidad del Método.

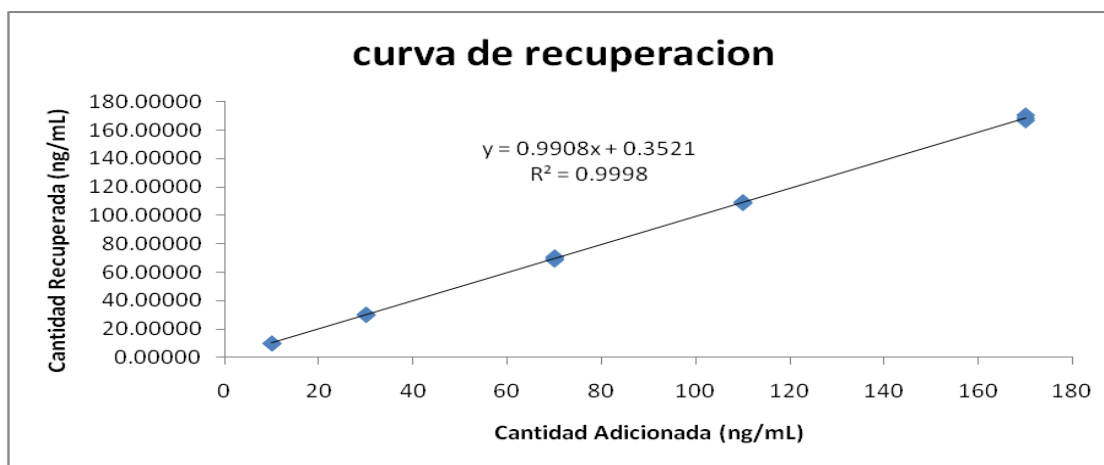


Tabla 17. Parámetros requeridos para la linealidad del método.

Parámetro	Especificación	Resultado
r2	≥ 0.98	0.9998
Promedio	98-102 %	99.94%
CV	≤ 2.0 %	1.06%
IC (μ)	Incluye el 100% o el promedio aritmético del % de recobro se incluye en el intervalo de 98-102	(98.02, 101.6)

9.1.6. Selectividad

Se realizó una comparación de los cromatogramas obtenidos del estándar de AFM₁ (100 ng), de la muestra de leche en polvo contaminada naturalmente con 60 ng de AFM₁, y finalmente la suma de la matriz enriquecida con el estándar de AFM₁ da una concentración de 161 ng a los mismos tiempos de retención y sin que se traslapan picos del estándar y la matriz, **Figuras 7 a 9**.

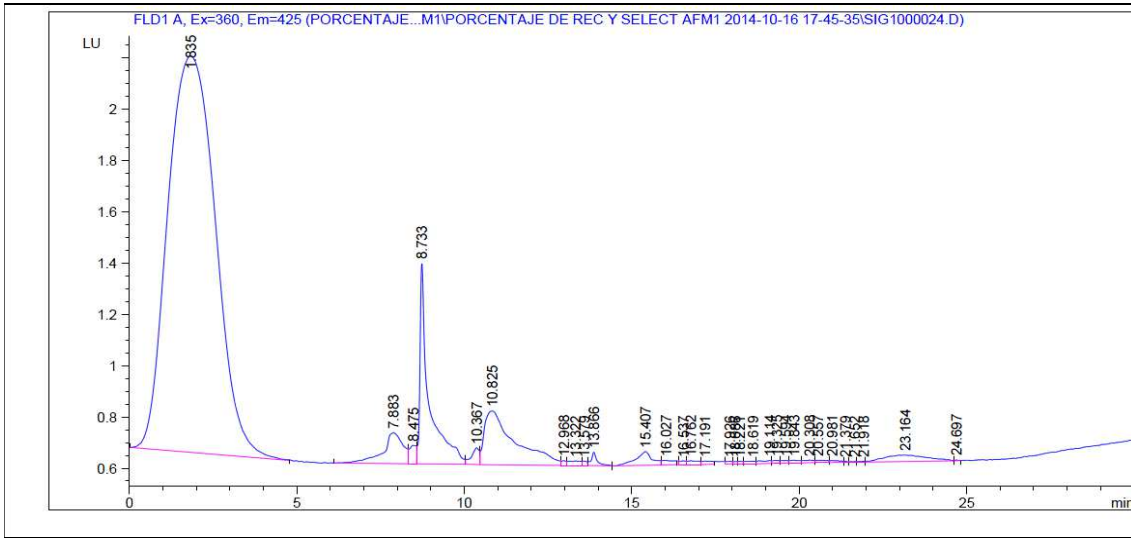


Figura 7: Estándar de 100 ng de AFM₁ sola con tiempo de retención 8.73 min .

