



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos
Facultad de Veterinaria
Universitat Autònoma de Barcelona

**Ocurrencia y estimación de la exposición humana
a aflatoxina M₁ en muestras de leche
procedentes de Monterrey (México)**

Tesis Doctoral dirigida por:
Dr. Antonio José Trujillo Mesa
Dr. Pedro César Cantú Martínez

Memoria presentada para
optar al Grado de Doctora en
Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Patricia Amanda Quevedo Garza

Bellaterra, 2014

ANTONIO JOSÉ TRUJILLO MESA, Profesor Titular de Tecnología de los Alimentos de la Universitat Autònoma de Barcelona.

PEDRO CÉSAR CANTÚ MARTÍNEZ, Profesor investigador de la Facultad de Salud Pública y Nutrición de la Universidad Autónoma de Nuevo León (México).

HACEN CONSTAR: Que la Maestra en Ciencias de los Alimentos PATRICIA AMANDA QUEVEDO GARZA ha realizado, bajo su dirección en el Área de Tecnología de los Alimentos de la Universitat Autònoma de Barcelona, el trabajo titulado “*Ocurrencia y estimación de la exposición humana a aflatoxina M₁ en muestras de leche procedentes de Monterrey (México)*” que presenta para optar al grado de Doctora.

Y para que así conste firmamos el presente documento en Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), Septiembre de 2014.

Dr. Antonio José Trujillo Mesa

Dr. Pedro César Cantú Martínez

*“En cuestiones de cultura y de saber,
sólo se pierde lo que se guarda,
sólo se gana lo que se da.”*

Antonio Machado

A mis amores ...

Luis Ángel Ceceñas Falcón

Gracias por ser quien eres y por hacer de mí quien soy

Luis Ángel Ceceñas Quevedo y Guillermo Ceceñas Quevedo

Mi motivo

Mi inspiración

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de Tesis Antonio José Trujillo Mesa y Pedro César Cantú Martínez, por su apoyo, dirección en el trabajo y por darme ánimos en los momentos de incertidumbre.

A la Unión Ganadera Regional del estado de Nuevo León, a través del Dr. Alberto Morales Loredo, director técnico del Laboratorio Central Regional de Monterrey S. A. De C. V., a Miriam Montante Leal, Jefa del Departamento de Residuos Tóxicos, a todos los compañeros del laboratorio, en especial a la LQI. Isaura Ávila Villarreal y LQI. Mario Alberto Morales Hernández, mi más profundo agradecimiento por compartir sus conocimientos y por su apoyo técnico y económico, con el cual se realizó este trabajo.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León por su apoyo económico a través del Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT – UANL) y a la Universitat Autònoma de Barcelona a través de la Unidad de Tecnología de los Alimentos, Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos por su apoyo económico, de los cuales se obtuvieron los recursos materiales.

A Yolanda Elva de la Garza Casas y a Manuel López Cabanillas Lomelí, por su apoyo a la adquisición de la beca de estudio otorgada por CONACYT y el enlace entre UANL – UAB. A Hilda Irene Novelo Huerta por el apoyo a la conclusión de este trabajo.

A mis compañeros de odisea, Adela, Arnoldo, Betty, Gustavo, José Luis, Lety, Lucha, Marco, Mirna, Rodrigo y Tere, gracias por su amistad.

ÍNDICE

	RESUMEN / SUMMARY	15
I.	INTRODUCCIÓN	19
	1.1 AFLATOXINAS: Generalidades	21
	1.1.1 Concepto y origen	21
	1.1.2 Estructura, características químicas y propiedades físicas	22
	1.1.3 Biosíntesis	24
	1.2 IMPORTANCIA ECONÓMICA	31
	1.3 EFECTOS FISIOPATOLÓGICOS	36
	1.4 EXPOSICIÓN A LAS AFLATOXINAS	41
	1.5 NORMATIVA	42
	1.6 MÉTODOS DE TRATAMIENTO PARA EVITAR LOS EFECTOS DE LAS MICOTOXINAS	45
	1.6.1 Métodos químicos	45
	1.6.2 Métodos biológicos	46
	1.6.3 Métodos físicos	47
	1.7 PRESENCIA DE AFLATOXINAS EN LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS	47
	1.8 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE AFM ₁	48
	1.8.1 Muestreo	49
	a) Muestreo de productos fluidos	49
	b) Muestreo de leche en polvo y otros productos lácteos en polvo	50
	1.8.2 Preparación y extracción	50
	1.8.3 Cuantificación de micotoxinas	50
	1.9 LA LECHE	53
	1.9.1 Desarrollo de la industria láctea en México	55
	1.9.2 Calidad de la leche y productos lácteos según la normativa mexicana	57
	1.9.3 Fórmulas infantiles	59
II.	OBJETIVOS	63
III.	DISEÑO EXPERIMENTAL	69

3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL: ACTIVIDADES, MOTIVOS Y JUSTIFICACIÓN	71
3.1.1 Prospección de la presencia de AFM ₁ en leche y productos lácteos. Primer muestreo	71
3.1.2 Segundo muestreo. análisis por HPLC	72
3.1.3 Análisis de la presencia de AFB ₁ en productos lácteos	73
3.1.4 Determinación de la ingesta diaria de AFM ₁ por grupos de edad	74
3.2 PLAN DE TRABAJO	75
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	77
4.1 MATERIAL	79
4.1.1 Método de cuantificación por técnica ELISA	79
4.1.2 Método de cuantificación por técnica HPLC	81
4.1.2.1 Patrones de aflatoxina M ₁ y B ₁	81
4.1.2.2 Columnas	81
4.1.2.3 Equipo HPLC	82
4.2 MÉTODOS	83
4.2.1 Determinación de AFM ₁ por ELISA	83
4.2.1.1 Preparación de las muestras	83
4.2.2 Determinación de AFM ₁ por HPLC	84
4.2.2.1 Preparación de la solución stock de AFM ₁	84
4.2.2.2 Preparación de la solución patrón de AFM ₁	85
4.2.2.3 Preparación de las soluciones patrón de trabajo	85
4.2.2.4 Preparación de las muestras	85
4.2.2.5 Extracción de la AFM ₁	86
4.2.2.6 Cuantificación por HPLC	87
4.2.3 Determinación de AFB ₁ por HPLC	89
4.2.3.1 Preparación del estándar	89
4.2.3.2 Fortificación de las muestras	90
4.2.3.3 Preparación de la muestra	92

	4.2.3.4 Extracción de AFB ₁	92
	4.2.4 Determinación de la exposición a la AFM ₁ en la población	93
	4.2.5 Análisis estadístico	94
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN. PRIMER MUESTREO. TÉCNICA ELISA	95
	5.1 RESULTADOS DEL PRIMER MUESTREO.	97
	5.1.1 Valores de AFM ₁ encontrados en leches fluidas	97
	5.1.2 Análisis de las leches y productos lácteos según su procedencia	98
	5.1.3 Análisis de las leches según su proceso térmico aplicado	101
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN. SEGUNDO MUESTREO. TÉCNICA HPLC	113
	6.1 RESULTADOS DEL SEGUNDO MUESTREO.	115
	6.1.1 Presencia de AFM ₁ en leche bronca (cruda)	120
	6.1.2 Presencia de AFM ₁ en fórmula infantil	125
	6.1.3 Presencia de AFM ₁ en leche y producto lácteo	131
VII.	PRESENCIA DE AFB₁ EN PRODUCTOS LÁCTEOS	133
	7.1 PRESENCIA DE AFB ₁ EN PRODUCTO LÁCTEO	133
	7.2 VALIDACIÓN	133
	7.2.1 Definiciones relacionadas con la validación	135
	7.2.2 Resultados de la validación	137
	7.2.3 Presencia de AFB ₁ en productos lácteos	139
VIII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN. INGESTA DIARIA DE AFM₁ POR GRUPOS DE EDAD	141
	8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. INGESTA DIARIA DE AFM ₁ POR GRUPOS DE EDAD E ÍNDICE DE RIESGO CARCINOGENICO	143
	8.1 ESTIMACIÓN DE LA INGESTA DIARIA DE AFM ₁ POR LA POBLACIÓN PRE-ESCOLAR	143
	8.1.1 Lactante menor (recién nacido a 6 meses)	143
	8.1.2 Lactante menor (hasta 12 meses)	144

8.1.3 Lactante mayor (hasta 2 años)	144
8.1.4 Pre-escolar (hasta 4 años)	144
8.2 INGESTA DIARIA DE AFM ₁ POR POBLACIÓN ESCOLAR	147
8.3 INGESTA DIARIA DE AFM ₁ POR POBLACIÓN ADOLESCENTE	149
8.4 INGESTA DIARIA DE AFM ₁ POR POBLACIÓN ADULTA	150
8.5 INGESTA DIARIA DE AFM ₁ POR POBLACIÓN ADULTA MAYOR	152
IX. CONCLUSIONES	155
X. BIBLIOGRAFÍA	159

RESUMEN

La leche y los productos lácteos son alimentos con un alto valor nutritivo pero también susceptibles de contaminación y principales vehículos de introducción de aflatoxina M₁ (AFM₁) en la dieta, ya que no es destruida por los tratamientos convencionales térmicos de pasteurización o esterilización usados en la industria láctea para higienizar estos productos, y así puede estar presente en yogurt, queso, leche deshidratada y otros productos lácteos. La International Agency for Research on Cancer (IARC) de la OMS, ha categorizado la AFM₁ como carcinogénica y tóxica para humanos en el Grupo 1.

En este trabajo se analizó la presencia de AFM₁ en leche y productos de base láctea comercializados en el área metropolitana de Monterrey, N.L., México, y se evaluó el consumo de estos productos susceptibles de contaminación por AFM₁ en la población por grupos de edad, así como el índice de riesgo carcinogénico.

En el primer muestreo se analizaron 84 muestras por la técnica ELISA, de las cuales 20 fueron leche pasteurizada y 64 con proceso térmico UHT, de las cuales 48 fueron leches con presencia de grasa butírica y 16 producto lácteo con presencia de grasa vegetal. Las leches pasteurizadas presentaron un 100% de presencia de AFM₁, con una media de 0,39 µg/L y un 20% de las muestras por encima de lo que establece la NOM-243-SSA1-2010 (0,5 µg/L), mientras que de los productos UHT, todas mostraron presencia de AFM₁, siendo la leche que contiene grasa butírica la que en promedio se encontró dentro de la NOM con 0,45 µg/L y un 38% de las muestras sobre el límite marcado por la NOM, mientras que el producto lácteo mostró un promedio de 0,66 µg/L y un 69% de las muestras por encima de lo que establece la NOM.

En el segundo muestreo se analizaron 162 muestras de leche, incluyendo leche bronca (n = 51), fórmula infantil (n = 55), leche deshidratada (n = 15) y leche y producto lácteo UHT (n = 41), colectadas en supermercados y analizadas

por extracción en columnas de inmunoafinidad con anticuerpos monoclonales y cuantificadas mediante HPLC con detector de fluorescencia. Con el objetivo de determinar la ingesta promedio diaria de AFM₁ por grupos de edad y poder establecer el índice de riesgo carcinogénico se utilizó la encuesta ENSANUT-2012 correspondiente a Nuevo León, aplicando la fórmula descrita por Kuiper-Goodman (1994).

De las 51 muestras de leche bronca analizadas, 16 de éstas resultaron positivas (31%), obteniéndose 2 muestras (4%) por encima del límite máximo que establece la NOM y una media de 0,07 µg/kg. De las 55 fórmulas infantiles analizadas, 11 de éstas mostraron resultados positivos a la presencia de AFM₁, mostrando todas valores por encima de lo que establece el *Códex Alimentarius* (0,025 µg/kg) y una media de 0,04 µg/kg. De las 15 muestras de productos deshidratados, 12 fueron leche (con grasa butírica) y 3 producto lácteo (con grasa vegetal), con una media de 0,13 µg/L y 10 de éstas tuvieron presencia de AFM₁. De las 41 muestras UHT, 27 fueron leche y 14 producto lácteo, con una media de 0,30 µg/L y 26,8% de las muestras con niveles de AFM₁ por encima de lo establecido por la NOM.

Según los datos obtenidos de la ingesta promedio diaria de AFM₁ por grupos de edad, se observó que los niños de edades comprendidas entre recién nacidos y edad escolar (0 - 11 años) fue el grupo poblacional que presentó los niveles más elevados de ingesta de AFM₁, ya que en este grupo se encuentran los lactantes cuya principal dieta hasta los 6 meses es a base de leche materna o bien leches maternizadas, presentando niveles de ingesta de AFM₁ (4,40 ng/kg PCP/día) por encima del límite de índice de riesgo carcinogénico (2 ng/kg PCP/día). Aunque en la población pre-escolar y escolar se modifica la frecuencia, el tipo y el consumo de leche y productos lácteos, el peso corporal todavía no es suficientemente alto para revertir los valores de ingesta promedio diaria de AFM₁ presentando niveles elevados de riesgo carcinogénico (5,01 ng/kg PCP/día). Al disminuir la ingesta de leche y productos lácteos por la población adolescente, adulta y adulta mayor y al relacionar esta ingesta con el peso corporal, la ingesta promedio diaria de AFM₁ (0,68 ng/kg PCP/día) se encontró por debajo del índice de riesgo carcinogénico, no representando riesgo

a este respecto.

SUMMARY

Milk and dairy products are foods with a high nutritional value but also susceptible to contamination and main vehicle entry of aflatoxin M₁ (AFM₁) in the diet because it is not destroyed by the conventional thermal treatments such as sterilization or pasteurization usually used in the dairy industry to sanitize these products, and thus may be present in yogurt, cheese, dried milk and other dairy products. The International Agency for Research on Cancer (IARC) of WHO has categorized the AFM₁ as carcinogenic and toxic to humans in Group 1.

This paper analyzed the presence of AFM₁ in milk and milk-based products marketed in the metropolitan area of Monterrey, NL, Mexico, and the consumption of these products, which are susceptible to contamination by AFM₁ was evaluated in the population by age group and as the index of carcinogenic risk.

In the first sampling, 84 samples were analyzed by ELISA, of which 20 were pasteurized milks and 66 were UHT-treated products, including 48 milks containing butyric fat and 16 milk products containing vegetable fat. The pasteurized milks showed 100% presence of AFM₁, with an average of 0.39 µg/L and 20% of the samples above the provisions of the NOM-243-SSA1-2010 (0,5 µg/L), while UHT products, all showed the presence of AFM₁, with milk containing butyric fat which on average were within the NOM with 0.45 µg/L and 38% of the samples above the limit set by the NOM, while the dairy product showed an average of 0.66 µg/L and 69% of the samples above the provisions of the NOM.

In the second sampling, 162 milk samples were analyzed, including raw milk (n = 51), infant formula (n = 55), milk powder (n = 15) and UHT-treated products (n = 41), collected from supermarkets and analyzed by extraction in immunoaffinity columns containing monoclonal antibodies, and quantified by

HPLC with fluorescence detection. In order to determine the average daily intake of AFM₁ by age group and to establish the carcinogenic risk index, ENSANUT corresponding 2012 survey was used to Nuevo León, applying the formula described by Kuiper-Goodman (1994).

Among the 51 raw milk samples analyzed, 16 were positive (31%), obtaining 2 samples (4%) above the maximum limit established by the NOM and an average of 0.07 µg/kg. Among the 55 infant formulas analyzed, 11 were positive for the presence of AFM₁, showing all values above that established by the Codex Alimentarius (0.025 µg/kg) and a mean of 0.04 µg/kg. Among the 15 dehydrated samples, 12 were milk (milk fat) and 3 milk products (vegetable fat), with an average of 0.13 µg/L and 10 had presence of AFM₁. Among the 41 UHT samples 27 were milk and 14 dairy product, with a mean of 0,30 µg/L and 26,8% of samples above the AFM₁ levels established by the NOM.

According to the data of the average daily intake of AFM₁ by age group, it was observed that children aged between newborn and school age (0 - 11 years) was the population group that had the highest intake levels of AFM₁, since in this group of infants whose main diet is up to 6 months is breast milk or milk-based infant formula presented AFM₁ intake levels of 4.40 ng/kg PCP/day over the limit carcinogenic risk index (2 ng/kg PCP/day). Although the pre-school and school population the frequency, type and consumption of milk and milk products is changed, the body weight is not yet high enough to reverse the values of average daily intake of AFM₁ presenting high levels of carcinogenic risk (5.01 ng/kg PCP/day). By reducing the intake of milk and dairy products by the adolescent, adult and older adult population and to relate this intake to body weight, average daily intake of AFM₁ (0.68 ng/kg PCP/day) was below the carcinogenic risk index, and representing no risk in this regard.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 AFLATOXINAS: GENERALIDADES

1.1.1 Concepto y origen

Desde el siglo VII a.c. se conocen los efectos de la colonización por hongos en los cultivos y se han relacionado brotes de enfermedades en humanos y animales con el consumo de los alimentos contaminados con micotoxinas (Periaca *et al.*, 1999; Gimeno y Martins, 2011).

Las micotoxinas son metabolitos secundarios (no esenciales para su crecimiento) producidos por diferentes géneros y especies de hongos filamentosos, dentro de los cuales los principales son: *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. y *Penicillium* spp. Los hongos toxigénicos producen uno o más de estos metabolitos secundarios tóxicos. Es bien sabido que no todos los hongos son toxigénicos y no todos los metabolitos secundarios de los hongos son tóxicos (Richard, 2007; FAO, 2009; Zain, 2011). Estos hongos colonizan y contaminan sustratos que son utilizados en la alimentación humana y animal, y se estima que el 25% de la producción mundial de cereales se encuentra contaminada con estas micotoxinas (CAST, 2003; FAO, 2004; Kumar *et al.*, 2008).

Una micotoxina se considera “importante” si se demuestra su capacidad para tener efectos considerables sobre la salud de las personas y la productividad de los animales. Desde 1960, con el advenimiento de la micotoxicología moderna, se han descrito entre 300 y 400 micotoxinas que se identifican en el mundo, pero los grupos que son de preocupación por sus implicaciones en la salud humana y animal son las aflatoxinas, los tricotecenos (deoxinivalenol y nivalenol), la ocratoxina A, las fumonisinas y la zearalenona (Bennett y Klich, 2003; CAST, 2003; Trucksess *et al.*, 2006).

El término "aflatoxina" fue acuñado a comienzos del decenio de 1960, cuando miles de pavos, patos y otros animales domésticos murieron a causa de una enfermedad conocida como "enfermedad X de los pavos", y que se atribuyó a la presencia de toxinas de *A. flavus* en harina de maní importada de

Sudamérica (Austwick, 1978; Bennett y Klich, 2003; Zain, 2011).

Las aflatoxinas, al igual que otras micotoxinas, son metabolitos secundarios generalmente tóxicos producidos por algunas especies fúngicas, en este caso *A. flavus*, *A. parasiticus* y rara vez por *A. nomius*. Entre las aflatoxinas, se caracterizan por lo menos 16 estructuralmente relacionadas, sin embargo, sólo hay cuatro aflatoxinas principales, B₁, B₂, G₁ y G₂ (AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂), que contaminan los productos agrícolas y plantean un riesgo potencial para la ganadería y la salud humana. Asimismo, la aflatoxina M₁ (AFM₁) es un metabolito hidroxilado de la AFB₁ y a su vez la aflatoxina M₂ (AFM₂) lo es de la AFB₂ (Bennet *et al.*, 1987 y 2003; Jelinek *et al.*, 1989; Tsakiris *et al.*, 2013). *A. flavus* produce sólo AFB₁ y AFB₂, mientras que *A. parasiticus* produce tanto AFB₁ y AFB₂, así como AFG₁ y AFG₂ (Cassel *et al.*, 2001). Algunas otras especies que producen las aflatoxinas son *A. nomius*, *A. pseudotamarii* (Ito *et al.*, 2001), *A. bombycis* (Peterson *et al.*, 2001) y *A. ochraceoroseus* (Klich *et al.*, 2000).

1.1.2 Estructura, características químicas y propiedades físicas

Las aflatoxinas son compuestos policetónicos, resultantes de las reacciones de condensación que tienen lugar cuando en determinadas condiciones físicas, químicas y biológicas se interrumpe la reducción de los grupos cetónicos en la biosíntesis de los ácidos grasos, realizada por los hongos. Estos ácidos grasos son metabolitos primarios utilizados por los mohos como fuente de energía. Las micotoxinas se forman al final de la fase exponencial o al principio de la fase estacionaria del crecimiento de los mohos toxigénicos (Gimeno y Martins, 2003).

Las características químicas de las principales aflatoxinas se muestran en la Tabla 1. 1.

Se ha publicado que *A. flavus* puede proliferar a temperaturas de 10 a 43 °C, produciendo aflatoxinas en el intervalo de temperaturas de al menos 15 a 37 °C, pero no es posible especificar una temperatura óptima para la producción de

Tabla 1. 1. Estructura y características químicas de las aflatoxinas.

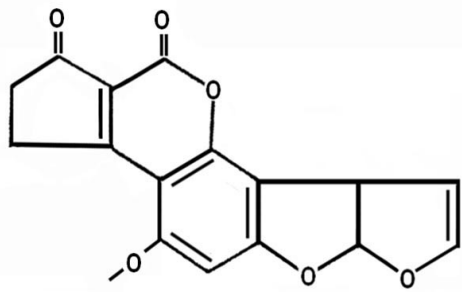
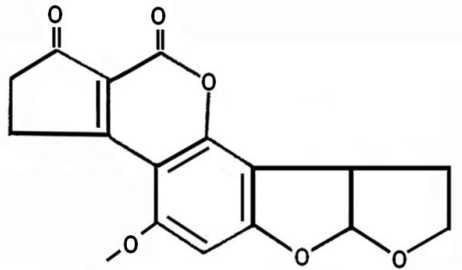
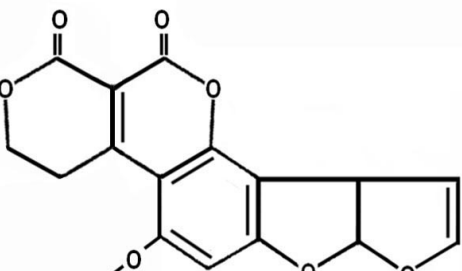
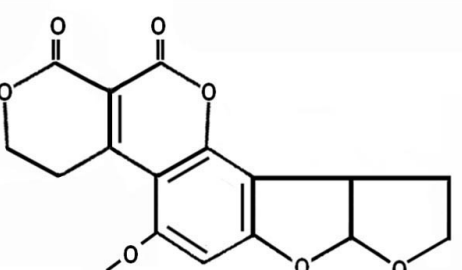
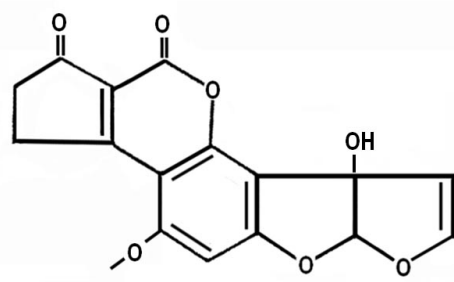
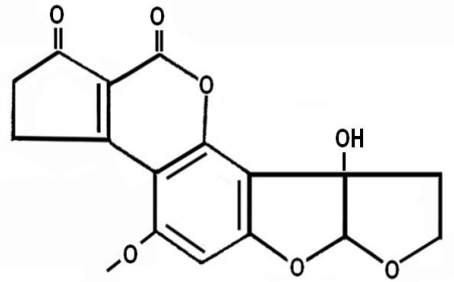
Aflatoxina B ₁	Fórmula Molecular: C ₁₇ H ₁₂ O ₆ P.M.= 312,3 Da. (6aR,9aS)- 2,3,6a,9a- Tetrahidro-4-metoxiciclopenta[c]fura-[3',2':4,5]fura[2,3- <i>h</i>][<i>l</i>]benzopirano-1,11-diona.
	Sinónimo: 6-Metoxidifurocumarona; 2,3,6aα,9aα-tetrahidro-4-metoxiciclopenta-[c]furo[3',2':4,5]fura[2,3- <i>h</i>][<i>l</i>]benzopirano-1,11-diona.
Aflatoxina B ₂	Fórmula Molecular: C ₁₇ H ₁₄ O ₆ P.M.= 314,08 Da. (6aR,9aS)-2,3,6a,8,9,9a,-hexahidro-4-metoxiciclopenta[c]-fura[3',2':4,5]fura[2,3- <i>h</i>][<i>l</i>]benzopirano-1,11-diona.
	Sinónimo: Dihidroaflatoxina B ₁ ; 2,3,6aα,8,9,9aα-hexahidro-4-metoxiciclopenta-[c]fura[3',2':4,5]fura[2,3- <i>h</i>][<i>l</i>]benzopirano-1,11-diona
Aflatoxina G ₁	Fórmula Molecular: C ₁₇ H ₁₂ O ₆ P.M.= 328,06 Da. (7aR,10aS)-3,4,7a,10a-Tetrahidro-5-metoxi-1 <i>H</i> ,12 <i>H</i> -fura-[3',2':4,5]fura[2,3- <i>h</i>]-pirano[3,4- <i>c</i>][<i>l</i>]benzopirano-1,12-diona.
	Sinónimo: 3,47α,10α-Tetrahidro-5-metoxi-1 <i>H</i> ,12 <i>H</i> -fura[3',2':4,5]fura[2,3- <i>h</i>]-pirano-[3,4- <i>c</i>][<i>l</i>]benzopirano-1,12-diona
Aflatoxina G ₂	Fórmula Molecular: C ₁₇ H ₁₄ O ₇ P.M.= 330,0 Da. (7aR,10aS)-3,4,7a,9,10,10a-Hexahidro-5-metoxi-1 <i>H</i> ,12 <i>H</i> -fura[3',2':4,5]fura[2,3- <i>h</i>]-pirano-[3,4- <i>c</i>][<i>l</i>]benzopirano-1,12-diona.
	Sinónimo: Dihidroaflatoxina G ₁ ; 3,4,7aα,9,10,10α-hexahidro-5-metoxi-1 <i>H</i> ,12 <i>H</i> -fura[3',2':4,5]fura[2,3- <i>h</i>]pirano[3,4- <i>c</i>][<i>l</i>]benzopirano-1,12-diona.

Tabla 1.1. (Continuación).

<p style="text-align: center;">Aflatoxina M₁</p>  <p>The chemical structure of Aflatoxina M₁ is a complex polycyclic molecule. It features a central benzene ring fused to a five-membered furan ring on the right and a six-membered dihydroisocoumarin ring on the left. The dihydroisocoumarin ring has a carbonyl group at the 2-position and a methoxy group at the 4-position. The furan ring has a hydroxyl group at the 4-position. The central benzene ring has a methoxy group at the 4-position and is fused to a five-membered furan ring at the 1-position.</p>	<p>Fórmula Molecular: C₁₇H₁₂O₇ P.M.= 328 Da. (6aR,9aR)-2,3,6a,9a- Tetrahidro-9a-hidroxi-4-metoxiciclopenta[c]fura[3',2':4,5]fura[2,3-h][l]benzopirano-1,11-diona.</p> <p>Sinónimo: 4-Hidroxiaflatoxina B₁. (6aR-<i>cis</i>)-2,3,6a,9a-tetrahidro-9a-hidroxi-4-metoxiciclopenta[c]fura[3',2':4,5]fura[2,3-h][l]benzopirano-1,11-diona.</p>
<p style="text-align: center;">Aflatoxina M₂</p>  <p>The chemical structure of Aflatoxina M₂ is very similar to Aflatoxina M₁. It has the same core structure, but the dihydroisocoumarin ring has a carbonyl group at the 2-position and a methoxy group at the 4-position. The furan ring has a hydroxyl group at the 4-position. The central benzene ring has a methoxy group at the 4-position and is fused to a five-membered furan ring at the 1-position.</p>	<p>Fórmula Molecular: C₁₇H₁₄O₇ P.M. = 330,3 Da.</p> <p>Sinónimo: 4-Hidroxiaflatoxina B₂.</p>

Fuente: (Castegnaro *et al.*, 1980; IARC, 2002; Garrido *et al.*, 2003).

toxinas, aunque se ha visto que entre 20 y 30°C la producción es considerablemente mayor que a temperaturas más altas y más bajas. (Pitt y Miscamble, 1995; Fallah *et al.*, 2011). En cuanto a la actividad de agua (a_w) mínima necesaria para iniciar el desarrollo del *Aspergillus spp.* es de 0,75 y para producir micotoxinas es de 0,83 (Hesseltine, 1976) (ver Tabla 1. 2).

Las aflatoxinas forman cristales incoloros o con tonalidades amarillo pálido, cuyas propiedades físicas se muestran en la Tabla 1. 2.

1.1.3 Biosíntesis

Los intentos para descifrar la ruta biosintética de aflatoxinas comenzó con el descubrimiento de la estructura de estas toxinas. Químicamente pertenecen al grupo de derivados de las bisfurano-isocumarinas. Los principales pasos bioquímicos y genéticos de los componentes correspondientes de la biosíntesis de AFB₁ se han dilucidado sólo en las últimas décadas a nivel mole-

Tabla 1. 2. Propiedades físicas de las aflatoxinas

Propiedad	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	AFM ₁	AFM ₂	FUENTE
Punto de fusión	268-269 °C	287-289 °C	244-246 °C	237-239 °C	299 °C	-	(IARC, 1976;
Descomposición en:	Cristales de cloroformo	Cristales de cloroformo-pentano	Cristales de cloroformo-metanol	Cristales de acetato de etilo	Cristales de metanol	-	<u>Castegnaro et al.</u> , 1980; Cole y Cox, 1981; <u>Budavari</u> , 1989).
<u>Fluorescencia</u> a λ en metanol	362	363	362	363	362	363	(<u>Castegnaro et al.</u> , 1980 y 1991;
Emite fluorescencia	Azul	Azul	Verde	Verde	Azul-Violeta	Azul-Violeta	<u>Budavari</u> , 1989).
Solubilidad	Poco solubles en agua, insolubles en solventes no polares, solubles en solventes orgánicos moderadamente polares (cloroformo y metanol) y especialmente <u>dimetilsulfóxido</u>						
Estabilidad	Inestable a la luz ultravioleta en presencia de oxígeno, a condiciones extremas de pH (3 y 10) y agentes oxidantes						(Cole y Cox, 1981).
Reactividad	El anillo de <u>lactona</u> es <u>susceptible</u> a la hidrólisis alcalina. Se degradan por reacción con hipoclorito de sodio o de amonio						

cular (Bhatnagar *et al.*, 1992 y 2002; Yu, 2003).

La biosíntesis de la AFB₁ ha sido ampliamente estudiada (Maggon *et al.*, 1977; Bennett y Christensen, 1983; Bhatnagar *et al.*, 1987; McCormick *et al.*, 1987). Se ha propuesto que se involucran por lo menos 23 reacciones enzimáticas. Hasta el momento, en la ruta de biosíntesis de las aflatoxinas se han identificado por lo menos 15 intermediarios estructuralmente bien definidos (Minto y Townsend, 1997; Payne y Brown, 1998; Yu *et al.*, 2002 y Bhatnagar *et al.*, 2002 y 2003).

El esquema aceptado actualmente para la biosíntesis de la aflatoxina B₁ es el siguiente: un precursor hexanoil-CoA → ácido norsolorínico (NOR) → averantina (AVN) → hidroxiaverantina (HAVN) → averufina, (AVF) → hidroxiversicolorona (HVN) → acetato de versiconal hemiacetal (VHA) → versiconal (VAL) → versicolorina B (VERB) → versicolorina A (VERA) → dimetil-esterigmatocistina (DMST) → esterigmatocistina (ST) → *O*-metilesterigmatocistina (OMST) → aflatoxina B₁ (AFB₁).

El proceso de biosíntesis comienza con la condensación de un acetyl Coenzima A, que reacciona con un grupo malonato y la enzima acetyl-CoA carboxilasa para producir el malonil Coenzima A, en un proceso similar en algunos aspectos al de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena larga (Ellis *et al.*, 1991).

Estudios metabólicos realizados con precursores (acetato) marcados isotópicamente, han demostrado que los carbonos del esqueleto carbonado de la aflatoxina provienen en su totalidad del acetato y el grupo metilo proviene del aminoácido metionina (Zaika y Buchanan, 1987). El decacétido lineal formado (policétido) sufre un proceso de ciclación a compuestos de la familia de las antronas, que por la acción de la enzima policétido sintasa se transforma en ácido norsolorínico (ver Tabla 1.3). Este proceso biosintético ocurre en el citoplasma soluble (extra mitocondrial) y utiliza los equivalentes reducidos (NADPH + H⁺) producidos en la vía de las pentosas.

El ácido norsolorínico es el primer precursor estable en la biosíntesis de las

aflatoxinas. Este compuesto es transformado a averufina en dos etapas del proceso vía averantina como intermediario (Bennet *et al.*, 1980). La siguiente etapa de la biosíntesis involucra la abertura del anillo de averufina, seguido secuencialmente por una deshidratación, epoxidación y un rearrreglo del epóxido a la forma versicolorina A, vía acetato de versicolorina A hemiacetal (Applebaum y Marth, 1981). La versicolorina A es convertida en el último intermediario mayor, esterigmatocistina por una óxidoreductasa. El grupo *O*-metoxi, el cual es común en todas las aflatoxinas, proviene del donador de metilos *S*-adenosilmetionina, por catálisis de *S*-adenosilmetiltransferasa, el cual convierte la esterigmatocistina a *O*-metilesterigmatocistina (Bhatangar *et al.*, 1988). La formación del sistema de anillos bisfurano presente en versicolorina A, esterigmatocistina y aflatoxina B₁ aparentemente involucran la hidrólisis de la unión éster en el acetato de versiconal hemiacetalico con la eliminación de un grupo de acetyl, seguido por el cierre del anillo. Esto ocurre por la vía de la oxidación del grupo hidroxilo terminal al aldehído, resultando la estructura hemiacetal (Wan y Hsieh, 1980).

Existen claramente cuatro productos principales policetónicos en la vía biosintética de las aflatoxinas (Lillehoj, 1991):

1) Antraquinonas hidroxiladas

- a. Ácido norsolorínico (C₂₀H₁₈O₇) (P.M. = 370).
- b. Averantina (C₂₀H₂₀O₇) (P.M. = 372).
- c. Averufanina (C₂₀H₁₈O₇) (P.M. = 370).
- d. Averufina (C₂₀H₁₆O₇) (P.M. = 368).

2) Bifuranoantraquinonas

- a. Hidroxiversicolorina
- b. Acetato de versiconal hemiacetal (C₂₀H₁₆O₉) (P.M. = 400).
- c. Alcohol versiconal
- d. Versicolorina B
- e. Versicolorina A (C₁₈H₁₀O₇) (P.M. = 338).

3) Bifuranoxantonas

- a. Esterigmatocistina ($C_{18}H_{12}O_6$) (P.M. = 324).
- b. *O*-metil-esterigmatocistina ($C_{19}H_{14}O_6$) (P.M. = 338).

4) Bifuranocumarinas

- a. Aflatoxinas ($C_{17}H_{12}O_6$) (P.M. = 312).

Los pesos moleculares (P.M.) de algunos intermediarios de la biosíntesis, fueron descritos por Bennett *et al.*, (1980). La esterigmatocistina y la *O*-metil-esterigmatocistina son xantonas caracterizadas por una mitad de dihidrofurano; las aflatoxinas son decacetonas caracterizadas por un anillo cumarínico en su estructura (Steyn *et al.*, 1980).

Se estima que son necesarios por lo menos 17 pasos enzimáticos para que la biosíntesis de las aflatoxinas se complete a partir de ácido norsolorínico (Bhatnagar *et al.*, 1992).

Numerosas enzimas implicadas en la biosíntesis de aflatoxinas se han purificado: dos *O*-metiltransferasas están implicadas en la conversión de esterigmatocistina a *O*-metilesterigmatocistina (Bhatnagar *et al.*, 1988; Keller *et al.*, 1992), una ácido-norsolorínico reductasa está implicada en la conversión reversible de averantina en ácido norsolorínico (Bhatnagar y Cleveland, 1990; Chuturgoon y Dutton, 1991), una ciclasa está implicada en la conversión del versiconal a versicolorina B (Townsend *et al.*, 1991; Lin y Anderson, 1992) y dos versiconal hemiacetal reductasas (reductasas I y II; probablemente isoenzimas) catalizan la reacción del acetato de hemiacetal versiconal a acetato de versiconal (Matsushima *et al.*, 1994).

La versicolorina A es importante porque es la primera molécula en la biosíntesis de la aflatoxina B₁ que contiene un doble enlace en la posición 2-3 de la porción difurano. Este doble enlace es el objetivo de las enzimas microsomales del citocromo P-450, que genera un epóxido altamente reactivo, lo que resulta en la activación de la molécula y la formación de un aducto con el ADN y las proteínas

(Dvorackova, 1990). Dado que aflatoxina B₂ (AFB₂) no tiene este doble enlace, es cientos de veces menos cancerígena que la AFB₁.

A diferencia de otras estructuras policetónicas descritas (que sólo requieren una policétido sintasa para generar un producto policetónico) la biosíntesis de esterigmatocistina y de aflatoxina es iniciada por la producción de un ácido graso sintasa única, codificada por dos genes del "cluster", *fas-1* y *fas-2* (Mahanty *et al.*, 1996; Watanabe *et al.*, 1996; Woloshuk y Prieto, 1998). Estos genes y un gen de policétido sintasa (*pksA*) están involucrados en la síntesis del decacétido de malonil Coenzima A (Townsend *et al.*, 1984; Bhatnagar *et al.*, 1991 y 1992; Trail *et al.*, 1995; Feng *et al.*, 1995; Brown *et al.*, 1996).

La conversión de ácido norsolorínico en averantina (Bennett *et al.*, 1980) requiere una deshidrogenasa (Bhatnagar *et al.*, 1992), codificada por el gen *nor-1* (Chang *et al.*, 1991; Trail *et al.*, 1994). Genes adicionales, tales como *norA* (Bennett *et al.*, 1994; Cary *et al.*, 1996) o *norB* (Yu *et al.*, 2002) se encuentran en el grupo que codifican deshidrogenasas que también podría ser capaz de llevar a cabo la conversión. El gen *nor-1* fue clonado por complementación de acumulación del mutante de un ácido norsolorínico (Chang *et al.*, 1991). El gen que codifica una cetoreductasa responsable de la conversión de una versicolorina A a esterigmatocistina se clonó también del mismo *A. parasiticus* (Yu *et al.*, 2003). Se ha confirmado que el próximo intermedio estable es dimetilesterigmatocistina que da lugar a una esterigmatocistina y un citocromo P-450 monooxigenasa codificada por *verA*, que se requiere para la conversión de versicolorina A a dimetilesterigmatocistina (Yabe *et al.*, 1989 y 1993). Un citocromo P-450 monooxigenasa codificada por el gen *avnA* se requiere para la conversión de averantina a hidroxiaverantina (Yu *et al.*, 1997), mientras que el gen *adhaA* que codifica un alcohol deshidrogenasa (Chang *et al.*, 2000) se encontró que era esencial para la conversión de hidroxiaverantina a averufina. El gen *avfA* que codifica una oxidasa es responsable de la conversión de averufina a acetato de versiconal hemiacetal (Yu *et al.*, 2000) en ambos *A. parasiticus* y *A. flavus*. Recientemente, un gen designado como *estA*, que podría codificar una esterasa (Bennett *et al.*, 1976;

Yabe *et al.*, 1991; Yabe *et al.*, 1991b; Kusumoto *et al.*, 1996) para la conversión de acetato de versiconal hemiacetal a versiconal, ha sido clonado (Skory *et al.*, 1992). El gen *vbs* (Silva y Townsend, 1996; McGuire *et al.*, 1996) codifica una deshidratasa que cataliza la ciclación de cadena lateral de acetato de versiconal hemiacetal con versicolorina B. La conversión de versicolorina B a versicolorina A es catalizada por una desaturasa codificada por el gen, *verB* (Bhatnagar *et al.*, 2003) que es homóloga a *stcL* en *A. nidulans* (Kelkar *et al.*, 1997).

En la etapa posterior de la biosíntesis de la aflatoxina, una *O*-metiltransferasa requerida para la conversión de esterigmatocistina a *O*-metilesterigmatocistina ha sido detectada, purificada y caracterizada (Cleveland *et al.*, 1987; Bhatnagar *et al.*, 1988; Keller *et al.*, 1993). El gen que codifica *O*-metiltransferasa se clonó utilizando un anticuerpo contra la *O*-metiltransferasa (Yu *et al.*, 1993). La secuencia de ADN genómico de *omtA* también se determinó a partir tanto de *A. parasiticus* y *A. flavus* (Yu *et al.*, 1995). El *omtA* fue el primer gen cuya participación en el producto de la biosíntesis de aflatoxina fue confirmado y estudiado a fondo *in vitro* por ensayo enzimático. Otro gen llamado *omtB* que codifica una metiltransferasa requerida para la conversión de dimetil-esterigmatocistina a esterigmatocistina y dihidrodimetil-esterigmatocistina a dihidro-esterigmatocistina fue identificado (Yu *et al.*, 2000). El gen *omtB* fue clonado simultáneamente por el grupo de Yabe y llamado *dmtA* (Motomura *et al.*, 1999). El paso final en la formación de aflatoxinas es la conversión de *O*-metil-esterigmatocistina o dihidroxi-*O*-metil-esterigmatocistina a aflatoxina B₁, B₂, G₁ y G₂, pasos que requieren la presencia de un NADPH dependiente de una monooxigenasa (*orda*) (Prieto y Woloshuk, 1997; Yu *et al.*, 1998). La formación de las toxinas G probablemente requiere un paso oxidativo adicional (Bhatnagar *et al.*, 1992; Yu *et al.*, 1998; Yabe *et al.*, 1999).

Para que la acción tóxica de la AFB₁ ocurra, es necesario que ésta tenga un cambio metabólico, el cual ocurre cuando llega al hígado de los animales que la ingieren. Dicho cambio ocurre en las células hepáticas, en la fracción microsomal citocromo P-450 (CYP1A2) y participa el oxígeno y las enzimas dependientes del

NADPH localizadas en el retículo endoplásmico de las células (Groopman *et al.*, 1988). El compuesto formado es AFB₁ exo-8,9-epóxido, que es altamente inestable y se une con alta afinidad a la guanina, reaccionando covalentemente con el ADN para formar aductos, responsables del efecto carcinogénico y mutagénico de las aflatoxinas (Smela *et al.*, 2001; Turner *et al.*, 2005; Farombi, 2006). En este proceso, la AFB₁ también es transformada en AFM₁ por la CYP1A2, en una proporción de 1:3. Los mamíferos que ingieren dietas contaminadas con AFB₁ excretan cantidades de AFM₁ a través de la leche, presentándose en asociación con las fracciones proteicas de la leche y así de algunos derivados lácteos como yogur y queso (Shibamoto y Bjeldanes, 2009).

La Tabla 1.3 muestra los elementos que intervienen en la biosíntesis, tanto de AFB₁ como de AFM₁.

1.2 IMPORTANCIA ECONÓMICA

Las micotoxinas pueden presentarse tanto en las regiones templadas como en las tropicales del mundo, dependiendo de las especies de hongos. Los principales productos básicos de alimentos afectados son los cereales (maíz, trigo y arroz), nueces, frutos secos, café, cacao, especias, semillas y aceites de oleaginosas (algodón, cacahuete, colza, coco, girasol y otros), mandioca, frutas, guisantes y frijoles secos (Soriano *et al.*, 2007; Decastelli *et al.*, 2007; Turner *et al.*, 2009; Mohammadian *et al.*, 2010; Movassagh, 2011).

La Food and Agriculture Organisation (FAO) estima que más de un 25% de la producción de alimentos en el mundo está contaminada en un cierto grado con micotoxinas (Lawlor y Lynch, 2001; Marin *et al.*, 2013). La mayoría de los hongos crecen en los cereales, produciendo sus toxinas cuando las condiciones son favorables. Así, se estima que entre el 25 y 40% de los cereales puede estar contaminado con alguna o varias micotoxinas (Pittet, 1998). De esta forma, los cereales cobran una atención prioritaria por la incidencia de su contaminación así

Tabla 1. 3. Biosíntesis de aflatoxinas, enzimas y cofactores que intervienen, así como el gen que codifica la síntesis de la enzima correspondiente.

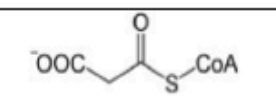
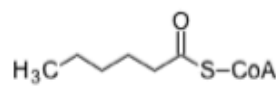
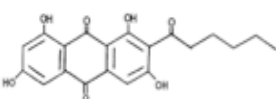
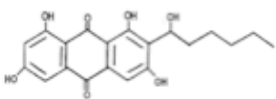
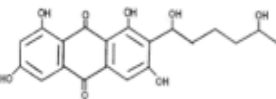
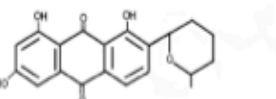
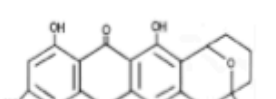
SUSTRATO	GEN (Nombre antiguo)	ENZIMA / COFACTOR	ESTRUCTURA	PRODUCTO
Acetil-CoA + CO ₂	<i>aflA (fas-1)</i>	Acetil-CoA carboxilasa/ Mg ²⁺ , ATP, Biotina		Malonil-CoA
2 Malonil-CoA	<i>aflB (fas-2)</i>	Maloniltransferasa		Hexanoil-CoA
Hexanoil-CoA	<i>aflC (pksA)</i>	Complejo acido graso sintasa / NADPH		Ácido norsolorínico (NOR)
NOR	<i>aflD (nor-1)</i> <i>aflE (norA)</i> <i>aflF (norB)</i>	Reductasa NOR-Reductasa Deshidrogenasa / NADPH, Zn ²⁺		Averantina (AVN)
AVN, O ₂	<i>aflG (avnA)</i>	P450 monooxigenasa / NADPH		5'-Hidroxiaverantina (AVHN)
AVHN	<i>Afl (adhA)</i>	Alcohol Deshidrogenasa / NADP ⁺		Averufanina (AVNN)
AVNN		AVNN Deshidrogenasa		Averufina (AVF)

Tabla 1. 3. (Continuación).

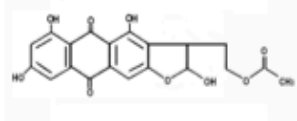
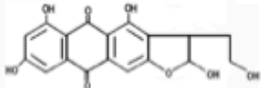
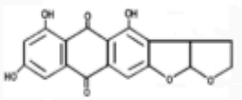
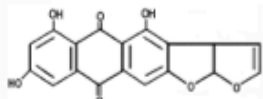
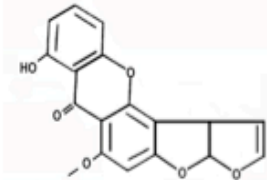
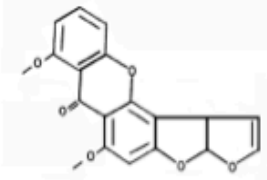
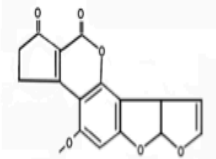
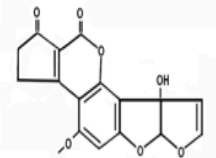
AVF	<i>aflI (avfA)</i>	Versiconal Oxidasa NADPH		Acetato de versiconal hemiacetal (VHA)
VHA	<i>aflJ (estA)</i>	VHA Esterasa		Versiconal (VAL)
VAL	<i>aflK (vbs)</i>	Sintasa		Versicolorina B (Ver B)
Ver B	<i>aflL (verB)</i>	Desaturasa		Versicolorina A (Ver A)
Ver A	<i>aflM (ver-1)</i> <i>aflN (verA)</i>	Deshidrogenasa Monooxigenasa		Esterigmatocistina (ST)
ST	<i>aflP (omtA)</i>	ST-6-Transferasa / NADPH		O-Metilesterigmatocistina (OMST)

Tabla 1. 3. (Continuación).

OMST	<i>aflQ (ordA)</i>	6-OMST Dioxigenasa / Fe ³⁺		Aflatoxina B₁ (AFB₁)
AFB ₁	<i>cyp1A2</i>	CYP1A2 (Hidroxilasas)		Aflatoxina M₁ (AFM₁)

Fuente: (Yu *et al.*, 2004).

como por su elevado consumo por animales y el hombre. Sin embargo, la incidencia y concentración de las micotoxinas en los productos es variable y esporádica en diferentes años y localizaciones geográficas (CAST, 1989; EFSA, 2007; Nemati *et al.*, 2010; Almeida *et al.*, 2013), en parte debido a la variación en las condiciones climáticas.

La AFB₁ afecta fundamentalmente a las aves, cerdos y otros monogástricos. Los rumiantes son menos vulnerables a la ingestión de aflatoxina. Cuando los animales ingieren alimentos contaminados por aflatoxinas, éstas se transfieren a la cadena alimentaria, aunque de forma distinta entre rumiantes y el resto. En el caso de los rumiantes, la ingestión durante largos períodos de tiempo, la producción (leche, carne o lana), la reproducción y el crecimiento pueden verse alterados (Hussein y Brasel, 2001). A diferencia de los no rumiantes, poseen una primera barrera de defensa que la constituye la microflora ruminal, sin embargo ésta no es capaz de degradar las aflatoxinas (Driehuis *et al.*, 2010).

En los animales monogástricos la sintomatología clínica puede producirse tras el consumo de piensos contaminados con concentraciones por encima de 50 ppb de AFB₁, mientras que en el vacuno la sintomatología sobreviene con concentraciones por encima de 1,5 - 2,23 µg/kg (Miller y Wilson, 1994; Kourousekos, *et al.*, 2012). Dependiendo de la presencia de otros factores simultáneos, pequeñas cantidades de AFB₁ (>20 ppb) pueden provocar efectos tóxicos. En estas condiciones un nivel de aflatoxina por encima de 100

ppb puede resultar también tóxico en rumiantes. Los síntomas de aflatoxicosis aguda consisten en depresión, anorexia, pérdida de peso, afección gastrointestinal, hemorragias, lesiones hepáticas (hígado graso, necrosis, y apoptosis) y edema pulmonar. Los síntomas a una exposición moderada y prolongada a aflatoxinas pueden reflejarse en un descenso en el consumo de pienso y de las producciones (crecimiento, producción de huevos y leche) (Creppy, 2002; Elkak *et al.*, 2011; Brayden, 2012).

En el caso del ganado lechero se ha mencionado que 100 ppb de aflatoxinas pueden reducir la producción de leche (Paterson y Anderson 1982), sin embargo en este caso el problema está enfocado más sobre los residuos de la AFM₁ en leche (Mwanza y Dutton, 2013). Se sabe que las vacas transforman del 0,3 al 4,8% de la AFB₁ contenida en el alimento en AFM₁, con un promedio de biotransformación del 1,6% (Van Egmond, 1989; Hussain *et al.*, 2010; Milicevic *et al.*, 2010; Siddappa *et al.*, 2012). La FDA fija un valor de 0,5 ppb de AFM₁ en la leche, que correspondería a un valor máximo de AFB₁ en el alimento del ganado lechero de 20 ppb. En el caso de la Comunidad Europea el valor límite de AFM₁ en leche es de 0,05 ppb (Kos *et al.*, 2013; Levic *et al.*, 2013). Los residuos de aflatoxina aparecen en la leche en unas 12 h después del inicio del consumo de alimento contaminado y desaparecen en unos 2 ó 3 días, después que el alimento contaminado se ha retirado (Kiermeier, 1973; Frobish *et al.*, 1986; Fallah, 2010; Tsakiris *et al.*, 2013). La concentración de AFM₁ en la leche varía según la raza de la vaca, la concentración de AFB₁ en la ración alimenticia del animal, la cantidad y duración del consumo de alimento contaminado y el estado de salud del animal (Frobish, 1986; Van Egmond, 1989; Elzupir y Elhoussein, 2010; Assem *et al.*, 2011; Iaha *et al.*, 2011). Factores ambientales como la geografía del sitio de pastoreo, condiciones ambientales y climáticas y desarrollo del país productor de leche y productos lácteos, juegan un papel importante en la variación de la presencia de AFM₁ en estos productos (Rahimi *et al.*, 2010; Skrbic *et al.*, 2014; Bilandzic *et al.*, 2014).

Se han calculado los valores extrapolados de la concentración de AFB₁ en los piensos del ganado, a partir de los valores de AFM₁ que se obtienen a partir del análisis de muestras de leche, tomando en consideración que el 1,6% de la AFB₁ ingerida se convierte en AFM₁ por vacas de pastoreo. Al respecto,

Skrbic *et al.* (2014) sugieren la aplicación de la siguiente fórmula:

$$AFB_1 \left(\frac{\mu g}{kg} \right) = \frac{\left[AFM_1 \left(\frac{ng}{kg} \right) \times 100 \right]}{1,6} \times 1000$$

Lubulwa y Davis (1994) han estudiado las pérdidas económicas atribuibles únicamente a la presencia de aflatoxinas, en maíz y maní, en países de Asia sudoriental (Tailandia, Indonesia y Filipinas), llegando a la conclusión de que alrededor del 66% de las pérdidas totales se deben al maíz contaminado, y las pérdidas atribuibles al deterioro y a los efectos dañinos sobre la salud de las personas y de los animales representaban, respectivamente, el 24, 60 y 16 % del total. No obstante, el estudio tuvo en cuenta únicamente las pérdidas relacionadas con la morbilidad y las muertes prematuras ocasionadas por el cáncer. En consecuencia, es probable que las pérdidas relacionadas con las aflatoxinas sean mucho mayores si se incluyen las otras consecuencias para la salud humana del efecto inmunotóxico de las aflatoxinas (y otras micotoxinas) (Zain, 2011; Martin *et al.*, 2013).

1.3 EFECTOS FISIOPATOLÓGICOS

La toxicidad de las aflatoxinas debe distinguirse entre aguda y crónica. Actualmente, hay muy baja incidencia de toxicidad aguda por aflatoxinas en los seres humanos. La intoxicación aguda se produce cuando la comida está contaminada con altas concentraciones de aflatoxinas. Esto ocurre de forma esporádica en los países en desarrollo, como ocurrió durante el brote agudo y severo de aflatoxicosis humana en Kenia en 2004, donde se registraron 317 casos y 125 defunciones (39,4% de mortalidad) (Lewis *et al.*, 2005; Probst *et al.*, 2007; Makun *et al.*, 2010). Las aflatoxinas producen intoxicación aguda, tras una elevada ingestión de la toxina, con efectos como hemorragias, daño agudo del hígado, edema, alteraciones en la digestión, absorción y/o metabolismo de

alimentos y posiblemente la muerte. También se puede producir intoxicación crónica, tras una prolongada exposición a niveles bajos de micotoxina, con efectos generalmente subclínicos y difíciles de reconocer, que se dan a largo plazo y pueden ocurrir en cualquier momento después de haberse expuesto a las aflatoxinas durante meses o años. Entre éstos destacan los efectos carcinogénicos, teratogénicos, inhibición de la síntesis de proteínas, pueden actuar como anticoagulantes y pueden actuar sobre el sistema inmunológico causando inmunosupresión (CAST, 2003; Williams, 2004; Wu y Santella, 2012) (ver Figura I.1).

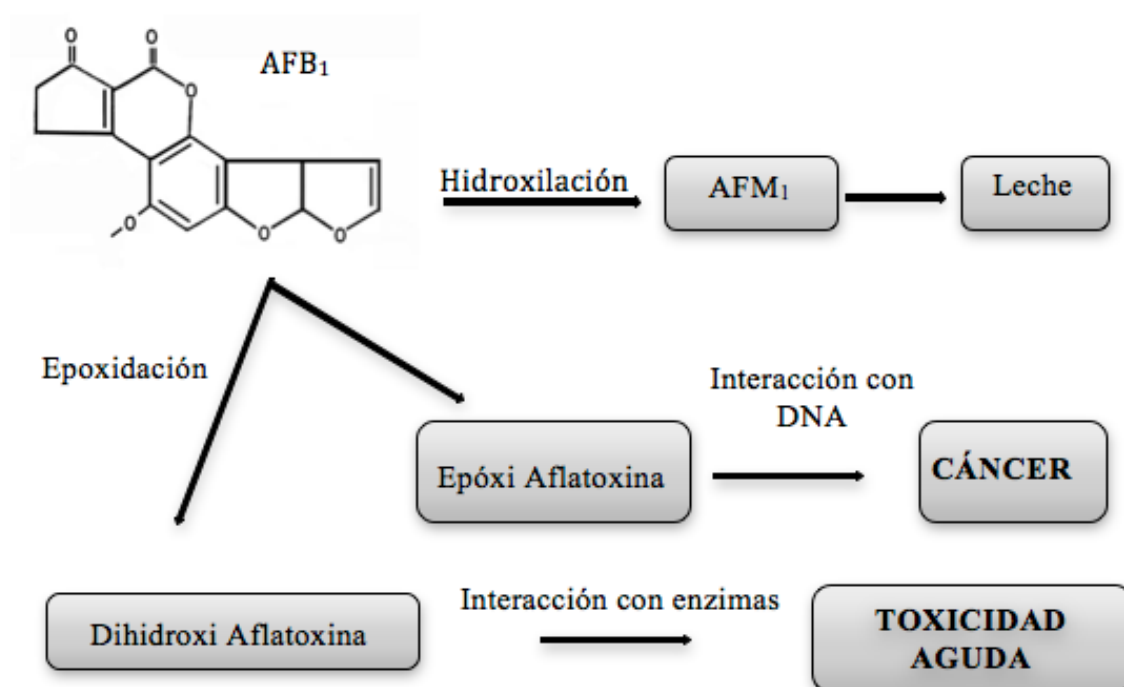


Figura I. 1. Efecto de la biotransformación de la aflatoxina B₁.

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, <http://www.iarc.fr/>) ha clasificado a las aflatoxinas AFB₁ y AFM₁ como carcinogénicas para humanos (grupo 1), a la ocratoxina A y fumonisinas como posibles carcinógenos para humanos (grupo 2B) y a la zearalenona como carcinógeno grupo 3 (no puede ser clasificado respecto a su carcinogenicidad para el ser humano) (IARC, 1993, 1999, 2002).

Su papel en la hepatocarcinogénesis, a menudo junto con el virus de la

hepatitis B, está bien establecida (Wild y Turner, 2002; INVS, 2011). Los estudios muestran que la infección concurrente con el virus de la hepatitis B (HBV) durante la exposición a la aflatoxina, incrementa el riesgo de presentar carcinoma hepatocelular. Como el virus de la HBV interfiere con la habilidad de los hepatocitos en metabolizar aflatoxinas, una aflatoxina B₁-ADN conjugada puede estar presente durante un prolongado período en el hígado, incrementando la probabilidad de daño de oncogénesis en el gen *p53* (Gursoy-Yuzugullu *et al.*, 2011). Este efecto es sinérgico y el daño resulta mucho mayor que el daño producido por aflatoxina o del virus de la HBV individualmente (Williams, 2004). Hay algunas evidencias de asociación con el síndrome de Reye, el Kwashiorkor y la hepatitis aguda (Wild y Hall, 1996; Egal *et al.*, 2005). Esto concuerda con estudios que afirman que la exposición a las aflatoxinas en los primeros años de vida, se ha asociado con problemas de crecimiento, en especial el retraso del crecimiento en infantes (Gong *et al.*, 2002; Juan *et al.*, 2013).

Los principales factores que tienen influencia sobre la toxicidad de las micotoxinas en los humanos son: la biodisponibilidad y toxicidad de la micotoxina, los sinérgicos entre ellas, la cantidad de micotoxina ingerida diariamente en función de la concentración de micotoxina y de la cantidad de alimento ingerido, la continuidad o intermitencia de ingestión del alimento contaminado, el peso del individuo y el estado fisiológico y de salud de éste, y la edad del individuo. Juan *et al.* (2014) han mencionado que el potencial de riesgo para la salud debido a cualquier contaminante presente en los alimentos, es tres veces más alta para lactantes que para los adultos. Así pues, los niños y los jóvenes son más susceptibles a la toxicidad de las micotoxinas debido a una mayor variación del metabolismo basal, y pueden no tener suficientes mecanismos bioquímicos para la detoxificación. En los niños, el cerebro continúa su desarrollo durante muchos años después del nacimiento y esto puede causar una mayor susceptibilidad a las micotoxinas que afectan al sistema nervioso central (Kuiper-Goodman, 1994; Liu y Wu, 2010). La conjugación de todos los factores antes mencionados y que tienen influencia sobre la toxicidad de las micotoxinas, hace que el análisis de riesgo respecto a los problemas de salud en humanos (hepatotóxicos, nefrotóxicos, neurotóxicos, gastroentéricos, cancerígenos e inmunosupresivos) que pueden ser causados por la ingestión de

esos metabolitos tóxicos, sea complejo y la mayor parte de las veces difícil de entender y correlacionar (Smith *et al.*, 1994; Gürbay *et al.*, 2010). Por otro lado, la situación es aún más complicada ya que en la interpretación de los datos epidemiológicos que pueden estar relacionados con una micotoxina, debemos también tener en cuenta la posible influencia de otros factores de riesgo como el estado nutricional del individuo, las infecciones endémicas y la ingestión de otras sustancias tóxicas (Kuiper-Goodman, 1994). Al respecto, algunos investigadores han estudiado la presencia de diversas micotoxinas presentes en alimentos destinados a nutrición infantil (Alvito *et al.*, 2010; Bonerba *et al.*, 2010; Romagnoli *et al.*, 2010; Zinedine *et al.*, 2010; Marín *et al.*, 2012; Kabak, 2012; Juan *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2014).

Dado que la leche materna es el alimento principal para los niños, se considera a esta población más susceptible a los efectos adversos de las micotoxinas (Sadeghi *et al.*, 2009). Hay una mayor conciencia de la relación entre el crecimiento y la salud del feto y del lactante, y el riesgo de enfermedad en la edad adulta (Delisle, 2002; Firestone y Amler, 2003; Wild y Kleinjans, 2003; Barker, 2004). La exposición a largo plazo pre y postnatal a las aflatoxinas podría ser uno de los factores que contribuyen a los trastornos del crecimiento y/o la aparición temprana de carcinoma hepatocelular en países con una alta incidencia de la enfermedad (Afshar *et al.*, 2013).

Un indicador usual de la salud reproductiva es el bajo peso al nacer, definido como peso al nacer inferior a 2500 g. Se estima que más de 20 millones de infantes a nivel mundial, lo que representa un 15,5 por ciento de todos los nacimientos, nacen con bajo peso al nacer con 95,6% de ellas en países en vía de desarrollo (Unicef/WHO, 2004). El bajo peso al nacimiento está estrechamente asociado con la morbilidad y mortalidad fetal y neonatal, inhibición del crecimiento, desarrollo cognitivo deficiente y enfermedades crónicas más tarde en la vida (Shuaib *et al.*, 2010; Lei *et al.*, 2014). Estudios realizados por diferentes grupos de investigadores encontraron asociaciones significativas o correlaciones entre el peso al nacer y las aflatoxinas (Yousef *et al.*, 2004; Turner *et al.*, 2007). Asimismo, se encontró que la aflatoxina en suero materno es un factor de riesgo para la ictericia en recién nacidos. En general la leche materna en los países en vía de desarrollo presenta índices más altos de contaminación

por aflatoxinas que en los países de altos ingresos (Shuaib *et al.*, 2010; Iha *et al.*, 2014). En China, Lei *et al.* (2014) estimaron la presencia de AFM₁ en muestras de orina de mujeres embarazadas, donde se encontró que la frecuencia de detección de AFM₁ en las mujeres y los hombres eran el 84 y 16% respectivamente, lo que sugiere que la población de mujeres embarazadas especialmente, fue ampliamente expuesta a AFM₁. A pesar de las indicaciones a los padres chinos a prestar más atención a la selección de alimentos sanos, debido a la "política de un hijo por familia", la detección de AFM₁ en la orina de las mujeres embarazadas indica que todavía tienen que ser controlados los alimentos con respecto a la AFM₁.

En Sri Lanka, un estudio realizado por Desalegn *et al.* (2011) han relacionado la presencia de AFM₁ en muestras de orina de personas con enfermedad crónica renal de origen desconocido.

En cuanto a los efectos de las aflatoxinas en el sistema reproductivo, éstas ejercen efectos reproductivos negativos en el hombre, causando retraso en el desarrollo testicular, degeneración testicular, disminución de los posibles cambios morfológicos, reproductivos, la reducción de tamaño y peso de los testículos, reducción de índice meiótico, la disminución en el porcentaje de espermatozoides vivos, esperma con un aumento de anomalías, degeneración del epitelio seminífero y disminución de concentración de testosterona en el plasma, entre otros (CAST, 2003).

En referencia a los efectos sobre el sistema inmune, éstas actúan como inmunomoduladores, causando una disminución en la resistencia a infecciones secundarias por hongos, bacterias y parásitos. La respuesta celular es particularmente sensible a las aflatoxinas, como se evidencia por una disminución de la actividad de linfocitos T o B, actividad deficiente de macrófagos y funciones efectoras de neutrófilos, la síntesis modificada de citoquinas inflamatorias, citolisis suprimida mediada por células NK, disminución de la inmunidad por vacunación y la función inmune alterada en los animales en crecimiento (Jiang *et al.*, 2008).

1.4 ESPOSICIÓN A LAS AFLATOXINAS

Un enfoque común para estimar la exposición de la población a las aflatoxinas es la combinación de datos de contaminación con los datos de consumo. Si bien los datos de contaminación se proporcionan a menudo por los investigadores, los datos de consumo en la mayoría de los casos son extraídos de encuestas dietéticas. Estas encuestas están diseñadas principalmente para evaluar el estado nutricional de las poblaciones en materia de energía y/o nutrientes, como es el caso de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 (ENSANUT 2012) realizada en México.

En Europa la EFSA (<http://www.efsa.europa.eu/>) ha desarrollado y aplicado en los últimos 5 años encuestas referentes al consumo de alimentos, cada vez con un creciente nivel de detalle. El recordatorio del consumo de alimentos en las últimas 24 h ha sido propuesto como el método estándar de elección. Este método ha sido utilizado para evaluar la exposición de niños y adultos a varias micotoxinas (Sizoo y Van Egmond, 2005; Bakker *et al.*, 2009; Dubuisson *et al.*, 2010; Haighton *et al.*, 2012; Hassan y Kassaify, 2014).

Entre estos estudios se han destacado los realizados en bebés, niños y adolescentes porque representan los principales grupos de riesgo y la población más vulnerable (Hernández y Navarro, 2010; Meucci *et al.*, 2010; Rubert *et al.*, 2011). Se sospecha que los pacientes celíacos presentan una exposición mayor a las aflatoxinas, ya que la mayoría de los alimentos a base de cereales sin gluten reemplazan la harina de trigo por harina de maíz (Cano-Sancho *et al.*, 2011, 2012, 2013; Dall'Asta *et al.*, 2012).

Se han realizado estudios de dieta total (TDS) para proporcionar estimaciones más exactas de contaminación por grupos de alimentos que consume la población o grupo de individuos. Uno de los estudios pioneros en aplicar la TDS fue un estudio francés que incluía aflatoxinas (AFB₁, B₂, G₁ y G₂) y la AFM₁, ocratoxina, patulina, tricotecenos, (diacetoxiscirpenol, monoacetoxiscirpenol, neosolaniol, HT-2, T-2, T2 triol), 3-acetildeoxinivalenol,

15-acetildeoxinivalenol, DON, fusarenona X, Nivalenol (NIV), Zen y fumonisinas (FB₁ y FB₂) (Leblanc *et al.*, 2005), y se ha repetido más recientemente añadiendo varias micotoxinas emergentes (Sirot *et al.*, 2009 y 2013). Otro estudio basado en TDS se ha llevado a cabo en Cataluña para evaluar la exposición de los grupos más vulnerables a las principales micotoxinas (Cano-Sancho *et al.*, 2012a, b).

A pesar de que el nivel de aflatoxinas de 0,5 µg/kg ha sido considerado como seguro tanto por diversos países a nivel mundial, estudios realizados por Gimeno y Martins (2006, 2011), demuestran lo contrario. La TD50 (dosis de micotoxina con la cual el 50% de los individuos pueden desarrollar tumores malignos) para la AFM₁ es de 10,38 µg/kg de peso corporal/día, que dividida por un factor de seguridad 5000, nos daría un valor de 2 ng/kg de peso corporal/día (Gimeno, 2002) que podríamos atribuir a la ingesta diaria de AFM₁ que puede ser tolerada (TDI = 2 ng/kg de peso corporal/día). Si consideráramos que toda la leche consumida tuviera una contaminación con AFM₁ de 0,05 µg/kg (nivel máximo permitido en la UE) o de 0,5 µg/kg (nivel máximo permitido en EEUU y otros países), la ingesta de AFM₁ en la dieta sería estimada en 15 y 150 ng de AFM₁/persona/día (0,015 y 0,150 µg/persona/día) respectivamente (JECFA, 2001; WHO, 2002). Considerando una persona de 50 kg de peso, la ingesta de AFM₁/kg de peso corporal/día sería de 0,3 ng y 3 ng respectivamente para los dos niveles máximos permitidos e indicados anteriormente. Por lo tanto, el segundo valor estaría por encima de la TDI de AFM₁, lo cual refuerza la necesidad de la aplicación del principio ALARA (As Low As Reasonable), que indica que para este tipo de carcinógenos no hay una dosis máxima por debajo de la cual no se producen tumores malignos, por lo que el nivel de exposición debería ser cero para tener un riesgo nulo de padecer cáncer de hígado que pudiera ser provocado por las aflatoxinas en general (Haighton *et al.*, 2012).

1.5 NORMATIVA

La Food and Drug Administration (FDA) establece niveles de

concentración para AFB₁ de no más de 20 µg/kg para alimentos de consumo humano (Park, 1993), y varían entre 2 y 8 µg/kg para AFB₁ y de 4 a 15 µg/kg para AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂, dependiendo de los diferentes géneros alimenticios (cacahuetes, frutos de cáscara, frutos secos y productos derivados de su transformación, cereales y productos derivados de su transformación) tanto si son utilizados para consumo humano directo o como para ingredientes de los productos alimenticios (Van Egmond, 1999). La legislación también incluye en estos géneros alimenticios, aquellos que son sometidos a procesos de selección o bien a otros tratamientos físicos antes del consumo humano directo o como ingredientes de productos alimenticios y tiene en cuenta que esos procesos pueden reducir la concentración original de AFB₁. Se especifica también que esas concentraciones máximas admisibles se refieren a la parte comestible, excluyendo pues la cáscara en los géneros alimenticios que la tienen. La legislación de la Unión Europea (UE) también establece niveles máximos permitidos de 5 µg/kg para AFB₁ y de 10 µg/kg para AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂, en algunas especias. En el caso de alimentos infantiles y alimentos elaborados a base de cereales para lactantes y niños de corta edad y alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales dirigidos específicamente a los lactantes, la concentración máxima permitida de AFB₁ es de 0,10 µg/kg (referido a materia seca cuando se trata de alimentos infantiles y alimentos elaborados a base de cereales).

El nivel máximo permitido de AFM₁ en leche líquida, deshidratada o producto lácteo, varía de un país a otro y depende, en gran medida, de consideraciones económicas (Stoloff *et al.*, 1991).

La legislación en la UE establece los niveles máximos admisibles en 0,05 µg/kg (0,05 ppb) para AFM₁ en leche (leche cruda, leche para la fabricación de productos lácteos y leche tratada térmicamente). En el caso de preparados para lactantes, preparados de continuación (incluidas la leche para lactantes y la leche de continuación), y alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales dirigidos específicamente a los lactantes, la concentración máxima permitida de AFM₁ es de 0,025 µg/kg (Commission Regulation, 2006).

En otros países (Australia, Holanda, Rumania, Suiza, EEUU) las

concentraciones máximas admitidas para la AFM₁ en la leche y productos lácteos varían entre 0,01 y 0,5 µg/kg, dependiendo del país y del alimento lácteo. Es de destacar que en Suiza y Brasil, los alimentos lácteos para niños tiene un límite de contaminación con AFM₁ de 0,01 µg/kg y que en Australia y EEUU (Estados Unidos de América) la concentración máxima de AFM₁ permitida en la leche es de 0,5 µg/kg. No hay legislación para la AFM₁ en quesos ni mantequilla, sin embargo Holanda tiene establecido un máximo de tolerancia de 0,2 y 0,02 µg/kg, respectivamente. Algunos países como Austria y Suiza tienen un límite de AFM₁ para quesos de 0,25 µg/kg (Smith *et al.*, 1994; CAST, 2003). La norma adoptada en EEUU para AFM₁ en la leche, lo ha sido también para algunos países de la América Latina, entre ellos los que forman parte de MERCOSUR (Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay) (GMC, 2002). Vemos pues que en el caso de EEUU y otros países, el nivel de tolerancia para AFM₁ en la leche es 10 veces superior al de la UE.

La regulación en países como Estados Unidos, Brasil y México, establece como máximo nivel aceptable para AFM₁ en leche cruda, leche tratada térmicamente y producto lácteo, de no más de 0,5 µg/kg (Creppy, 2002; NOM-243-SSA1, 2010; ANVISA, 2011). Sin embargo, ni la regulación en Estados Unidos ni la norma oficial mexicana hacen mención específica a niveles aceptables de AFM₁ para fórmulas infantiles ni para fórmulas de continuidad.

Para las otras aflatoxinas, en países como Australia, Canadá, Colombia, Hungría, India, Japón, México, Cuba, Tailandia y EEUU, también existen niveles máximos de tolerancia que oscilan entre 5 y 30 µg/kg para AFB₁ y para la suma de las cuatro aflatoxinas, dependiendo del país y del alimento en cuestión (frutos de cáscara y productos derivados, cacahuates, todos los géneros alimenticios), destacando a la India con el nivel de tolerancia más alto (30 µg AFB₁/kg para todos los géneros alimenticios) y a México y EEUU con el nivel de tolerancia más alto para la suma de las cuatro aflatoxinas (20 µg/kg en todos los géneros alimenticios) (Yousef, 1986; Smith *et al.*, 1994; Unusan, 2006; Zinedine, 2007).

1.6 MÉTODOS DE TRATAMIENTO PARA EVITAR LOS EFECTOS DE LAS MICOTOXINAS

Idealmente, la mejor manera de prevenir la contaminación por aflatoxinas en la cadena alimentaria es la adopción de prácticas agrícolas mejoradas y el control de las condiciones de almacenamiento de los productos. Sin embargo, dificultades prácticas para prevenir eficazmente la contaminación, así como la estabilidad que presentan las aflatoxinas en condiciones normales del procesamiento del alimento, han llevado a la investigación sobre los métodos de destoxificación que sean seguros, eficaces, amigables con el medio ambiente y un balance positivo costo-beneficio (Wu *et al.*, 2009). La detoxificación de las micotoxinas se refiere al conjunto de tratamientos posteriores a la cosecha dirigidos a eliminar o reducir los efectos tóxicos de las toxinas sobre los animales. Las estrategias pueden dividirse en tres, como son las físicas, químicas y microbiológicas destinadas a destruir, modificar o adsorber las micotoxinas, y por lo tanto eliminar o disminuir sus efectos tóxicos (Farzaneh *et al.*, 2012).

1.6.1 Métodos químicos

Entre los métodos químicos, se ha utilizado la amonización y nixtamalización. Otros agentes utilizados han sido los agentes oxidantes (peróxido de hidrógeno, ozono), o algunos ácidos y álcalis (Scott, 1998). Sin embargo, no existen informes detallados disponibles sobre los efectos secundarios del uso de estos agentes (Bhat *et al.*, 2010), o en algunos casos como los bisulfitos o el ozono, su uso en piensos no es económicamente factible. Solamente la amonización mediante hidróxido de amonio o gas amonio, ha sido desarrollada a escala industrial en algunos países para su uso con alimentos para animales (Driehuis *et al.*, 2010; Luo *et al.*, 2014), obteniéndose resultados aceptables.

Algunos esfuerzos se han dirigido a eliminar o reducir el impacto de las micotoxinas en los animales mediante el uso de diferentes productos adsorbentes

(Ramos *et al.*, 1996; Di Natale *et al.*, 2009). En la actualidad, la utilización de adsorbentes de micotoxinas en el contenido digestivo es el método considerado de elección en la protección de los animales frente al consumo de ingredientes contaminados. Los sustratos más utilizados son los aluminosilicatos (zeolitas naturales) (Harvey *et al.*, 1993), clinoptilolita, aluminosilicatos de sodio y calcio hidratados (HSCAS) (Kubena *et al.*, 1990; Huff *et al.*, 1992; Jindal *et al.*, 1993), bentonitas naturales, (Santurio *et al.*, 1999), carbón activado (Edrington *et al.*, 1997) o diferentes polímeros especiales (Huwig *et al.*, 2001). Sin embargo, debemos destacar también el riesgo de que algunos adsorbentes pueden fijar algunos micronutrientes y reducir la biodisponibilidad de algunos minerales y vitaminas (Yiannikouris y Jouany, 2002).

Recientes estudios se han enfocado en la utilización del ozono en un esfuerzo para desarrollar un método efectivo, rápido y seguro para la degradación de AFB₁ en cultivos de cereales (Luo *et al.*, 2014). El ozono ha sido utilizado en diversos productos, tales como cacahuate, cereales, tabaco y ha sido aplicado en forma de gas o en forma de ozono acuoso (Naguib *et al.*, 2011; de Alencar *et al.*, 2012; Diao *et al.*, 2013). Se ha aplicado una capa de ozono en el procesamiento de granos o en el transportador de granos de tornillo modificado para tratar plagas de insectos, hongos contaminantes y aflatoxinas (Tiwari *et al.*, 2010; McDonough *et al.*, 2011; Luo *et al.*, 2013).

1.6.2 Métodos biológicos

El control biológico es un recurso disponible prometedor para reducir la acumulación de aflatoxinas, que consiste en utilizar cepas no-toxigénicas de *Aspergillus* para reducir la incidencia de hongos productores de la toxina a través del desplazamiento competitivo (Dorner, 2004; Abbas *et al.*, 2009) y que evita el uso de transgénicos.

La descontaminación biológica mediante la utilización de microorganismos es otra de las estrategias utilizadas. Algunas bacterias lácticas o levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, *Flavobacterium aurantiacum*, *Rhizopus*, *spp*, *Neurospora sitophila*, cepas de bacterias probióticas como

Lactobacillus casei Shirota, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus johnsonii* y *Bifidobacterium bifidum* y microorganismos del rumen, que se utilizan ampliamente en la fermentación de los alimentos (Shetty y Jespersen, 2006; Hernández-Mendoza *et al.*, 2010; Bovo *et al.*, 2012) poseen estructuras de pared con capacidad para adherir micotoxinas (Stanley *et al.*, 1993; Yoon y Baek, 1999; Celik *et al.*, 2003; Serrano-Niño *et al.*, 2013).