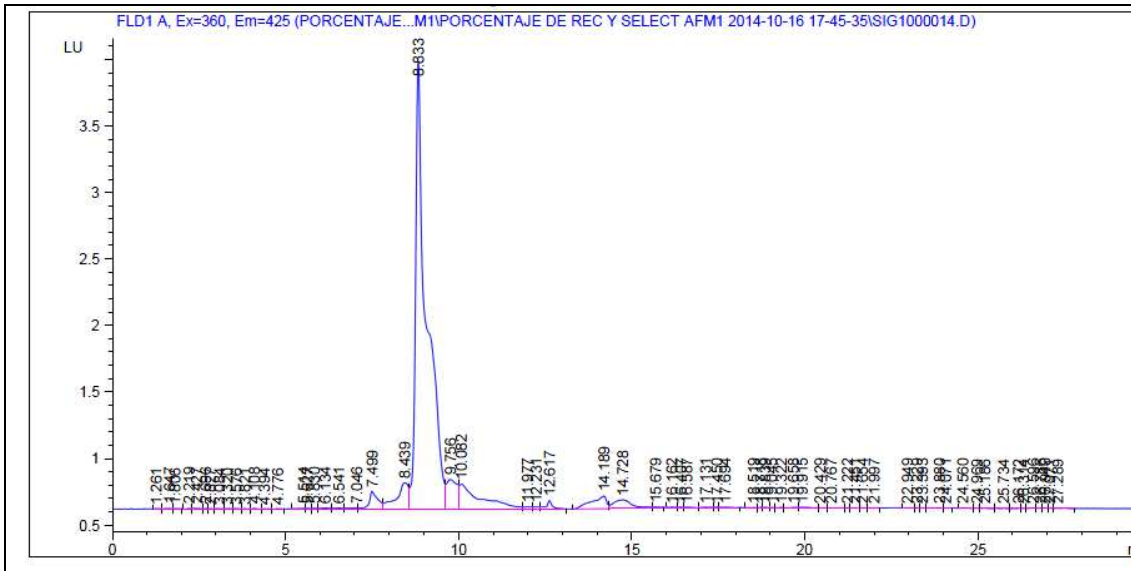


Figura 8: Muestra de leche en polvo sola que corresponde a una concentración basal natural de 60 mL⁻¹ de AFM₁

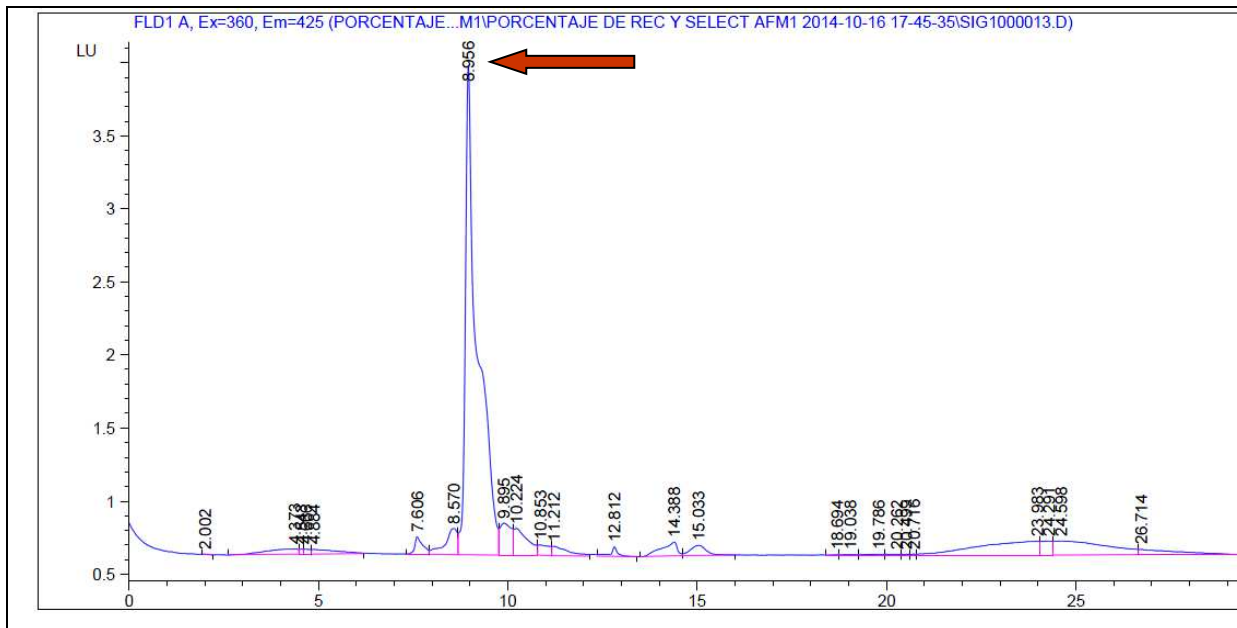


Figura 9: Muestra de leche en polvo con contaminación basal de 60 ng de AFM₁ + marcaje de 100 ng de estándar de AFM₁, con tiempo de retención 8.956 min.

9.2. Análisis de las muestras

En el cuadro siguiente se muestran los valores de área y concentración de AFM₁ obtenidos para cada una de las muestras de leche industrializada para lactante

Tabla 18. Determinación de la cantidad de AFM₁ en muestras de leche en polvo Industrializada para lactantes.

Muestra	T.R	Área	Promedio	Conc. (ng/mL)
1	7.007	6.14086		
1	8.107	6.79149		
1	7.077	7.45892	6.79709	30.4893
2	8.622	10.13132		
2	8.927	11.78895		
2	8.924	10.82496	10.91508	48.3416
3	8.944	20.04625		
3	8.907	18.73652		
3	8.878	18.64171	19.14149	60.1613

X. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Respecto a cada parámetro se aprecia que la linealidad se realizó con 10 diluciones del estándar de la AFM₁ con un rango de tiempos de retención de 8.139 a 8.842 min, y tuvo una regresión lineal con un coeficiente de correlación R² de 0.9834 que es muy bueno. El límite de detección fue de 0.1 ng /mL que es excelente, considerando que el LOQ teórico sería 0.4 ng/mL. la selectividad mostró que los picos de la matriz y del estándar de AFM₁ no se traslapan, sino que coinciden en el mismo rango de la AFM₁ con tiempos de retención de 8.733 a 8.833 min. El promedio de porcentaje de recuperación fue de 99.94 %.