Estudios realizados con células muertas por calor de *S. cerevisiae* combinada con un grupo de bacterias ácido lácticas, como *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium lactis*, demuestran una capacidad de ligar el 100% de aflatoxina, mostrando una potencial aplicación para reducir la concentración de AFM₁ en la leche (ElKhoury *et al.*, 2011; Farzaneh *et al.*, 2012; Corassin *et al.*, 2013).

1.6.3 Métodos físicos

Algunos métodos físicos utilizados para la inactivación de las micotoxinas son la utilización de elevadas temperaturas, los rayos UV y X o las irradiaciones con microondas (Samarajeewa *et al.*, 1990; Scott, 1998; Liu *et al.*, 2011). Otros métodos que pueden resultar efectivos son la limpieza de las semillas, su fraccionamiento mediante cribados y la extrusión. Sin embargo, la mayoría de estas técnicas son poco prácticas, no eficientes en su totalidad o pueden disminuir el contenido en micronutrientes de los alimentos (Kubena *et al.*, 1998).

1.7 PRESENCIA DE AFLATOXINAS EN LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS

La AFM₁ es un metabolito hidroxilado de la AFB₁, que se puede encontrar en la leche de animales que son alimentados con piensos que contienen maíz u otros cereales contaminados con AFB₁. Los productos de maíz y derivados, son los alimentos más contaminados, por lo tanto el análisis de los factores de riesgo de contaminación de aflatoxina B₁ en maíz es necesario para

evaluar el riesgo de contaminación con AFM₁ en leche y productos lácteos (Prandini *et al.*, 2009; Bilandzic *et al.*, 2010; Chen, 2011).

La AFM₁ es excretada en la leche y la orina (Lei *et al.*, 2013). El consumo de leche contaminada con AFM₁ por los seres humanos, especialmente los recién nacidos y los niños, es de considerable interés (Oveisi *et al.*, 2006; Alvito *et al.*, 2010), especialmente cuando se considera que la AFM₁ se excreta en la leche materna (Saad *et al.*, 1995; Ghiasian *et al.*, 2007; Piekola *et al.*, 2012). Por lo tanto, la presencia de AFM₁ en la leche y los productos lácteos pueden representar una amenaza para todo los niños que son considerados como los mayores consumidores de leche y productos lácteos (Kim *et al.*, 2000).

La AFM₁ puede ser detectada en leche y productos lácteos de 12 a 24 h después de la primera ingestión de AFB₁ (López *et al.*, 2003). Algunos autores opinan que la AFM₁ es relativamente estable durante los procesos de pasteurización y la preparación de varios productos lácteos (López *et al.*, 2003; Fallah, 2010; Anfossi *et al.*, 2012), mientras que otros autores comentan que durante el procesamiento y almacenaje, la AFM₁ presente en la leche no es estable y homogénea (Kaniou-Grigoriadou *et al.*, 2005).

La AFM₁ es estable en algunos quesos, yogures, leche pasteurizada, leche desnatada o entera y helados (Atasever *et al.*, 2011; Elkak *et al.*, 2012; Iha *et al.*, 2013). En procesos de pasteurización lenta, pasteurización rápida y proceso de esterilización, la concentración de contaminación original de la leche cruda permanece prácticamente inalterada (Yousef, 1986; Unusan, 2006; Zinedine, 2007; Atasever *et al.*, 2010; Tabari *et al.*, 2013). Teniendo en cuenta su estabilidad al calor, estas sustancias constituyen un riesgo potencial para la salud humana y animal (Zinedine y Mañes, 2009; Fernández *et al.*, 2012).

1.8 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE AFM₁

Un buen resultado depende de una buena muestra, pues ese resultado será tan bueno como lo sea la muestra. Así, el Consejo para el Fomento de la Calidad de la Leche y sus Derivados, (COFOCALEC, <http://www.cofocalec.org.mx>)

organismo privado sin fines de lucro elabora, actualiza, expide y cancela normas mexicanas en el área de productos, equipos, procesos, servicios y métodos de prueba de leche y sus derivados. Las normas NMX-F-718-COFOCALEC-2006 y la NMX-F-712-COFOCALEC-2005 describen respectivamente la “Guía para el muestreo de leche y productos lácteos” y los “Métodos de prueba”, según se expone a continuación:

1.8.1 Muestreo

El muestreo de leche y productos lácteos tiene por objeto la obtención de una muestra representativa del lote o partida de los mismos, la cual puede tomarse a lo largo de la cadena completa de producción para diferentes propósitos, como determinar la aceptación de un lote, estimar el control del entorno en el que se produjo o elaboró el producto, estudiar el origen de un problema, validar el proceso, evaluar el cumplimiento con una norma, etc.

a) Muestreo de productos fluidos

Las instrucciones de este punto pueden aplicar, según sea el caso, a la leche cruda, leche tratada térmicamente, leche fermentada, crema, suero líquido y productos similares.

En productos contenidos en pipas o grandes recipientes, el producto se debe mezclar con agitación manual, mecánica, eléctrica o mediante aire comprimido limpio, hasta obtener una buena homogeneidad.

Para productos almacenados en tanques de almacenamiento equipado con un sistema programado de agitación periódica, la muestra se puede extraer después de 1 a 2 min de agitación.

Para productos contenidos en botes o tarros, se debe introducir cuidadosamente el agitador hasta el fondo del recipiente, evitando derramar el producto y subirlo rápidamente para producir un movimiento desde el fondo hasta la superficie. Este movimiento vertical debe ser suficiente para asegurar

que el producto se mezcle apropiadamente y no quede grasa adherida al cuello del recipiente.

b) Muestreo de leche en polvo y otros productos lácteos en polvo

Durante el muestreo de la leche contenida en sacos, debe evitarse que el producto absorba humedad del ambiente y deben considerarse las condiciones de asepsia necesarias para evitar su contaminación.

Para la toma de muestras previamente se debe limpiar y desinfectar la zona de muestreo y posteriormente hundir o introducir el instrumento de muestreo limpio y seco a través del producto hasta el fondo. Efectuaremos una o varias tomas hasta obtener la cantidad de muestra suficiente para el análisis.

En productos preenvasados debemos extraer del lote y en forma aleatoria, el número de envases representativos del lote y necesarios para el análisis (NMX-F-718-COFOCALEC-2006).

1.8.2 Preparación y extracción

Posterior a un proceso de desnatado de la muestra de leche, la aflatoxina M_1 es extraída por aplicación de la porción de prueba (leche líquida o leche deshidratada reconstituida) a una columna de inmunoafinidad, la cual contiene anticuerpos monoclonales específicos ligados a un material de soporte sólido. Así como la muestra pasa a través de la columna, los anticuerpos selectivamente se ligan a la AFM_1 presente, para formar un complejo antígeno-anticuerpo. Los otros componentes de la matriz de la muestra son retirados de la columna con agua destilada. Finalmente la AFM_1 es eluída de la columna con acetonitrilo y cuantificada por cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa con detección de fluorescencia (NOM-243-SSA1, 2010).

1.8.3 Cuantificación de micotoxinas

Hasta la fecha la AOAC ha evaluado 793 métodos analíticos de los cuales 692 se aplican a aflatoxinas (B_1 , B_2 , G_1 , G_2 y M_1) y 101 al resto de las

micotoxinas, (fumonisinas B₁ y B₂, deoxinivalenol, ocratoxinas A y B, patulina, esterigmatocistina, zearalenol y zearalenona) (Horwitz, *et al.*, 1993; Maragos y Busman, 2010).

Los métodos de cromatografía en capa fina (TLC), el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) y la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), son métodos rápidos, sencillos, específicos, sensibles y portátiles, que se han convertido en los métodos rápidos de análisis más comunes para la detección de micotoxinas en los alimentos (Trucksess, 2001, Goryacheva *et al.*, 2009; Guan *et al.*, 2011). En los últimos 20 años, la importancia y la aplicación de los inmunoensayos, especialmente ligado a enzimas (ELISA), ha crecido significativamente (Lee *et al.*, 2004; Kav y Kaan, 2011). El uso de métodos de ELISA para la detección de AFM₁ es rápido, fiable y rentable y se ha incluido en la recopilación oficial de los procedimientos de prueba por el Consejo Federal Alemán de Salud (Kaniou-Grigoriadou *et al.*, 2005; Fang *et al.*, 2011). El kit de prueba ELISA se ha hecho muy popular debido a su relativamente bajo costo y fácil aplicación y sus resultados podrían ser comparables con los obtenidos por otros métodos convencionales tales como TLC y HPLC (Zheng *et al.*, 2004, 2005, 2005a; Pirestani *et al.*, 2011).

Otros métodos que han sido utilizados para cuantificar AFB₁, B₂, G₁ y G₂ se basan en una etapa de extracción, seguida de un proceso acoplado de cromatografía líquida - electrospray - analizador de cuadrupolo - analizador de tiempo de vuelo - espectrometría de masas en tándem (LC-ESI-QTOF-MS/MS) (Beltrán *et al.*, 2009 y 2011; Sulyok *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010 y 2011; Ahn *et al.*, 2012; Sirhan *et al.*, 2013). Asimismo, se han propuesto métodos de detección múltiple para evaluar el nivel, simultáneamente, de una amplia gama de micotoxinas y metabolitos en diversas matrices biológicas, como herramientas prometedoras de múltiple biomonitorio (Solfrizzo *et al.*, 2011; Beltrán *et al.*, 2011; Njumbe *et al.*, 2011; Oueslati *et al.*, 2012; Warth *et al.*, 2012b; Mathías *et al.*, 2012; Mañes *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2014).

Los métodos basados en PCR, particularmente aquellos basados en secuencias diana de múltiples copias, son una buena alternativa para el diagnóstico rápido. Sin embargo, dado que las matrices de alimentos pueden

contener inhibidores de las reacciones de PCR, necesitan ser probados y optimizados en base a la matriz (Sarwar, 2002; Sardiñas *et al.*, 2010 y 2011; Dinçkaya *et al.*, 2011).

Debido a la diversidad química entre las micotoxinas, su análisis se realiza generalmente a través de la determinación del compuesto en cuestión o bien para un grupo de micotoxinas por HPLC acoplada a un detector UV o de fluorescencia, o por cromatografía de gases (GC) mediante detección de captura de electrones después de los procedimientos de extracción y limpieza específica extensos (Zöllner *et al.*, 2006; Krska y Molinelli, 2007; Di Mavungu *et al.*, 2009; Frenich *et al.*, 2009; Kanungo *et al.*, 2011).

Se han desarrollado también métodos de inmunoensayo por detección de fluorescencia polarizada para la determinación de aflatoxinas en granos y de inmunoensayo enzimático ultrasensible por quimiluminiscencia para análisis de AFM₁ en leche (Sarwar y Jolley, 2002; Magliulo *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2011).

Algunos otros métodos que han sido reportados para el análisis de aflatoxinas incluyen las minicolumnas (AOAC, 1990), que son tubos de cristal de 6 mm de diámetro y 190 mm de largo que se llenan con albúmina, florisil y sulfato de sodio, donde queda atrapada la aflatoxina entre las capas de albúmina y florisil, dando una banda detectable por fluorescencia.

Los métodos instrumentales complementan a los procedimientos antes mencionados para aumentar el poder resolutivo y detección de las aflatoxinas. Entre éstos están los densitómetros (299-800 nm) que se aplican en la detección y cuantificación de aflatoxinas u otras micotoxinas una vez realizada la TLC y visualizada por la fluorescencia que emite la propia sustancia al hacer incidir la luz ultravioleta (Wu *et al.*, 1990). Otro es el espectrómetro de masa que puede utilizarse solo o en combinación con la cromatografía líquida (Kostiainen, 1991; Kostiainen y Kuronen, 1991; Hurst *et al.*, 1991; Capiello *et al.*, 1995).

Los bioensayos, dentro de los métodos biológicos, se emplean como métodos complementarios de los procedimientos fisicoquímicos para determinar la actividad biológica de las aflatoxinas (teratogenicidad y mutagenicidad). Estas incluyen cultivos de tejidos de embrión de pollo (Prelusky *et al.*, 1987), método

que ha sido oficializado por la AOAC para la confirmación de la toxicidad de la aflatoxina B₁ (AOAC 1990). Asimismo, en los bioensayos se incluyen animales de laboratorio y microorganismos, en los cuales se impregnan discos de papel filtro con bacterias como método confirmatorio para el diagnóstico de las aflatoxinas, similar al empleado en la determinación de la sensibilidad a los antibióticos.

1.9 LA LECHE

La leche de vaca es un producto alimenticio de excelencia por sus cualidades nutritivas. En la Tabla 1.4 se muestra la clasificación de los principales componentes de la leche, que son los que se encuentran en mayor cantidad.

Tabla 1. 4. Composición aproximada de la leche.

Componentes	Contenido medio en la leche (% p/p)	Intervalo (% p/p)	Contenido medio sobre extracto seco (% p/p)
Agua	87,1	85,3 - 88,7	
Sólidos no grasos	8,9	7,9 - 10,0	
Grasa sobre extracto seco	31	22 - 38	
Lactosa	4,6	3,8 - 5,3	36
Grasa	4,0	2,5 - 5,5	31
Proteína	3,25	2,3 - 4,4	25
Caseína	2,6	1,7 - 3,5	20
Sustancias minerales	0,7	0,57 - 0,83	5,4
Ácidos orgánicos	0,17	0,12 - 0,21	1,3
Varios	0,15		1,2

Fuente: (Walstra *et al.*, 2001).

Evidentemente, la cantidad (en gramos) no es lo esencial en todos los aspectos. Por ejemplo, compuestos minoritarios como las vitaminas, tienen una gran importancia desde el aspecto nutritivo, las enzimas como catalizadores de las reacciones, y algunos componentes minoritarios que están en cantidades traza, contribuyen decisivamente al sabor y aroma de la leche (Astiasarán y Martínez, 2003).

La *lactosa* es el carbohidrato característico de la leche. Es un disacárido compuesto por glucosa y galactosa. La *materia grasa* está constituida fundamentalmente por triglicéridos y pequeñas cantidades de otros lípidos, como fosfolípidos, colesterol, ácidos grasos libres y diglicéridos. Las *proteínas* de la leche son caseínas que, a su vez, están constituidas por una mezcla de aproximadamente 10 proteínas diferentes. El resto corresponde esencialmente a las llamadas proteínas del suero y además hay algunas otras proteínas minoritarias, como las enzimas (Walstra *et al.*, 2001). Una porción de leche (un vaso de 240 mL) es fuente de *minerales*, pues aporta el 12% de la recomendación establecida para el zinc y el 33% de la recomendación de fósforo y calcio. Con respecto a *vitaminas*, esta misma cantidad de alimento (240 mL) lo hace muy buena fuente de riboflavina (35%), vitamina B₁₂ (48%) y vitamina A (20%) y fuente de vitamina D (15%). En algunos países también es fuente de hierro (18%) y de ácido fólico (10%). Los *ácidos orgánicos* se encuentran como iones o como sales; el más abundante es el citrato. Además, la leche contiene muchos otros componentes *misceláneos* en cantidades traza. El total de los componentes, exceptuando el *agua*, constituye el extracto seco de la leche (Walstra *et al.*, 2001).

La leche y sus derivados, desempeñan un papel fundamental en la alimentación humana, ya que el consumo incrementa la masa ósea durante el crecimiento y ayudan a reducir la pérdida ósea en adultos (Lawrence, 2007). Las Indicaciones Alimenticias (Nestel *et al.*, 2005) para estadounidenses afirman que “*Los adultos y los niños no deben evitar la leche y los productos lácteos por temor a que los mismos puedan ocasionar aumento de peso*”. Estudios y ensayos clínicos controlados sugieren que el consumo de leche rica en calcio, ayuda a mantener un peso sano (Miller *et al.*, 2007). También se presenta menor riesgo de enfermedades cardiovasculares (Elwood *et al.*, 2004), y es no-

cariogénica (Bowen, 2002; Moynihan y Peterson, 2004). El hombre obtiene la leche de varios animales para su propia alimentación. Con el término *leche* se distingue la leche de vaca y si se trata de otros animales, se especifica la especie utilizada como leche de cabra, por ejemplo.

1.9.1 Desarrollo de la industria láctea en México

La ganadería lechera fue introducida en México por los españoles y cumplió un papel fundamental en la extensión del territorio dominado. Se menciona que en el año 1560 ya existían en el territorio 100000 cabezas de ganado bovino, que se incrementaron a 10,5 millones en tan sólo 60 años (1620) (Simpson, 1952).

La leche y los productos lácteos son alimentos con un alto valor nutritivo, razón por la que su consumo ha sido muy extendido desde las antiguas poblaciones nómadas, que consideraban al rebaño su mayor riqueza, hasta los habitantes de grandes ciudades industriales de hoy, que cuentan con un alto nivel económico, para quienes las empresas transformadoras (por lo general transnacionales), ofrecen cada día una gama de nuevos productos derivados, con el fin de aumentar de manera permanente, el consumo de lácteos (Pinard, 1988).

En México, el comercio de leche y su transformación se da en un primer momento en pequeñas regiones y en cantidades excedentes que eran vendidas después de satisfacer el autoconsumo. El hecho de ser la leche un producto altamente perecedero, implicaba –en la época en que no había medios de conservación y transporte rápidos y especializados– que ésta tuviera que ser transformada en establecimientos situados a una distancia corta de las zonas de producción y distribuida de manera inmediata (García, 1996).

A principios del siglo XIX, es la población infantil de EEUU el principal estrato de consumidores, sobre todo en los casos de orfandad o por problemas en la producción de leche materna. De la manera como se configuran las ciudades, a sus alrededores se van creando áreas productoras de alimentos, y en el caso particular de la leche, se asoció su consumo con posiciones ideológicas y religiosas (LICONSA 1987).

A fines del siglo XIX, se inventa la desnatadora centrífuga en Suecia. La leche se recolectaba entera entre los productores y en un principio se les devolvía ya desnatada (LICONSA, 1987). A partir de ésta, las industrias empezaron a desarrollar nuevos productos, como la caseína y la leche en polvo. Con el progreso del consumo de productos alimenticios elaborados y el surgimiento de medios de transporte y vías de comunicación rápidas, se dio la instalación de nuevas industrias de transformación en la periferia de las ciudades y en los suburbios, generalmente cerca de las vías férreas (LICONSA, 1987).

El aumento en el consumo de leche fresca en las ciudades aprovisionadas por los establos y lecherías de la periferia, y la promulgación de reglamentos cada vez más estrictos relativos a la higiene del producto, tienen como consecuencia el aumento en el interés por el tratamiento y distribución de leche fluida. La puesta en práctica de técnicas de pasteurización, favorece enormemente esta nueva actividad y amplía en forma considerable el papel comercial de las empresas que van a dedicarse diariamente a la repartición de leche de consumo, en diferentes formas y presentaciones, inclusive a la puerta del propio consumidor (García, 1996).

Para principios del siglo XX, ya se localizaban zonas lecheras alrededor de las ciudades de México, Guadalajara y Monterrey y es hasta después del porfiriato, que la ganadería adquiere un carácter mercantil (López, 1969). Después de la revolución mexicana, era común que la distribución de la leche fuera realizada por los mismos productores y por pequeños comerciantes en “bidones” que se vendían al menudeo de casa en casa y sin el menor control sanitario. Se asumía que la calidad de la leche era adecuada porque estaba “fresca”, es decir, que se había ordeñado esa misma mañana. Por lo regular se hervía y con eso se consideraba garantizada su inocuidad. Sin embargo, la leche era uno de los principales alimentos transmisores de enfermedades a los humanos, como la tuberculosis y la brucelosis, y debido a ello, una de las primeras legislaciones referidas a la producción de leche, abordó precisamente las condiciones sanitarias de los expendios del lácteo en la ciudad de México (LICONSA, 1987).

En la década de los cincuenta, en EEUU la leche es ya parte de la dieta

del consumidor y en México se empiezan a dar los primeros pasos para configurar lo que serían las cuencas lecheras y futuras abastecedoras del alimento para los centros urbanos. Respecto al hato lechero, una quinta parte se ubica en el estado de Jalisco; otras regiones importantes se localizan en Durango y Coahuila (La Laguna), así como en los estados de México, Chihuahua y Veracruz, es decir, se trata de cuencas lecheras instaladas en torno a grandes centros de consumo (LICONSA, 1987).

1.9.2 Calidad de la leche y productos lácteos según la normativa Mexicana

Se define a la *leche para el consumo humano* como la secreción natural de las glándulas mamarias de las vacas sanas y bien alimentadas, que para esto deberá excluirse el producto obtenido quince días antes del parto y cinco días posteriores al mismo, o cuando tenga calostro (NOM-243-SSA1-2010).

La clasificación de la leche pasteurizada y ultrapasteurizada para los efectos de su venta al público es la siguiente:

- a) De Alta Calidad, es el producto final que ya envasado deberá contener no menos de 84 g/L de sólidos de leche no grasos y no menos de 33 g/L de proteínas propias de la leche.
- b) Preferente Especial, es el producto final que ya envasado deberá contener no menos de 35 g/L de grasa propia de la leche, no menos de 84 g/L de sólidos de leche no grasos y no menos de 30 g/L de proteínas propias de la leche.
- c) Preferente, es el producto final que ya envasado deberá contener no menos de 30 g/L de grasa propia de la leche, no menos de 83 g/L de sólidos de leche no grasos y no menos de 30 g/L de proteínas propias de la leche.
- d) Parcialmente Descremada es el producto final que deberá contener como mínimo 28 g/L de grasa propia de la leche y no menos de 30 g/L de proteína propia de la leche.
- e) Semidescremada o *Light* es el producto final que deberá contener como

mínimo 16 g/L de grasa propia de la leche y no menos de 30 g/L de proteínas propias de la leche. Se le adiciona como mínimo 4.000 U.I. de vitamina A y 4.000 U.I. de vitamina D por litro.

f) Descremada es el producto final que deberá contener menos de 5 g/L de grasa butírica y no menos de 30 g/L de proteínas propias de la leche. (NOM-155-SCFI-2012).

Dentro de la norma, también se describen las “Fórmulas lácteas” y las definen como un productos elaborados a partir de ingredientes propios de la leche, tales como caseína, grasa, lactosueros, agua para uso y consumo humano, con un mínimo de 22 g/L de proteína de la leche y de ésta, el 70% de caseína, puede contener grasa de origen vegetal en las cantidades necesarias para ajustarlo a las especificaciones establecidas anteriormente. También se define el “Producto lácteo combinado” como el producto elaborado a partir de sólidos lácteos y otros ingredientes, el cual debe contener como mínimo 15 g/L de proteína propia de la leche y de ésta, el 70% de caseína, además de la cantidad de grasa especificada en la etiqueta, que por lo general es de origen vegetal.

Las leches no pasteurizadas (crudas o broncas) se clasifican en “*no pasteurizada para consumo humano*” y “*no pasteurizada para uso industrial*” (NOM-243-SSA1-2010).

Para el interés del consumidor, es necesario saber cuándo legalmente la leche se considera “adulterada” y ello ocurre cuando se expende o suministre con una clasificación sanitaria diferente a la autorizada; también si su naturaleza, composición o características sanitarias no corresponden a las clasificaciones del reglamento, si ha sufrido un tratamiento que disimule su alteración o encubra defectos en el proceso. Si se le ha sustraído alguno o varios de sus componentes normales, con excepción de su contenido graso propio de la leche, que podrán estandarizarse al límite permitido por la ley, o se le ha agregado cualquier otra sustancia, (a excepción de las vitaminas A y D en la leche semidesnatada) será considerada adulteración (NMX-F-026- 1997 SCFI).

La leche se le considera “contaminada” cuando contiene microorganismos patógenos, cuerpos extraños, residuos de antibióticos,

hormonas y microorganismos no patógenos, sustancias plaguicidas, metales pesados, sustancias bacteriostáticas, bactericidas, radiactivas o cualquier sustancia tóxica en cantidades que rebasen los límites máximos establecidos por la Secretaría de Salud (NOM-243-SSA1-2010).

En México, el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos y Servicios, en su artículo 215 señala, entre otras disposiciones, que la leche para consumo humano deberá contener únicamente grasa propia de la leche.

Diversos autores consideran que la adulteración de la grasa láctea se hace principalmente con fines económicos, ya que las grasas de sustitución son más baratas que la grasa butírica. Las adulteraciones más comunes se hacen con aceites vegetales (coco, algodón, palma, soya, entre otros), sebo de vacuno, manteca de cerdo y grasas sintéticas, y se preparan por hidrogenación parcial o transesterificación de los anteriores. En conclusión, la incorporación de sólidos no lácteos de origen vegetal o animal a productos como la mantequilla, quesos, leches en polvo y leche fluida, entre otros, constituye una adulteración del producto lácteo (Fraga *et al.*, 1980; Juárez, 1991).

1.9.3 Fórmulas infantiles

La lactancia natural es la práctica más saludable para el binomio madre-hijo, pero las estadísticas refieren que los menores de seis meses alimentados exclusivamente con leche materna no llega al 40% (OMS, 2012). Sólo el 38% de los niños menores de seis meses de edad en el mundo en desarrollo reciben leche materna exclusivamente y solo el 39% de los niños de 20 a 23 meses de edad se benefician de la práctica de la lactancia materna (UNICEF, 2009a). En la región de Latinoamérica y el Caribe solamente alrededor de 40% de los niños reciben leche materna exclusiva durante 6 meses (UNICEF, 2009b).

Durante el siglo XX los avances científicos y tecnológicos crearon otras opciones de alimentación infantil, mientras que se sucedían profundos cambios en el estilo de vida occidental, entre los cuales podemos mencionar la alta

migración a las zonas urbanas, separación de las familias, aspiraciones sociales de las mujeres, una mayor atención perinatal por parte de las instituciones hospitalarias, aunado a una mayor publicidad de carácter comercial de fórmulas infantiles o sucedáneos de leche materna, que influyó el comportamiento de las madres y de los médicos, particularmente cuando las madres trabajadoras requirieron el uso de la asistencia de guarderías, lo que favoreció e incrementó el uso de sucedáneos (Cuevas, 2010). Un factor que se ha identificado de gran impacto en el abandono de la lactancia materna, fue la disponibilidad gratuita de fórmulas lácteas.

En un estudio publicado en 1990 en la Revista de Salud Pública en México referente al uso de sucedáneos se menciona que el Instituto Mexicano de Seguro Social (IMSS) adquirió 19 millones de latas de leche anuales, de las cuales menos del 1% se destinaron a los hospitales para su preparación en los bancos de leche y el resto se utilizó para las dotaciones mensuales de los menores derechohabientes que se proporcionaron a través de unidades de primero y segundo nivel, representando un gran gasto anual (Cuevas, 2010).

No obstante lo anterior, la Organización Mundial de la Salud (OMS) se pronuncia a través de la recomendación de que “todo lactante debe ser alimentado exclusivamente al pecho materno durante los primeros seis meses de edad”. En respuesta a esta disposición en México fue emitida la NOM-031-SSA2-1999 que se refiere a la atención a la salud del niño y la NOM-043-SSA2-2005 que trata de la promoción y educación para la salud en materia alimentaria (Vandale-Toney *et al.*, 1992). Sin embargo, aunque la prevalencia de lactancia materna ha aumentado en los últimos años en México, debido a la estrategia conjunta OMS/UNICEF, la política pública en el país paralelamente implementó la visión del Hospital Amigo del Niño, práctica que se realiza por primera vez en Guadalajara, Jalisco. A pesar de que la práctica de lactancia materna completa durante seis meses es estimulada, aún es mas bien rara (Santos-Torres *et al.*, 2011).

Los sucedáneos de la leche materna son productos alimenticios que se presentan como sustitutos parciales o totales de la leche humana. Es deseable referirse a estos productos como fórmulas lácteas cuando el contenido de

nutrimentos proceda principalmente de la leche de vaca. Las fórmulas lácteas de inicio (FLI) se recomiendan para cubrir la totalidad de los requerimientos nutrimentales de un lactante sano durante los primeros seis meses de vida (Vásquez y Romero (2008).

A pesar de los esfuerzos de muchas instituciones por incentivar hacia la lactancia materna, Navarro-Estrella *et al.* (2003), mencionan que en nuestro país en los últimos 30 años se ha sufrido de una disminución progresiva de la lactación materna exclusiva y una introducción cada vez mas temprano de sucedáneos de la leche materna. En la región norte de México estas características se dan con mayor frecuencia que en el sur y centro del país.

Pese a que la UNICEF tiene lineamientos para favorecer la ingesta de leche materna desde los primeros 30 min del nacimiento de un niño, en los hospitales mexicanos inhiben esta práctica. En México, 7 de cada 10 mujeres eliminan la lactancia materna, ya sea por que los ritmos laborales y las condiciones inadecuadas en los centros de trabajo no permiten que la mujer pueda amamantar a su hijo después de la cuarentena, provocando así el uso de sucedáneos.

La NOM-031-SSA2-1999 describe las indicaciones médicas mayores para la sustitución de la lactancia materna:

- a) Enfermedades infecciosas como listeriosis neonatal, hepatitis B materna, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), varicela, tosferina, tuberculosis activa y lesiones herpéticas o sifilíticas en el pecho materno.
- b) Precaución extrema en enfermedades metabólicas, toxemia, uso de drogas, tirotoxicosis materna con tratamiento anti-tiroideo.

Por otra parte paralelamente, la investigación en México con respecto a las micotoxinas, se ha enfocado principalmente a la presencia de AFB₁ en cereales, especialmente el maíz, ya que es el cultivo más importante de nuestro país (Torres *et al.*, 1995; López *et al.*, 1995; Flores *et al.*, 2003). Asimismo, Carvajal *et al.* (2003) han realizado estudios sobre la situación de la leche en

México con respecto a la presencia de AFB₁ y su metabolito aflatoxicol.

La presencia y niveles de AFM₁ en leche y productos lácteos en leche cruda y con proceso térmico, se han analizado en las zonas del país donde se produce principalmente estos productos, como el estado de Jalisco, Guanajuato y estado de México (Carbajal *et al.*, 2003; Pérez *et al.*, 2008; Reyes *et al.*, 2009; Urbán *et al.*, 2010; Landeros *et al.*, 2012). En estos estudios no está incluido el norte del país. Por otro lado, en ninguna de las investigaciones publicadas en nuestro país, se publica la ingesta diaria de AFM₁ en la población en general o por grupos de edad.

Por lo anterior, consideramos importante realizar un trabajo de investigación para determinar la presencia de AFM₁ en la leche y productos lácteos que se ingiere por la población del noreste del país, así como la ingesta diaria de AFM₁ por grupos de edad. Asimismo, establecer el índice del riesgo carcinogénico que se deriva de la ingesta de leche y productos lácteos.

II. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS

En el presente trabajo, el objetivo general fue **“Determinar la presencia de aflatoxinas M₁ y B₁ en leche y producto lácteo que se consumen en el área metropolitana de Monterrey (México) y establecer el riesgo potencial asociado al consumo de estos productos”**. Para la consecución del mismo, se establecieron los siguientes objetivos específicos

2.1.1 Realizar una prospección de la presencia de AFM₁ en leche y producto lácteo que se comercializan en el área metropolitana de Monterrey (Nuevo León, México).

Para ello se realizó un primer muestreo de leches y producto lácteo y se determinó la presencia de AFM₁ por origen, tratamiento y clasificación de producto por tipo de grasa en la leche, mediante análisis por la técnica de ELISA.

2.1.2 Poner a punto la técnica oficial de análisis de AFM₁ en leche, producto lácteo y fórmulas infantiles por HPLC.

Se efectuó el análisis de AFM₁ con estándares puros en HPLC con detector de fluorescencia según la Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, realizando curvas de calibración con matriz y sin matriz, a fin de determinar el tiempo de retención y su cuantificación.

2.1.3 Adaptar y validar la técnica de análisis oficial por HPLC descrita para la cuantificación de AFB₁ en cereales, en las matrices leche y producto lácteo, incluyendo las fórmulas infantiles lácteas.

Se adaptó y validó la técnica de cuantificación de AFB₁ por HPLC y derivatización con ácido trifluoroacético, según las Normas Oficiales Mexicanas NOM-188-SSA1-2002 y NOM-247-SSA1-2008 descritas para cereales a las matrices leche y producto lácteo, incluyendo las fórmulas infantiles lácteas,

realizando las curvas de calibración correspondientes a 8 niveles con y sin matriz.

2.1.4 *Cuantificar la presencia de AFM₁ en leche bronca (cruda), leche y producto lácteo y fórmulas infantiles comercializados en el área metropolitana de Monterrey, (Nuevo León, México) mediante el método oficial cromatográfico.*

Para esto se realizó un segundo muestreo incluyendo muestras de leche cruda facilitada por el Laboratorio Regional de la Unión Ganadera de Nuevo León, leche y producto lácteo obtenidos de supermercados y tiendas de conveniencia, fórmulas infantiles obtenidas de supermercados y farmacias. Se cuantificó la presencia de AFM₁ mediante columnas de inmunoafinidad y separación y cuantificación mediante técnica de HPLC con detector de fluorescencia.

2.1.5 *Cuantificar la presencia de AFB₁ en producto lácteo y fórmulas infantiles y relacionarla con la adulteración de estos productos con grasa de origen vegetal.*

Se cuantificó la presencia de AFB₁, a fin de identificar una posible relación de la presencia de esta aflatoxina con la inclusión de grasa vegetal en producto lácteo y fórmulas infantiles.

2.1.6 *Determinar la ingesta diaria de AFM₁ por peso corporal y estimar el índice de riesgo carcinogénico en la población del estado de Nuevo León (México), por grupos de edad asociado al consumo de leche, producto lácteo y fórmulas infantiles.*

Se analizaron los datos reportados en la ENSANUT 2012 (Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012) de donde se tomaron los datos correspondientes al estado de Nuevo León, con respecto a peso corporal e ingesta promedio diaria de leche en la población y se relacionaron con los

resultados obtenidos de AFM₁. Asimismo, se realizó la estimación del índice de riesgo carcinogénico basado en la propuesta de Kuiper-Goodman (1994).

III. DISEÑO EXPERIMENTAL

3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL: ACTIVIDADES, MOTIVOS Y JUSTIFICACIÓN

3.1.1 Prospección de la presencia de AFM₁ en leche y productos lácteos. Primer muestreo



Figura III.1. Centéotl Dios del maíz

En México los esfuerzos que se han realizado en la determinación de aflatoxinas se han centrado principalmente en la presencia de AFB₁ en cereales, sobre todo en maíz, dada la veneración que desde tiempos precolombinos se tiene en la mitología azteca por Centéotl (náhuatl: *cinteotl*, ‘dios del maíz’ *cintli*, *maíz*; *teotl*, *dios*’,

ver Figura III.1). Es por ello que en

la literatura se encuentran escasas referencias acerca de la presencia de AFM₁ en leche en México, sobre todo en la región noreste del país.

En México, las leches líquidas más comercializadas reciben procesos térmicos de pasteurización y esterilización UHT, observándose una mayor presencia de esta última en el mercado. En el proceso de pasteurización, la leche se somete a condiciones mínimas de temperatura de 72 °C por un período de 15 s, mientras que en la esterilización UHT el proceso térmico se realiza de 135 a 149 °C por 2 a 8 s (NOM-243-SSA1-2010).

Cabe destacar que Nuevo León (México) no es un estado productor de leche, por lo que es necesario buscar opciones de abastecimiento en otros estados del país y al ser un estado fronterizo, se facilita el hecho de importar leche de Estados Unidos de Norteamérica y en ocasiones, de otros países.

Es por ello que se realizó un análisis prospectivo de la presencia de AFM₁ en leche y productos lácteos que se comercializan en el área

metropolitana de Monterrey, Nuevo León (México), para lo cual se realizó una recolección entre los meses de febrero a mayo de 2008, de 84 muestras de leche y producto lácteo fluidas, de las cuales 20 fueron pasteurizadas y 64 esterilizadas UHT, procedentes de supermercados, camiones repartidores y tiendas de conveniencia del área metropolitana. Las leches correspondieron a 27 marcas comerciales, con fecha de caducidad vigente. Las muestras se trasladaron en neveras isotermas en su envase original hasta el laboratorio para ser analizadas. Las leches pasteurizadas se mantuvieron en refrigeración a 4 °C, mientras que las UHT estuvieron a temperatura ambiente. La leche no permaneció almacenada más de 24 h antes de su análisis.

Las leches analizadas procedieron en un 35% del estado de Durango, donde se encuentra la comarca lechera de nuestro país, el 18% provino del estado de México y el 19% del estado norteamericano de Texas. Las leches restantes, en menor proporción, se elaboraron en diversos estados de la república: Aguascalientes, Jalisco y Guanajuato con el 8, 7 y 6%, respectivamente, Baja California, Coahuila, Hidalgo y Puebla con 1% cada uno, y Nuevo León participó localmente con el 2% de la leche comercializada.

De estas muestras analizadas, el 81% contenían grasa butírica y el 19% fueron elaboradas con grasa vegetal, de ahí su denominación como producto lácteo, según lo establece la NOM-243-SSA1-2010. Por tal motivo, en lo sucesivo en este documento se denominará producto lácteo a aquel producto de leche cuya grasa butírica ha sido sustituida total o parcialmente por grasa vegetal.

Este muestreo inicial se realizó con la finalidad de establecer si realmente existe una problemática de la presencia de AFM₁ en la región noreste del país, para lo cual se utilizó una técnica de cuantificación de esta aflatoxina por un método ELISA.

3.1.2 Segundo muestreo. Análisis de AFM₁ por HPLC

Una vez establecida la presencia importante de AFM₁ en las muestras

analizadas por la técnica de ELISA, se amplió el muestreo para ser analizadas por la técnica oficial que establece la NOM-243-SSA1-2010 utilizando HPLC en fase reversa con detector de fluorescencia. En este segundo muestreo se obtuvieron 162 muestras, en las cuales se contó con leche bronca o cruda (sin proceso térmico), fórmulas infantiles, además de leches y producto lácteo (producto líquido de base láctea con grasa vegetal) con proceso térmico UHT, y productos lácteos deshidratados. Esta recolección y análisis de muestras se realizó entre mayo de 2010 y mayo de 2011.

Para la obtención de leche cruda, se contó con el apoyo del Laboratorio Regional de la Unión Ganadera de Nuevo León, en donde se recibe muestras de leche (entre otros productos) procedentes de productores ganaderos de la región noreste del país, para su análisis de calidad.

Las muestras de fórmulas infantiles fueron obtenidas de tiendas de autoservicio y en farmacias, ya que algunos de estos productos, por ser para dietas infantiles específicas, no son de consumo frecuente. Todas estas muestras se presentaron en polvo y todas incluyeron en su formulación grasa vegetal.

Las muestras de leche y productos lácteos con proceso de deshidratación y esterilización UHT se obtuvieron en tiendas de autoservicio, tiendas de conveniencia y camiones repartidores.

3.1.3 Análisis de la presencia de AFB₁ en producto lácteo y fórmulas infantiles

De las muestras analizadas con proceso térmico, en el 48% de éstas se les sustituyó total o parcialmente la grasa butírica por grasa vegetal. Dado que México es el mayor importador de leche a nivel mundial en forma deshidratada y desnatada, a algunas de estas muestras se les ha añadido total o parcialmente grasa animal o grasa vegetal para ajustar su contenido graso, de acuerdo al tipo de leche a producir.

El producto *Leche Reconstituida con Grasa Vegetal*, es el alimento líquido obtenido a partir de leche en polvo descremada, mezclada con grasa hidrogenada y/o aceites vegetales comestibles con punto de fusión no mayor de

38 °C y agua, según lo define la Norma Mexicana NMX-F-507-1988. Esta norma indica que estos productos deben estar libres de micotoxinas.