Para la Linealidad del sistema, la curva de calibración a 357 nm resultó ser lineal en el intervalo de concentraciones comprendidos entre 8.0 y 200.0 ng/mL. Al aplicar el método de los mínimos cuadrados a los resultados registrados se obtuvo la ecuación de la recta que se expresó según $y = 11019,41 x - 2909,67$. El coeficiente de correlación lineal fue de 0.9968. Al aplicar la prueba de linealidad se obtuvo un valor de desviación estándar relativa del 0.22 % y el término independiente incluyo al cero.

La determinación de la precisión del sistema se realizó satisfactoriamente cumpliendo con el parámetro de aceptación del coeficiente de variación para muestras repetidas a una sola concentración, de lo cual también se deriva la repetitividad.

El porcentaje de recobro y la determinación de la linealidad del método con muestras cargadas, se muestra en la tabla 2, donde la pendiente de la curva de recuperación presentó un valor de 0,9972. La curva de recuperación mostró un comportamiento lineal dado por la ecuación de la línea recta y el coeficiente de correlación de 0.9998. La recuperación media fue del 99.94 %. Al aplicar la prueba de linealidad se obtuvo un valor de desviación estándar relativa igual al 1.0 % y el intervalo de confianza del término independiente incluyó el cero.

XI. OBJETIVOS Y METAS ALCANZADOS

Los objetivos plateados inicialmente se cumplen satisfactoriamente ya que se valida correctamente el método de extracción y cuantificación (AOAC 2005) de la AFM₁ tomando como matriz muestras de leche en polvo, lo anterior debido a que el método satisface los requisitos de la aplicación analítica deseada, cumpliendo con todos los parámetros requeridos.

La técnica analítica permitió además la comprobación de cada parámetro con la realización de diferentes curvas de calibración, para LOD, LOQ, Linealidad del sistema y % de recobro) con la comparación de cromatogramas para la selectividad del mismo, el procesamiento de datos y resultados arrojados verificando el cumplimiento de cada criterio de aceptación.

XII. CONCLUSIONES

El método AOAC (2005) permitió determinar satisfactoriamente el contenido de dicho compuesto en diferentes tipos de muestras de leche en polvo para lactante (fórmula), además de cumplir con todos los parámetros y requerimientos de validación por lo tanto, se valida correctamente proporcionando así resultados confiables.

El estudio de laboratorio para extracción y cuantificación de AFM1 consistió no solo en identificar y cuantificar a la misma (LOD y LOQ), se verifico también la Adecuabilidad del sistema concluyendo que el método es apto para su uso, y de acuerdo a los resultados arrojados, demostró ser lineal, específico, preciso, reproducible y con recobros óptimos.

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que la leche en polvo para lactantes (fórmula), efectivamente presenta contaminación por AFM1 al igual que el derivado de leche de vaca de acuerdo a los estudios antes realizados, sin embargo las cantidades de AFM1 presentes en las muestras analizadas son muy pequeñas, (prácticamente trazas ng/mL) por lo tanto, no existen datos significativos, para asegurar que dicha aflatoxina presente un riesgo significativo para la salud del pequeño lactante. Y es necesario realizar un estudio mucho más amplio de las muestras existentes en el mercado para poder así no solo determinar la cantidad de AFM1 sino también otros tipos de aflatoxinas presentes en las muestras y por tanto, obtener resultados contundentes.

XIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abdulrazzaq Y, Osman M, Yousif N, Zuhair M, Al-Falahi S. 2003. Aflatoxin M₁ in breast-milk of UAE (United Arab Emirates) women. *Journal Annals of Tropical Paediatrics*, 23:173-179.
- Akiyama H, Goda Y, Tanaka T, Toyoda M. 2001. Determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in spices using a multifunctional column clean-up. *Journal of Chromatography A*, 932:153-157.
- Amaro R, Gómez L, Vita Y. 2008. Guía de Métodos de Análisis por Cromatografía de líquidos de Alta Eficiencia. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela 1-17 pp.
- Anónimo. 2012. Easi-Extract aflatoxin. R-Biopharm Rhône LTD. RP71 RP70N/V12/28. 06.12. Glasgow UK. 1-12 pp.
- AOAC. 2005. Natural toxins in Official Methods of Analysis of AOAC international. Horwitz, W (Ed.). 17th edit. Trucksess MW. Chapter Ed. Chapter 49: Natural Toxins. Vol. II Food Composition Additives; Natural contaminants. Washington, DC. USA. 1-42.
- Asao T, Büchi G, Abdel-Kader MM, Chang SB, Wick EL, Wogan GN. 1963. Aflatoxins B and G. *Journal of American Chemistry Society*, 85: 1706-1707.
- Asao T, Büchi G, Abdel-Kader MM, Chang SB, Wick EL, Wogan GN. 1965. The structures of aflatoxins B₁ and G₁. *Journal of American Chemistry Society*, 87: 882-886.
- Baltaci C, Ilyasoglu H, Yuksel F. 2012. Single-Laboratory validation for the determination of Aflatoxin B₁, B₂, G₁ and G₂ in foods based on immunoaffinity column and liquid chromatography with postcolumn derivatization and fluorescence detection. *Food Analytical Methods*. Doi. 10.1007/s12161-012-9417-3
- 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*. 88:3063-3069
- Battacone G, Nudda A, Rassu SP, Decandia M, Pulina G. 2012. Excretion pattern of aflatoxin M₁ in milk of goats fed a single dose of aflatoxin B₁. *Journal Dairy Science*, 95(5):2656-2661.
- Bhatnagar D, Ehrlich KC, Clevel TE. 2003. Molecular genetics analysis and regulation of aflatoxin biosynthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61:83-93.
- Bucio-Villalobos CM, De Peña Guzmán D, Peña-Cabriaes JJ. 2001. Aflatoxin synthesis in corn fields in Guanajuato, México. *Latin American Journal of Mycology*, 18: 83-87.
- Boudra H., Barnouin J., Dragacci S., Morgavi D.P. 2007. Aflatoxin M₁ and Ochratoxin A in raw bulk milk from French dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 90:3197-31201.
- Caloni F, Stamatia A, Friggè G, De Angelis I. 2006. Aflatoxin M₁ absorption and cytotoxicity on human intestinal in vitro model. *Toxicon Journal*, 47:409-415.
- Carvajal M, Rojo F, Méndez I, Bolaños A. 2003 a. Aflatoxin M₁ in pasteurized and ultrapasteurized milk with different fat contents in México. *Journal of Food Protection*, 66: 1885-1892.

- Carvajal M, Rojo F, Méndez I, Bolaños A. 2003 b. Aflatoxin B₁ and its interconverting metabolite Aflatoxicol in milk. Situation in Mexico. *Food Additives and Contaminants*, 20 (11):1077-1086.
- CNQFB, Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biológicos (2000). Guía de validación de métodos analíticos. México.
- Comisión Europea, 2010. Commission Regulation. European Union (EU) N° 165/2010 of 26 February 2010 amending Regulation (EC) No.1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. European Commission.
- Duarte-Vogel S, Villamil-Jiménez LC. 2006. Micotoxinas en la Salud Pública Ensayo. *Rev. Salud pública. Sup. 8*: 129-135.
- Ellis W, Smith J, Simpson B. 1991. Aflatoxins in food: occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control. *Critical reviews in food science nutrition*, 30:403-439.
- Esqueda-Valle M, Higuera-Ciapara I, Nieblas J. 1995. Aflatoxin M1 in milk traded in Hermosillo, Sonora, México. Short Note. *Revista Mexicana de Micología* 11: 179-182
- Fernández-Oller, A. 2014 El cambio climático y la prevalencia de micotoxinas. *Agrinews. Nutrición. España*. Consultado el 23 de feb de 2015.
<http://agrinews.es/2014/06/03/cambio-climatico-y-prevalencia-de-micotoxinas/#prettyPhoto/0/>
- Galvano F, Pietri A, Bertuzzi T, Gagliardi L, Ciotti S, Luisi S, Bognanno M, La Fauci L, Lacopino AM, Nigro F, Li Volti G, Vanella L, Giammanco G, Tina GL, Gazzolo D. 2008. Maternal dietary habits and mycotoxin occurrence in human mature milk. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52:496-501.
- Ghazani M, Hosein M. 2009. Aflatoxin M1 contamination in pasteurized milk in Tabriz (northwest of Iran). *Journal Food and Chemical Toxicology*, 47:1624-162.
- Ghiasian S, Maghsood A. 2012. Infants' exposure to Aflatoxin M1 from mother's breast milk in Iran. *Iranian Journal Public Health*, 41:119-126.
- 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 & Contaminants Journal*; 22:9-14.
- Gimeno A, Martins ML. (2000). Residuos de micotoxinas en leche, huevos y tejidos comestibles de aves, cerdos y rumiantes (parte II), *Albéitar*, 37: 44-46.
- Gong YY, Egal S, Hounsa A, Turner PC, Hall AJ, Cardwell KF, Wild C.P. 2003. Determinants of aflatoxin exposure in young children from Benin and Togo, West Africa: the critical role of weaning. *International Journal of Epidemiology*. 32: 556-562.
- Henry SH, Whitaker T, Rabbani I, Bowers J, Park D, Price W, Bosch FX. 2001. Aflatoxin M1. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) 47.
- Horwitz W. 1982. Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs. *Analytical Chemistry* 54, 67A.
- IARC, International Agency for the Research on Cancer. 2002. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. Summary of data reported and evaluation. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk to Humans. International Agency for Research on Cancer. Lyon, France, 82:171.
- Kang'ethe EK, Lang'a KA. 2009. Aflatoxin B1 and M1 contamination of animal feeds and milk from urban centers in Kenya. *African Health Sciences*, 9: 218-226.