Los aceites vegetales que pueden estar presentes en productos lácteos y fórmulas infantiles son aceites de coco, de palma, de soja, de semillas de girasol, de colza, de oliva, etc. También pueden ser aceites de oleaginosas, en los cuales se ha demostrado la probable presencia de AFB₁.

Por tal motivo y a la par del análisis de las muestras para AFM₁, se decidió analizar la presencia de AFB₁ en productos lácteos y fórmulas infantiles con contenido de grasa vegetal, para lo cual se realizó la adaptación de la técnica de cuantificación de AFB₁ en cereales por HPLC en leche y la validación de este método en esta matriz.

3.1.4 Determinación de la ingesta diaria de AFM₁ por grupos de edad

Para determinar la exposición de la población a la AFM₁, se determinó la ingesta diaria de AFM₁ por consumo de leche contaminada, por grupos de edad.

Los datos correspondientes a la ingesta promedio de leche y el peso corporal ambos por grupos de edad, fueron obtenidos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 (ENSANUT 2012).

3.2 PLAN DE TRABAJO

La Figura III.1 resume el plan de trabajo seguido en esta tesis y así el procedimiento para determinar la presencia de aflatoxinas M₁ y B₁ en leche y producto lácteo incluidas las fórmulas infantiles, que se consumen en el área metropolitana de Monterrey (México) y establecer el riesgo potencial asociado al consumo de éstos productos.

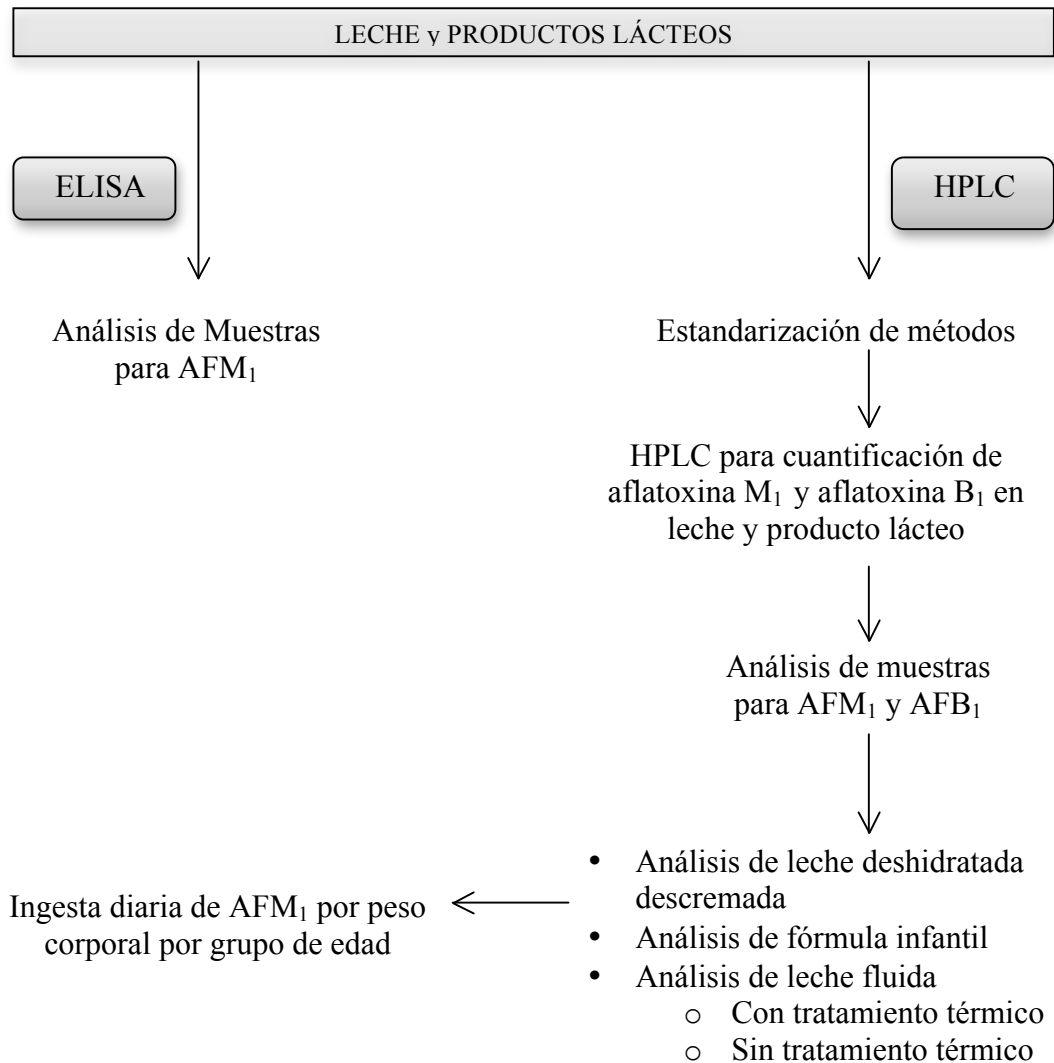


Figura III.1. Plan de trabajo para la determinación de aflatoxinas en leche y producto lácteo e ingesta diaria de AFM₁ en la población por grupos de edad.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Método de cuantificación de AFM₁ por técnica ELISA

Para el análisis de AFM₁ en leche por el método ELISA se usó el kit RIDASCREEN®FAST Aflatoxin M₁ de R-Biopharm AG (Alemania), el cual se muestra en la Figura IV.1. El test se basa en la reacción antígeno-anticuerpo. Los pocillos están recubiertos con anticuerpos de captura contra anticuerpos anti-aflatoxina M₁. Se agregan estándares de aflatoxina M₁ o la solución de las muestras, conjugado aflatoxina M₁-enzima y anticuerpos anti-aflatoxina a los pocillos. La aflatoxina M₁ libre y el conjugado aflatoxina M₁-enzima compiten para unirse a sitios del anticuerpo anti-aflatoxina M₁ (inmunoensayo enzimático competitivo). Al mismo tiempo, los anticuerpos anti-aflatoxina M₁ se unen a los anticuerpos de captura inmovilizados sobre la placa. El conjugado aflatoxina M₁-enzima que no se unió es extraído posteriormente en un proceso de lavado. El sustrato/cromógeno es agregado a los pocillos e incubado. El conjugado aflatoxina M₁-enzima unido a los pocillos a través de los anticuerpos, convierte al cromógeno en una sustancia azul. La adición de la solución stop provoca un cambio de color azul a amarillo. La medición se realiza fotométricamente a 450 nm; la absorción es inversamente proporcional a la concentración de aflatoxina M₁ en la muestra.

Este análisis tiene un límite de detección <125 ppt (respecto al estándar de AFM₁), siguiéndose las instrucciones de uso suministradas por la compañía.



Figura IV.1. Kit para determinación de aflatoxina M₁ por técnica de ELISA.

El kit RIDASCREEN®FAST Aflatoxin M₁ de R-Biopharm AG se compone de:

- 1 Placa de microtitulación de 48 pocillos recubiertos de anticuerpos de captura.
- Soluciones estándar de aflatoxina M₁ con 0 ppt (estándar cero), 125 ppt, 250 ppt, 500 ppt, 1000 ppt, 2000 ppt aflatoxina M₁ en tampón de leche
- Conjugado concentrado de aflatoxina M₁-peroxidasa
- Anticuerpo anti-aflatoxina M₁
- Solución de sustrato/cromógeno
- Solución de paro de reacción, que contiene ácido sulfúrico 1N

Otros materiales que se utilizaron en esta técnica fueron:

- Programa RIDA®SOFT Win 145 (Art. No. Z9999) para los RIDASCREEN® inmunoensayo enzimático.
- Espectrofotómetro lector de ELISA EL301 Microwell
- Centrífuga Eppendorf refrigerada Modelo 5810R
- Tubos cónicos de centrífuga (50 mL)
- Micropipeta Eppendorf volumen ajustable de 10 a 100 µL
- Micropipeta Eppendorf volumen ajustable de 100 a 1000 µL
- Micropipeta Eppendorf volumen ajustable de 1 a 5 mL

Las características de las leches analizadas en el primer muestreo se presentan en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Leche fluida analizada en el primer muestreo.

Producto	<i>n</i>	Grasa butírica	Grasa vegetal	Total
Pasteurizada	20	20	0	20
UHT	64	48	16	64
Total	84			84

4.1.3 Método de cuantificación de AFM₁ por técnica de HPLC

4.1.2.1 Patrones de aflatoxina M₁ y B₁

En todos los ensayos, para la determinación de aflatoxina, se emplearon estándares de referencia para garantizar el correcto análisis de las muestras.

Los patrones de AFM₁ y AFB₁ utilizados se adquirieron en forma cristalina de R-Biopharm (Glasgow, Escocia, UK) y fueron certificados por las normas ISO 9001 e ISO 13485.

Los patrones se prepararon para obtener una solución madre y series de dilución en metanol o acetonitrilo según fuese necesario, para realizar curvas patrón o para adicionar a la leche y/o productos lácteos en función del experimento a realizar. Todos los solventes utilizados fueron de calidad HPLC. Todos los patrones se protegieron de la luz usando material ámbar (Figura IV.2) durante su preparación y análisis para evitar el deterioro de las aflatoxinas. Cuando su destino era la contaminación de muestras antes de su uso, éstas se mantuvieron a temperatura ambiente durante 30 min para la correcta distribución de la AFM₁ en la leche (Oruc *et al.*, 2006) y la evaporación del disolvente en las muestras.



Figura IV.2. Material ámbar utilizado para evitar la degradación de la AFM₁.

4.1.2.2 Columnas

Columnas de inmunoafinidad.

Las columnas de inmunoafinidad fueron diseñadas para lograr una purificación simple con anticuerpos monoclonales, antes de la detección con HPLC.

Las columnas de inmunoafinidad utilizadas fueron AflaM₁ HPLC y AflaB₁ HPLC (VICAM, Milford, MA, EEUU).

Columna de separación.

La columna de separación utilizada fue Phenomenex C₁₈ de 4,5 × 250 mm y 5 μm de partícula. Las columnas descritas se muestran en la Figura IV.3.

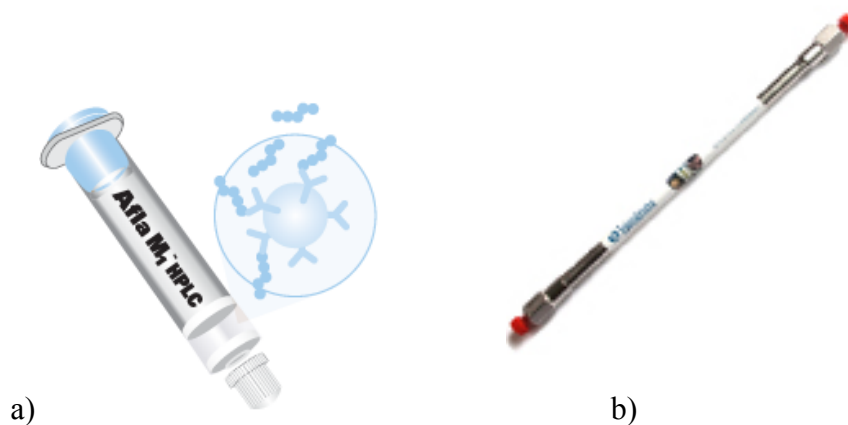


Figura IV.3. a) Columna de inmunoafinidad; b) Columna de separación.

4.1.2.3 Equipo de HPLC

El equipo utilizado en el análisis HPLC fue un equipo VARIAN modelo 9012 con detector de fluorescencia ProStar, adaptado a un auto-muestreador ProStar 410, Santa Clara, California, EEUU (ver Figura IV.4).



Figura IV.4. HPLC Varian Modelo 9012.

Las características de las leches analizadas en el segundo muestreo se presentan en la Tabla 4.2.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Determinación de AFM1 por ELISA

4.2.1.1 Preparación de las muestras

Las muestras de leche fueron centrifugadas a $3500 \times g$ por 10 min a 10 °C para retirar la grasa de la leche. Las aflatoxinas son solubles en agua y permanecen en la leche desnatada tras un proceso de desnatado de la leche entera (Deshpande, 2002).

Tabla 4.2. Leches analizadas en el segundo muestreo

Producto	<i>n</i>	Tratamiento térmico		Consistencia		Tipo de grasa	
		Pasteurizada	UHT	Deshidratada*	Fluida	Butírica	Vegetal
Leche bronca	51				51	51	0
Leche tratada térmicamente	57	1	41	15	42	40	17
Fórmula infantil	55	1	54	54	1	1	54
Total	163	2	95	69	94	92	71

* Considerada tanto en el rubro de tratamiento térmico como en el rubro de consistencia

Se utilizaron 5 pocillos de la placa de microtitulación para colocar 50 µL de cada uno de los estándares. Posteriormente se colocaron, por duplicado, 50 µL de las muestras de leche desnatada. Se vertieron 50 µL del conjugado aflatoxina M₁-enzima a todos los pocillos a analizar. Se añadieron 50 µL de anticuerpo anti-aflatoxina M₁ a cada pocillo. Se mezcló el contenido de la microplaca y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Se vaciaron los pocillos sobre un papel absorbente limpio para eliminar completamente los líquidos. Se lavaron tres veces los pocillos con agua destilada. Se agregaron 100

μL del sustrato cromógeno Red Chromogen Pro a cada pocillo, se mezcló el contenido de la microplaca suavemente e incubó 5 min en la oscuridad a temperatura ambiente (20 - 25 °C). Se agregaron 100 μL de la de la solución de paro de reacción a cada pocillo. Se mezcló el contenido de la microplaca para posteriormente medir la absorción a 450 nm en el transcurso de los siguientes 10 min.

La evaluación y el análisis de los resultados se realizó mediante el software especial para los Ridascreen inmunoensayos enzimáticos.

4.2.2 Determinación de AFM₁ por HPLC

La muestra de leche fué centrifugada para eliminar la grasa. La AFM₁ fué extraída por aplicación de la porción de prueba (50 mL) a una columna de inmunoafinidad, la cual contiene anticuerpos monoclonales específicos para la AFM₁, ligados a un material de soporte sólido. En el transcurso en que la muestra pasa a través de la columna, la AFM₁ se liga selectivamente a los anticuerpos presentes para formar un complejo antígeno-anticuerpo. Los otros componentes de la matriz de la muestra son eliminados de la columna con agua destilada. La AFM₁ es eluida de la columna con acetonitrilo, concentrada y finalmente cuantificada por HPLC en fase reversa con detección de fluorescencia (NOM-243-SSA1-2010).

4.2.2.1. Preparación de la solución stock de AFM₁

El estándar de AFM₁ se diluyó con acetonitrilo a un volumen apropiado para obtener una concentración aproximada de 1 μg/mL.

Se transfirió una alícuota de 2-3 mL de esta solución a una cubeta de cuarzo y se registró el espectro ultravioleta entre 300 y 400 nm, usando acetonitrilo en la celda de referencia. Se midió la absorbancia de la solución a la longitud de onda de máxima absorción (348 nm) y se determinó la concentración exacta de esta solución empleando la siguiente ecuación:

$$\mu\text{g AFM}_1/\text{mL} = 1000 \times A \times M/\epsilon$$

en donde:

A = Valor de máxima absorbancia

M = Peso molecular para AFM₁ = 328

ϵ = Coeficiente de extinción para AFM₁ = 19850

4.2.2.2 Preparación de la solución patrón de AFM₁ (0,1 $\mu\text{g/mL}$)

Se midió un volumen apropiado de solución stock transfiriéndose 200 ng de AFM₁. Se diluyó a un volumen de 2 mL con acetonitrilo. Se almacenó esta solución en frasco vial ámbar a una temperatura menor de 4 °C.

4.2.2.3. Preparación de las soluciones patrón de trabajo

Se midieron volúmenes de solución patrón de AFM₁ de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ en viales para automuestreador color ámbar, conforme a la Tabla 4.3.

Tabla 4.3. Soluciones patrón de trabajo.

Vial	$\mu\text{L Std}$ AFM ₁ de 0,1 $\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{L Fase}$ móvil	ng AFM ₁	$\mu\text{g AFM}_1/\text{L}$
Blanco	0	1000	0,00	0,000
1	15	985	0,15	0,012
2	25	975	0,25	0,020
3	50	950	0,50	0,040
4	75	925	0,75	0,060
5	100	900	1,00	0,080

4.2.2.4 Preparación de las muestras

Se midieron por triplicado 50 mL de muestra en un tubo para centrífuga y se centrifugó a 5000 rpm durante 15 min para eliminar la grasa sobrenadante. Se filtró a través de papel filtro Whatman No. 4 y se colectó el filtrado en matraces Erlenmeyer de 250 mL.

4.2.2.5. Extracción de la AFM₁

Se conectó una columna de inmunoafinidad a la punta de una jeringa de plástico de 50 mL colocada en la bomba manual. Se midió por duplicado 50 mL de la muestra filtrada y desgrasada y se colocó en la jeringa del sistema de bombeo (ver Figura IV.5).

A la par se agregaron a 2 muestras control, 50 y 75 μL de solución de AFM₁ de 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (equivalentes a 0,50 y 0,75 ng de AFM₁, respectivamente).

Se pasaron las muestras a través de las columnas de inmunoafinidad a un flujo lento de aproximadamente 1 a 2 gotas por segundo.

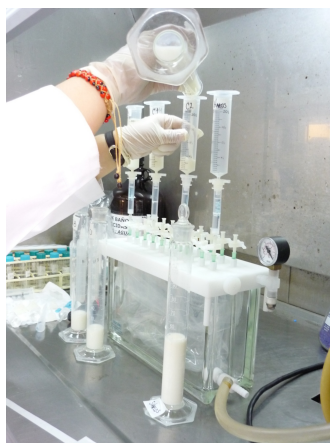


Figura IV.5. Montaje de las columnas de inmunoafinidad para la extracción de AFM₁.

Se cambió la jeringa por una de 10 mL y se lavó la columna con dos porciones de 10 mL de agua destilada. Se descartaron los lavados y se pasó aire para secar la columna.

Posteriormente se eluyó la aflatoxina con 4 mL de acetonitrilo, permitiendo que el solvente entrara en contacto con la columna al menos 60 s. El eluido se recolectó en un vial color ámbar y se evaporó a sequedad en baño de agua a 40 °C con la ayuda de nitrógeno.

Se disolvieron las muestras de prueba y las muestras de control con 400 μL y 1 mL, respectivamente de fase móvil (agua : acetonitrilo, 67 : 33), y fueron

filtrados a través de filtros Millipore de 0,45 µm y depositados en viales de color ámbar para posteriormente ser inyectados en el cromatógrafo.

4.2.2.6. Cuantificación por HPLC

Se fijaron los parámetros cromatográficos de acuerdo con la NOM-243-SSA1-210, tal como se muestran en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4. Condiciones de trabajo del HPLC para separación y cuantificación de la AFM₁.

Fase móvil:	Agua : Acetonitrilo 67:33
Flujo:	1 mL/min
Volumen de inyección:	100 µL
Detector de fluorescencia:	Excitación: 360 nm Emisión: 440 nm

Se inyectó el estándar equivalente a 0,5 ng de AFM₁ por quintuplicado, para efectuar la prueba de adecuabilidad del sistema.

Se inyectaron en secuencia, volúmenes de 100 µL de cada solución patrón de trabajo, de menor a mayor concentración y se preparó una curva de calibración graficando el área del pico contra la concentración de AFM₁ inyectada.

Se inyectó del mismo modo 100 µL de cada una de las muestras, conforme a la secuencia mostrada en la Tabla 4.5.

Se calculó la concentración de AFM₁ en las muestras, usando la siguiente fórmula:

$$Y = mx + b$$

donde:

Y = Área del pico correspondiente a la AFM₁ en la muestra

m = Pendiente

x = Concentración en ng/μL de AFM₁ en la muestra

b = Ordenada al origen

Despejando x de la ecuación se obtuvieron los valores de AFM₁ en la muestra, expresados en ng/μL.

Tabla 4.5. Distribución de controles y muestras por duplicado a inyectar en el cromatógrafo.

Vial	Identificación
1	Blanco de muestra
2	Muestra control con 0,5 ng de AFM ₁
3	Muestra 1A
4	Muestra 1B
5	Muestra 2A
6	Muestra 2B
7	Muestra 3A
8	Muestra 3B
9	Muestra 4A
10	Muestra 4B
11	Muestra 5A
12	Muestra 5B
13	Blanco de muestra
14	Muestra control con 0,50 ng de AFM ₁
15	Muestra control con 0,75 ng de AFM ₁

Se obtuvieron los nanogramos de AFM₁ en las muestras control directamente de la curva de calibración y se aplicó la siguiente fórmula para calcular el porcentaje de recobro:

$$\% \text{ de recobro} = CM - C \times \frac{100}{CA}$$

donde:

CM = ng AFM₁ obtenidos de la muestra control

C = ng de AFM₁ obtenidos de la muestra control sin adicionar

CA = ng de AFM₁ añadidos a la muestra control

4.2.3 Determinación de AFB₁ por HPLC

La “NORMA Oficial Mexicana NOM-188-SSA1-2002, *Productos y Servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones sanitarias*” y la “NORMA Oficial Mexicana NOM-247-SSA1-2008, *Productos y servicios. Cereales y sus productos. Cereales, harinas de cereales, sémolas o semolinas. Alimentos a base de: cereales, semillas comestibles, de harinas, sémolas o semolinas o sus mezclas. Productos de panificación. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales*”, describen el procedimiento técnico para la cuantificación de aflatoxinas en cereales y otros productos. Dado que no existe un procedimiento oficial para la cuantificación de AFB₁ en leche y productos lácteos, se adaptó la técnica de cuantificación de AFB₁ en cereales descrita en las normas antes mencionadas a la matriz producto lácteo incluyendo fórmulas infantiles.

Las aflatoxinas son extraídas de la muestra, con metanol al 80%, el extracto es filtrado, diluido con agua y pasado a través de una columna de inmunoafinidad, la cual contiene anticuerpos monoclonales específicos para AFB₁. Las aflatoxinas son aisladas, purificadas y concentradas en la columna y posteriormente son eluidas con acetonitrilo. El eluido es derivatizado con ácido trifluoroacético. Las aflatoxinas son cuantificadas en HPLC en fase reversa y detectadas por fluorescencia.

4.2.3.1 Preparación del estándar

Se preparó una solución stock de 1000 ng/mL a partir de una solución de 25 µg/mL de toxina preparada a partir del estándar cristalino de AFB₁.

4.2.3.2 Fortificación de las muestras

El procedimiento que se utilizó consiste en fortificar muestras de producto lácteo con estándar certificado de AFB₁ a distintas concentraciones. A continuación se extrae mediante columnas de inmunoafinidad y posterior derivatización con ácido trifluoroacético para aumentar su intensidad fluorescente y sensibilidad de detección.

Se trabajó la curva de matriz con un estándar de 1000 ng/mL de AFB₁ reconstituido a razón de los niveles de concentración que se muestran en la Tabla 4.6.

Tabla 4.6. Niveles de concentración de la curva de calibración para AFB₁.

Nivel	Volumen		Concentración final (ng/mL)
	Muestra (mL)	Estándar (ng/mL)	
1	10	10	1
2	10	20	2
3	10	30	3
4	10	40	4
5	10	50	5
6	10	100	10
7	10	200	20
8	10	400	40

Se trabajó la validación del sistema usando una curva de 8 niveles con estándar puro y la validación del método trabajando con 8 niveles del estándar con matriz, de acuerdo a la Tabla 4.7.

Para la validación del método se fortificaron cuatro muestras de producto lácteo con diferentes volúmenes de la solución de trabajo, obteniendo así diferentes niveles de concentración.

Tabla 4.7. Formato de trabajo para validación del sistema.

Validación del sistema usando estándares puros		
Día	Trabajo	Acción
1 - 3	3 Curvas con 8 niveles	Se trabajaron 8 niveles de estándar, de tal modo que dieran las siguientes concentraciones: 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20 y 40 ng/mL

Se sometieron las muestras fortificadas al proceso de extracción y se analizaron mediante el procedimiento analítico cromatográfico establecido. A la vez se trabajaron cuatro blancos de matriz, un blanco de reactivos y un blanco de cristalería, tal como se muestra en la Tabla 4.8.

Tabla 4.8. Formato de trabajo para la validación del método.

Validación del método		
Día	Trabajo	Acción
1 - 3	4 Curvas de 8 niveles con matriz (producto lácteo) fortificada	Se trabajó matriz fortificada con estándar, de tal forma que dieran las siguientes concentraciones: 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20 y 40 ng/mL .
	4 Blancos de matriz	Se trabajó con producto lácteo libre de aflatoxinas.
	1 Blanco de reactivos	Se trabajó todo el proceso de extracción sin muestra y sin estándar.
	1 Blanco de cristalería	Se trabajó todo el proceso de extracción en agua destilada procedente de enjuague del material utilizado.

4.2.3.3 Preparación de la muestra

Se colocaron 50 mL de muestra en un tubo de centrifuga y se centrifugó a 5000 rpm durante 15 min para eliminar la grasa. El sobrenadante se filtró a través de papel filtro Whatman No. 4 y se colectó el filtrado en matraces Erlenmeyer de 250 mL. Se adicionaron 20 mL de metanol al 80%, se agitó en agitador mecánico por 30 min y posteriormente se filtró a través de papel filtro Whatman No. 4. Del filtrado se tomaron 10 mL, se adicionaron 40 mL de agua destilada y se homogenizó completamente. De esta muestra se tomaron 10 mL y se adicionaron 20 mL de hexano, se agitó por 5 min para posteriormente centrifugarse por 10 min a 3500 rpm. Se eliminó la fase de hexano por aspiración con una pipeta Pasteur.

4.2.3.4 Extracción de la AFB₁

Se conectó una columna de inmunoafinidad a la bomba manual y sobre esta una jeringa de plástico de 10 mL. Se colocaron 10 mL de la muestra diluida en la jeringa y se pasó a través de la columna de inmunoafinidad a razón de dos gotas por segundo. Posteriormente se lavó la columna dos veces con 10 mL de agua destilada cada vez. Se pasó aire por la columna, llevándola a sequedad. Se agregó 1 mL de acetonitrilo para eluir la aflatoxina y se colectó en un tubo de borosilicato color ámbar.

Tabla 4.9. Condiciones de trabajo del HPLC para separación y cuantificación de la AFB₁.

Fase móvil:	Agua : Acetonitrilo : Metanol (60 : 20 : 20)
Flujo:	1 mL/min
Volumen de inyección:	50 µL
Detector de fluorescencia:	Excitación: 360 nm Emisión: 440 nm

Para realizar la derivatización, se tomaron 200 µL del eluido, se adicionó 700 µL de la solución derivatizadora de ácido trifluoroacético y se agitó por 30 s en un vórtex. Se incubó durante 10 min a 65 °C en baño de agua. Transcurrido el

tiempo, se enfriaron los viales, se filtraron a través de filtros Millipore de 0,45 μm para posteriormente ser inyectados en el cromatógrafo. Para separar y cuantificar la AFB₁, se fijaron los parámetros cromatográficos que se muestran en la Tabla 4.9.

4.2.4 Determinación de la exposición a la AFM₁ en la población

La determinación de la exposición de la población regiomontana a la AFM₁ por el consumo de leche y productos lácteos, se realizó mediante la combinación de datos sobre el consumo promedio diario de leche por grupos de edad, con la concentración promedio de AFM₁ encontrado en este trabajo, así como el peso promedio de la población por grupos de edad. Para ello se aplicó la siguiente fórmula:

Ingesta Diaria de AFM₁ (ng/kg) =

$$\frac{\text{Ingesta promedio de leche (L)} \times \text{AFM}_1 \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{L}}\right) \times \text{Conversión} \left(\frac{\text{ng}}{\mu\text{g}}\right)}{\text{Peso corporal (kg)}}$$

Donde:

Ingesta promedio de leche es la ingesta que la población ingiere de leche diariamente, expresada en litros.

AFM₁ es el promedio de AFM₁ que contienen las muestras analizadas, expresadas en $\mu\text{g/L}$.

Peso corporal es el promedio de peso corporal en la población por grupos de edad.

Los datos correspondientes al consumo diario de leche por grupos de edad se obtuvieron de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de México (ENSANUT 2012), en la sección correspondiente al estado de Nuevo León.

Para obtener la ingesta diaria de AFM₁ en la población pre-escolar, fue necesario separar a la población, según lo señala la NOM-031-SSA2-1999 en:

- a) Lactante menor (recién nacido a 6 meses). En esta etapa de la vida del bebé, su dieta es únicamente a base de leche materna o sucedáneos de la misma. De la ENSANUT 2012 (<http://ensanut.insp.mx/>) se obtuvieron los pesos promedio del recién nacido y del lactante de 6 meses. Las fórmulas infantiles que se tomaron para este segmento fueron las fórmulas infantiles de inicio.
- b) Lactante menor (6 a 12 meses). En esta etapa de la vida del bebé se lleva a cabo la ablactación, por lo cual se toma como ingesta de lácteos la fórmula infantil de inicio y aquellas que contienen cereales y miel.
- c) Lactante mayor (12 a 24 meses). En esta etapa de la vida la ablactación se ha establecido y se ingieren tanto fórmulas infantiles de continuidad como leche.
- d) Pre-escolar (2 a 4 años). La ingesta de lácteos en esta etapa es con fórmulas infantiles encaminadas al desarrollo y leche.

Asimismo, se realizó la estimación del índice de riesgo (IR) basado en la propuesta de Kuiper-Goodman (1994), que estima la ingesta diaria tolerable (IDT) de AFM₁ dividiendo el TD50 (dosis umbral por peso corporal), que para la AFM₁ es de 10,38 µg/kg de peso corporal por día, y se dividió por el factor de seguridad 5000, para darnos un valor estimado de 2 ng/kg de peso corporal por día como índice de riesgo (Kuiper-Goodman, 1994; Gimeno, 2002; Shundo *et al.*, 2009).

4.2.5 Análisis estadístico

Se realizó análisis de varianza (ANOVA) mediante el programa estadístico SPSS ver. 20.

V. RESULTADOS y DISCUSIÓN

PRIMER MUESTREO

TÉCNICA ELISA

5. RESULTADOS DEL PRIMER MUESTREO

5.1 Valores de AFM₁ encontrados en leches fluidas

Los resultados de AFM₁ obtenidos del análisis de 84 muestras de leche fluida y productos lácteos, con diferentes procesos térmicos, como pasteurización y ultrapasteurización (UHT), dieron a conocer que todas ellas dieron positivo para esta aflatoxina aplicando el test ELISA, presentando valores comprendidos entre 0,1 µg/L, como el valor más bajo, hasta 1,27 µg/L como valor más alto, con una media de 0,49 (± 0,23) µg/L. La Figura V.1 muestra los valores de AFM₁ (µg/L) de todas las muestras de leche analizadas, observándose que la mayoría de las muestras (51) presentaron valores por debajo del valor máximo aceptable por la NOM-243-SSA1-2010 (0,5 µg/L), el cual se indica con una línea punteada.

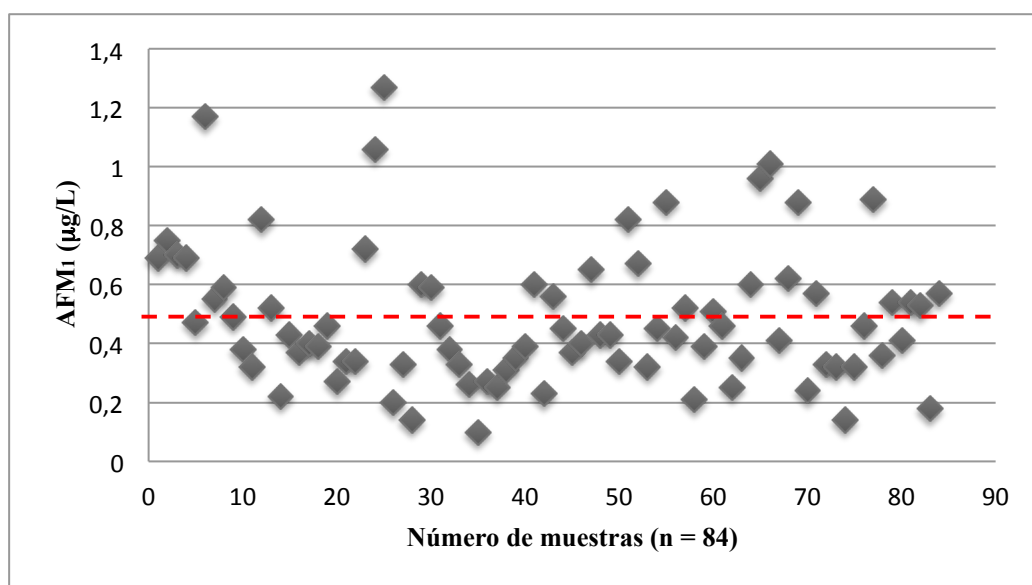


Figura V.1. Valores de AFM₁ en leche fluida que se comercializa en el área metropolitana de Monterrey, México. La línea punteada indica el límite máximo de AFM₁ permitido por la NOM.

La proporción de leches y productos lácteos que presentaron niveles aceptables de AFM₁ fue del 61% con una media de 0,34 (± 0,1) µg/L, mientras que el 39% restante (media de 0,72 ± 0,2 µg/L) se encontraron en niveles por encima de lo permitido por la NOM.

La Food and Drug Administration (entidad reguladora en EEUU), establece que la concentración máxima permitida de AFM₁ en leche entera,

semidesnatada y desnatada es de 0,5 µg/L (EHSO, 2004). Esta norma ha sido también adoptada por algunos países de América Latina, entre ellos los que forman parte de Mercosur (Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay) y México, para lo cual se establece en la Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010 (FAO, 1995). Sin embargo, la legislación existente en la Unión Europea (UE) relacionada con aflatoxinas y productos lácteos, indica que para leche cruda, leche destinada a la fabricación de productos a base de leche y leche de consumo tratada térmicamente, la concentración máxima permitida de AFM₁ es de 0,05 µg/L o kg (0,05 ppb), mientras que en el caso de preparados y leche para lactantes y alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales, dirigidos específicamente a los lactantes, la concentración máxima permitida de AFM₁ es de 0,025 µg/L (0,025 ppb) (Official Journal of the European Union, 2004). En el caso de aplicar la normativa europea, la totalidad de las leches analizadas por el método ELISA se encontrarían en niveles por encima de lo permitido por esta norma de aplicación en los países de la Unión Europea.

5.2 Análisis de las leches y productos lácteos según su procedencia

Cuando se realizó el análisis de las leches en base a su procedencia (nacional o importada), se encontró que 66 de las muestras fueron de procedencia nacional (corresponde a un 79%, valor que incluye un 2% local), mientras que sólo 18 de ellas (21%) fueron leches importadas (Tabla 5.1).

Tabla 5.1 Comparación del nivel de AFM₁ entre leches nacionales e importadas .

Muestras	<i>n</i>	AFM ₁ (µg/L) ^a	Intervalo (µg/L)	% Fuera de valores aceptables
Nacional	66	0,53 ± 0.24	0,14 – 1,27	47
Importada	18	0,34 ± 0.13	0,1 – 0,6	11

^a Media ± Desviación estándar

Del análisis de los valores de las 66 leches de procedencia nacional, el 47% (31 muestras) presentó valores no aceptables por la NOM, mientras que de

las 18 leches de importación sólo un 11% (2 muestras) excedieron el límite marcado por esta norma (Ver figuras V.2 y V.3).

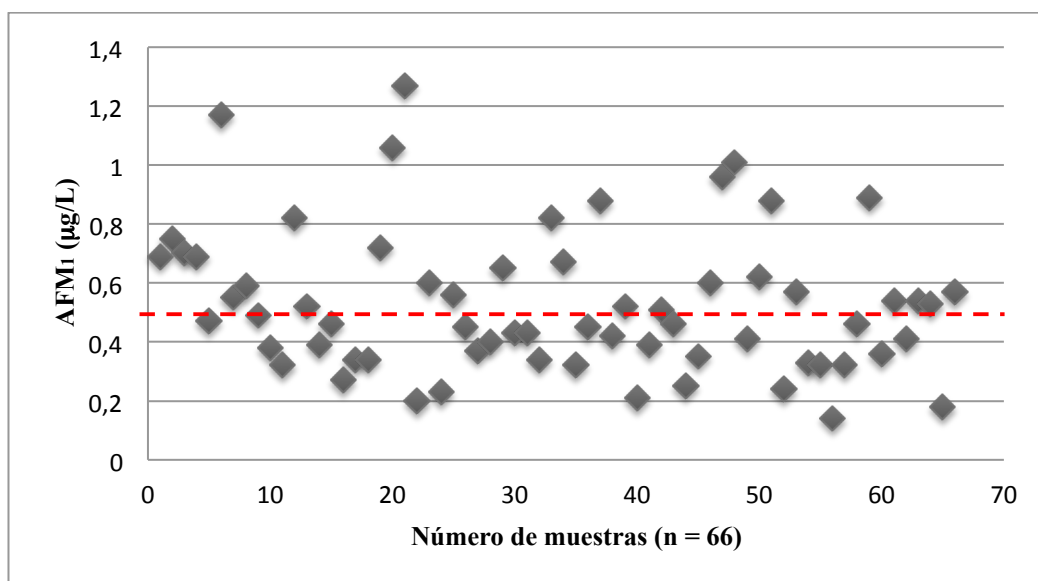


Figura V.2. Valores de AFM₁ en leche y productos lácteos en muestras de procedencia nacional. La línea punteada indica el límite máximo de AFM₁ permitido por la NOM.

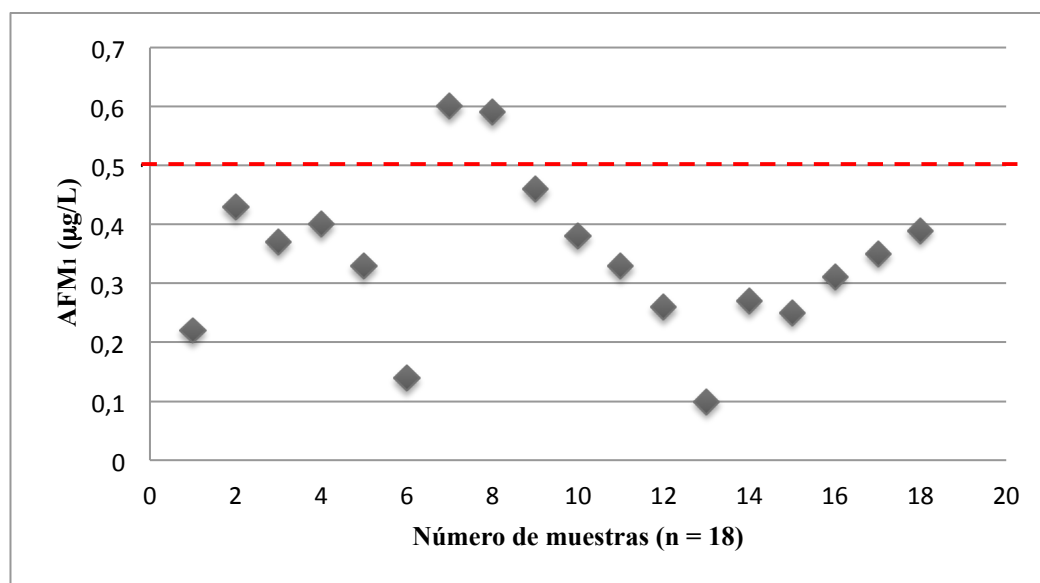


Figura V.3. Valores de AFM₁ en leche y productos lácteos en muestras importadas. La línea punteada indica el límite máximo de AFM₁ permitido por la NOM.