- Khoshpey B, Farhud DD, Zaini F. 2011. Aflatoxins in Iran: nature, hazards and carcinogenicity. *Iranian Journal Public Health*, 40:1-30.
- Klein CJ. 2002. Nutrient Requirements for Preterm Infant Formulas. *Journal of Nutrition*, 1(132): 1395S-1577S.
- Kok WTh. 1994. Derivatization reactions for the determination of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 659: 127-137.
- Kuiper–Goodman T. 1990. Uncertainties in the risk assessment of three mycotoxins: aflatoxin, ochratoxin and zearalenone. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 68: 1071-1024.
- LSRO, Life Sciences Research Office. 1998. Assessment of nutrient requirements for infant formulas. *The Journal of Nutrition*; 128: 20595-20935.
- Lutz WK, Jaggi W, Luthy J, Sagelsdorff P, Schlatter C. 1980. In vivo covalent binding of aflatoxin B₁ and M₁ to liver DNA of rat mouse and pig. *Chemical Biological Interactions*, 32: 249-256.
- Manonmani HK, Anand S, Chandrashekar A, Rati ER. 2005. Detection of aflatoxigenic fungi in selected food commodities by PCR. *Process Biochemistry*, 40: 2859-2864.
- Meucci V, Razzuoli E, Soldani G, Massart F. 2010. Mycotoxin detection in infant formula milks in Italy. *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*; 27: 64-71.
- Motawee MM, Bauer J, McMahan DJ. 2009. Survey of Aflatoxin M₁ in cow, goat, buffalo and camel milks in Ismailia-Egypt. *Environmental Contamination and Toxicology*, 83:766-769
- MSCR, Ministerio de Salud de Costa Rica. 2002. Guía de Validación de Métodos Analíticos. GUIA-01. Consultado el 18 de noviembre de 2015 en: http://www.netsalud.sa.cr/ms/drc/pciudadano/guia_01.doc.
- Offiah N, Adesiyun A. 2007. Occurrence of aflatoxins in peanuts, milk, and animal feed in Trinidad. *Journal of Food Protection*, 70:771-775.
- OPS-OMS, Organización Panamericana de la Salud/ Organización Mundial de la Salud. 1983. Criterios de la salud ambiental Micotoxinas 11. *Publicación Científica 453*, Washington, USA. 1-131.
- Oyelami OA, Maxwell SM, Adelusola KA, Aladekoma TA, Oyelese AO. 1998. Aflatoxins in autopsy kidney specimens from children in Nigeria. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 55:317-323.
- Periaca M, Radiç B, Lucić A, Pavlović M. 1999. Efectos tóxicos de las micotoxinas en el ser humano. *Bulletin of the World Health Organization*, 77 (9): 754-766.
- Pharmacopoeia Convention, Inc. 2007. United States Pharmacopoeia 30/ National formulary 25. Rockeville, MD: US Pharmacopeial Convention, Inc., 2872-2883.
- Pier DC. 1987. Aflatoxicosis and immunosuppression in mammal animals. In: Zuber, M.S., Lillehoj, E.B., Renfro, B.L. (Eds). *Aflatoxins in maize: A proceedings of the workshop*. CIMMYT, México. 58-65.
- RD, 2009. Actualización en 2009 del Real Decreto 475/2007 del 13 abril de 2007. CNAE (Clasificación Nacional de Actividades Económicas 2009. BOE 102 Madrid España. pp 18572-18573.
- Sargeant K, O'Kelly J, Carnaghan RBA, Allcroft R. 1961. The assay of a toxic principle in certain groundnut meals. *Veterinary Records*, 73: 1219-1222.

- Stroka, J., Otterdijk, R. y Anklam, E. 2000. Immunoaffinity column clean-up prior to thin-layer chromatography for the determination of aflatoxins in various food matrices. *Journal of Chromatography A*, 904: 251-256.
- Sugiyama K, Hiraoka H, Sugita-Konishi Y. 2008, Aflatoxin M₁ Contamination in raw bulk milk and the presence of Aflatoxin B₁ in corn supplied to dairy cattle in Japan. *Food Hygiene and Safety Science Journal*, 49:352-355.
- Sweeney MJ, Dobson ADW. 1999. Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters*, 175:149-163.
- Tekinşen KK, Semih EH. 2008. Aflatoxin M₁ levels in ultra high temperature milk and kashar cheese consumed in Turkey. *Journal Food and Chemical Toxicology*. 46:3287-3289.
- Tomerak RH, Shaban HH, Khalafallah OA, El Shazly MN. 2011. Assessment of exposure of Egyptian infants to aflatoxin M₁ through breast milk. *Journal of the Egyptian Public Health Association*; 86:51-55.
- Turconi G, Guarcello M, Livieri C, Comizzoli S, Maccarini L, Castellazi AM, Pietri A, Piva G, Roggi C. 2004. Evaluation of xenobiotics in human milk and ingestion by the newborn--an epidemiological survey in Lombardy (Northern Italy). *European Journal of Nutrition*, 43: 191-197.
- Unusan N. 2006. Occurrence of aflatoxin M₁ in UHT milk in Turkey. *Journal. Food and Chemical Toxicology*, 44:1897-1900.
- Van Egmond H. 1989. *Mycotoxins in dairy products*. Elsevier Books, London.11-56.
- Veldman A, Meijst JAC, Borggreve CJ, Heeres Van der Tol JJ. 1992. Carry-over of aflatoxin for cows' food to milk. *Animal Production*, 55(2): 163-168.
- Wakhisi J. 1980. Exposure of rat offspring to aflatoxin risks through suckling mothers dosed with aflatoxin B₁. *Journal of Toxicology Toxin Reviews*, 8 (1-2): 275-280.
- WHO, World Health Organization. 1999: Standard for infant formula (Draft). *Codex Alimentarius; ALINORM 99:46-54*.
- Zinedine A, González-Osnaya L, Soriano JM, Moltó JC, Idrissi L, Mañes J. 2007. Presence of aflatoxin M₁ in pasteurized milk from Morocco. *International Journal of Food Microbiology*, 114:25-29.

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS**

"Validación de un método para cuantificar la aflatoxina M1, en leche en polvo industrializada para lactantes humanos por cromatografía de líquidos."

PERTENECE AL PROYECTO GENÉRICO

"Evaluación de productos relacionados con la salud "

SERVICIO SOCIAL

**Equivalente a Tesis, para obtener el grado de Licenciatura de
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

Alumna

María Teresa Sánchez Estrada
Matrícula: 204205256

Lugar de realización: Lab de Micotoxinas C-119. Departamento de Botánica,
Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México

Asesora Externa: Dra. Magda Carvajal Moreno.

Asesora Interna: M. en C. María Luisa Margarita Vázquez Ramírez

DATOS PERSONALES

Alumno: María Teresa Sánchez Estrada

Teléfono: 55 25 14 07 87

Dirección: Calle Jacarandas Mz. 14 Lt 5, Col. Margarito F. Ayala, Ecatepec de Morelos
Estado de México.

Fecha de inicio de Servicio Social: 11 de Marzo de 2013

Fecha de término de Servicio Social: 11 de Septiembre de 2013

INTRODUCCIÓN

Las micotoxinas son toxinas de hongos y las más importantes son las aflatoxinas (AF). Las AF son metabolitos secundarios producidas principalmente por los hongos *Aspergillus flavus* Link, *A. parasiticus* Speare y *A. nomius* Kurtzman (Manonmani *et al.*, 2005), que se desarrollan y contaminan los alimentos, en el campo, durante el procesamiento y almacenamiento con condiciones adecuadas de luz, temperatura, humedad y pH. No se sabe con certeza la función de las AF para el hongo, algunos autores las consideran como venenos con la función de proteger al hongo contra la predación y la competencia (Kang'ethe *et al.*, 2009), otros consideran que son mecanismos de defensa contra otros hongos. Su nombre viene de A = *Aspergillus*, fla = *flavus* y toxina = veneno.

Se han identificado alrededor de 20 tipos de AF que químicamente corresponden a bis-dihidro-furanocumarinas. Las principales AF son la aflatoxina B₁ (AFB₁), aflatoxina B₂ (AFB₂), aflatoxina G₁ (AFG₁) y la aflatoxina G₂ (AFG₂), siendo la AFB₁ la más frecuente y tóxica.

Dichas AF se nombran por el color de su fluorescencia, la AFB₁ y AFB₂ presentan fluorescencia azul intenso bajo la luz ultravioleta de onda larga, mientras que la AFG₁ y AFG₂ presentan fluorescencia amarilla verdosa.

Las AFM₁ (AFM₁) y M₂ (AFM₂) provienen del metabolismo del hígado de mamíferos, como la vaca, cabras y humanos, y cuando consumen granos contaminados con la AFB₁ y AFB₂, el organismo les añade un grupo OH⁻ se forman los hidroxilados, y baja su toxicidad como mecanismo de detoxificación. El hígado forma las AF hidroxiladas que son secretadas en la leche como la AFM₁, la AFM₂, la aflatoxina P₁ (AFP₁) y el aflatoxicol (AFL) y pasan a los productos lácteos (Baltaci *et al.* 2012, Carvajal *et al.*, 2003 a,b).

OBJETIVOS

General: La validación del método AOAC (2005) de extracción y cuantificación de AFM₁ con objeto de tener datos confiables acerca de la contaminación de AFM₁ en leches para lactantes.

Específicos: Comprobación de los parámetros de validación: Linealidad (curvas de calibración de la aflatoxina M₁ (AFM₁), coeficiente de correlación (R^2), Límite de detección (LOD) del equipo, selectividad y porcentaje de recuperación.

OBJETIVOS Y METAS ALCANZADOS

Los objetivos planteados inicialmente se cumplen satisfactoriamente ya que se valida correctamente el método de extracción y cuantificación (AOAC 2005) de la AFM₁ tomando como matriz muestras de leche en polvo, lo anterior debido a que el método satisface los requisitos de la aplicación analítica deseada, cumpliendo con todos los parámetros requeridos.

La técnica analítica permitió además la comprobación de cada parámetro con la realización de diferentes curvas de calibración, para LOD, LOQ, Linealidad del sistema y % de recobro) con la comparación de cromatogramas para la selectividad del mismo, así como el procesamiento de datos y resultados arrojados verificando el cumplimiento de cada criterio de aceptación.

CONCLUSIONES

El método AOAC (2005) permitió determinar satisfactoriamente el contenido de dicho compuesto en diferentes tipos de muestras de leche en polvo para lactante (fórmula), además de cumplir con todos los parámetros y requerimientos de validación por lo tanto, se valida correctamente proporcionando así resultados confiables.

El estudio de laboratorio para extracción y cuantificación de AFM1 consistió no solo en identificar y cuantificar a la misma (LOD y LOQ), se verificó también la Adecuabilidad del sistema concluyendo que el método es apto para su uso, y de acuerdo a los resultados arrojados, demostró ser lineal, específico, preciso, reproducible y con recobros óptimos.

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que la leche en polvo para lactantes (fórmula), efectivamente presenta contaminación por AFM1 al igual que el derivado de leche de vaca de acuerdo a los estudios antes realizados, sin embargo las cantidades de AFM1 presentes en las muestras analizadas son muy pequeñas, (prácticamente trazas ng/mL) por lo tanto, no existen datos significativos, para asegurar que dicha aflatoxina, presente un riesgo significativo para la salud del pequeño lactante. Y es necesario realizar un estudio mucho más amplio de las muestras existentes en el mercado para poder así no solo determinar la cantidad de AFM1 sino también otros tipos de aflatoxinas presentes en las muestras y por tanto, obtener así, resultados contundentes.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdulrazzaq Y, Osman M, Yousif N, Zuhair M, Al-Falahi S. 2003. Aflatoxin M₁ in breast-milk of UAE (United Arab Emirates) women. *Journal Annals of Tropical Paediatrics*, 23:173-179.
- Akiyama H, Goda Y, Tanaka T, Toyoda M. 2001. Determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in spices using a multifunctional column clean-up. *Journal of Chromatography A*, 932:153-157.
- Amaro R, Gómez L, Vita Y. 2008. *Guía de Métodos de Análisis por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia*. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela 1-17 pp.
- Anónimo. 2012. Easi-Extract aflatoxin. R-Biopharm Rhône LTD. RP71 RP70N/V12/28. 06.12. Glasgow UK. 1-12 pp.
- AOAC. 2005. Natural toxins in Official Methods of Analysis of AOAC international. Horwitz, W (Ed.). 17th edit. Trucksess MW. Chapter Ed. Chapter 49: Natural Toxins. Vol. II Food Composition Additives; Natural contaminants. Washington, DC. USA. 1-42.
- Asao T, Büchi G, Abdel-Kader MM, Chang SB, Wick EL, Wogan GN. 1963. Aflatoxins B and G. *Journal of American Chemistry Society*, 85: 1706-1707.