Al hacer la comparación de los niveles de AFM₁ entre leche de procedencia nacional e importada, se observó una marcada diferencia entre los valores no aceptables de AFM₁; aproximadamente la mitad de las leches de

procedencia nacional presentaron valores que excedieron a los valores aceptables por la NOM, mientras que apenas una décima parte de las leches de importación se localizaron fuera de la zona de aceptación. Por otra parte, al comparar el promedio de valores de AFM₁ que presentaron las leches nacionales y las leches importadas, las leches nacionales se situaron ligeramente por encima del límite que marca la NOM, mientras que las leches importadas se emplazaron por debajo de la misma (Tabla 5.1).

Al comparar los resultados del promedio de los valores de AFM₁ que presentaron las leches por estado de procedencia, aquellos que presentaron niveles superiores a lo que marca la NOM fueron: Baja California, Coahuila, Hidalgo, estado de México y Puebla. Cabe señalar, que de las leches mencionadas procedentes de estos estados, sólo se pudo obtener una marca comercial de cada uno de ellos, a excepción del estado de México del que se obtuvieron 15 marcas comerciales diferentes (Tabla 5.2).

Tabla 5.2 Comparación del nivel de AFM₁ por estado de procedencia de la leche.

Procedencia	<i>n</i>^a	AFM₁ (µg/L)^b	Intervalo (µg/L)
Aguascalientes	7 (28)	0,44 ± 0,24	0,14 – 0,89
Baja California	1 (100)	0,69	–
Coahuila	1 (100)	0,60	–
Durango	29 (38)	0,50 ± 0,22	0,24 – 1,01
Guanajuato	5 (20)	0,46 ± 0,21	0,32 – 0,82
Hidalgo	1 (100)	0,54	–
Jalisco	6 (50)	0,46 ± 0,19	0,18 – 0,72
México	15 (60)	0,54 ± 0,25	0,14 – 1,27
Nuevo León	2 (50)	0,40 ± 0,23	0,23 – 0,56
Puebla	1 (100)	0,57	–
Texas (EEUU)	16 (12)	0,43 ± 0,30	0,1 – 0,65

^a Valor en paréntesis indica % de muestras que exceden los límites. ^b Media ± desviación estándar.

Las Tablas 5.3 y 5.4 muestran los resultados obtenidos en el análisis ANOVA aplicado a las muestras con proceso térmico de pasteurización y UHT.

Tabla 5.3 Resumen de resultados de muestras con proceso térmico UHT y pasteurizadas.

Grupos	<i>n</i>	Suma	Media	Varianza
Nacional	66	34,78	0,5269	0,0586
Importada	18	6,18	0,3433	0,0172

El análisis estadístico de varianza (ANOVA) indicó la existencia de diferencia significativa ($P = 0,0027$) entre las muestras tratadas térmicamente mediante pasteurización y esterilizadas mediante UHT. Esto se concluyó comparando los valores F arrojados por el análisis de varianza y rechazando la hipótesis nula (H_0).

Tabla 5.4 Análisis de varianza ($H_0 \mu = \mu$; $H_1 \mu \neq \mu$).

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,4769	1	0,4769	9,528	0,0027	3,957
Dentro de los grupos	4,1043	82	0,0500			
Total	4,5813	83				

5.3 Análisis de las leches según tipo de producto y proceso térmico aplicado

Las leches analizadas recibieron un proceso térmico de pasteurización o UHT. De las leches que encontramos en el comercio, un 76% correspondieron a leches UHT, (16 de ellas no pueden legalmente denominarse leche ya que su etiqueta indicaba la presencia de grasa vegetal y su correcta designación sería producto lácteo), mientras que el 24% restante fueron leches pasteurizadas (Tabla 5.5 y Figs. V.4 y V.5).

Tabla 5.5 Comparación de niveles de AFM₁ en leche pasteurizada y leche o producto lácteo UHT.

Producto	<i>n</i> ^a	AFM ₁ (µg/L) ^b	Intervalo (µg/L)
Pasteurizada	20 (20)	0,39 ± 0,11	0,21 – 0,56
UHT	64 (45)	0,52 ± 0,26	0,1 – 1,27

^a Valor en paréntesis indica % de muestras que exceden los límites establecidos por la NOM.

^b Media ± desviación estándar

Al analizar individualmente la sección que se refiere a la leche pasteurizada, se observó que un 20% de las muestras de leche (4 muestras de 20 totales pasteurizadas) se encontró por encima del valor máximo permitido, mientras que el 80% restante se situó dentro de valores aceptables por la NOM (Figura V.4).

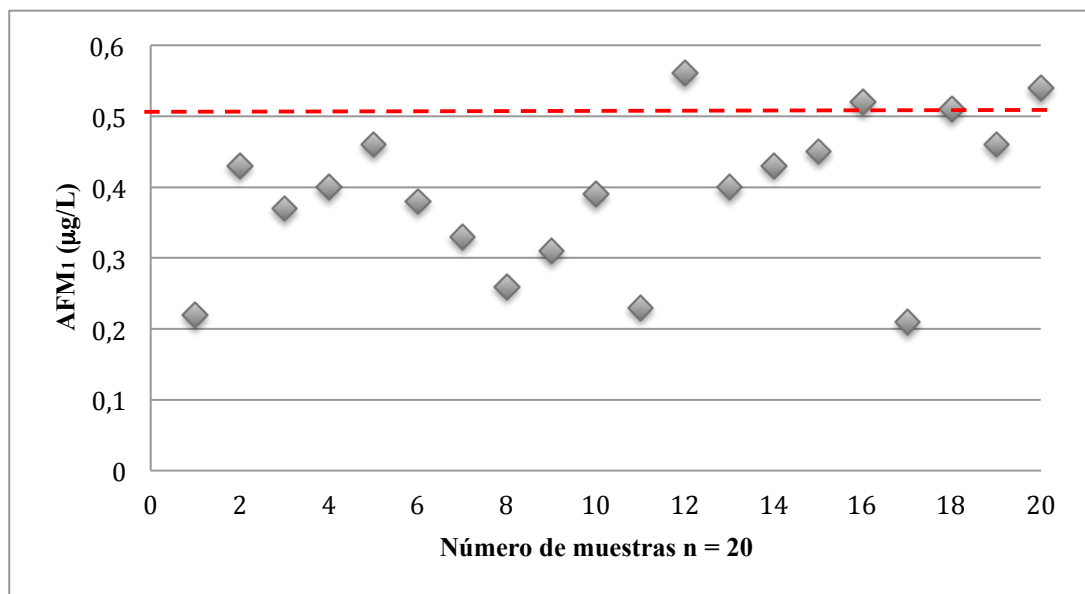


Figura V.4. Distribución de los valores de muestras con proceso térmico de pasteurización. La línea punteada indica el límite máximo de AFM₁ permitido por la NOM.

Asimismo, al analizar la leche o producto lácteo que sufre un proceso térmico UHT, se observó que un 45% de estas muestras presentó valores de AFM₁ por encima del valor máximo permitido (29 de 64 muestras UHT), mientras que el 55% restante se encontró dentro de valores aceptables por la NOM (Figura V.5).

Al comparar los niveles medios de AFM₁ de las leches pasteurizadas y UHT, se pudo observar que la leche pasteurizada presentó valores promedio de 0,39 µg/L, situándose este tipo de leche en conjunto dentro del límite que marca la NOM, mientras que las leches y productos lácteos UHT presentaron valores promedio de 0,52 µg/L, ligeramente por encima del valor establecido por la NOM (Tabla 5.5).

Por otra parte y al comparar los niveles de AFM₁ aceptables y no aceptables de leches pasteurizadas y UHT, se pudo observar que la leche pasteurizada presentó la mayor cantidad de muestras (80%) con niveles aceptables de AFM₁ y una media de $0,39 \pm 0,11$ µg/L mientras que en la leche y productos lácteos UHT la cantidad de muestras con valores de AFM₁ dentro de límites aceptables (55%) presentaron una media de $0,52 \pm 0,26$ µg/L, siendo estos valores considerablemente más elevados que los presentados en las leches pasteurizadas.

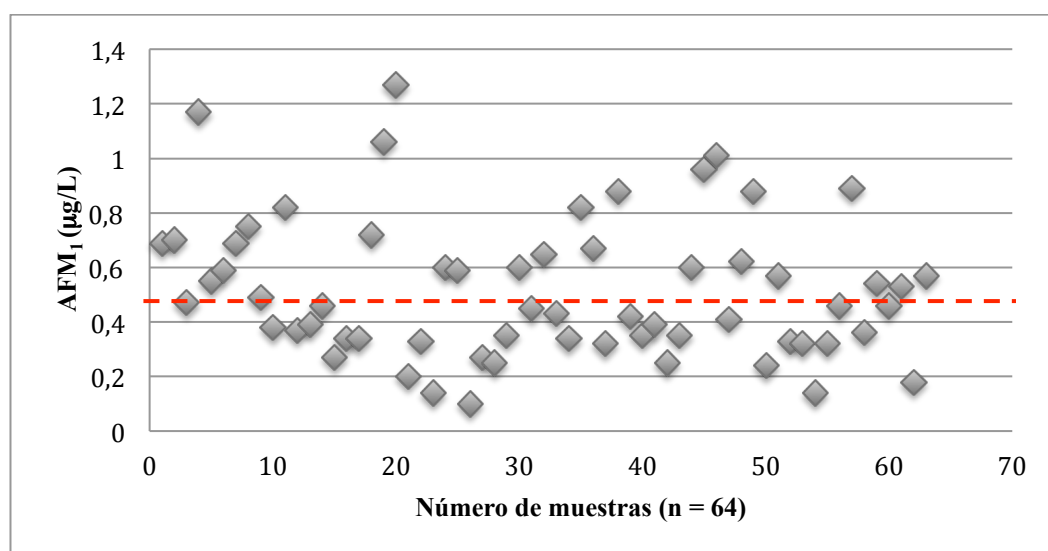


Figura V.5. Distribución de los valores de muestras con proceso térmico UHT. La línea punteada indica el límite máximo de AFM₁ permitido por la NOM.

Las Tablas 5.6 y 5.7 muestran los resultados obtenidos en el análisis ANOVA aplicado a las muestras con proceso térmico de pasteurización y UHT.

Tabla 5.6 Resumen de resultados de muestras con proceso térmico UHT y pasteurizadas.

Grupos	n	Suma	Media	Varianza
Pasteurizada	20	7,86	0,393	0,0112
UHT	64	33,1	0,5171	0,0656

El análisis estadístico de varianza (ANOVA) indicó la existencia de diferencia significativa ($P = 0,0383$) entre las muestras tratadas térmicamente mediante pasteurización y esterilizadas mediante UHT. Esto se concluyó comparando los valores F arrojados por el análisis de varianza y rechazando la hipótesis nula (H_0).

Tabla 5.7 Análisis de varianza ($H_0 \mu = \mu$; $H_1 \mu \neq \mu$).

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,2350	1	0,2350	4,433	0,0383	3,957
Dentro de los grupos	4,3463	82	0,0530			
Total	4,5813	83				

Al realizar la comparación de las leches (con presencia de grasa butírica) y producto lácteo (con grasa vegetal), se observó que de las 68 leches analizadas un 32% de éstas se encontraron por encima del valor permitido por la NOM, con una media de $0,45 \pm 0,21 \mu\text{g/L}$, mientras que en las 16 muestras analizadas de productos lácteos, el 69% presentaron niveles por encima de la NOM y con una media de $0,66 \pm 0,28 \mu\text{g/L}$ (Tabla 5.8). De estos resultados se observa que la leche muestra valores por encima de lo que marca la NOM considerablemente menores (32%) y con valores promedio dentro de la NOM ($0,45 \mu\text{g/L}$), comparados con los de productos lácteos (69%) y con una media por encima de valores aceptados por la NOM ($0,66 \mu\text{g/L}$) Ver Tabla 5.8.

Tabla 5.8 Comparación de niveles de AFM₁ en leches y productos lácteos.

Muestra	<i>n</i>	Muestras positivas	AFM ₁ (µg/L)	
			Intervalo	Media ± Desv. Std.
Leche	68	68 (32)*	0,1 – 1,17	0,45 ± 0,21
Producto lácteo	16	16 (69)	0,2 – 1,29	0,66 ± 0,28

*Valor entre paréntesis indica el porcentaje de muestras que exceden el límite marcado por la NOM.

Las Tablas 5.9 y 5.10 muestran los resultados obtenidos en el análisis ANOVA aplicado a las muestras de leche y productos lácteos.

Tabla 5.9 Resumen de resultados de muestras de leche y productos lácteos.

Grupos	<i>n</i>	Suma	Media	Varianza
Leche	68	30,42	0,4473	0,0422
Producto lácteo	16	10,54	0,6587	0,0783

El análisis estadístico de varianza (ANOVA) nos indicó la existencia de diferencias significativas ($P = 0,0009$) entre las muestras leche y producto lácteo. Esto se concluyó comparando los valores F arrojados por el análisis de varianza y rechazando la hipótesis nula (H_0).

Tabla 5.10 Análisis de varianza ($H_0 \mu = \mu$; $H_1 \mu \neq \mu$).

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,5788	1	0,5788	11,858	0,0009	3,957
Dentro de los grupos	4,0025	82	0,0488			
Total	4,5813	83				

De los 18 diferentes tipos de aflatoxinas, la más tóxica es la AFB₁, seguida por la AFM₁, la cual es un derivado metabólico de la AFB₁. Ambas aflatoxinas poseen gran actividad cancerígena, teratogénica y mutagénica, además de ser inmunosupresoras, ya que inhiben la síntesis de proteínas en los ribosomas (Yates, 2007). Cobra una mayor importancia cuando la AFB₁ se transforma en AFM₁ que es excretada por la leche, tanto de animales como la humana, y al ser el alimento principal en la etapa infantil, el tema adquiere mayor relevancia.

La presencia de AFM₁ en leche está relacionada con condiciones ambientales de humedad y temperatura que facilitan el crecimiento de los hongos en los piensos. En clima adecuado, el ganado se alimenta de los pastos, prácticamente libres de contaminación, pero en clima inadecuado, el pienso se almacena en silos, lo que propicia la contaminación por los hongos aflatoxigénicos (García, 2006).

Un estudio realizado por Carvajal *et al.* (2003) en México, en el cual analizaron 290 muestras de las 7 marcas de leche de mayor consumo en el país, encontraron que el 10% de ellas presentaron valores de AFM₁ por encima de los niveles establecidos por la NOM (0,5 µg/kg). En este estudio las muestras de leche fluida pasteurizada y UHT se recolectaron en la ciudad de México D. F. en el período de Abril de 1996 a Julio de 1997, considerándose que fueron representativas del consumo a nivel nacional y se trató de leche de procedencia nacional e importada. También se reportó que la leche con menor cantidad de AFM₁ fue la de importación.

Estudios realizados en la zona metropolitana de Guadalajara, Jalisco, México por Landeros *et al.* (2012) para detectar la presencia de AFM₁ en leche cruda de vaca en 10 centros de acopio (n = 50) y 7 marcas de leche pasteurizada (n = 84), mostraron la presencia de AFM₁ en el 100% de las muestras estudiadas. El 18,6% (25/134) de las muestras superaron el límite establecido por la UE (0,05 µg/L), pero sólo el 0,7% (1/134) excedió el límite establecido por la NOM (0,5 µg/L).

Estudios realizados en 13 estados miembros de la Unión Europea, han mostrado que solamente en dos de ellos se encontraron niveles mayores a 0,05 µg/kg de AFM₁ en leche (EFSA, 2004). De la misma manera, un estudio realizado en Italia indica que sólo 2 muestras (0,6%) en una región del país, mostraron niveles no satisfactorios de AFM₁ (Nachtmann, 2007), refiriendo el problema a únicamente una región de Italia, debido al uso de alimento contaminado para el ganado cuando los controles oficiales fueron menos intensos.

Según informes de la FAO (2004), aproximadamente 60 países han establecido límites para AFM₁. La UE, los estados miembros, y los países EFTA (European Free Trade Association, www.efta.int) donde se integra Islandia, Noruega, Suiza y Liechtenstein, generalmente aplican un nivel máximo de 0,05 µg/kg de AFM₁ en leche. Algunos países en África, Asia y América Latina (Honduras) también proponen este nivel. En contraste, Estados Unidos, así como algunos países europeos y asiáticos aceptan un nivel máximo de 0,5 µg/kg de AFM₁ en leche, el cual armoniza con los límites aplicados en México y en el MERCOSUR (Brasil, Argentina, Paraguay y Uruguay) en América Latina (FAO, 1995). El límite de 0,5 µg/kg ha sido adoptado también por el *Código Alimentarius*. Así, el máximo nivel permitido de AFM₁ en leche en la UE (EC European Community, 2003), está entre las más bajas en el mundo, y está basada en el principio ALARA (As Low As Reasonably Achievable). Por otro lado, se encuentran países que no cuentan con legislación respecto a aflatoxinas, como es el caso de Panamá y países como Islas Mauricio, Hong Kong y Sri Lanka, cuya legislación permite niveles de hasta 10, 15 y 30 µg/kg, respectivamente (International Legislation on Mycotoxins, 2012).

La Tabla 5.11 recoge los límites para la AFM₁ en diferentes países según la [International Legislation on Mycotoxin](http://services.leatherheadfood.com/eman/index.aspx) (<http://services.leatherheadfood.com/eman/index.aspx>); estos límites generalmente sólo se establecen para la leche y los productos lácteos y en algunos casos para los productos para los niños en todo el mundo.

Tabla 5.11 Límites de aflatoxina M₁ en diferentes países.

País	Producto	Aflatoxin M ₁ (µg/kg)
Unión Europea	Leche cruda, leche tratada térmicamente y leche para preparar productos a base de leche	0,05
Bosnia y Herzegovina	Fórmulas infantiles y fórmulas de continuidad, incluyendo leche para infantes y leches de continuación	0,025 (productos listos para usarse)
Turquía	Alimentos para propósitos médicos dirigidos especialmente para infantes	0,025 (productos listos para usarse)
China	Leche y productos lácteos (para leche deshidratada, calculada en base a leche fresca)	0,5
	Alimentos formulados para infantes (leche o leche rica en proteínas)	0,5 (calculado en base a producto deshidratado)
	Alimentos formulados para infantes mayores y niños pequeños (leche o leche rica en proteínas)	0,5 (calculado en base a producto deshidratado)
Codex, GCC, India, Kenya, EEUU	Alimentos formulados para propósitos médicos especiales dirigido a infantes	0,5
	Leche	0,5
Argentina	Leche, incluyendo leche líquida usada en la manufactura de productos lácteos y leche reconstituida	0,5*
	Leche deshidratada	
	Fórmula láctea	ND
México	Leche pasteurizada, ultrapasteurizada, esterilizada y deshidratada, fórmula láctea y productos de leche combinada	0,5*
Sudafrica	Leche	0,5

ND = No detectable, *Dado en µg/L

La Tabla 5.12 presenta un listado de estudios realizados sobre la

presencia de AFM₁ en leches con tratamiento térmico. Se observa que en algunos países (Italia, Argentina, Brasil, Japón, Francia y Colombia), a pesar de presentar resultados positivos de AFM₁, no exceden el nivel aceptable. Otros estudios similares realizados en Turquía (Unusan, 2006), mencionan proporciones del 58% de leche contaminada con AFM₁ de un total de 129 muestras. En América Latina, en un estudio realizado en Brasil, se analizaron 139 leches, y se encontró que el 21% de ellas presentaron valores por encima de los aceptables con respecto a la legislación de la UE (<0,05 µg/kg) y ninguna por encima del valor aceptado por el MERCOSUR (Garrido, 2003).

En nuestro trabajo, las 84 muestras de leche analizadas, procedieron de 27 marcas diferentes que se comercializaban al momento del muestreo en Monterrey (Nuevo León, México) y se encontró, por la técnica de ELISA, que los valores de AFM₁ fluctuaron desde 0,1 µg/kg hasta 1,27 µg/kg, de las cuales representaron un 39% presentaron valores por encima de los valores permitidos en nuestro país, donde la Norma Oficial Mexicana (NOM-184-SSA1-2002), establece como nivel máximo aceptable 0,5 µg/L para AFM₁ en leche fluida.

Son muy escasos los estudios que sobre AFM₁ hay en México, por lo tanto, los resultados de este trabajo ponen de manifiesto los altos valores de AFM₁ en leches de la región. Si tomásemos como referencia los estándares Europeos, que son más estrictos en la materia, ninguna de las leches analizadas en este estudio sería aceptada, ya que el valor encontrado más bajo fue de 0,1 µg/L, es decir, dos veces el valor límite indicado en la legislación Europea.

Tabla 5.12 Reportes de presencia de AFM₁ en diversos países.

País	Total de muestras	Nivel de referencia (µg/kg)	% de muestras positivas	% por encima de nivel aceptable	Referencia
Unión Europea					
Portugal	70	0,05	100	2,85	Martins y Martins (2000)

Tabla 5.12 (Continuación).

Italia	161	0,05	78	0	Galvano <i>et al.</i> (2001)
Francia	132	0,05	3	0	Boudra <i>et al.</i> (2007)
España	72	0,05	0,01	0	Cano-Sancho <i>et al.</i> (2010)
Portugal	40	0,05	27,5	5	Duarte <i>et al.</i> (2013)
Serbia	50	0,05	80	76	Skrbic <i>et al.</i> (2014)
Italia	24	0,05	0	0	Juan <i>et al.</i> (2014)
Serbia	150	0,05	98,7	86	Kos <i>et al.</i> (2014)
Croacia	706	0,05	36,2	9,64	Bilandzic <i>et al.</i> (2014)
África y Asia					
Marruecos	54	0,05	88,8	7,4	Zinedine <i>et al.</i> (2007)
Sudan	44	0,5	95,45	83,33	Elzupir (2010)
Sudáfrica	85	0,05	100	85,6	Mwanza y Dutton (2014)
Kuwait	54	0,2	26	28	Srivastava <i>et al.</i> (2001)
Japón	208	0,05	99,5	0	Nakajima <i>et al.</i> (2004)
Irán	624	0,05	100	17,8	Solmaz <i>et al.</i> (2006)
Turquía	129	0,05	58,1	47	Unusan (2006)
Irán	128	0,05	95	78	Mohammad <i>et al.</i> (2007)
Turquía	100	0,05	67	31	Tekinsen y Eken (2008)

Tabla 5.10 (Continuación)

Taiwan	144	0,05	100	0,7	Peng y Chen (2009)
China	135	0,05	100	72	Pei <i>et al.</i> (2009)
Kuwait	105	0,05	100	3,8	Dashti <i>et al.</i> (2009)
Siria	10	0,2	100	70	Ghanem y Orfi (2009)
Iran	225	0,5	67,1	3,31	Fallah (2010)
Turquía	40	0,05	20	2	Kabak y Ozbey (2012)
Pakistan	232	0,05	76,3	32	Sadia <i>et al.</i> (2012)
China	153 UHT	0,5	54,9	0	Zheng <i>et al.</i> (2013)
Líbano	120	0,05	88,2	11,8	Hassan y Kasaify (2014)
Turquía	73	0,025	18	0	Atasever <i>et al.</i> (2014)
Turquía	12	0,05	100	25	Temamogullari y Kanici (2014)
América					
México	290	0,5	50	10	Carvajal <i>et al.</i> (2003)
Brasil	139	0,5	79,9	0	Garrido <i>et al.</i> (2003)
Argentina	77	0,5	23	0	López <i>et al.</i> (2003)
Colombia	241	0,4	79,4	0	Díaz y Espitia (2006)
México	20	0,5	59	60	Pérez <i>et al.</i> (2008)
México	60	0,5	30	8,3	Urbán <i>et al.</i> (2010)

Tabla 5.10 (Continuación)

México	84	0,5	100	0,7	Landeros <i>et al.</i> (2012)
Brasil	129	0,05	100	13,95	Almeida <i>et al.</i> (2013)
Brasil	100	0,05	2	0	Iha <i>et al.</i> (2014)

VI. RESULTADOS y DISCUSIÓN
SEGUNDO MUESTREO
TÉCNICA HPLC

6. RESULTADOS DEL SEGUNDO MUESTREO.

Para este segundo muestreo se obtuvieron 163 muestras: 51 muestras de leche bronca (cruda), 55 muestras de fórmulas infantiles (49 fórmulas infantiles de inicio y 6 fórmulas infantiles de continuidad), 40 muestras de leche y 17 de producto lácteo. De estos dos últimos productos, 15 de ellos fueron productos deshidratados y 41 productos UHT.

6.1 Presencia de AFM₁ en leche bronca (cruda)

Para este segundo muestreo, se obtuvieron 51 muestras de leche bronca procedente de establos del noreste del país, a través de los proveedores de la Unión Regional Ganadera de Nuevo León (www.unionganaderadnl.com.mx).

La Norma Oficial Mexicana (NOM-243-SSA1-2010), establece que el límite máximo permitido de AFM₁ en leche bronca no deberá ser mayor a 0,5 µg/L, mientras que la normativa en la Unión Europea estipula valores no mayores a 0,05 µg/L. La Tabla 6.1 muestra los resultados obtenidos en 51 muestras de leche bronca analizadas, de las cuales 31% fueron positivas para la presencia de AFM₁. Asimismo, se observó que un 4% del total de la leche bronca analizada se encontraba fuera de los valores aceptados por la NOM, representando el 31% de las muestras cuando se aplica la norma europea.

Tabla 6.1 Presencia de AFM₁ en leche cruda.

Muestra	n	Positivas (%)	AFM ₁ (µg/L)	
			Intervalo	Media +Desv Estándar
Leche bronca	51	16 (31%)	0,00 – 0,88	0,07 ± 0,15
Muestras fuera de NOM*		2 (4%)		
Fuera de norma UE**		16 (31%)		

*NOM-243-SSA1-2010. Establece un máximo de 0,5 µg/L.

** Norma UE. Establece un máximo de 0,05 µg/L.

Se han publicado diversos estudios respecto a la presencia de AFM₁ en leche cruda de diferentes especies de animales, así como también los niveles de

AFM₁ según la estación del año, estudios que han sido realizados en diferentes países y que se han recopilado en la Tabla 6.2. Los resultados obtenidos en países asiáticos como Irán, Turkía y Paquistán, muestran de un 30 a un 41% de las muestras por encima del nivel aceptable para esos países. Sin embargo, otros países asiáticos como Corea, Indonesia, Kuwait e India, reducen estos niveles presentando un número de muestras que oscila entre 0 y 13% por encima de nivel aceptable. Los estudios realizados en países de la UE como España, Francia y Eslovenia, reducen un poco más los niveles presentando, según el estudio realizado, entre 0 y 10% de las muestras por encima de los niveles aceptables según la normativa que aplica en estos países. En Brasil los niveles reportados de muestras por encima del nivel aceptable, se sitúan entre 7 y 14%, y en México se ha reportado un 0% cuando se comparan estos valores con la NOM y 100% cuando se compara con la normativa de la UE.

Tabla 6.2 Reportes de presencia de AFM₁ en leche cruda en diversos países.

País	Total de muestras	Nivel de referencia (µg/kg)	% de muestras positivas	% por encima de nivel aceptable	Referencia
España	92	0,05	3,3	0	Rodríguez <i>et al.</i> (2003)
Brasil	42	0,5	24	7	Sassahara <i>et al.</i> (2005)
Irán	111	0,05	76,6	40	Kamkar (2005)
Francia	264	0,05	1,13	0	Boudra <i>et al.</i> (2007)
Irán	98	0,05	100	36,7	Tajkarimi <i>et al.</i> (2007)
Eslovenia	60	0,05	-	10	Torkar y Vengust (2008)
Irán	319	0,05	54	30	Tajkarimi <i>et al.</i> (2008)

Tabla 6.2 (Continuación)

Pakistán	120	0,05	52,5	13,9	Hussain <i>et al.</i> (2008)
México	9	0,05**	100	100	Pérez <i>et al.</i> (2008)
Indonesia	113	0,05	100	0	Nuryono <i>et al.</i> (2009)
Kuwait	177	0,05	100	4,52	Dashti <i>et al.</i> (2009)
Corea	100	0,5	77	0	Lee <i>et al.</i> (2009)
México	40	0,5*	80	0	Reyes <i>et al.</i> (2009)
Sudán	44	0,5	95,45	83,33	Elzupir y Elhussein (2010)
Irán	88	0,05	84,1	35,2	Fallah <i>et al.</i> (2011)
Pakistán	17	0,05	88	41	Sadia <i>et al.</i> (2012)
Turquía	45	0,5	91,1	35,5	Sahindokuyucu <i>et al.</i> (2012)
India	45	0,5	100	13,3	Siddappa <i>et al.</i> (2012)
Brasil	129	0,05	100	13,95	Almeida <i>et al.</i> (2013)

*NOM-243-SSA1-2010. Establece 0,5 µg/L

** Norma UE. Establece un máximo de 0,05 µg/L.

Las estrategias de conservación de alimentos son una herramienta muy útil que permite el almacenaje de alimentos en épocas de abundancia para que se puedan utilizar cuando los suministros escasean. Dependiendo de la localización

y de las condiciones de producción, se pueden utilizar distintas formas de conservación que generalmente se enfocan en los principios de deshidratación (henificación), fermentación (ensilaje) o una combinación de ambos (henilaje). Asimismo, las estructuras para conservar alimentos varían de acuerdo a las posibilidades de cada explotación (silos de trinchera, silos verticales, silos de bolsa, etc) (Ver Figura 6.1).



Figura 6.1 Silos de bolsa.

El ensilaje de maíz sirve como un forraje de alta energía, para el ganado lechero. Esto es lo más importante para hatos de alta producción y en establos que experimentan problemas para elaborar o comprar cosechas de heno de alta calidad.

La AFB₁ es una micotoxina que crece en los granos, especialmente en maíz, maníes y semillas de algodón. Raramente, si no nunca, se encuentra en los forrajes frescos. La formulación de raciones por mezcla de granos con otro alimento está permitida, pero cada ingrediente del alimento debe contener menos de 20 ppb de aflatoxina.

Si el maíz amarillo usado como ingrediente en la ración del ganado es de importación debido al déficit en la producción de maíz en México, la verificación de su calidad durante su importación es un punto que se debe vigilar si es que ya viene contaminado, o la contaminación de este maíz aparece cuando se almacena en las bodegas de México.

Estudios realizados en México por Flores *et al.* (2006) acerca de la presencia de micotoxinas en alimento balanceado y granos de uso pecuario, mostraron que la presencia natural de micotoxinas representa un problema crítico en la producción de aves, cerdos y ganado, ya que reportaron que un 57% de las muestras analizadas contienen presencia de micotoxinas. Asimismo mencionan que la presencia de AFB₁ fue mayor en gluten y alimento balanceado

que en granos.

Algunos autores han reportado una mayor incidencia de AFM₁ durante las estaciones frías que las calientes (Kiermeier y Meshaley, 1977; Fremy y Gaymard, 1980; Fremy y Boursier, 1981; Heesuchen *et al*, 1981; Gelosa, 1986; Blanco *et al*, 1988; Bachner *et al*, 1998), debido a que en invierno el ganado es alimentado con una mayor cantidad de piensos compuestos con mezclas de granos, algunas veces contaminados con AFB₁, ya que provienen de silos con alto contenido de humedad y temperatura elevada, que favorecen el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus*. En un estudio realizado en Croacia por Bilandzic *et al.* (2010), donde fueron recolectadas y analizadas muestras de leche cruda en período invierno-primavera (enero, febrero, marzo y abril) y verano-otoño (junio, julio y septiembre), encontraron que una de las muestras tomada en el mes de febrero excedió el límite permitido por la UE (50 ng/L) para AFM₁, donde reportaron niveles en un intervalo de 35,8 – 58,6 ng/L. Otro trabajo publicado por Kamkar (2005), mostró que de las 111 leches recolectadas en el mes de diciembre, 85 (76,6%) presentaron niveles elevados de AFM₁, en el intervalo de 0,015 – 0,28 µg/L situándose fuera de la normativa europea, con respecto a aquellas recolectadas en el mes de agosto (0,024 µg/L).

En un estudio realizado por Almeida *et al.* (2013) en el estado de Minas Gerais (Brazil) se analizaron 129 muestras de leche recolectadas de granjas lecheras en tres períodos distintos (período seco, el período de transición y el período de lluvias) y todas ellas mostraron contaminación con AFM₁. En los tres periodos, la AFM₁ se detectó a concentraciones por debajo del límite permitido de 0,50 µg/L en leche, de acuerdo con la legislación brasileña, y 18 muestras (13,95%) mostraron contaminación con AFM₁ por encima del límite permitido de 0,05 µg/L establecido por Codex Alimentarius y la Comisión Europea.

En Líbano, Assem *et al.* (2011) reportaron que en un muestreo de 38 leches crudas, 73,6% presentaron contaminación por AFM₁, con un promedio de 60 ng/L utilizando un límite de 50 ng/L. En Siria, Ghanem y Orfi (2009) trabajando con una muestra de 74 leches crudas reportaron que un 59% de ellas excedieron los 50 ng/L. En Slovenia Godic y Vengus (2008) encontraron que de 120 muestras analizadas, 52,5% fueron positivas, con valores promedio de

AFM₁ alrededor de 0,044 µg/L, y que los valores más altos se encontraron en muestras procedentes de zonas urbanas, contrario a lo encontrado en zonas rurales. En Irán Rahimi *et al.* (2010) con un muestreo de 311 muestras de leche cruda, encontraron que un 36% se situó por encima de los 50 ng/L normativos.

En las ciudades de Karnataka y Tamil Nadu (India) Siddappa *et al.* (2012) mostraron que la AFM₁ estuvo presente en el 61,6% de las 52 muestras de leche cruda analizadas, con un intervalo de 0,1 - 3,8 µg/L, excediendo los límites reglamentarios del país un 17,3% de estas muestras.

Estudios en otros países, como Francia (Boudra, 2007), España (Rodríguez *et al.*, 2003) y Corea (Lee *et al.*, 2009), han reportado valores de AFM₁ en leche cruda que no exceden los valores de 50 ng/L.

En México, en un estudio realizado por Reyes (2009) en hatos lecheros del estado de Jalisco y sobre 40 muestras analizadas, no se encontró ninguna muestra fuera de los valores aceptados por la NOM, mientras que en otro estudio realizado en el altiplano mexicano, Pérez (2008) reportó un 59% de las muestras con un contenido de AFM₁ por encima de 50 ng/L. En nuestro estudio realizado sobre 51 muestras procedentes del noreste de México, los resultados fueron equivalentes a los reportados en otras regiones del país, ya que si tomamos los límites especificados por la NOM, tenemos sólo un 4% de muestras por encima de ésta, mientras que si los límites que tomamos como referencia son los de la normatividad europea, como es el caso de Pérez (2008), las muestras positivas serían del 32%.

6.2 Presencia de AFM₁ en fórmula infantil

Para el análisis de la presencia de AFM₁, se obtuvieron 55 muestras de fórmulas infantiles procedentes de farmacias y cadenas de autoservicio en Monterrey, Nuevo León, de las cuales 49 fueron fórmulas infantiles de inicio y 6 fórmulas infantiles de continuidad.

La Norma Oficial Mexicana más reciente (NOM-131-SSA1-2012) que

trata de fórmulas infantiles, alimento de continuidad y alimentos para infantes con necesidades especiales de nutrición, no establece el límite máximo permitido de AFM₁ en fórmulas infantiles, por lo que se tomó el valor que establece el *Códex Alimentarius* (Comisión del *Codex Alimentarius*, 2001, 2004), que especifica que no deberá ser mayor a 0,025 µg/kg, mismo límite que adopta la normativa en la Unión Europea.

En la Tabla 6.3 se muestra que de las fórmulas infantiles analizadas, el 20% de éstas contuvieron AFM₁ con un nivel promedio global de todas las muestras de 0,04 µg/L, niveles de AFM₁ que se sitúan por encima de los aceptados por el *Códex Alimentarius*. Sin embargo, y si analizamos por separado las fórmulas infantiles de inicio y las infantiles de continuidad, podemos observar que los valores de AFM₁ encontrados en las fórmulas infantiles de continuidad son mucho más elevados que los encontrados para las infantiles de inicio. De hecho la media calculada para las diferentes fórmulas infantiles de inicio estarían dentro del valor reglamentado para este tipo de producto por el *Códex Alimentarius*, mientras que los valores obtenidos para las fórmulas infantiles de continuidad excederían en más de 7 veces los niveles permitidos en esta reglamentación.

Tabla 6.3 Presencia de AFM₁ en muestras de fórmula infantil.

Muestra	n	Muestras positivas	AFM ₁ (µg/L)	
			Intervalo	Media ± Desv. Std.
Fórmula infantil total	55	11 (20%) ^a	0,00 – 0,45	0,04 ± 0,1
Fórmula infantil de inicio	49	7 (14%)	0,00 – 0,42	0,02 ± 0,07
Fórmula infantil de continuidad	6	4 (67%)	0,00 – 0,45	0,18 ± 0,18

^a Valor en paréntesis indica el % de muestras por encima de valores aceptables según el *Códex Alimentarius* (0,025 µg/L) con respecto al total.

Las Tablas 6.4 y 6.5 muestran los resultados obtenidos en el análisis

ANOVA aplicado a las muestras de fórmulas infantiles de inicio y de continuidad.

Tabla 6.4 Resumen de resultados de muestras de fórmulas infantiles.

Grupos	<i>n</i>	Suma	Media	Varianza
Fórmula infantil de inicio	49	1,07	0,1783	0,0342
Fórmula infantil de continuidad	6	0,94	0,0191	0,0045

El análisis estadístico de varianzas (ANOVA) nos indicó la existencia de diferencias significativas ($P = 0,00007$) entre las muestras de fórmulas infantiles de inicio y de continuidad. Esto se concluyó comparando los valores F arrojados por el análisis de varianza y rechazando la hipótesis nula (H_0).

Tabla 6.5 Análisis de varianza ($H_0 \mu = \mu$; $H_1 \mu \neq \mu$).

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,1353	1	0,1353	18,434	0,00007	4,0230
Dentro de los grupos	0,3892	53	0,0073			
Total	0,5246	54				

El preparado para lactantes es un producto a base de leche de vaca o de otras especies y/u otros ingredientes que han demostrado que son idóneos para la alimentación infantil. La seguridad nutricional y la adecuación de la fórmula infantil debe ser científicamente demostradas para apoyar el crecimiento y desarrollo normal de los niños. A nivel industrial, se procede a realizar una serie de modificaciones, tanto en su composición de nutrientes (reemplazo de caseína por proteínas de suero, agregado de determinados carbohidratos, reemplazo

parcial de la grasa butírica por aceites vegetales, suplementada con vitaminas y minerales), como en su estado físico (cambio de líquido a polvo) (Koletzko *et al.* 2005).

En diversos países se han realizados estudios de la presencia de AFM₁ en productos lácteos y alimentos infantiles, trabajos que se recogen en la Tabla 6.6.

Tabla 6.6 Presencia de AFM₁ en fórmula infantil y leche materna en diversos países.