- Asao T, Büchi G, Abdel-Kader MM, Chang SB, Wick EL, Wogan GN. 1965. The structures of aflatoxins B₁ and G₁. *Journal of American Chemistry Society*, 87: 882-886.
- Baltaci C, Ilyasoglu H, Yuksel F. 2012. Single-Laboratory validation for the determination of Aflatoxin B₁, B₂, G₁ and G₂ in foods based on immunoaffinity column and liquid chromatography with postcolumn derivatization and fluorescence detection. *Food Analytical Methods*. Doi. 10.1007/s12161-012-9417-3
- 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*. 88:3063-3069
- Battacone G, Nudda A, Rassu SP, Decandia M, Pulina G. 2012. Excretion pattern of aflatoxin M₁ in milk of goats fed a single dose of aflatoxin B₁. *Journal Dairy Science*, 95(5):2656-2661.
- Bhatnagar D, Ehrlich KC, Cleaveland TE. 2003. Molecular genetics analysis and regulation of aflatoxin biosynthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61:83-93.
- Bucio-Villalobos CM, De Peña Guzmán D, Peña-Cabriales JJ. 2001. Aflatoxin synthesis in corn fields in Guanajuato, México. *Latin American Journal of Mycology*, 18: 83-87.
- Boudra H., Barnouin J., Dragacci S., Morgavi D.P. 2007. Aflatoxin M₁ and Ochratoxin A in raw bulk milk from French dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 90:3197-31201.
- Caloni F, Stamatii A, Friggè G, De Angelis I. 2006. Aflatoxin M₁ absorption and cytotoxicity on human intestinal in vitro model. *Toxicology Journal*, 47:409-415.
- Carvajal M, Rojo F, Méndez I, Bolaños A. 2003 a. Aflatoxin M₁ in pasteurized and ultrapasteurized milk with different fat contents in México. *Journal of Food Protection*, 66: 1885-1892.
- Carvajal M, Rojo F, Méndez I, Bolaños A. 2003 b. Aflatoxin B₁ and its interconverting metabolite Aflatoxicol in milk. Situation in Mexico. *Food Additives and Contaminants*, 20 (11):1077-1086.
- CNQFB, Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biológicos (2000). Guía de validación de métodos analíticos. México.
- Comisión Europea, 2010. Commission Regulation. European Union (EU) N° 165/2010 of 26 February 2010 amending Regulation (EC) No.1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. European Commission.
- Duarte-Vogel S, Villamil-Jiménez LC. 2006. Micotoxinas en la Salud Pública Ensayo. *Rev. Salud pública*. Sup. 8: 129-135.
- Ellis W, Smith J, Simpson B. 1991. Aflatoxins in food: occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control. *Critical reviews in food science nutrition*, 30:403-439.
- Esqueda-Valle M, Higuera-Ciapara I, Nieblas J. 1995. Aflatoxin M₁ in milk traded in Hermosillo, Sonora, México. Short Note. *Revista Mexicana de Micología* 11: 179-182
- Fernández-Oller, A. 2014 El cambio climático y la prevalencia de micotoxinas. *Agrinews*. Nutrición. España. Consultado el 23 de feb de 2015.
<http://agrinews.es/2014/06/03/cambio-climatico-y-prevalencia-de-micotoxinas/#prettyPhoto/0/>
- Galvano F, Pietri A, Bertuzzi T, Gagliardi L, Ciotti S, Luisi S, Bognanno M, La Fauci L, Lacopino AM, Nigro F, Li Volti G, Vanella L, Giammanco G, Tina GL, Gazzolo D. 2008. Maternal dietary habits and mycotoxin occurrence in human mature milk. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52:496-501.

- Ghazani M, Hosein M. 2009. Aflatoxin M1 contamination in pasteurized milk in Tabriz (northwest of Iran). *Journal Food and Chemical Toxicology*, 47:1624-162.
- Ghiasian S, Maghsood A. 2012. Infants' exposure to Aflatoxin M1 from mother's breast milk in Iran. *Iranian Journal Public Health*, 41:119-126.
- 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 & Contaminants Journal*; 22:9-14.
- Gimeno A, Martins ML. (2000). Residuos de micotoxinas en leche, huevos y tejidos comestibles de aves, cerdos y rumiantes (parte II), *Albéitar*, 37: 44-46.
- Gong YY, Egal S, Hounsa A, Turner PC, Hall AJ, Cardwell KF, Wild C.P. 2003. Determinants of aflatoxin exposure in young children from Benin and Togo, West Africa: the critical role of weaning. *International Journal of Epidemiology*. 32: 556-562.
- Henry SH, Whitaker T, Rabbani I, Bowers J, Park D, Price W, Bosch FX. 2001. Aflatoxin M1. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) 47.
- Horwitz W. 1982. Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs. *Analytical Chemistry* 54, 67A.
- IARC, International Agency for the Research on Cancer. 2002. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. Summary of data reported and evaluation. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk to Humans. International Agency for Research on Cancer. Lyon, France, 82:171.
- Kang'ethe EK, Lang'a KA. 2009. Aflatoxin B1 and M1 contamination of animal feeds and milk from urban centers in Kenya. *African Health Sciences*, 9: 218-226.
- Khoshpey B, Farhud DD, Zaini F. 2011. Aflatoxins in Iran: nature, hazards and carcinogenicity. *Iranian Journal Public Health*, 40:1-30.
- Klein CJ. 2002. Nutrient Requirements for Preterm Infant Formulas. *Journal of Nutrition*, 1(132): 1395S-1577S.
- Kok WTh. 1994. Derivatization reactions for the determination of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 659: 127-137.
- Kuiper-Goodman T. 1990. Uncertainties in the risk assessment of three mycotoxins: aflatoxin, ochratoxin and zearalenone. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 68: 1071-1024.
- LSRO, Life Sciences Research Office. 1998. Assessment of nutrient requirements for infant formulas. *The Journal of Nutrition*; 128: 20595-20935.
- Lutz WK, Jaggi W, Luthy J, Sagelsdorff P, Schlatter C. 1980. In vivo covalent binding of aflatoxin B1 and M1 to liver DNA of rat mouse and pig. *Chemical Biological Interactions*, 32: 249-256.
- Manonmani HK, Anand S, Chandrashekar A, Rati ER. 2005. Detection of aflatoxigenic fungi in selected food commodities by PCR. *Process Biochemistry*, 40: 2859-2864.
- Meucci V, Razzuoli E, Soldani G, Massart F. 2010. Mycotoxin detection in infant formula milks in Italy. *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*; 27: 64-71.

- Motawee MM, Bauer J, McMahon DJ. 2009. Survey of Aflatoxin M₁ in cow, goat, buffalo and camel milks in Ismailia-Egypt. *Environmental Contamination and Toxicology*, 83:766-769
- MSCR, Ministerio de Salud de Costa Rica. 2002. Guía de Validación de Métodos Analíticos. GUIA-01. Consultado el 18 de noviembre de 2015 en: http://www.netsalud.sa.cr/ms/drc/pciudadano/guia_01.doc.
- Offiah N, Adesiyun A. 2007. Occurrence of aflatoxins in peanuts, milk, and animal feed in Trinidad. *Journal of Food Protection*, 70:771-775.
- OPS-OMS, Organización Panamericana de la Salud/ Organización Mundial de la Salud. 1983. Criterios de la salud ambiental Micotoxinas 11. Publicación Científica 453, Washington, USA. 1-131.
- Oyelami OA, Maxwell SM, Adelusola KA, Aladekoma TA, Oyelese AO. 1998. Aflatoxins in autopsy kidney specimens from children in Nigeria. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 55:317-323.
- Periaca M, Radiç B, Lucić A, Pavlović M. 1999. Efectos tóxicos de las micotoxinas en el ser humano. *Bulletin of the World Health Organization*, 77 (9): 754-766.
- Pharmacopoeia Convention, Inc. 2007. United States Pharmacopoeia 30/ National formulary 25. Rockeville, MD: US Pharmacopoeial Convention, Inc., 2872-2883.
- Pier DC. 1987. Aflatoxicosis and immunosuppression in mammal animals. In: Zuber, M.S., Lillehoj, E.B., Renfro, B.L. (Eds). *Aflatoxins in maize: A proceedings of the workshop*. CIMMYT, México. 58-65.
- RD, 2009. Actualización en 2009 del Real Decreto 475/2007 del 13 abril de 2007. CNAE (Clasificación Nacional de Actividades Económicas 2009. BOE 102 Madrid España. pp 18572-18573.
- Sargeant K, O'Kelly J, Carnaghan RBA, Allcroft R. 1961. The assay of a toxic principle in certain groundnut meals. *Veterinary Records*, 73: 1219-1222.
- Stroka, J., Otterdijk, R. y Anklam, E. 2000. Immunoaffinity column clean-up prior to thin-layer chromatography for the determination of aflatoxins in various food matrices. *Journal of Chromatography A*, 904: 251-256.
- Sugiyama K, Hiraoka H, Sugita-Konishi Y. 2008, Aflatoxin M₁ Contamination in raw bulk milk and the presence of Aflatoxin B₁ in corn supplied to dairy cattle in Japan. *Food Hygiene and Safety Science Journal*, 49:352-355.
- Sweeney MJ, Dobson ADW. 1999. Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters*, 175:149-163.
- Tekinşen KK, Semih EH. 2008. Aflatoxin M₁ levels in ultra high temperature milk and kashar cheese consumed in Turkey. *Journal Food and Chemical Toxicology*. 46:3287-3289.
- Tomerak RH, Shaban HH, Khalafallah OA, El Shazly MN. 2011. Assessment of exposure of Egyptian infants to aflatoxin M₁ through breast milk. *Journal of the Egyptian Public Health Association*; 86:51-55.
- Turconi G, Guarcello M, Livieri C, Comizzoli S, Maccarini L, Castellazi AM, Pietri A, Piva G, Roggi C. 2004. Evaluation of xenobiotics in human milk and ingestion by the newborn--an epidemiological survey in Lombardy (Northern Italy). *European Journal of Nutrition*, 43: 191-197.
- Unusan N. 2006. Occurrence of aflatoxin M₁ in UHT milk in Turkey. *Journal. Food and Chemical Toxicology*, 44:1897-1900.

Van Egmond H. 1989. Mycotoxins in dairy products. Elsevier Books, London.11-56.

Veldman A, Meijst JAC, Borggreve CJ, Heeres Van der Tol JJ. 1992. Carry-over of aflatoxin for cows' food to milk. *Animal Production*, 55(2): 163-168.

Wakhisi J. 1980. Exposure of rat offspring to aflatoxin risks through suckling mothers dosed with aflatoxin B₁. *Journal of Toxicology Toxin Reviews*, 8 (1-2): 275-280