País	Total de muestras	Nivel de referencia (µg/L)	% de muestras positivas	% por encima de nivel aceptable	Referencia
India	35*	0,05	97	100	Rastogi <i>et al.</i> (2004)
Irán	120*	0,025	96,6	0	Reza-Oveisi <i>et al.</i> (2007)
Brasil	7*	0,025	0	0	Iha <i>et al.</i> (2013)
Egipto	443**	0,025	56	-	Polychronaki <i>et al.</i> (2007)
Irán	160**	0,025	98,12	0,62	Sadeghi <i>et al.</i> (2009)
Turquía	75**	0,025	100	100	Gürbay <i>et al.</i> (2007)
Irán	136**	0,025	0,73	0	Afshar <i>et al.</i> (2013)
Nigeria	256**	0,025	82	100	Adejumo <i>et al.</i> (2013)
Grecia	30*	0,025	46,5	0	Tsakiris <i>et al.</i> (2013)
India	72*	0,05	100	100	Kanungo y Bhand (2013)
Brasil	100**	0,025	2	0	Iha <i>et al.</i> (2014)

*Estudio realizado en fórmula infantil **Estudio realizado en leche materna

Un estudio realizado en Teherán (Irán) por Reza-Oveisi *et al.* (2007), se analizaron 120 muestras de fórmula infantil, de las cuales 116 (96,6%) fueron positivas a la presencia de AFM₁, con una media de 7,3 ng/kg (\pm 3,9), pero ninguna muestra excedió el límite establecido por el *Códex Alimentarius* (25 ng/kg).

En India, Rastogi *et al.* (2004) analizaron 35 muestras lácteas, de las cuales 17 fueron alimento a base de leche para lactantes y 18 fueron fórmula infantil, obteniendo un 100 y 94% de niveles positivos de AFM₁ por encima del límite establecido por el *Códex Alimentarius* para las muestras de alimento a base de leche para lactante y fórmula infantil, respectivamente.

Un estudio realizado en Grecia por Tsakiris *et al.* (2013), mostró que en 30 muestras de fórmula infantil analizadas, 46,5% tuvieron presencia de AFM₁, pero ninguna de ellas por encima de niveles aceptables.

En nuestro trabajo, 55 muestras analizadas correspondieron a fórmulas infantiles de inicio y de continuidad, donde 11 de ellas (20%) mostraron la presencia de AFM₁, con intervalo que fue desde 0,04 hasta 0,45 μ g/L, y todas ellas por encima del valor máximo permitido por el *Códex Alimentarius* (0,025 μ g/L).

En Brasil, Iha *et al.* (2013), analizaron la incidencia y prevalencia de AFM₁ en preparados para lactantes, sin encontrar presencia de la misma. El mismo equipo de trabajo (Iha *et al.*, 2014) analizaron la presencia de AFM₁ en 100 muestras de leche materna, encontrando que en solo 2 muestras los niveles de AFM₁ fueron superiores a 0,3 ng/L, por lo que concluyeron que los niños brasileños amamantados tenían una exposición insignificante a la AFM₁.

La leche materna es la mejor fuente de nutrición para los bebés, ya que proporciona una serie de beneficios para el crecimiento, la inmunidad y el desarrollo (OMS, 2003). La observación de la presencia de una amplia gama de contaminantes en la leche materna (Solomon y Weiss, 2002; Turconi *et al.*, 2004), plantea importantes problemas de salud (Landrigan *et al.*, 2002; Pronczuk

et al., 2004), aunque las consecuencias de dichas exposiciones sobre el desarrollo del bebé son poco conocidas. El seguimiento de la exposición infantil temprana y materna, y la identificación de patrones de exposición, es importante para un número de contaminantes altamente tóxicos que son potencialmente transferidos a la leche materna, incluyendo las aflatoxinas.

En Nigeria, Adejumo *et al.* (2013) detectaron AFM₁ en el 82% de las 256 muestras de leche materna analizadas. Estos autores correlacionaron la presencia de AFM₁ en diferentes distritos senatoriales de Ogun con el nivel socioeconómico de la población, encontrando una incidencia del 100% en Ogun central, seguido de Ogun occidental con 82,35% y Ogun oriental con 66,7%.

Otro estudio realizado por Polychronaki *et al.* (2007) en leches de madres egipcias, reportó la presencia de AFM₁ en 248 de las 443 muestras analizadas (56% positivas) con mayores tasas de detección durante los meses de verano en comparación a los meses de invierno; en junio la presencia de AFM₁ fue del 96% (25/26,) y la menor presencia se produjo en febrero con un 16% de presencia (8/49).

En Teherán (Irán), Sadeghi *et al.* (2009) encontraron que de 160 muestras de leche materna analizadas, la AFM₁ se detectó en 157 muestras (98%) con una concentración media de $8,2 \pm 5,1$ ng/kg (intervalo 0,3 - 26,7 ng/kg), de las que sólo una muestra excedió el límite de tolerancia máximo aceptado por la Unión Europea y EE.UU (25 ng/kg), aunque si se contempla la concentración máxima recomendada por Australia y Suiza (10 ng/kg), el número de muestras que excedieron este límite fue de 55.

En México no hay registro de estudios previos de la presencia de AFM₁ en fórmulas infantiles y tampoco hay evidencia de análisis de esta aflatoxina en leche materna.

6.3 Presencia de AFM₁ en leche y producto lácteo

Para el análisis de la presencia de AFM₁ en leche y producto lácteo, se obtuvieron 56 muestras (39 de leche y 17 de producto lácteo) de las cuales 15

fueron productos deshidratados y 41 productos esterilizados UHT, obtenidos en cadenas de autoservicio en Monterrey, Nuevo León. Los resultados del contenido de AFM₁ en las leches y producto líquido de base láctea, se muestran en la Tabla 6.7.

Tabla 6.7 Presencia de AFM₁ en leche y producto lácteo, según tipo de grasa contenida.

Muestra	<i>n</i>	Muestras positivas	AFM ₁ (µg/L)	
			Intervalo	Media ± Desv. Std.
Leche	39	31 (23)*	0,00 – 1,17	0,26 ± 0,28
Producto lácteo	17	12 (18)	0,00 – 1,29	0,24 ± 0,37
Total	56	43 (21,4)	0,00 – 1,29	0,26 ± 0,30

*Valor en paréntesis indica el % de muestras sobre valores aceptables con respecto al número de muestras, según la NOM (0,50 µg/L).

Al analizar los resultados, observamos que las muestras de leche y producto lácteo presentaron un valor medio de AFM₁ dentro del nivel permitido por la NOM, si bien hubo un número de muestras, dependiendo del tipo de leche que excedieron el nivel permitido por esta norma. En concreto de 56 muestras analizadas, el 77% mostraron presencia de AFM₁, con un 21% de ellas por encima de lo establecido por la NOM. Los productos deshidratados (leche y producto lácteo) presentaron menores concentraciones de AFM₁ que sus homólogos líquidos.

Las Tablas 6.8 y 6.9 muestran los resultados obtenidos en el análisis ANOVA aplicados a las muestras de leche y productos lácteos.

El análisis estadístico de varianza (ANOVA) nos indicó que no existieron diferencias estadísticamente significativas ($P = 0,5069$) entre las muestras de leche y producto lácteo. Esto se concluyó comparando los valores F arrojados por el análisis de varianza y aceptando la hipótesis nula (H_0).

Tabla 6.8 Resumen de resultados de muestras de leche y productos lácteos.

Grupos	<i>n</i>	Suma	Media	Varianza
Leche	39	8,68	0,26	0,0829
Producto lácteo	17	4,15	0,2441	0,1356

Tabla 6.9 Análisis de varianza ($H_0 \mu = \mu$; $H_1 \mu \neq \mu$).

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,0459	1	0,0459	0,4477	0,5069	4,0670
Dentro de los grupos	4,4090	43	0,1025			
Total	4,4549	44				

Tabla 6.10 Presencia de Aflatoxina M₁ en leche y producto lácteo, según el tratamiento tecnológico aplicado.

Muestra	<i>n</i>	Muestras positivas	AFM₁ (µg/L)	
			Intervalo	Media ± Desv. Std.
UHT	41	33 (26,8%)	0,00 – 1,29	0,30 ± 0,33
Deshidratada	15	10 (6,70%)	0,00 – 0,74	0,13 ± 0,19
Pasteurizada	1	0	0	0
Total	56	43 (21,4%)	0,00 – 1,29	0,26 ± 0,30

^a Valor en paréntesis indica el % de muestras sobre valores aceptables según la NOM (0,50 µg/L), con respecto al número de muestras.

Si analizamos las muestras desde el punto de vista de tratamiento tecnológico aplicado, los productos tratados con proceso térmico UHT fueron las que presentaron los valores medios más altos de AFM₁ con un 26,8% de las muestras por encima del nivel aceptable por la NOM. Asimismo, este tipo de

muestra presentó los niveles más altos de AFM₁ en muestras individuales (hasta 1,29 µg/L). Por otro lado, las muestras de leche tratadas con un proceso final de deshidratación, presentaron niveles medios más bajos de AFM₁ (0,13 µg/L) en comparación a las leches UHT, con un 6,7% de las muestras fuera de NOM.

Las Tablas 6.11 y 6.12 muestran los resultados obtenidos en el análisis ANOVA aplicado a las muestras con tratamiento térmico UHT y proceso térmico de deshidratación.

Tabla 6.11 Resumen de resultados de muestras con procrso térmico UHT y deshidratadas.

Grupos	<i>n</i>	Suma	Media	Varianza
UHT	41	12,4	0,3024	0,1071
Deshidratada	15	1,99	0,1326	0,0362

El análisis estadístico de varianzas (ANOVA) nos indicó que no existieron diferencias significativas ($P = 0,0644$) entre las muestras con tratamiento térmico UHT y deshidratadas. Esto se concluyó comparando los valores F arrojados por el análisis de varianza y aceptando la hipótesis nula (H_0). Aunque las muestras deshidratadas presentaron medias inferiores a las mostradas por las UHT, posiblemente la fuerte variación entre muestras, evidente por las elevadas desviaciones calculadas y el número de muestras más reducido, en el caso de las muestras deshidratadas, explicaría que las diferencias no fuesen significativas.

Tabla 6.12 Análisis de varianza ($H_0 \mu = \mu$; $H_1 \mu \neq \mu$).

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Proba-bilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,3165	1	0,3165	3,56	0,0644	4,019
Dentro de los grupos	4,7952	54	0,0888			
Total	5,1117	55				

En Brasil, Iha *et al.* (2013) detectaron AFM₁ en el 83% de las muestras de leche, con niveles que oscilaron desde 8 hasta 437 ng/kg para la leche líquida, y de 20 hasta 760 ng/kg para la leche en polvo.

En un estudio realizado en China por Zheng *et al.* (2013) se analizaron 153 muestras de leche UHT y 26 muestras de leche pasteurizada, de las cuales la AFM₁ estuvo presente en 54,9 y 96,2% de las muestras UHT y pasteurizada respectivamente, aunque en todas ellas los niveles de AFM₁ se situaron por debajo del límite legal de ese país (0,5 µg/L).

En Pakistán, Sadia *et al.* (2012) analizaron 232 muestras de leche, de las cuales 175 fueron productos de venta local (78% de muestras positivas a la AFM₁ con un 28,6% fuera de nivel aceptable de 0,05 µg/L), 40 muestras de leche doméstica (62% de muestras positivas con 45% fuera de límite) y 17 muestras procedentes de lecherías (88% positivas con 41% fuera de norma).

La Tabla 5.12 presenta los niveles de AFM₁ encontrados en estudios realizados en diversos países, mostrando los niveles fuera de la normativa correspondiente a cada país. En nuestro estudio reportamos que de 56 muestras analizadas, el 77% mostraron presencia de AFM₁, con un 21,4% de ellas por encima de lo establecido por la NOM, que en comparación con otros países donde se han realizado estudios similares, es inferior a los resultados obtenidos por ejemplo en Turquía por Unusan (2006) con un 47% de las muestras por encima del valor aceptable, en Irán por Mohammad *et al.* (2007) con un 78%, Pei *et al.* (2009) en China con el 72%, Ghanem y Orfi (2009) en Siria con 70%, Elzupir (2010) en Sudan con 83,33%, Mwanza y Dutton (2014) en Sudáfrica con 85,6%, Kos *et al.* (2014) con 86%, en Kuwait por Srivastava *et al.* (2001) con 28%, Tekinsen y Eken (2008) en Turquía con 31% y Sadia (2012) en Pakistán con 32% de las muestras por encima del nivel aceptable. Sin embargo, nuestros resultados se encuentran por encima de otros reportes como el de Martins y Martins (2000) en Portugal con 2,85% de las muestras por encima del nivel aceptable, Bilandzic *et al.* (2014) en Croacia con 9,64%, Zinedine *et al.* (2007) en Marruecos con 7,4%, Almeida *et al.* (2013) en Brasil con 13,95% y de aquellos que no presentan contaminación de AFM₁ como los trabajos reportados por Galvano *et al.* (2001) en Italia, Boudra *et al.* (2007) en Francia, Cano-

Sancho *et al.* (2010) en España, Juan *et al.* (2014) en Italia, Nakajima *et al.* (2004) en Japón, Zheng *et al.* (2013) en China, Atasever *et al.* (2014), Díaz y Espitia (2006) e Iha *et al.* (2014) en Brasil.

VII. PRESENCIA DE AFB₁ EN PRODUCTO LÁCTEO

7. PRESENCIA DE AFB₁ EN PRODUCTO LÁCTEO

Las especies de *Aspergillus* productores de AFB₁ se encuentran en cualquier parte del mundo, pudiendo crecer en una gran variedad de condiciones ambientales y sobre una gran cantidad de alimentos, principalmente cereales, especias y oleaginosas. Es por eso que muchos productos pueden ser susceptibles de contaminación. La ausencia de *Aspergillus* en el alimento no necesariamente implica que el alimento no tenga aflatoxinas, debido a que la toxina puede persistir aún después que el moho haya desaparecido, e incluso después de la cocción del alimento. Los aceites procedentes de cereales u oleaginosas se emplean en la sustitución total o parcial de grasa de la leche y dado que se ha demostrado la presencia de AFB₁ en estos productos, hemos creído conveniente realizar la valoración de su presencia en producto lácteo.

7.1 Validación del método

Para evaluar la presencia de aflatoxina B₁ (AFB₁) en productos lácteos, fue necesario validar la técnica establecida por la NOM-188-SSA1-2002, *Productos y Servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones sanitarias*, ya que se adaptó a la matriz “producto lácteo” incluyendo las fórmulas infantiles.

7.1.1 Definiciones relacionadas con la validación

- *Validación* es la confirmación mediante examen y provisión de evidencia objetiva de que se han satisfecho requisitos particulares para un uso pretendido y específico.
- *Protocolo* es un plan escrito de cómo va a ser realizada la validación incluyendo parámetros de prueba, procedimientos, instrumentos y criterios de aceptación.

- *Plan de trabajo* es un plan escrito de cuándo y por quién va a ser realizada cada una de las actividades definidas en el protocolo de evaluación de un método analítico.
- *Linealidad* es la capacidad del método analítico para obtener resultados de la prueba que sean directamente proporcionales a la concentración del analito de un rango definido.
- *Precisión* es la medición del grado de repetibilidad de un método analítico bajo condiciones normales de operación y es expresada como porcentaje de desviación estándar (%DER) o porcentaje de coeficiente de variación (%CV) para un número de muestras estadísticamente significativo y refleja el error aleatorio.
- *Repetibilidad* refleja la proximidad entre los resultados del método cuando se desarrolla bajo las mismas condiciones estipuladas usando la misma muestra, analizada por el mismo analista, en el mismo laboratorio, con los mismos equipos y reactivos y durante la misma sesión de trabajo en un período corto.
- *Reproducibilidad* es la proximidad entre los resultados obtenidos de un método bajo condiciones distintas de análisis en días diferentes.
- *Exactitud* indica la capacidad del método analítico para obtener resultados lo más próximo posible al valor verdadero y refleja el error sistemático.
- *Límite de detección (LD)* es la mínima concentración del analito que puede ser detectada en una muestra y que es sometida al procedimiento completo de análisis incluyendo la extracción química o pre-tratamiento de la muestra. Puede ser calculado a partir de la desviación estándar de la respuesta al origen de la ordenada y la pendiente de la curva de calibración.
- *Límite de cuantificación (LC)* es la mínima concentración del analito que puede ser determinada o cuantificada en la matriz y las condiciones descritas en LD, con aceptable precisión y exactitud bajo condiciones operacionales del método.
- *Recobro (%R)* es el porcentaje del elemento o compuesto de interés (analito)

obtenido en la muestra fortificada (MF) calculando en de la cantidad adicionada (CA) con la siguiente fórmula:

$$R = \frac{MF \times 100}{CA}$$

- *Coefficiente de correlación (r)* es la relación nominal teórica entre una variable y otra que hace mínima a la suma de los cuadrados de las desviaciones de la primera con respecto a su proporcionalidad con la segunda. Con proporcionalidad exacta, el coeficiente es 1, si no existe ninguna relación es cero.
- *Pendiente (m)*, conocida también como coeficiente de regresión, indica la sensibilidad de calibración o del método y se expresa en unidades de respuesta sobre unidades de concentración o cantidad de analito. La sensibilidad analítica relaciona la alatoriedad de la respuesta con la alatoriedad debida a la variación de la concentración del analito.
- *Intercepto (b)* es el estimador que se relaciona con la respuesta en presencia de interferencias o errores sistemáticos.
- *Porcentaje de Coeficiente de Variación (%CV)*, también llamado porcentaje de Desviación Estándar Relativa e indica la variación que existe entre los factores de calibración y se calcula como la desviación estándar de los factores de calibración por 100 entre el valor promedio de los mismos factores obtenidos de cada uno de los niveles de concentración.
- *Muestra fortificada* es una muestra blanco que ha sido adicionada de una concentración conocida del analito.

7.1.2 Resultados de la validación

La evaluación realizada en la validación del método analítico para la determinación de AFB₁ en productos lácteos por HPLC por el método descrito en la NOM-188-SSA1-2002 fue satisfactoria, por haber realizado pruebas que demuestran la linealidad, precisión, exactitud, límite de detección y límite de

cuantificación, las cuales cumple para la AFB₁ validada con los criterios de aceptación de la Tabla 7.1.

Tabla 7.1. Criterios de aceptación y resultados obtenidos en la validación de la determinación de AFB₁ en producto lácteo.

Parámetros validados	Criterio de aceptación	Resultados
Linealidad	$r \geq 0,995$	Se obtuvo un coeficiente de correlación de 0,996, por lo tanto la AFB ₁ validada cumple con $r \geq 0,995$
Precisión (Repetibilidad)	$\%CV \leq 16$	Se obtuvo lectura de repetibilidad de 15,44, por lo tanto la AFB ₁ validada cumple con $\%CV \leq 16$
Precisión (Reproducibilidad)	$\%CV \leq 16$	Se obtuvo lectura de 14,28, por lo tanto la AFB ₁ validada cumple con $\%CV \leq 16$
Exactitud	$\% R = 80$ a 120%	Se obtuvo un $\%R$ de límite inferior 83%, límite superior 104%, por lo tanto la AFB ₁ validada cumple con $\%$ de recobro.
Límite de detección	0,001 a 0,010 ppb	Se obtuvo un límite de detección de 0,003 $\mu\text{g/L}$. La AFB ₁ validada cumple con el límite de detección.
Límite de cuantificación	0,001 a 0,010 ppb	Se obtuvo un límite de cuantificación de 0,01 $\mu\text{g/L}$. La AFB ₁ validada cumple con el límite de cuantificación
Coeficiente de correlación (r)		$r = 0,996$
Intersección al eje (b)		$b = 73,5$
Pendiente (m)		$m = 79,6$

7.2 Presencia de AFB₁ en productos lácteos

7.2 Presencia de AFB₁ en producto lácteo

Se analizó la presencia de AFB₁ en 86 productos lácteos, de los cuales 54 fueron fórmulas infantiles y 32 productos lácteos (15 productos deshidratados y 17 productos fluidos). Para ello se trabajó de acuerdo a los esquemas de trabajo que se especifica en las secciones 4.2.3.3 y 4.2.3.4 sobre preparación de la muestra y extracción y cuantificación de la AFB₁.

El resultado para todas las muestras analizadas fue negativo a la presencia de AFB₁. Este resultado generalizado demuestra, que si bien las fórmulas infantiles y el producto lácteo son añadidos de aceites vegetales en los que se ha descrito la presencia de AFB₁, los que se están utilizando actualmente para la formulación de los productos descritos anteriormente están libres de este tipo de aflatoxina.

VIII. RESULTADOS y DISCUSIÓN INGESTA DIARIA DE AFM₁ POR GRUPOS DE EDAD E ÍNDICE DE RIESGO CARCINOGENICO

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. INGESTA DIARIA DE AFM₁ POR GRUPOS DE EDAD E ÍNDICE DE RIESGO CARCINOGENICO

Los principales factores que tienen influencia sobre la toxicidad de las micotoxinas en los humanos son: a) la biodisponibilidad y toxicidad de la micotoxina; b) los sinergismos entre las diferentes micotoxinas presentes en el alimento; c) la cantidad de micotoxina ingerida diariamente en función de la concentración de micotoxina y de la cantidad de alimento ingerido; d) la continuidad o intermitencia de ingestión del alimento contaminado; e) el peso del individuo y el estado fisiológico y de salud de éste; y f) la edad del individuo. Así pues, los niños y los jóvenes son los grupos más susceptibles a la toxicidad de las micotoxinas debido a una mayor variación del metabolismo basal, y se ha descrito no tener suficientes mecanismos bioquímicos para la detoxificación (Haighton *et al.*, 2012; Hassan y Kassaiy, 2014).

Tabla 8.1 Resumen de los resultados obtenidos de todas las leches y productos lácteos analizados.

Muestra	n	Positivas	AFM ₁ µg/L	
			Intervalo	Media ±Desv Estándar
Leche Bronca	51	16 (32%) ^a	0,00 – 0,88	0,07 ± 0,154
Fórmula infantil	55	11 (20) ^b	0,00 – 0,45	0,04 ± 0,01
Fórmula infantil de inicio	49	49 (14) ^b	0,00 – 0,42	0,02 ± 0,067
Fórmula infantil de continuidad	6	4 (67) ^b	0,00 – 0,45	0,18 ± 0,18
Pasteurizada	20	20 (19) ^a	0,00 – 0,56	0,37 ± 0,13
UHT	105	96 (42) ^a	0,00 – 1,29	0,43 ± 0,30
Leche	75	71 (35)	0,00 – 1,17	0,41 ± 0,26
Producto lácteo	30	25 (47)	0,00 – 1,29	0,48 ± 0,39

Tabla 8.1 (Continuación).

Deshidratada	15	10 (6,70) ^a	0,00 – 0,74	0,13 ± 0,19
Leche	12	8 (8,33)	0,00 – 0,74	0,15 ± 0,21
Producto lácteo	3	2 (0)	0,00 – 0,07	0,07 ± 0,09

Valor en paréntesis (^a) indica el % de muestras sobre valores aceptables según la NOM (0,50 µg/L), con respecto al número de muestras. (^b) Indica el % de muestras sobre valores aceptables según el *Códex Alimentarius* (0,025 µg/kg).

La Tabla 8.1 resume los resultados obtenidos en las diferentes muestras analizadas a lo largo de los dos muestreos realizados, datos que se utilizarán en la estimación de la ingesta diaria de AFM₁ en los diferentes segmentos de la población. La Tabla 8.2 resume los resultados referentes a ingesta diaria de leche, productos lácteos y fórmulas infantiles por grupos de edad, así como el peso corporal promedio. Los datos aquí presentados, fueron tomados de la Encuesta de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2012.

Tabla 8.2 Valores de ingesta diaria de leche, productos lácteos y fórmulas infantiles, así como peso corporal promedio por grupos de edad.

Grupo	Edad (años)	Consumo promedio (L)	Peso corporal (kg)
Lactante menor	0/12 - 1	0,840	3,55 – 10,8
Lactante mayor	1 - 2	0,650	10,8 – 13,03
Pre-escolar	2 - 4	0,313	13,03 – 17,52
Escolar	5 - 9	0,234	19,76 – 36,2
Adolescente	10 - 19	0,161	43,54 – 67,87
Adulto	20 - 59	0,132	75,74
Adulto mayor	> 60	0,165	67,12

Datos obtenidos de la ENSANUT 2012

8.1 Estimación de la ingesta diaria de AFM₁ por la población pre-escolar

8.1.1 Lactante menor (recién nacido a 6 meses)

La NOM-008-SSA2-1993, clasifica el desarrollo del infante como:

- a) Lactante menor de 0 a 12 meses
- b) Lactante mayor de 1 a 2 años
- c) Pre-escolar de 2 a 4 años

Se analizó la ingesta diaria de AFM₁ en la población de 0 a 6 meses de edad; en esta etapa de vida del bebé la dieta es a base de leche materna o sucedáneos de ésta como las fórmulas infantiles de inicio. Es a partir de los 6 meses de edad que ocurre la ablactación y el consumo de leche se reduce paulatinamente y se introducen nuevos alimentos.

La encuesta ENSANUT 2012 (<http://ensanut.insp.mx/>) correspondiente al segmento del estado de Nuevo León, donde se analizaron a 80824 infantes, determinó que el peso corporal promedio (PCP) de este segmento de la población al nacer fue de 3,55 kg, siendo a los 6 meses de 7,3 kg.

Se aplicó la fórmula de ingesta diaria de AFM₁ por kg de peso corporal, descrita en el apartado 4.2.4 de este mismo trabajo (material y métodos):

Ingesta de AFM₁ =

$$\frac{\text{Ingesta promedio de leche (L)} \times \text{AFM1} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{L}}\right) \times \text{Conversión} \left(\frac{\text{ng}}{\mu\text{g}}\right)}{\text{Peso corporal (kg)}}$$

Aplicando el cálculo anterior, la ingesta promedio diaria de AFM₁ a través de fórmula infantil de inicio se situaría en un intervalo entre 4,40 ng/kg PC por día para recién nacidos y 2,54 ng/kg PCP/día para lactantes de 6 meses de edad.

El valor correspondiente a la cantidad promedio de AFM₁ para fórmula infantil de inicio, (descrita en la Tabla 8.1) fue 0,02 µg/L y el peso corporal para infantes de 0 y 6 meses de edad (descrita en la Tabla 8.2) fue de entre 3,55 y 7,8 kg de peso corporal respectivamente.

8.1.2 Lactante menor (hasta 12 meses)

Se analizó la ingesta diaria de AFM₁ por peso corporal, tomando en cuenta que en esta etapa de la vida del lactante se lleva a cabo la ablactación, y la dieta del lactante en esta etapa de la vida se realiza a partir de la fórmula infantil de inicio combinada con productos lácteos que contienen cereales y en ocasiones contienen miel. En estos productos el contenido promedio de AFM₁ fue de 0,02 µ/L.

Según datos de la ENASANUT 2012, el promedio de peso en 89524 infantes de 12 meses fue de 10,8 kg y el promedio de consumo de fórmula infantil fue de 0,84 L diarios, que al aplicar la fórmula de ingesta promedio diaria de AFM₁ por peso corporal a este grupo de edad se obtuvo como resultado una ingesta promedio de 1,55 ng/kg de PCP por día.

8.1.3 Lactante mayor (hasta 2 años)

En esta etapa el infante ingiere fórmulas infantiles de continuidad, que presentaron, según nuestro estudio, una concentración promedio de AFM₁ de 0,18 µ/L. El consumo de leche reportado por la ENSANUT 2012 fue de 0,31 L diarios y el PCP de 82101 infantes encuestados fue de 13,03 kg. Al aplicar la fórmula de ingesta diaria de AFM₁, se obtuvo una ingesta de 4,33 ng/kg de PCP diarios.

8.1.4 Pre-escolar (hasta 4 años)

En esta etapa el pre-escolar ingiere fórmulas infantiles de continuidad y

también leche y productos lácteos (yogur, queso, batidos y postres a base de leche). En este grupo, así como en el resto de grupos que se exponen a continuación, se ha calculado la exposición a la AFM₁ en referencia a la ingestión de leche, pero no se ha tenido en consideración la exposición a esta aflatoxina a través de otros productos lácteos. En este caso para realizar el cálculo de exposición se promedió la concentración de AFM₁ de fórmulas infantiles de continuidad con la concentración de AFM₁ de leches pasteurizadas, UHT y deshidratadas, así como productos lácteos, obteniéndose una concentración promedio de AFM₁ de 390 ng/L. La ingesta de leche en un pre-escolar según la ENSANUT 2012 realizada en 184580 infantes fue de 0,31 L diarios y el PCP fue de 17,52 kg. Al aplicar la fórmula de ingesta diaria de AFM₁, se obtuvo una ingesta de 6,90 ng/kg PC por día.

En la Tabla 8.3 se muestra la ingesta de AFM₁ por peso corporal promedio en lactantes menores, lactantes mayores y pre-escolares, de acuerdo al tipo de fórmula infantil (de inicio, de continuidad, leche y productos lácteos) que se consume en cada etapa de desarrollo.

La alimentación infantil debería ser inocua, sin embargo se registró contaminación con AFM₁ en los diferentes tipos de fórmulas infantiles. Según los resultados incluidos en la Tabla 8.2, la población de lactantes menores en su etapa de recién nacidos, es en la que se estima niveles más altos de ingesta de AFM₁, debido al PCP menor con respecto a un lactante de 6 meses de edad. Cuando este infante adquiere peso y entra en su etapa de ablactación, la ingesta de fórmulas infantiles de inicio se va reduciendo paulatinamente y se ingiere a su vez otras fórmulas infantiles adicionadas con diversos cereales y en ocasiones con miel. Esta ganancia de peso hasta los 12 meses de edad se ve reflejada favorablemente en la disminución de la ingesta de AFM₁ por PCP, hasta 1,55 ng/kg PCP/día.

En la alimentación de la población de lactante mayor, se introducen las fórmulas infantiles de continuidad con un grado mayor de contaminación por AFM₁, por lo que aumenta el grado de exposición en este grupo de infantes, donde se estima una exposición de hasta un 4,33 ng/kg PCP/día en infantes hasta de 2 años de edad.

Con respecto a la población pre-escolar, la ingesta de fórmulas de continuidad se presenta combinada con leche y producto lácteo (bebida de base láctea con grasa vegetal), los cuales presentan mayor grado de contaminación por AFM₁ que las fórmulas infantiles. Es así que en los pre-escolares de hasta 4 años se estiman niveles de ingesta de AFM₁ diarios de 6,90 ng/kg PC/día, siendo este el mayor grado de exposición en este grupo de edad.

Tabla 8.3 Ingesta de AFM₁ por PCP y día e índice de riesgo carcinogénico (IRC) en población pre-escolar.

Edad (años)	Peso promedio (kg)	Tipo de ingesta	Consumo promedio		*IRC (2 ng/kg PC/día)
			Intervalo de ingesta de fórmula infantil (L/día)	Intervalo de ingesta de AFM ₁ (ng/kg/día)	
0 – 6 meses	3,55 – 7,3	Fórmula infantil de inicio	0,78 – 0,93	4,40 – 2,54	Riesgo
6/12 – 1	7,3 – 10,8	Fórmula infantil de inicio + Fórmula con cereal	0,93 – 0,84	2,54 – 1,55	Riesgo
1 – 2	10,8 – 13,03	Fórmula de continuidad	0,84 – 0,31	1,55 – 4,33	Riesgo
2 – 4	13,03 – 17,5	Fórmula de continuidad + leche/producto lácteo	0,31	4,33 – 6,90	Riesgo

*Índice de riesgo carcinogénico según propuesta de Kuiper-Goodman, (1994) y Shundo *et al.* (2009).

En Tailandia, Ruangwises *et al.* (2011) reportaron datos de consumo de fórmula infantil para la población de 0 a 3 años de 0,429 kg/día, con un peso corporal promedio de 10,1 kg y una presencia promedio de AFM₁ en fórmula infantil de 0,004 µg/kg, con lo que obtuvieron valores de exposición de 0,169 ng/kg de peso corporal y día. A pesar que Tailandia no tiene una regulación oficial de los niveles de AFM₁ en fórmulas infantiles, éstas presentan valores

bajos de AFM₁, por lo que el cálculo de ingesta de AFM₁ por peso corporal es muy inferior al presentado en nuestro estudio.

En Grecia, Tsakiris *et al.* (2013) realizaron una estimación de la ingesta diaria de AFM₁ en niños de 1 a 12 años, encontrando el nivel más alto de ingesta diaria de AFM₁ por peso corporal en niños de entre 1 y 3 años de edad de 0,07 ng/kg de PC, lo que se esperaba teniendo en cuenta la relación de la cantidad de leche que se consume en relación con el menor peso corporal.

Para los bebés y los niños, la leche y productos lácteos son alimentos esenciales, siendo los consumos elevados y muy frecuentes diariamente. Los bebés, los niños y los jóvenes son más susceptibles a la toxicidad de las aflatoxinas debido a una mayor variación del metabolismo basal, pudiendo no tener suficientes mecanismos bioquímicos para la detoxificación. En los niños el cerebro continúa su desarrollo durante muchos años después del nacimiento y esto puede causar una mayor susceptibilidad a las micotoxinas que afectan al sistema nervioso central (Atasever *et al.*, 2014).

8.2 Estimación de la ingesta diaria de AFM₁ por la población escolar

Se analizó la ingesta diaria de AFM₁ en población escolar de entre 5 y 11 años de edad.

Tomando los datos de la ENSANUT 2012 correspondiente al segmento del estado de Nuevo León, donde se analizaron a 652953 niños en edad escolar, se determinó que el peso corporal promedio de este segmento de población fue de 19,76 kg en infantes de 5 años, hasta 45,54 kg para infantes de 11 años de edad. Asimismo se obtuvieron datos del promedio de ingesta diaria de leche para este segmento de población, que correspondió a 234,4 mL diarios. En este caso para realizar el cálculo de exposición se promedió la concentración de AFM₁ de leches pasteurizadas, UHT y deshidratadas, así como productos lácteos. Aplicando la fórmula de ingesta diaria de AFM₁ por PCP diario, obtuvimos un intervalo de 4,62 ng/kg PCP/día para niños de 5 años y hasta 2,0 ng/kg PCP/día

para 11 años de edad.

Resultados obtenidos en Francia por Leblanc *et al.* (2005) para este grupo de edades comprendidas entre 3 y 14 años, reportaron una media de 0,22 ng/kg PCP/día. En Brasil Shundo *et al.* (2009) obtuvieron 1,04 ng/kg peso corporal/día en infantes de 5 a 7 años de edad, mientras que en España, Cano-Sancho *et al.* (2010) obtuvieron para escolares de 4 a 9 años de edad valores de 0,21 ng/kg PCP/día. En Tailandia, Ruangwises *et al.* (2011) reportaron resultados para escolares de >3 a 9 años de 0,26 ng/kg PCP/día y en Francia Sirot *et al.* (2013) reportaron valores de 1,56 ng/kg PCP/día. Estos y otros estudios sobre la exposición humana a AFM₁ se recogen en la Tabla 8.4.

Los resultados presentados en nuestro trabajo, a pesar que el promedio de AFM₁ se encuentra dentro de la NOM, son considerablemente altos en relación a los presentados en otros países, debido a que éstos manejan niveles de tolerancia a las AFM₁ diez veces menores (0,05 µg/L) a lo que la NOM acepta (0,5 µg/L). Si nuestra normatividad manejara los mismos valores que la UE, los resultados de estimaciones de exposición a AFM₁ serían similares a los aquí comparados.

Tabla 8.4. Resultados de ingesta diaria de AFM₁ en población escolar.

País	Autor	Edad	Resultado ng/kg de PC/día	*IRC (2 ng/kg PC/día)
Francia	Leblanc <i>et al.</i> 2005	3 – 14	0,22	No riesgo
Brasil	Shundo <i>et al.</i> 2009	5 – 7	1,04	No riesgo
España	Cano-Sancho <i>et al.</i> 2010	4 – 9	0,21	No riesgo
Tailandia	Ruangwises <i>et al.</i> 2011	3 – 9	0,26	No riesgo
Francia	Sirot <i>et al.</i> 2013	3 - 17	1,56	No riesgo

*Índice de riesgo carcinogénico según propuesta de Kuiper-Goodman, (1994) y Shundo *et al.* (2009).

Asimismo nuestro resultado, al reportar niveles por encima a 2 ng/kg

PCP/día, presentó una situación de riesgo carcinogénico según la propuesta de Kuiper-Goodman (1994).

8.3 Ingesta diaria de AFM₁ por la población adolescente

En esta sección se analizó la ingesta diaria de AFM₁ en población adolescente con edades entre 12 y 19 años.

Tomando los datos de la ENSANUT 2012 correspondiente al segmento del estado de Nuevo León, donde se analizaron a 674973 adolescentes, se determinó que el PCP de este segmento de población fue en un intervalo de 51,71 kg en jóvenes de 12 años a 67,87 kg a los 19 años de edad. Se obtuvieron datos del promedio de ingesta diaria de leche para este segmento de población, que correspondió a 161,6 mL de leche diarios. Con estos datos, se aplicó la fórmula de ingesta de AFM₁ por peso corporal y día, obteniéndose un intervalo entre 1,21 ng/kg de PC/día para los jóvenes de 12 años y 0,93 ng/kg de PC/día para los de 19 años de edad.

Los resultados obtenidos en España por Cano-Sancho *et al.* (2010) para este grupo de edad (10 a 19 años de edad), reportaron una exposición de 0,075 ng/kg PCP/día. En Tailandia, Ruangwises *et al.* (2011) reportaron resultados para escolares mayores de 9 a 19 años de 0,12 ng/kg PCP/día y Leblanc *et al.* (2005) en Francia mostraron valores de exposición de 0,01 ng/kg PCP/día.

Tabla 8.5. Resultados de ingesta diaria de AFM₁ en población adolescente.

País	Autor	Edad	Resultado ng/kg de PC/día	*IRC (2 ng/kg PC/día)
Francia	Leblanc <i>et al.</i> (2005)	3 – 17	0,01	No riesgo
España	Cano-Sancho <i>et al.</i> (2010)	10 – 19	0,075	No riesgo
Tailandia	Ruangwises <i>et al.</i> (2011)	9 – 19	0,12	No riesgo

*Índice de riesgo carcinogénico según propuesta de Kuiper-Goodman, (1994) y Shundo *et al.* (2009).

Nuestros resultados obtenidos para adolescentes es considerablemente menor del reportado en el segmento de población escolar (4,62 – 2,0 ng/kg PCP/día para 5 – 11 años), debido a que la población adolescente ingiere menor cantidad de leche y productos lácteos, disminuyendo el riesgo carcinogénico. Sin embargo, al comparar nuestros resultados con el segmento similar en otros países, (Tabla 8.5), nuestro resultado se encuentra muy por encima de la exposición estimada en estos países.

8.4 Estimación de la ingesta diaria de AFM₁ por la población adulta

Se analizó la ingesta diaria de AFM₁ en población adulta de entre 20 y 59 años de edad.

Tomando los datos de la ENSANUT 2012 correspondiente al segmento del estado de Nuevo León, donde se analizaron a 2547294 adultos, se determinó que el PCP de este segmento de población fue de 75,74 kg y el promedio de ingesta diaria de leche para este segmento de población, correspondió a 131,7 mL de leche diarios. La ingesta de AFM₁ por leche y producto lácteo aplicando la fórmula correspondiente para este grupo de edad fue de 0,68 ng/kg de PCP/día.

La Tabla 8.6 muestra resultados de la ingesta diaria por peso corporal de AFM₁ en población adulta (20 a 59 años) en estudios realizados en varios países.

Los resultados que obtuvimos en la ingesta diaria de AFM₁ en población adulta es menor a la reportada en poblaciones menores (pre-escolar, escolar y adolescente), ya que este segmento de la población ingiere menos cantidad de leche y producto lácteo y aumenta el PCP, sin embargo aún se encuentra por encima de los valores reportados en otros países, a excepción de los reportados en Francia y Serbia por Sirot *et al.* (2013) y Skrbic *et al.* (2014) respectivamente. Los valores más bajos reportados en la bibliografía fueron los de África (JECFA, 2001), Irlanda (Coffey *et al.*, 2009) y Turquía (Kabak *et al.*, 2012) con 0,002, 008 y 008 ng/kg PCP/día, respectivamente. El JECFA, comité de expertos en evaluación de los riesgos asociados con las sustancias químicas (www.fao.org),

reportó para América Latina una ingesta diaria de AFM₁ por peso corporal en población adulta de 0,058 ng/kg PCP/día, sin embargo esta estimación es diez veces menor de la que aquí reportamos.

Tabla 8.6. Ingesta diaria de AFM₁ en población adulta (20 – 59 años) reportada en diferentes países.

País	Autor	Año	Resultado ng/kg de PC/día
América Latina	JECFA	2001	0,058
África	JECFA	2001	0,002
Oriente medio	JECFA	2001	0,1
Europa	JECFA	2001	0,11
Lejano oriente	JECFA	2001	0,20
Francia	Leblanc <i>et al.</i>	2005	0,09
Brasil	EMBRAPA	2007	0,08
Marruecos	Zinedine	2007	0,054
Irlanda	Coffey <i>et al.</i>	2009	0,008
Brasil	Shundo <i>et al.</i>	2009	0,08
España	Cano-Sancho <i>et al.</i>	2010	0,075
Tailandia	Ruangwises <i>et al.</i>	2011	0,04
Argentina	Signorini <i>et al.</i>	2012	0,12
Turquía	Kabak <i>et al.</i>	2012	0,008
Portugal	Duarte <i>et al.</i>	2013	0,08
Brasil	Almeida <i>et al.</i>	2013	0,018
Francia	Sirot <i>et al.</i>	2013	0,89
Serbia	Skrbic <i>et al.</i>	2014	0,90

JECFA: Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios y Riesgos Asociados a Sustancias Químicas.

EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria.

8.5 Estimación de la ingesta diaria de AFM₁ por la población adulta mayor

Se analizó la ingesta diaria de AFM₁ en población adulta mayor, correspondiente a población mayor de 60 años de edad.

Tomando los datos de la ENSANUT 2012 correspondiente al segmento del estado de Nuevo León, donde se analizaron a 462885 adultos mayores, se determinó que el peso corporal promedio (PCP) de este segmento de población fue de 67,12 kg y el promedio de ingesta diaria de leche para este segmento de población correspondió a 165,6 mL de leche diarios.

Aplicando los datos descritos para esta población a la fórmula correspondiente a la ingesta de AFM₁ por PCP y día, se obtuvo una estimación de ingesta promedio diaria de 0,96 ng/kg PCP/día debida a este tipo de alimento. Este resultado se encuentra por debajo del índice de riesgo carcinogénico, debido a la baja ingesta de leche y productos lácteos de esta población.

Algunos autores reportan trabajos de exposición a AFM₁ realizados en adultos mayores, como Cano-Sancho *et al.* (2010) en España y Ruangwises *et al.* (2011) en Tailandia, cuyos resultados dan estimaciones para esta aflatoxina de 0,05 y 0,03 ng/kg PCP/día respectivamente. Estos valores se encuentran muy por debajo de los estimados en nuestro trabajo, tal vez debido a que a pesar que el valor de AFM₁ se encuentra dentro de la NOM, este valor está muy por encima de los valores máximos de AFM₁ aprobados en la normativa europea.

El conjunto de resultados correspondientes a la ingesta de AFM₁ y el índice de riesgo cancerígeno en todos los grupos de edad, se muestran en la tabla 8.7.

Según los resultados mostrados en la Tabla 8.7, la población que presenta un índice mayor de riesgo carcinogénico fue la comprendida entre el recién nacido y la población escolar.

Tabla 8.7. Ingesta promedio diaria de AFM₁ por grupos de edad e IRC.

Población	Edad (años)	Ingesta de leche (L)	Peso promedio (kg)	Ingesta de AFM₁/PC/día (ng/kg/día)	IRC (≥ 2 ng/kg/día)
Lactante menor	0 – 6/12	0,78 – 0,93	3,55 – 7,3	4,40 – 2,54	Riesgo
Lactante menor	6/12 – 1	0,93 – 0,84	7,3 – 10,8	2,54 – 1,55	Riesgo
Lactante mayor	1 – 2	0,84 – 0,31	10,8 – 13,03	1,55 – 4,33	Riesgo
Pre-escolar	2 – 4	0,313	13,03 – 17,52	4,33 – 6,90	Riesgo
Escolar	5 – 11	0,234	19,76 – 45,54	4,62 – 2,0	Riesgo
Adolescente	12 – 19	0,161	51,71 – 67,87	1,21 – 0,93	No riesgo
Adulto	20 – 59	0,131	75,74	0,68	No riesgo
Adulto mayor	> 60	0,165	67,12	0,96	No riesgo

*Índice de riesgo carcinogénico según propuesta de Kuiper-Goodman, (1994) y Shundo *et al.* (2009).

Los lactantes menores fueron el grupo de mayor consumo de fórmulas infantiles y en relación al peso corporal promedio presentaron una alta ingesta promedio diaria de AFM₁. A partir de los 6 meses de edad el consumo de fórmulas infantiles disminuye y son complementadas con fórmulas adicionadas con cereales y otros nutrientes. En el grupo de pre-escolares la dieta del infante es complementada con fórmula infantil de continuidad, la cual mostró niveles más altos de AFM₁ y a pesar del aumento de PCP, la ingesta promedio diaria de AFM₁ por PCP es la mayor de todos los grupos de edad y en consecuencia el IRC es el mayor.

En la población escolar la dieta del infante es complementada con leche y producto lácteo y a pesar que el PCP de este grupo de edad se incrementa, el nivel de contaminación en estos productos es mayor que en las fórmulas

infantiles, mostrando niveles de ingesta diaria de AFM₁ superiores al límite del IRC.

A partir de la edad adolescente en adelante, la ingesta de leche y productos lácteos va en disminución y el PCP se incrementa, esto hace que desaparezca el IRC al estar estos resultados por debajo del umbral de riesgo (2 ng/kg de PCP/día).

IX. CONCLUSIONES

En el primer muestreo, donde se analizaron 84 leches y producto lácteo, se obtuvo la presencia positiva de AFM₁ en todas las muestras analizadas por la técnica ELISA, obteniendo un 40% de éstas con niveles por encima de lo que marca la NOM-243-SSA1-2010 (0,5 µg/L). El método de ELISA proporcionó la clara evidencia de la presencia de AFM₁ en la leche líquida (pasteurizada y UHT) que ingiere la población en el área metropolitana de Monterrey, N.L. México, lo cual dio pauta a la investigación con el método oficial HPLC que marca la NOM-243-SSA1-2010 en un amplio espectro de productos, incluyendo leche y producto lácteo que se consume en la región, así como leche bronca (cruda) y fórmulas infantiles.

En el segundo muestreo, se encontró que la leche bronca o cruda no representa un problema en cuanto a la presencia de AFM₁, ya que sólo un 4% de estas leches se encontraron fuera de la NOM. Esto sugiere que la leche bronca que se produce en el país no es la responsable de la contaminación por AFM₁ en leche y producto lácteo, sino que probablemente la gran cantidad de leche descremada en polvo que México importa de otros países es la causante de la presencia de esta aflatoxina en la mayoría de las leches comercializadas en el área de muestreo.

Al analizar las fórmulas infantiles (de inicio y de continuidad) se observó que el 20% de ellas, y en especial las de continuidad, presentaron niveles por encima de lo que marca el *Códex Alimentarius* (0,025 µg/kg), tomándose este valor de referencia, ya que la NOM-131-SSA1-2012 que trata de fórmulas infantiles, no establece límites para la presencia de AFM₁.

De las leches y producto lácteo tratados con proceso térmico, las muestras que reciben proceso de UHT presentan una mayor presencia de AFM₁ con un 38,5% de ellas por encima del límite que establece la NOM, seguida por la leche pasteurizada y la leche deshidratada con un 19 y 6,70% de las muestras analizadas por encima de lo que marca la NOM.

Debido a que la leche en México es adulterada con grasa de diversos orígenes, entre ellos con aceite de maíz y oleaginosas, donde se ha demostrado la presencia de AFB₁, se decidió analizar el contenido de AFB₁ en leche

adulterada con grasa vegetal, denominada por la NOM como producto lácteo. El análisis no arrojó resultados positivos para esta aflatoxina en ninguna de las muestras analizadas.

Según los datos obtenidos de la ingesta promedio diaria de AFM₁ por grupos de edad, se observó que los niños de edades comprendidas entre recién nacidos y edad escolar (0 - 11 años) son el grupo poblacional que presenta los niveles más altos de exposición a la AFM₁, (4,40 - 6,90 ng/kg PCP/día) ya que en este grupo se encuentran los lactantes, cuya dieta hasta los 6 meses es a base de leche materna o por el uso de sucedáneos de la leche materna como las fórmulas infantiles de inicio o continuidad, presentando esta población niveles de ingesta de AFM₁ por encima del límite del índice de riesgo carcinogénico (2 ng/kg/día).

Aunque en la población pre-escolar y escolar se modifica la frecuencia, el tipo y el consumo de leche y productos lácteos, el peso corporal todavía no es suficientemente alto para revertir los valores de ingesta promedio diaria de AFM₁, (4,62 - 2 ng/kg PCP/día) presentando niveles elevados de riesgo carcinogénico. Al disminuir la ingesta de leche y productos lácteos por la población adolescente, adulta y adulta mayor, y al relacionar esta ingesta con el peso corporal, la ingesta promedio diaria de AFM₁ (1,21, 0,68 y 0,96 ng/kg PCP/día respectivamente) se encuentra por debajo del índice de riesgo carcinogénico, no representando riesgo a este respecto.

Este estudio demuestra la contaminación por AFM₁ en niveles elevados en la leche y producto lácteo que consume la población regiomontana y en niveles que exceden los límites que marca la NOM. Esto es particularmente crítico en la población infantil, desde recién nacidos hasta la edad escolar, en donde el consumo de leche y fórmulas infantiles forma parte de su alimentación básica y al mostrarse que exceden los valores establecidos en el *Códex Alimentarius*, se encuentran expuestos al riesgo carcinogénico bien demostrado de la AFM₁, por lo que las autoridades encargadas de legislar y redactar la NOM sobre fórmulas infantiles deberían definir claramente los valores mínimos permisibles, para tener un mayor control y minimizar el riesgo para la salud.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, H.K., Wilkinson, J.R., Zablotowicz, R.M., Accinelli, C., Abel, C.A., Burns, H.A. y Weaber, M.A. (2009). Ecology of *Aspergillus flavus*, regulation of aflatoxin production, and management strategies to reduce aflatoxin contamination of corn. *Toxin Reviews*, 28(2–3), 142–153.
- Afshar, P., Shokrzadeh, M., Kalhori, S., Babae, Z. y Saeedi Saravi, S.S. (2013). Occurrence of Ochratoxin A and Aflatoxin M₁ in human breast milk in Sari, Iran. *Food Control*, 31, 525-529.
- Ahn, J.H., Jeong, Y.S., Lee, T., Kim, Y.P., y Kim, H.S. (2012). Sensitive and multi-plexed analysis of aflatoxins using time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *BioChip Journal*, 6, 34-40.
- Alencar, E., D'Antonino, L., Ferreira, N., Azevedo, W. y da Silva, M. (2012). Efficacy of ozone as a fungicidal and detoxifying agent of aflatoxins in peanuts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 92, 899–905.
- Almeida, L., Oliveira, M., Azevedo, E., Quintão, A., Maia, I. y Bordignon-Luiz, M. (2013). Influence of climate conditions on aflatoxin M₁ contamination in raw milk from Minas Gerais State, Brazil. *Food Control*, 31, 419-424.
- Alvito, P. C., Sizoo, E. A., Almeida, C. M. M., y van Egmond, H. P. (2010). Occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in baby foods in Portugal. *Food Analytical Methods*, 3, 22-30.
- ANVISA (2011). Regulamento técnico sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos,” RDC 7.
- Applebaum, R.S. y Marth, E.H. (1981). Biogenesis of the C₂₀ polyketide, aflatoxin. *A review: Mycopathologia*, 76, 103-104.
- Assem, E., Mohamad, A. y Oula, E. (2011). A survey on the occurrence of aflatoxin M₁ in raw and processed milk samples marketed in Lebanon. *Food Control*, 22, 1856–1858.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (1990). *Official methods of analysis* (15th ed). Ed. K. Helrich. Fifteenth edition. Arlington V. A. E.U.A.

Virginia, USA.

- Astiasarán, I. y Martínez, J.A. (2003). *Alimentos: composición y propiedades*. Madrid: Mc Graw Hill U.S.A.
- Atasever, M. A., Adıgüzel, G., Atasever, M., Özlü, H., & Özturhan, K. (2010). Occurrence of aflatoxin M₁ in UHT milk in Erzurum-Turkey. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16, 119-122.
- Atasever, M. A., Atasever, A., y Ozturan, K. (2011). Aflatoxin M₁ levels in retail yoghurt and ayran in Erzurum in Turkey. *Turkish Journal of Veterinary Animal Science*, 35 (1), 59-62.
- Austwick, P.K.C. (1978). Mycotoxicoses in Poultry. En Wyllie, T.D. y Morehouse, L.G. (Eds.) *Mycotoxic Fungi, Mycotoxins, Mycotoxicoses: An Encyclopedic Handbook: Vol. 2. Mycotoxicoses of Domestic and Laboratory Animals, Poultry, and Aquatic Invertebrates and Vertebrates*. (pp. 279-301). Nueva York: Marcel Dekker, Inc.
- Bakker, G., Sizoo, E., Jekel, A., Pereboom-De Fauw, D. P., Schothorst, R., y Van Egmond, H. (2009). Determination of mean daily intakes of aflatoxin B₁, aflatoxin M₁, ochratoxin A, trichothecenes and fumonisins in 24-hour diets of children in the Netherlands. *World Mycotoxin Journal*, 2 (4), 451-459.
- Barker, D. J. (2004). The developmental origins of chronic adult disease. *Acta Paediatrica, Supplement*, 93, 26-33.
- Beltrán, E., Ibáñez, M., Sancho, J. V., Cortés, M. Á., Yusà, V., y Hernández, F. (2011). UHPLC–MS/MS highly sensitive determination of aflatoxins, the aflatoxin metabolite M₁ and ochratoxin A in baby food and milk. *Food Chemistry*, 126 (2), 737–744.
- Beltrán, E., Ibáñez, M., Sancho, J. V., y Hernández, F. (2009). Determination of mycotoxins in different food commodities by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 23 (12), 1801–1809.

- Bennet, J.W., Lee, L.S., Shoss, S.M. y Boudreaux, G.H. (1980). Identification of averantin as an aflatoxin B₁ precursor; placement in the biosynthetic pathway. *Applied Environment Microbiology*, 39, 835-839.
- Bennett, J. W. y Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 497–516.
- Bennett, J.W. (1987). Mycotoxins, mycotoxicoses, mycotoxicology and Mycopathologia. *Mycopathologia*, 100, 3–5.
- Bennett, J.W. y Christensen S.B. (1983). New perspectives on aflatoxin biosynthesis. *Advances in Applied Microbiology*, 29, 53-92.
- Bennett, J.W., Bhatnagar, D. y Chang, P.K. (1994). The molecular genetics of aflatoxin biosynthesis. En K. A. Powell, J. Peberdy y A. Renwick (Eds.). *The genus Aspergillus. From Taxonomy and Genetics to Industrial Applications*. (pp. 51-58). New York: Plenum Press.
- Bennett, J.W., Lee, L.S. y Cucullu, A.F. (1976). Effect of dichlorvos on aflatoxin and versicolorin A production in *Aspergillus parasiticus*. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 137, 318-324.
- Bhat, R., Sridhar, K.R. y Karim, A.A. (2010). Microbial quality evaluation and effective decontamination of nutraceutically valued lotus seeds by electron beams and gamma irradiation. *Radiation Physics and Chemistry*, 79, 976–981.
- Bhatnagar, D. y Cleveland, T. E. (1990). Purification and characterization of a reductase from *Aspergillus parasiticus* SRRC 2043 involved in aflatoxin biosynthesis. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 4, 2164-2167.
- Bhatnagar, D., Ehrlich, K.C. y Cleveland, T.E. (2003). Molecular genetic analysis and regulation of aflatoxin biosynthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61, 83–93.
- Bhatnagar, D., Lillehoj, E. y Bennett, J.W. (1991). Biological detoxification of mycotoxins. En Smith, J.E y Henderson, R.S. (Eds.) *Mycotoxins and Animal Foods* (pp. 816-822). Boca Raton, Florida: CRC Press.

- Bhatnagar, D., Lillehoj, E.B. y Arora D.K. (1992). *Handbook of applied mycology, vol. 5. Mycotoxins in ecological systems*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Bhatnagar, D., McCormick, S.P., Lee, L.S. y Hil, R.A. (1987). Identification of O-methylsterigmatocystin as an aflatoxin B₁ and G₁ precursor in *Aspergillus parasiticus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 53, 1028-1033.
- Bhatnagar, D., Ullah, A.H.J. y Cleveland, T. E. (1988). Purification and characterization of a methyltransferase from *Aspergillus parasiticus* SRRC 163 involved in the aflatoxin biosynthetic pathway. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 18, 321-349.
- Bhatnagar, D., Yu, J. y Ehrlich, K.C. (2002). Toxins of filamentous fungi. *Chemical Immunology*, 81, 167–206.
- Bilandzic, N., Bozic, D., Dokic, M., Sedak, M., Kolanovic, B., Varenina, I., Tankovic, S. y Cvetnic, Z. (2014). Seasonal effect on aflatoxin M₁ contamination in raw and UHT milk from Croatia. *Food Control*, 40, 260-264.
- Bilandžić, N., Varenina, I. y Solomun, B. (2010). Aflatoxin M₁ in raw milk in Croatia. *Food Control*, 21, 1279-1281.
- Bonerba, E., Conte, R., Ceci, E., y Tantillo, G. (2010). Assessment of dietary intake of patulin from baby foods. *Journal of Food Science*, 75 (7) 123-125.
- Bovo F., Corassin C. H., y Rosim R. E. y Oliveira C. A. F. (2012) Efficiency of Lactic Acid Bacteria Strains for Decontamination of Aflatoxin M₁ in Phosphate Buffer Saline Solution and in skim milk. *Food Bioprocess Technology*, 5, 1-5.
- Bowen, D. J. (2002). Haemophilia A and haemophilia B: Molecular insights. *Journal Of Clinical Pathology-Molecular Pathology*, 55 (2), 127-144.
- Brayden, W. L. (2012). Mycotoxin contamination of the feed supply chain: implications for animal productivity and feed security. *Animal Feed Science and Technology*, 173, 134-158.
- Brown, D.W., Adams, T.H. y Keller, N.P. (1996). *Aspergillus* has distinct fatty

acid synthases for primary and secondary metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 14873-14877.

- Budavari, S., O'Neil, M.J., Smith, A. y Heckelman, P.E. (1989). *The Merck Index, an Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*, 11th edition, (pp. 30-31). Rahway, New Jersey: Merck y Co.,Inc.
- Cano-Sancho, G., Gauchi, J.-P., Sanchis, V., Marín, S., y Ramos, A. J. (2011). Quantitative dietary exposure assessment of the Catalonian population (Spain) to the mycotoxin deoxynivalenol. *Food Additives and Contaminants*, 28, 1098-1109.
- Cano-Sancho, G., Marin, S., Ramos, A.J. y Sanchis, V., (2012^a). Occurrence of zearalenone, an oestrogenic mycotoxin, in Catalonia (Spain) and exposure assessment. *Food Chem. Toxicol.* 50 (3–4), 835–839.
- Cano-Sancho, G., Ramos, A.J., Marin, S. y Sanchis, V., (2012^b). Occurrence of fumonisins in Catalonia (Spain) and an exposure assessment of specific population groups. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 29 (5), 799– 808.
- Cano-Sancho, G., Sanchis, V., Marín, S. y Ramos, A.J. (2013) Ocurrence and exposure assessment of aflatoxins in Catalonia (Spain). *Food and Chemical Toxicology*, 51, 188-193.
- Cappiello, M., Vilardo, P.G., Cecconi, I., Leverenz, V., Giblin, F. J., Del Corso, A., *et al.* (1995). Occurrence of glutathione-modified aldose reductase in oxidatively stressed bovine lens. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 207, 775-782.
- Cary, J.W., Wright, M., Bhatnagar, D., Lee, R. y Chu, F.S. (1996). Molecular characterization of an *Aspergillus parasiticus* dehydrogenase gene, norA, located on the aflatoxin biosynthesis gene cluster. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 360-366.
- Cassel, K., Cambel, B., Draper, M. y Epperson, B. (2001). Aflatoxins: Hazards in grain/aflatoxicosis and livestock. South Dakota State University Cooperative

Extension Service Report, FS 907. *College of Agriculture and Biological Science/USDA*.

- Castegnaro, M., Hunt, D.E., Sansone, E.B., Schuller, P.L., Siriwardana, M.G., Telling, G.M. *et al.*, (Eds.) (1980). Laboratory de contamination and destruction of aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂ in baboratory wastes. IARC Scientific Publications No. 37, Lyon, IAC.
- Castegnaro, M., Pleština, R., Dirheimer, G., Chernozemsky, LN. y Bartsch, H. (eds.) (1991). Mycotoxins, Endemie Nephropathy and Urinary Tract Tumours IARC *Scientific Publications* No. 115, Lyon, IAC.
- Celik, K., Denli, M. y Savas, T. (2003). Reduction of toxic effects of aflatoxin B₁ by using baker yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and chlortetra cycline in Growing Broiler Chicks. *Revista Brasileira de Zootecnia. Journal of Animal Science*, 32, 615–619.
- Chang, C.F. y Hamilton, P.B. (1991). Mycotoxicosis. En: Calnek, B.W. (Ed.), *Disease of Poultry*, 9th ed., (pp. 893–897). London, England: Wolfe Publishing Ltd.
- Chang, P.K., Yu, J., Ehrlich, K.C., Boue, S.M., Montalbano, B.G., Bhatnagar, D., *et al.* (2000). adhA in *Aspergillus parasiticus* is involved in conversion of 5'-hydroxyaverantin to averufin. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4715-4719.
- Chen, J.G. y Zhang, S.W. (2011). Liver cancer epidemic in China: Past, present and future. *Seminars in Cancer Biology*, 21, 59–69.
- Chuturgoon, A.A. y Dutton, M.F. (1991). The affinity purification and characterization of a dehydrogenase from *Aspergillus parasiticus* involved in aflatoxin B, biosynthesis. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 21, 125-140.
- Cleveland, T.E. y Bhatnagar, D. (1987). Individual reaction requirements of two enzyme activities, isolated from *Aspergillus parasiticus*, which together catalyze

- conversion of sterigmatocystin to aflatoxin B₁. *Canadian Journal of Microbiology*, 33, 1108-1112.
- Cole, R.J. y Cox, R.H. (1981). *The aflatoxins. Handbook of Toxic Fungal Metabolites*, New York, (pp.1-66) London: Academic Press, LTD.
 - Corassin C. H., Bovo F., Rosim R. E. y Oliveira C. A. F. (2013) Efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria strains to bind aflatoxin M₁ in UHT skim milk. *Food Control*, 31, 80-83.
 - Council for Agricultural Science and Technology (CAST). (1989). Mycotoxins, Economics and Health Risks. *Council for Agricultural Science and Technology Task Force Report No. 116*. p 91. Ames, Iowa. USA.
 - Council for Agricultural Science and Technology (CAST). (2003). Mycotoxins: Risk in plant, animal and human systems. *Task Force Report 139*. Ames, Iowa. USA.
 - Creppy, E.E. (2002). Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*, 127, 19–28.
 - Cuevas-López, LL. (2010). Impacto en la economía familiar por uso de sucedáneos de leche materna en bebés sanos y uso de fórmulas especiales. *Pediatría de México*. Vol. 12 (1) 23-28.
 - Dall'Asta, C., Scarlato, A.P., Galaverna, G., Brighenti, F., Pellegrini, N. (2012). Dietary exposure to fumonisins and evaluation of nutrient intake in a group of adult celiac patients on a gluten-free diet. *Mol. Nutr. Food Res.* 56, 632–640.
 - Delisle, H. (2002). Fetal programming of nutrition-related chronic diseases. *Sante*, 12, 56-63.
 - Desalegn, B., Nanayakkara, S., Harada, K. H., Hitomi, T., Chandrajith, R., Karunaratne, U., *et al.* (2011). Mycotoxin detection in urine samples from patients with chronic kidney disease of uncertain etiology in Sri Lanka. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 87 (1), 6–10.
 - Di Mavungu, J. D., Monbaliu, S., Scippo, M.L., Maghuin-Rogister, G.,

- Schneider, Y.J., Larondelle, Y., *et al.* (2009). LC–MS/MS multi-analyte method for mycotoxin determination in food supplements. *Food Additives and Contaminants, Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 26 (6), 885–895.
- Di Natale, F., Gallo, M. and Nigro, R., (2009). Adsorbents selection for aflatoxins removal in bovine milks. *Journal of Food Engineering*, 95, 186-191.
 - Diao, E., Hou, H., Chen, B., Shan, C., y Dong, H. (2013). Ozonolysis efficiency and safety evaluation of aflatoxin B₁ in peanuts. *Food and Chemical Toxicology*, 55, 519-525.
 - Dinçkaya, E., Kınık, Ö., Sezgintürk, M.K., Altuğ, Ç., y Akkoca, A. (2011). Development of an impedimetric aflatoxin M₁ biosensor based on a DNA probe and gold nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*, 26 (9), 3806-3811.
 - Dorner, J.W. (2004) Biological control of aflatoxin contamination of crops. *Journal of Toxicology - Toxin Reviews*, 23, 425-450.
 - Driehuis, F., Te Giffel, M.C., Van Egmond, H.P., Fremy, J.M. y Blüthgen, A. (2010). Feed-associated Mycotoxins in the Dairy Chain: Occurrence, and Control. *Bulletin of the International Dairy Federation 444/2010*. Brussels, Belgium: International Dairy Federation. 25 p.
 - Dubuisson, C., Lioret, S., Touvier, M., Dufour, A., Calamassi-Tran, G., Volatier, J.L. y Lafay, L., (2010). Trends in food and nutritional intakes of French adults from 1999 to 2007: results from the INCA surveys. *Br. J. Nutr.* 103 (7), 1035–1048.
 - Dvorackova, I. (1990). *Aflatoxins and Human Health*. Boca Raton, Florida: CRC Press.
 - Edrington, T.S., Kubena, L.F., Harvey, R.B. y Rottinghaus, G.E. (1997). Influence of a super activated charcoal on the toxic effects of aflatoxin or T-2 toxin in growing broilers. *Poultry Science Association*, 76, 1205–1211.
 - EFSA (European Food Safety Authority). (2007). Opinion of the scientific panel

on contaminants in the food chain on a request from the Commission related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products. *EFSA J.* 446, 1–127.

- Egal, S., Hounsa, A., Gong, Y.Y., Turner, P.C., Wild, C.P. y Hall, A.J. (2005). Dietary exposure to aflatoxin from maize and groundnut in young children from Benin and Togo, West Africa. *International Journal of Food Microbiology*, 104, 215–224.
- El Khoury, A., Atoui, A., y Yaghi, J. (2011). Analysis of aflatoxin M₁ in milk and yogurt and AFM₁ reduction by lactic acid bacteria used in Lebanese industry. *Food Control*, 22, 1695-1699.
- Elkak, A., El Atat, O., Habib, J., y Abbas, M. (2012). Occurrence of aflatoxin M₁ in cheese processed and marketed in Lebanon. *Food Control*, 25, 140-143.
- Elkak, A., El Atat, O., y Abbas, M. (2011). A survey on the occurrence of aflatoxin M₁ in raw and processed milk samples marketed in Lebanon. *Food Control*, 22, 1856-1858.
- Ellis, W.O., Smith, J.P. y Simpson, B.K. (1991). Aflatoxin in food: Occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 30, 403-439.
- Elwood, P.C., Pickering, J.E., Hughes, J., Fehily, A.M. y Ness, A.R. (2004). Milk drinking, ischaemic heart disease and ischaemic stroke II. Evidence from cohort studies. *European Journal of Clinical Nutrition*, 58, 718-724.
- Elzupir, A.O. y Elhoussein, A.M. (2010). Determination of aflatoxin M₁ in dairy cattle milk in Khartoum State, Sudan. *Food Control*, 21, 945-946.
- European Commission. (2006). Commission Regulation (EC) No. 1881/2006 of 19 December 2006d Setting maximum levels for certain contaminants in food-stuffs.
<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2006R1881:20100701:PT:PDF>.

- European Food Safety Authority (EFSA). (2004). Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to aflatoxin B₁ as undesirable substance in animal feed. *The European Food Safety Authority Journal*, 39, 1-27.
- Fallah, A.A. (2010). Aflatoxin M₁ contamination in dairy products marketed in Iran during winter and summer. *Food Control*, 21, 1478-1481.
- Fallah, A.A. (2010). Assessment of aflatoxin M₁ contamination in pasteurized and UHT milk marketed in central part of Iran. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 988-991.
- Fallah, A.A., Rahnama, M., Jafari, T. y Saei-Dehkordi, S. S. (2011). Seasonal variation of aflatoxin M₁ contamination in industrial and traditional Iranian dairy products. *Food Control*, 22, 1653-1656.
- Fang, Y., Hu, J., Xiong, S. y Zhao, S. (2011). Effect of low-dose microwave radiation on *Aspergillus parasiticus*. *Food Control*, 22, 1078-1084.
- FAO, Food and Agriculture Organization. (2009). Seminario: Impacto de las micotoxinas en la inocuidad y comercio de los alimentos, Santiago (Chile).
- FAO. (2004). Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*.
- Farombi, E.O. (2006). Aflatoxin contamination of foods in developing countries: Implications for hepatocellular carcinoma and chemopreventive strategies. *African Journal of Biotechnology*, 5, 1-14.
- Farzaneh, M., Shi, Z. Q., Ghassempour, A., Sedaghat, N., Ahmadzadeh, M., Mirabolfathy, M., *et al.* (2012). Aflatoxin B₁ degradation by *Bacillus subtilis* UTBSP1 isolated from pistachio nuts of Iran. *Food Control*, 23, 100-106.
- Feng, G.H. y Leonard, T.J. (1995). Characterization of the polyketide synthase gene (pksL1) required for aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Bacteriology*, 177, 6246–6254.
- Fernandes, A. M., Correa, B., Rosim, R. E., Kobashigawa, E., y Oliveira, C. A.

- F. (2012). Distribution and stability of aflatoxin M₁ during processing and storage of Minas Frescal cheese. *Food Control*, 24, 104-108.
- Firestone, M. P., y Amler, R. W. (2003). Children's environmental health an international perspective. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 206, 395-400.
 - Fondo Internacional de Emergencia de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF) (2009a). Consecuencias sobre la supervivencia infantil y la situación mundial. [En línea]. http://www.unicef.org/spanish/nutrition/index_24824.html.
 - Fondo Internacional de Emergencia de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF) (2009b). Lactancia materna en la región de América Latina. [En línea]. http://www.unicef.org/lac/lactancia_materna_tacro.pdf.
 - Fraga, C.G., Shigenaga, M.K., Park, J.W., Degan, P. y Ames, B.N. (1990). Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87, 4533-4537.
 - Frenich, A. G., Vidal, J. L. M., Romero-González, R., y Aguilera-Luiz, M. (2009). Simple and high-throughput method for the multimycotoxin analysis in cereals and related foods by ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 117, 705-712.
 - Frobish, R.A., Bradley, B.D., Wagner, D.D., Long-Bradley, P.E. y Hairston, H. (1986). Aflatoxin residues in milk of dairy cows after ingestion of naturally contaminated grain. *Journal of Food Protection*, 49, 781-785.
 - García, L.A. (1996). Las importaciones mexicanas de leche descremada en polvo en el contexto del mercado mundial y regional. *U.S. Dairy Export Council y UAM-Xochimilco*, 163 pp.
 - Garrido, N.S., Iha, M.H., Santos, M.R. y Duarte, R.M. (2003). Occurrence of aflatoxin M₁ and M₂ in milk commercialized in Ribeirao Preto-SP, Brazil. *Food Additives and Contaminants*, 20, 70-73.

- Ghiasian, S.A., Maghsood, A.H., Neyestani, T.R. y Mirhendi, S.H. (2007). Occurrence of aflatoxin M₁ in raw milk during the summer and winter seasons in Hamadan, Iran. *Journal of Food Safety*, 27, 188–198.
- Gimeno, A. (2002). Los hongos y las micotoxinas en la alimentación animal; conceptos, problemas, control y recomendaciones. [En línea]. <http://www.engormix.com/MA-micotoxinas/articulos/los-hongos-micotoxinas-alimentacion-t362/p0.htm>.
- Gimeno, A. y Martins, M. L. (2003). *Micotoxinas y Micotoxicosis en Animales y Humanos*. Special Nutrients, Inc. USA, (Ed.) (pp.1-160) Buenos Aires, Argentina: Talleres gráficos del SRL.
- Gimeno, A., Martins, M.L. (2006). Mycotoxins and Mycotoxicosis in Animals and Humans. *Special Nutrients, Inc. USA* (Ed.). Victor Mireles Communications, Ciudad de México, México, 127 pp.
- Gimeno, A., Martins, M.L. (2011). Micotoxinas y Micotoxicosis en Animales y Humanos. *Special Nutrients*, Florida, pp. 50–53.
- Gong, Y.Y., Cardwell, K., Hounsa, A., Egal, S., Turner, P. C., Hall, A. J., *et al.* (2002). Dietary aflatoxin exposure and impaired growth in young children from Benin and Togo: cross sectional study. *British Medical Journal*, 325, 20–21.
- Goryacheva, I.Yu., Rusanova, T.Yu., Burmistrova, N.A., De Saeger, S. (2009). Immunochemical methods for the determination of mycotoxins. *Journal of Analytical Chemistry*, 64, 768-785.
- Groopman, J.D., Cain, L.G. y Kensler, T.W. (1988). Aflatoxin exposure in human populations: Measurements and relationship to cancer. *Critical Reviews in Toxicology*, 19, 113–146.
- Guan, D., Li, P., Cui, Y., Zhang, Q. y Zhang, W. (2011). A comparative immunoassay with a surrogate calibrator curve for aflatoxin M₁ in milk. *Analytica Chimica Acta*, 703 64-69.
- Gurbay, A., Sabuncuoglu, S. A., Girgin, G., Sahin, G., Yigit, S., Yurdakok, M., *et al.* (2010). Exposure of newborns to aflatoxin M₁ and B₁ from mothers breast

milk in Ankara, Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 314-319.

- Gursoy-Yuzugullu, O., Yuzugullu, H., Yilmaz, M., y Ozturk, M. (2011). Aflatoxin genotoxicity is associated with a defective DNA damage response bypassing p53 activation. *Liver International*, 31 (4), 561-571.
- Haighton, L.A., Lynch, B.S., Magnuson, B.A., Nestmann, E.R., (2012). A reassessment of risk associated with dietary intake of ochratoxin A based on a lifetime exposure model. *Crit. Rev. Toxicol.* 42 (2), 147–168.
- Harvey, R., Kubena, L.F., Elissalde, M.H. y Phillips, T.D. (1993). Efficacy of zeoliticore compounds on the toxicity of aflatoxin to growing broiler chickens. *Avian Diseases.* 37, 67-73.
- Hassan, H y Kassaify, Z. (2014). The risks associated with aflatoxins M₁ occurrence in Lebanese dairy. *Food Control*, 37, 68-72.
- Hernández-Martínez, R., Navarro-Blasco, I. (2010). Aflatoxin levels and exposure assessment of spanish infant cereals. *Food Addit. Contam. Part B* 4, 275–288.
- Hernandez-Mendoza, A., Guzman-de-Peña, D. L., Gonzalez, A. F., Vallejo, B., y Garcia, H. S. (2010). In vivo assessment of the potential protective effect of *Lactobacillus casei* Shirota against aflatoxin B₁. *Dairy Science and Technology*, 9, 729-740.
- Hesseltine, C. W. (1976). Conditions Leading to Mycotoxin Contamination of Foods Feeds. En Joseph V. Rodricks (Ed). *Mycotoxins Other Fungal Related Food Problems*, (pp.1022) Washington: American Chemical Society.
- Horwitz, W., Albert, R. y Nesheim, S. (1993). Reliability of Mycotoxins Assay. *Journal of AOAC International*, 76, 461–491.
- Huang, L.C., Zheng, N., Zheng, B.Q., Wen, F., Cheng, J.B., Han, R.W., Xu, X.M., Li, S.L., Wang, J.Q. (2014). Simultaneous determination of aflatoxin M₁, ochratoxin A, zearalenone and α -zearalenol in milk by UHPLC-MS/MS. *Food Chemistry*, 146, 242-249.

- Huff, W.E., Kubena, L.F., Harvey, R.B. y Phillips, T.D. (1992). Efficacy of Hydrated Sodium Calcium Aluminosilicate to Reduce the Individual and Combined Toxicity of Aflatoxin and Ochratoxin A1. *Journal of Poultry Science*, 71, 64-69.
- Hurst, W.J., Martin, R.A. y Vestal, C.H. (1991). Use of HPLC thermospray MS for the confirmation of aflatoxins in peanuts. *Journal of Liquid Chromatography*, 14, 2541-2550.
- Hussain, I., Anwar, J., Asi, M. R., Munawar, M. A., y Kashif, M. (2010). Aflatoxin M₁ contamination in milk from five dairy species in Pakistan. *Food Control*, 21, 122-124.
- Hussein HS, Brasel JM. (2001). Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* 167, 101–34.
- Huwig, A., Freimund, S., Kapelli, O. y Dutler, H. (2001). Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicology Letters*, 122, 179-188.
- Iaha, M. H., Barbosa, C. B., Okada, I. A., & Trucksess, M. W. (2011). Occurrence of aflatoxin M₁ in dairy products in Brazil. *Food Control*, 22 (12), 1971-1974.
- Iha, M. H., Barbosa, C. B., Okada, I. A., y Trucksess, M. W. (2011). Occurrence of aflatoxin M₁ in dairy products in Brazil. *Food Control*, 22, 1971-1974.
- Iha, M., Baltazar, C., Akemi, I. y Trucksess, M. (2013). Aflatoxin M₁ in milk and distribution and stability of aflatoxin M₁ during production and storage of yoghurt and cheese. *Food Control*, 29, 1-6.
- Iha, M., Baltazar, C., Ribeiro, A. y Trucksess, M. (2014). Aflatoxin M₁ and ochratoxin A human milk in Ribeirao Preto-SP, Brazil. *Food Control*, 40, 310-313.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). (1976). Some naturally occurring substances. International Agency for Research on Cancer.

Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to man, 10, 1–342.

- International Agency for Research on Cancer (IARC). (1993). *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*, Vol. 56, 489-521. Geneva: International Agency for Research on Cancer.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). (1999). Overall evaluation of carcinogenicity to humans. *International Agency for Research, Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans*, 1, 1–36. Geneva: International Agency for Research on Cancer.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). (2002). Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. *International Agency for Research Monograph on the evaluation of carcinogenic risk chemical to humans*, 82, 171-300.
- INVS, (2011). Institut de Veille Sanitaire – Institute of Sanitary Surveillance, Projections de l'incidence et de la mortalité par cancer en France en 2010 – Estimation of the incidence and mortality by cancer in France in 2010. In. Vol. 2011.
- Ito, Y., Peterson, S. W., Wicklow, D. T. y Goto, T. (2001). *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *Flavi*. *Mycological Research*, 105, 233–239.
- Jelinek, C.F., Pohland, A.E. y Wood, G.E. (1989). Worldwide occurrence of mycotoxins in foods and feeds an update. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 72, 223–230.
- Jiang, Y., Jolly, P.E., Preko, P., Wang, J.S., Ellis, W.O., Phillips, T.D., Williams, J.H. (2008). Aflatoxin-related immune dysfunction in health and in human immunodeficiency virus disease. *Clin. Dev. Immunol.* vol. 2008, 12 pages (Article ID 790309). doi:10.1155/2008/790309.

- Jindal, N., Mahipal, S.K. y Mahajan, N.K., (1993). Occurrence of aflatoxin in compound poultry feeds in Haryana and effect of different storage conditions on its production. *The Indian Journal of Animal Sciences*, 63, 71–73.
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). (2001). Safety evaluation of certain mycotoxins in food. In Prepared by the 56th meeting of the food additives Series No. 47, [En línea] <http://inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je02.htm>.
- Juan, C., Mañes, J., Raiola, A., Ritieni, A. (2013). Evaluation of beauvericin and enniatins in Italian cereal products and multicereal food by liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Food Chem.* 140, 755–762.
- Juárez, M. (1991). Criterios analíticos para establecer la genuinidad de la grasa de leche. *Revista Española de la Lechería*, 24, 30-34.
- Kabak, B. y Ozbey, F. (2012). Aflatoxin M₁ in UHT milk consumed in Turkey and first assessment of its bioaccessibility using an in vitro digestion model. *Food Control*, 28, 338-344.
- Kaniou-Grigoriadou, I., Eleftheriadou, A., Mouratidou, T. y Katikou, P. (2005). Determination of aflatoxin M₁ in ewe's milk samples and the produced curd and Feta cheese. *Food Control*, 16, 257-261.
- Kanungo, L., Pal, S., y Bhand, S. (2011). Miniaturised hybrid immunoassay for high sensitivity analysis of aflatoxin M₁ in milk. *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 2601-2606.
- Kav, K., Col, R., y Kaan Tekinsen, K. (2011). Detection of aflatoxin M₁ levels by ELISA in white-brined Urfa cheese consumed in Turkey. *Food Control*, 22 (12), 1883–1886.
- Kelkar, HS., Skloss, T.W., Haw, J.F., Keller, N.P. y Adams, T.H. (1997). *Aspergillus nidulans* stcL encodes a putative cytochrome P-450 monooxygenase required for bisfuran desaturation during aflatoxin/sterigmatocystine biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 272 (3), 1589-1594.

- Keller, N., Dischinger, H., Bhatnagar, D., Cleveland, T. y Ullah, A. (1993). Purification of a 40-kilodalton methyltransferase active in the aflatoxin biosynthetic pathway. *Applied and Environmental Microbiology*, 59 (2), 479-84.
- Keller, N.P., Cleveland, T.E. y Bhatnagar, D. (1992). *En Handbook of Applied Mycology*. Bhatnagar, D., Lillehoj, E.B y Arora, D.K. (Eds.), Vol. 5, pp. 287-310. New York: Marcel Dekker.
- Kiermeier, F. (1973). Aflatoxins residues in fluid milk. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 35, 271-273.
- Kim, E. K., Shon, D. H., Ryu, D., Park, J. W., Hwang, H. J. y Kim, Y. B. (2000). Occurrence of aflatoxin M₁ in Korean dairy products determined by ELISA and HPLC. *Food Additives and Contaminants*, 17, 59-64.
- Klich, M. A., Mullaney, E.J., Daly, C.B. y Cary, J.W. (2000). Molecular and physiological aspects of aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis by *Aspergillus tamarii* and *A. ochraceoroseus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53, 605–609.
- Kos, J., Mastilovic, J., Hajnal, J. E., y Saric, B. (2013). Natural occurrence of aflatoxins in maize harvested in Serbia during 2009-2012. *Food Control*, 34, 31-34.
- Kostianen, R. (1991). Identification of trichothecenes by thermospray, plasmaspray and dynamic fast-atom bombardment liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 562, 555-562.
- Kostianen, R. y Kuronen, P. (1991). Use of 1-[P-(2,3-Dihydroxypropoxy)Phenyl]-1-Alkanones as retention index standards in the identification of tricothecenes by liquid chromatography-thermospray and dynamic fast atom bombardment mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 543, 39-47.
- Kourousekos, G., Theodosiadou, E., Belibasaki, S., Deligiannis, K., Koukoulas, T., Zoulfos, K. y Lymberopoulos, A. (2012). Effects of aflatoxin B₁

- administration on Greek indigenous goats' milk. *International Dairy Journal*, 24, 123-129.
- Krska, R. y Molinelli, A. (2007). Mycotoxin analysis: state-of-the-art and future trends. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387, 145–148.
 - Kubena, L. F., Harvey, R.B., Phillips, T.D., Corrier, D.E. y Huff, W.E. (1990). Diminution of aflatoxicosis in growing chickens by dietary addition of a hydrated sodium calcium aluminosilicate. *Journal of Poultry Science*, 69, 727–735.
 - Kubena, L.F., Harvey, R.B., Baileym, R.H., Buckley S.A. y Rottinghaus, G.E. (1998). Effects of a hydrated sodium calcium aluminosilicate (t-bind) on mycotoxicosis in young broiler chickens. *Journal of Poultry Science*, 77, 1502–1509.
 - Kuiper Goodman, T. (1994). Prevention of human mycotoxicoses trough risk assesment and risk management. En Miller, J.D y Trenholm, H.L. (Eds.) *Mycotoxins In Grain, Compouns Other Than Aflatoxin*. (pp. 439-469) St.Paul, Minnesota: Eagan Press.
 - Kumar, V., Basu, M. S. y Rajendran, T. P. (2008). Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. *Crop Protection*, 27, 891–905.
 - Kusumoto, K.I. y Hsieh, D.P.H. (1996). Purification and characterization of the esterases involved in aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus*, *Canadian Journal of Microbiology*, 42, 804- 810.
 - Leblanc, J.C., Tard, A., Volatier, J.L. y Verger, P. (2005). Estimated dietary exposure to principal food mycotoxins from The First French Total Diet Study. *Food Additives and Contaminants: Part A*, 22, 652-672.
 - Lee, N. A., Wang, S., Allan, R. D. y Kennedy, I. R. (2004). A rapid aflatoxin B₁ ELISA: Development and validation with reduced matrix effects for peanuts, corn, pistachio, and soybeans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 2746–2755.

- Lei, Y., Fang, L., Akash, M., Rehman, K., Liu, Z., Shi, W. y Chen S. (2013). Estimation of Urinary Concentration of Aflatoxin M₁ in Chinese Pregnant Women. *Journal of food Science*. 78, 1835-1838.
- Lei, Y., Fang, L., Akash, M.S.H., Rehman, K., Liu, Z., Shi, W., and Chen, S. (2013). Estimation of Urinary Concentration of Aflatoxin M₁ in Chinese Pregnant Women. *Journal of Food Science*, 78, 1835-1838.
- Levic, J., Đuragic, O., Kos, J., Varga, J., y Bagi, F. (2013). The occurrence of aflatoxins in Serbia-from feed to food. In *The second North and East European Congress on food, Kiev, Ukraine, May 26e29* (pp. 77).
- Lewis, L., Onsongo, M., Njapau, H., Schurz-Rogers, H., Lubert, G., Kieszak, S., et al. (2005). Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in eastern and central Kenya. *Environmental Health Perspectives*, 113, 1763-1767.
- Li, S.C., Chen, J.H., Cao, H., Yao, D.S., Liu, D.L. (2011). Amperometric biosensor for aflatoxin B₁ based on aflatoxin-oxidase immobilized on multiwalled carbon nanotubes. *Food Control*, 22, 43-49.
- LICONSA. (1987). Historia del abasto social de leche en México. Liconsa, México, 112 pp.
- Lillehoj, E.B. (1991). Aflatoxin: an ecologically elicited activation signal. En: Smith, J.E., Anderson, R.A. (Eds.). *Mycotoxins and Animal Foods*. (pp. 119-139) Boca Raton: CRC Press.
- Lin, B.K. y Anderson, J.A. (1992). Purification and properties of versiconal cyclase from *Aspergillus parasiticus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 293, 67-70.
- Liu, R. J., Chang, M., Jin, Q. Z., Huang, J. H., Liu, Y. F., y Wang, X. G. (2011). Degradation of aflatoxin B₁ in aqueous medium through UV irradiation. *European Food Research and Technology*, 233, 1007-1012.
- Liu, Y. y Wu, F. (2010). Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular

carcinoma: a risk Assessment. *Environ. Health Perspect.* 118, 818–824.

- López, C.E., Ramos, L.L., Ramadán, S.S. y Bulacio, L.C. (2003). Presence of aflatoxin M₁ in milk for human consumption in Argentina. *Food Control*, 14 (1), 31-34.
- López, D. (1969). Historia y pensamiento económico de México. UAM, México. Vol. 1, p.113.
- Lubulwa, A.S.G. y Davis, J.S. (1994). Estimating the social costs of the impacts of fungi and aflatoxins in maize and peanuts, págs. 1017-1042. En: *Stored Product Protection. Proceedings of the 6th International Working Conference on Stored-product Protection*. Highley, E., Wright, E.J., Banks, H.J. y Champ, B.R. (eds.). CAB International, Wallingford, Reino Unido.
- Luo, X. H., Wang, R., Wang, L., Wang, Y., y Chen, Z. X. (2013). Structure elucidation and toxicity analyses of the degradation products of aflatoxin B₁ by aqueous ozone. *Food Control*, 31, 331-336.
- Luo, X., Wang, R., Wang, L., Li, Y., Bian, Y. y Chen, Z. (2014). Effect of ozone treatment on aflatoxin B₁ and safety evaluation of ozonized corn. *Food Control*, 37, 171-176.
- Maggon, K. K., Gupta, S.K. y Venkitasubramanian, T.A. (1977). Biosynthesis of aflatoxins. *Bacteriological Reviews*, 41, 822-855.
- Magliulo, M., Mirasoli, M., Simoni, P., Lelli, R., Portanti, O. y Roda, A. (2005). Development and validation of an ultrasensitive chemiluminescent enzyme immunoassay for aflatoxin M₁ in Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3300-3305.
- Mahanti, N., Bhatnagar, D., Cary, J.W., Jourbran, J. y Linz, J.E. (1996). *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 191-195.
- Makun, H.A., Anjorin, S.T., Moronfoye, B., Adejo, F.O., Afolabi, O.A., Fagbayibo, G., Balogun, B.O. y Surajudeen, A.A., (2010). Fungal and aflatoxin contamination of some human food commodities in Nigeria. *Afr. J. Fd. Sci.* 4

(4), 127–135.

- Maragos, C. M., y Busman, M. (2010). Rapid and advanced tools for mycotoxin analysis: a review. *Food Additives and Contaminants*, 27, 688-700.
- Marín, S., Ramos, A.J., Sanchis, V. (2012). Modelling *Aspergillus flavus* growth and aflatoxins production in pistachio nuts. *Food Microbiology*, 32: 378-388.
- Mathias, D., Siegrid, D. B., Patrick, D. B., y Siska, C. (2012). Quantitative determination of several toxicological important mycotoxins in pig plasma using multi-mycotoxin and analyte-specific high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometric methods. *Journal of Chromatography A*, 1257, 74–80.
- Matsushima, K., Ando, Y., Hamasaki, T. y Yabe, K. (1994). Purification and characterization of two versiconal hemiacetal acetate reductases involved in aflatoxin biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 2561-2567.
- McCormick, S.P., Bhatnagar, D. y Lee, L.S. (1987). Averufanin is an aflatoxin B₁ precursor between averantin and averufin in the biosynthetic pathway. *Applied and Environmental Microbiology*, 53, 14-16.
- McDonough, M.X., Campabadal, C.A., Mason, L.J., Maier, D.E., Denvir, A., y Woloshuk, C. (2011). Ozone application in a modified screw conveyor to treat grain for insect pests, fungal contaminants, and mycotoxins. *J. Stored Prod. Res.* 47 (3), 249-254.
- McGuire, S.M., Silva, J.C., Casillas, E.G. y Townsend, C.A. (1996). Purification and characterization of versicolorin B synthase from *Aspergillus parasiticus*. Catalysis of the stereodifferentiating cyclization in aflatoxin biosynthesis essential to DNA interaction, *Biochemistry*, 35, 11470-11486.
- MERCOSUL/GMC. (2002). Regulamento técnico Mercosul sobre Limites Máximos de Aflatoxinas admissíveis no leite, amendoim e milho (Revogação da Res. GMC N56/94). [En línea] http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/mercosul/alimentos/25_02.pdf

- Meucci, V., Razzuoli, E., Soldani, G., y Massart, F. (2010). Mycotoxin detection in infant formula milks in Italy. *Food Additives and Contaminants*, 27, 64-71.
- Milicevic, D., Skrinjar, M., Baltic, T. (2010). Real and perceived risks for mycotoxin contamination in foods and feeds: challenges for food safety control. *Toxins*, 2, 572–592.
- Miller G.D., Jarvis J.D., McBean L.D. (2007) *Handbook of Dairy Foods and Nutrition*. (Eds) CRC Press, Florida US.
- Miller, D.M. y Wilson, D.M. (1994). Veterinary diseases related to aflatoxins. En: Eaton, D.L y Groopman, J.D (Eds.) *The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance*, p. 347–64. San Diego, CA: Academic Press.
- Minto, R.E. y Townsend, C.A. (1997). Enzymology and molecular biology of aflatoxin biosynthesis. *Chemical Reviews*, 97, 2537–2556.
- Mohammadian, B., Khezri, M., Ghasemipour, N., Mafakheri, Sh., y Langroudi, P. (2010). Aflatoxin M₁ contamination of raw and pasteurized milk produced in Sanandaj, Iran. *Archives of Razi Institute*, 65, 99-104.
- Motomura, M., Chihaya, N., Shinozawa, T., Hamasaki, T. y Yabe, K. (1999). Cloning and characterization of the O-methyltransferase I gene (dmtA) from *Aspergillus parasiticus* associated with the conversions of demethylsterigmatocystin to sterigmatocystin and dihydrodemethylsterigmatocystin to dihydrosterigmatocystin in aflatoxin biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 4987-4994.
- Movassagh, M. H. (2011). Presence of aflatoxin M₁ in UHT milk in Tabriz (Northwest of Iran). *Journal of Food Safety*, 31, 238-241.
- Moynihan and Peterson. (2004). Diet, nutrition and the prevention of dental diseases. *Public Health Nutrition*, 7, 210-216.
- Naguib, K. M., Hassan, N. S., El-Nekeety, A. A., Ibrahim, M. I., Mohamed, S. R., y Abdel-Wahhab, M. A. (2011). Safety use of ozone gas in the degradation

of aflatoxin in tobacco and prevention its toxicity in rats. *Toxicology Letters*, 205, S144.

- Navarro-Estrella, M., Duque-López, M.X. y Trejo-Pérez, J.A. (2003). Factores que influyen en el abandono temprano de la lactancia por mujeres trabajadoras. *Salud Pública de México*. Vol. 45, 276-284.
- Nemati, M., Mehran, M. A., Hamed, P. K., y Masoud, A. (2010). A survey on the occurrence of aflatoxin M₁ in milk samples in Ardabil, Iran. *Food Control*, 21, 1022-1024.
- Njumbe Ediage, E., Diana Di Mavungu, J., Monbaliu, S., Van Peteghem, C. y De Saeger, S. (2011). A validated multianalyte LC-MS/MS method for quantification of 25 mycotoxins in cassava flour, peanut cake and maize samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (10), 5173-5180.
- NMX-F-026-SCFI-(1997). Leche. Denominación, especificaciones comerciales y métodos de prueba. Normas mexicanas. Dirección general de normas.
- Norma Mexicana NMX-F-712-COFOCALEC-(2005). Sistema producto leche alimentos lácteos. Determinación de aflatoxina M₁ en leche fluida por cromatografía de líquidos de alta resolución. Método de prueba.
- Norma Mexicana NMX-F-718-COFOCALEC-(2006). Sistema producto leche alimentos lácteos. Guía para el muestreo de leche y productos lácteos.
- Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-(2010), Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. Diario Oficial de la Federación. Diario Oficial de la Federación. Gobierno constitucional de los Estados Unidos Mexicanos. México D.F.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2012). 10 datos sobre la lactancia materna. [En línea] <http://www.who.int/features/factfiles/breastfeeding/es/>.
- Oueslati, S., Romero-González, R., Lasram, S., Frenich, A. G., y Vidal, J. L. M. (2012). Multi-mycotoxin determination in cereals and derived products marketed in Tunisia using ultra-high performance liquid chromatography

coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Food and Chemical Toxicology*, 50 (7), 2376–2381.

- Oveisi, M. R., Jannat, B., Sadeghi, N., Hajimahmoodi, M. y Nikzad, A. (2006). Presence of aflatoxin M₁ in milk and infant milk products in Tehran, Iran. *Food Control*, 18, 1216–1218.
- Park, D. L. (1993). Controlling aflatoxin in food and feeds. *Food Technology*, 47, 92-96.
- Paterson, D.S.P. y Anderson, P.H. (1982). Recent Aflatoxin feeding experiments in cattle. *Veterinary Record*, 110 (3), 60-61.
- Payne, G.A. y Brown, M.P. (1998). Genetics and physiology of aflatoxin biosynthesis. *Annual Review of Phytopathology*, 36, 329–362.
- Peraica, M., Radis, B., Lucic, A. y Pavlovic, M. (1999). Efectos tóxicos de las micotoxinas en el ser humano. *Bulletin of the World Health Organization*, 77 (9), 754-766.
- Peterson, S.W., Ito, Y., Horn, B.W. y Goto, T. (2001). *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. *Mycologia*, 93, 689–703.
- Piekola S, Turner PC, Abdel-Hamid M, Ezzat S, El-Daly M, El-Kafrawy S, Savchenko E, Poussa T, Woo JC, Mykka'nen H, El-Nezami H. (2012). Characterisation of aflatoxin and deoxynivalenol exposure among pregnant Egyptian women. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 29, 962–71.
- Pinard, J. (1988). Les industries alimentaires dans le monde. Masson Collection Géographie, Paris.
- Pirestani, A., Tabatabaei, S.N., Fazeli, M., Antikchi, M. Y Baabaei, M. (2011). Comparison of HPLC and ELISA for determination of aflatoxin concentration in the milk and feeds of dairy cattle. *Journal of Research in Agricultural Science*. 7 (1), 71-78.

- Pitt, J.I. y Miscamble, B.F. (1995). Water relations of *Aspergillus flavus* and closely related species. *Journal of Food Protection*, 58, 86-90.
- Pittet, A. (1998). Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 149, 479-492.
- Prandini, A., Tansini, G., Sigolo, S., Filippi, L., Laporta, M. y Piva, G. (2009). On occurrence of aflatoxin M₁ in milk and dairy products. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 984-991.
- Prelusky, D.B., Veira, D.M., Trenholm, H.L. y Foster, B.C. (1987). Metabolic fate and elimination in milk, urine and bile of deoxynivalenol following administration to lactating sheep. *Journal of Environmental Science and Health (B)*, 22, 125-148.
- Prieto, R. y Woloshuk, C.P. (1997). Ord1, an oxidoreductase gene responsible for conversion of O- methylsterigmatocystin to aflatoxin in *Aspergillus flavus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 1661-1666.
- Probst, C., Njapau, H., Cotty, P.J. (2007). Outbreak of an acute aflatoxicosis in Kenya in 2004, identification of the causal agent. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 2762– 2764.
- Rahimi, E., Bonyadian, M., Rafei, M. y Kazemeini, H. R. (2010). Occurrence of aflatoxin M₁ in raw milk of five dairy species in Ahvaz, Iran. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 129-131.
- Ramos, A.J., Fink-Gremmels, J. y Hernández, E. (1996). Prevention of toxic effects of mycotoxins by means of non-nutritive adsorbent compounds. *Journal of Food Protection*, 59 (6), 631-641.
- Richard, E., Heutte, N., Sage, L., Pottier, D., Bouchart, V., Lebailly, P., *et al.* (2007). Toxigenic fungi and mycotoxins in mature corn silage. *Food and Chemical Toxicology*, 45 (12), 2420-2425.
- Romagnoli, B., Ferrari, M., y Bergamini, C. (2010). Simultaneous determination of deoxynivalenol, zearalenone, T-2 and HT-2 toxins in breakfast cereals and baby food by high-performance liquid chromatography and tandem mass

spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 45, 1075-1080.

- Rubert, J., Soler, C., y Mañes, J. (2011). Application of an HPLC–MS/MS method for mycotoxin analysis in commercial baby foods. *Food Chemistry*, 133 (1), 176–183.
- Saad, A.M., Abdelgadir, A.M. y Moss, M.O. (1995). Exposure of infants to aflatoxin M₁ from mothers' breast milk in Abu Dhabi. *Food Additives and Contaminants*, 12, 255–261.
- Sadeghi, N., Oveisi, M.R., Jannat, B., Hajimahmoodi, M., Bonyan, H. y Jannat, F. (2009). Incidence of aflatoxin M₁ in human breast milk in Tehran, Iran. *Food Control*, 20, 75–78.
- Samarajeewa, U., Sen, A.C., Cohen, M.D. y Wei, C.I. (1990). Detoxification of aflatoxins in foods and feeds by physical and chemical methods. *Journal of Food Protection*, 53, 489-501.
- Santos-Torres, M.I., Vázquez-Garibay, E.M., Troyo-Sanromán, R. y Méndez-de León, E. (2011). Prácticas de lactancia materna en los primeros seis meses en un hospital con 15 años de práctica del programa Hospital Amigo. *Pediatría de México*. 13, 7-12.
- Santurio, J.M., Mallmann, C. A., Rosa, A. P., Appel, G., Heer, A., Degeforde, S., *et al.* (1999). Effect of sodium bentonite on the performance and blood variables of broiler chickens intoxicated with aflatoxins. *British Poultry Science*, 40 (1), 115-119.
- Sardiñas, N., Vázquez, C., Gil-Serna, J., González-Jaén, M.T. y Patiño, B. (2010). Specific detection of *Aspergillus parasiticus* in wheat flour by a highly sensitive PCR assay. *Food Additives and Contaminants*, 27, 853–858.
- Sardiñas, N., Vázquez, C., Gil-Serna, J., González-Jaén, M.T. y Patiño, B. (2011). Specific detection and quantification of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in wheat flour by SYBR® Green quantitative PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 145, 121-125.

- Sarwar Nasir, M. y Jolley, M.E. (2002). Development of a fluorescence polarization assay for the determination of aflatoxins in grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3116-3121.
- Scott, P.M. (1989). Methods for Determination of Aflatoxin M₁ in Milk and Milk Products. A Review of Performance Characteristics. *Food Additives and Contaminants*, 6, 283-305.
- Scott, P.M. (1998). Industrial and farm detoxification processes for mycotoxins. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 149, 543–548.
- Serrano-Niño J.C., Cavazos-Garduño A., Hernandez-Mendoza, A., Applegate, B., Ferruzzi, M.G., San Martín-González, M.F., García, H.S. (2013). Assessment of probiotic strains ability to reduce the bioaccessibility of aflatoxin M₁ in artificially contaminated milk using an in vitro digestive model, *Food Control*, 31: 202-207.
- Shetty, P.H. y Jespersen, L. (2006). *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. *Trends in Food Science & Technology*, 17, 48–55.
- Shibamoto, T. y Bjeldanes, L.F. (2009). *Introduction to Food Toxicology* (2^a Ed.) Burlington: Academic Press.
- Shuaib, F., Ehiri, J., Abdullahi, A., Williams, J., Jolly, P.E. (2010). Reproductive health effects of aflatoxins: A reiview of the Reproductive Toxicology, 29, 262-270.
- Siddappa, V., Kallenahalli, D. y Viswanath, P. (2012). Occurrence of aflatoxin M₁ in some samples of UHT, raw and pasteurized milk from Indian states of Karnataka and Tamilnadu. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 4158-4162.
- Silva, J.C. y Townsend, C.A. (1996). Heterologous expression, isolation, and characterization of versicolorin B synthase from *Aspergillus parasiticus*. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 804-813.
- Simpson, L.B. (1952). Exploration of Land in Central México in the XVI Century. *University of California Press*, Berkeley, Los Ángeles.

- Sirhan, A.Y., Tan, G.H. y Wong, R. (2013). Determination of aflatoxins in food using liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time of flight mass spectrometry (LC-ESI-QTOF-MS/MS). *Food Control*, 31, 35-44.
- Sirot, V., Fremy, J.M. y Leblanc, J.C. (2013). Dietary exposure to mycotoxins and health risk assessment in the second French total diet study. *Food and Chemical Toxicology*, 52, 1-11.
- Sirot, V., Volatier, J.L., Calamassi-Tran, G., Dubuisson, C., Menard, C., Dufour, A., Leblanc, J.C., (2009). Core food of the French food supply: second Total Diet Study. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 26 (5), 623– 639.
- Sizoo, E.A., van Egmond, H.P., (2005). Analysis of duplicate 24-hour diet samples for aflatoxin B₁, aflatoxin M₁ and ochratoxin A. *Food Addit. Contam.* 22 (2), 163– 172.
- Skory, C.D., Chang, P.K., Cary, J.W. y Linz, J.E. (1992). Isolation and characterization of a gene from *Aspergillus parasiticus* associated with the conversion of versicolorin A to sterigmatocystin in aflatoxin biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 3527-3537.
- Skrbic, B., Zivancev, J., Antic, I. y Godula, M. (2014). Levels of aflatoxin M₁ in different types of milk collected in Serbia: Assessment of human and animal exposure. *Food Control* 40, 113-119.
- Smela, M.E., Currier, S.S., Bailey, E.A. y Essigmann, J.M. (2001). The chemistry and biology of aflatoxin B₁ from mutational spectrometry to carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 22, 535-545.
- Smith, J.E., Solomons, G.L., Lewis, C.W. y Anderson, J.G. (1994). *Mycotoxins in Human Nutrition and Health*. En Directorate-General XII Science, Research and Development (Ed.), (pp. 1-300) European Commission.
- Solfrizzo, M., Gambacorta, L., Lattanzio, V.M.T., Powers, S. and Visconti, A. (2011). Simultaneous LC-MS/MS determination of aflatoxin M₁, ochratoxin A,

deoxynivalenol, de-epoxydeoxynivalenol, α and β -zearalenols and fumonisin B₁ in urine as a multi-biomarker method to assess exposure to mycotoxins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401, 2831-2841.

- Soriano del Castillo, J.M. (2007). *Micotoxinas en Alimentos*. España: Ediciones Díaz de Santos.
- Stanley, V.G., Ojo, R., Woldeesenbet, S., Hutchinson, D.H. y Kubena, L.F. (1993). The Use of *Saccharomyces cerevisiae* to Suppress the Effects of Aflatoxicosis in Broiler. *Chicks. Poultry Science*, 72, 1867-1872.
- Steyn, P.S., Vlegaar, R. y Wessels, P.L. (1980). The biosynthesis of aflatoxin and its congeners. En: Steyn, P.S. (Ed.) *The biosynthesis of mycotoxins: A study in secondary metabolism*. (pp. 105-155) New York: Academic Press.
- Stoloff, L., Van Egmond, H. P. y Parks, D. L. (1991). Rationale for the establishment of limits and regulations for mycotoxins. *Food Additives and Contaminants*, 8, 213-222.
- Sulyok, M., Krska, R., y Schuhmacher, R. (2010). Application of an LC-MS/MS based multi-mycotoxin method for the semi-quantitative determination of mycotoxins occurring in different types of food infected by moulds. *Food Chemistry*, 119 (1), 408-416.
- Tabari M, Tabari K, Tabari O. (2013). Aflatoxin M₁ determination in yoghurt produced in Guilan province of Iran using immunoaffinity column and high-performance liquid chromatography. *Toxicol Ind Health*, 29, 72-76.
- Tiwari, B. K., Brennan, C. S., Curran, T., Gallagher, E., Cullen, P. J., y Donnell, C. P. (2010). Application of ozone in grain processing. *Journal of Cereal Science*, 51, 248-255.
- Townsend, C.A., Christensen, S.B. y Trautweink, K. (1984). Hexanoate as a starter unit in polyketide biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 106, 3868-3869.

- Townsend, C.A., McGuire, M., Brobst, W., Graybill, T. L., Pal, K. y Barry, C.E. III. (1991). Examination of tetrahydro- and dihydrobisfuran formation in aflatoxin biosynthesis: from whole cells to purified enzymes. En Petroski, R.J y McCormick, S.P. (Ed.) *Secondary-Metabolite Biogenesis and Metabolism*. (pp. 141-154). New York: Plenum Press.
- Trail, F., Chang, P.K., Cary, J. y Linz, J.E. (1994). Structural and functional analysis of the nor-1 gene involved in the biosynthesis of aflatoxins by *Aspergillus parasiticus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 4078-4085.
- Trail, F., Mahanti, N. y Linz, J. (1995). Molecular biology of aflatoxin biosynthesis. *Microbiology*, 141, 755-765.
- Trucksess, M., Weaver, C., Oles, C., D'Ovidio, K. y Rader, J. (2006). Determination of aflatoxins and ochratoxin A in ginseng and other botanical roots by immunoaffinity column cleanup and liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of AOAC International*, 89, 624–630.
- Trucksess, M.W. (2001). Rapid analysis (thin layer chromatographic and immunochemical methods) for mycotoxins in foods and feeds. En De Koe, W.J., Samson, R.A., Van Egmond, H.P., Gilbert, J y Sabino, J. (Eds.), *Mycotoxins and Phycotoxins in perspective at the turn of the millennium* (pp. 29-40). Wageningen: Ponsen y Looyen.
- Tsakiris, I., Tzatzarakis, M., Alegakis, A., Vlachou, M., Renieri, E. y Tsatsakis, A. (2013). Risk assessment scenarios of children's exposure to aflatoxin M₁ residues in different milk types from the Greek market. *Food and Chemical Toxicology*, 56, 261-265.
- Turner, N.W., Subrahmanyam, S., y Piletsky, S.A. (2009). Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica Acta*, 632 (2), 168–180.
- Turner, P., Collinson, A., Cheung, Y., Gong, Y., Hall, A. y Prentice, A. 2007. Aflatoxin exposure in utero causes growth faltering in Gambian infants. *International Journal of Epidemiology*, 36, 1119–1125.

- Turner, P., Sylla, A., Gong, Y., Diallo, M., Sutcliffe, A. y Hall, A. (2005). Reduction in exposure to carcinogenic aflatoxins by postharvest intervention measures in West Africa: a community-based intervention study. *Lancet*, 365, 1950–1956.
- Unicef (2004) *Low Birth Weight: Country, Regional and Global Estimates*. Unicef, Geneva, Italia.
- Unusan, N. (2006). Occurrence of aflatoxin M₁ in ultra-high-temperature milk. *Food and Chemical Toxicology*, 44 (11), 1897-1900.
- Van Egmond, H. (1989). Current situation on regulations of mycotoxins. Overview of tolerances and status of standart methods of sampling and analysis. *Food Additives and Contaminants*, 6, 139–188.
- Van Egmond, H. (1999). Worldwide Regulations for Mycotoxins. Documento de Trabajo Tercera Conferencia Internacional Mixta FAO/OMS/PNUMA sobre las Micotoxinas. MYC-CONF/99/8a. Túnez, Túnez, 3-6 de marzo de 1999.
- Vandale-Toney, S., Reyes-Vázquez, H., Montaña-Uscanga, A., López-Marroquín, E. y Vega- Castillo, N.E. (1992). Programa de promoción de la lactancia materna en el Hospital General de México: un estudio evaluativo. *Salud Pública de México*, 34, 25-35.
- Wan, N.C. y Hsieh, D.P. (1980). Enzymatic formation of the bisfuran structure in aflatoxin biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 39 (1), 109–112.
- Wang, H., Zhou, X. J., Liu, Y. Q., Yang, H. M., y Guo, Q. L. (2011). Simultaneous determination of chloramphenicol and aflatoxin M₁ residues in milk by triple quadrupole liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (8), 3532–3538.
- Wang, W., Shao, B., Zhu, J., Yu, H., Li, F. (2010). Dietary exposure assessment of some important Fusarium toxins in cereal-based products in China. *Wei sheng yan jiu. J. Hygiene Res*, 39, 709–714.
- Warth, B., Sulyok, M., Fruhmann, P., Mikula, H., Berthiller, F., Schuhmacher,

- R., Hametner, C., Abia, W.A., Adam, G., Froehlich, J., Krska, R. (2012). Development and validation of a rapid multi-biomarker liquid chromatography/tandem mass spectrometry method to assess human exposure to mycotoxins. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 26, 1533–1540.
- Warth, B., Sulyok, M. y Krska, R. (2013). LC-MS-based multibiomarker approaches for the assessment of human. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 405 (17), 5687-5695.
 - Watanabe, C.M.H., Wilson, D., Linz, J.E. y Townsend, C.A. (1996). Demonstration of the catalytic roles and evidence for the physical association of type 1 fatty acid synthases and a polysketide synthase in the biosynthesis of aflatoxin B₁. *Chemistry and Biology*, 3, 463-469.
 - WHO; International Agency for Research on Cancer (IARC). (2002). Monograph on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol. 82. *WHO*. 171-275.
 - Wild, C. P. y Turner, P. C. (2002). The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. *Mutagenesis*, 17, 471–481.
 - Wild, C. P., y Kleinjans, J. (2003). Children and increased susceptibility to environmental carcinogens: evidence or empathy cancer. *Epidemiological Biomarker*, 12, 1389-1394.
 - Wild, C.P. y Hall, A. J. (1996). Epidemiology of mycotoxin-related disease. En Howard, D.H. y Miller, J.D. (Eds.), *The Mycota: VI. Human and Animal Relationships* (pp. 213–227). Berlin: Springer-Verlag.
 - Williams, J.H., Phillips, T.D., Pauline, E.J., Jonathan, K.S., Curtis, M.J. y Deepak, A. (2004). Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *American Journal of Clinical Nutrition*, 80, 1106-1122.
 - Wolshuk, C.P. y Prieto, R. (1998). Genetic organization and function of the aflatoxin B₁. *Federation of European Microbiological Societies, Microbiology Letters*, 160, 169-176.

- Wu, H.C., Santella, R. (2012). The role of aflatoxins in hepatocellular carcinoma. *Hepat. Mon.* 12, 8–16.
- Wu, J., Myers, S., Carson, N., Kid, J., Arwerson, L., Castiglione, *et al.* (1990). A Refined Linkage Map for DNA Markers around the Pericentromeric Region of Chromosome 10. *Genomics*, 8, 461-468.
- Wu, Q., Jezkova, A., Yuan, Z., Pavlikova, L., Dohnal, V., y Kuca, K. (2009). Biological degradation of aflatoxins. *Drug Metabolism Reviews*, 41, 1-7.
- Yabe, K., Ando, Y. y Hamasaki, T. (1991b). A metabolic grid among versiconal hemiacetal acetate, versiconal acetate, versiconol and versiconal during aflatoxin biosynthesis. *Journal of General Microbiology*, 137, 2469-2475.
- Yabe, K., Ando, Y., Hashimoto, J. y Hamasaki, T. (1989). Two distinct O-methyltransferases in aflatoxin biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 2172-2177.
- Yabe, K., Matsuyama, Y., Ando, Y., Nakajima, H. y Hamasaki, T. (1993). Stereochemistry during aflatoxin biosynthesis: conversion of norsolorinic acid to averufin. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 2486-2492.
- Yabe, K., Nakamura, M. y Hamasaki, T. (1999). Enzymatic formation of G-group aflatoxins and biosynthetic relationship between G and B group aflatoxins. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 3867-3872.
- Yabe, K., Nakamura, Y., Nakajima, H., Amdo, Y. y Hamasaki, T. (1991a). Enzymatic Formation of G-Group Aflatoxins and Biosynthetic Relationship between G- and B-Group Aflatoxins. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 1340-1345.
- Yiannikouris, A. y Jouny, J. (2002). Micotoxins in feeds and their fate in animals: a review. *Animal Research*, 51, 81–99.
- Yoon, Y. y Baek, Y.J. (1999). Aflatoxin binding and antimutagenic activities of *Bifidobacterium bifidum* HY strains and their genotypes. *Korean Journal of Dairy Science*, 21, 291-298.

- Yousef, A., Osman, N., Yousif, Z. y Trad, O. (2004). Morbidity in neonates of mothers who have ingested aflatoxins. *Annals of Tropical Paediatrics*, 24, 145–151.
- Youssef, A.E. y Marth, E.H. (1986). Use of ultraviolet energy to degrade aflatoxin M₁ in raw or heated milk with and without added peroxide. *Journal of Dairy Science*, 69, 2243-2247.
- Yu, F.L., Geronimo, I.H., Bender, W., Permthamsin, J. (1988). Correlation studies between the binding of aflatoxin B₁ to chromatin components and the inhibition of RNA-synthesis. *Carcinogenesis*, 9, 527–532.
- Yu, J., Bhatnagar, D. y Cleveland, T. E. (2004). Completed sequence of Aflatoxin pathway gene cluster in *Aspergillus parasiticus*. *Federation of European Biochemical Societies, letters*, 23, 126–130.
- Yu, J., Bhatnagar, D. y Ehrlich, K.C. (2002). Aflatoxin biosynthesis. *Revista Iberoamericana de Micología*, 19, 191–200.
- Yu, J., Cary, J.W., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Keller, N.P. y Chu, F.S. (1993). Cloning and characterization of a cDNA from *Aspergillus parasiticus* encoding an O-methyltransferase involved in aflatoxin biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 3564-3571.
- Yu, J., Chang, P.K., Bhatnagar, D. y Cleveland, T.E. (2000). Genes encoding cytochrome P450 and monooxygenase enzymes define one end of the aflatoxin pathway gene cluster in *Aspergillus parasiticus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53, 583-590.
- Yu, J., Chang, P.K., Cary, J.W., Wright, M., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., *et al.* (1995). Comparative mapping of aflatoxin pathway gene clusters in *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 2365–2371.
- Yu, J., Wang, Z., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. y Zhang, L. (2003). PUMA mediates the apoptotic response to p53 in colorectal cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 1931-1936.

- Yu, M.W., Lien, J.P., Chiu, Y.H., Santella, R.M., Liaw, Y.F. y Chen, C.J. (1997). Effect of aflatoxin metabolism and DNA adduct formation on hepatocellular carcinoma among chronic hepatitis B carriers in Taiwan. *Journal of Hepatology*, 27, 320–330.
- Zaika, L.L. y Buchanan, R.L. (1987). Review of compounds affecting the biosynthesis of aflatoxins. *Journal of food protection*, 50, 691-708.
- Zain, M. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15, 129-144.
- Zheng, Z., Hanneken, J., Houchins, D., King, R. S., Lee, P. y Richard, J. L. (2005). Validation of an ELISA test kit for the detection of ochratoxin A in several food commodities by comparison with HPLC. *Mycopathologia*, 159, 265–272.
- Zheng, Z., Houchins, D., Ung, J. y Richard, J.L. (2004). Validation of an ELISA test kit for the detection of deoxynivalenol in several food commodities. New horizon of mycotoxicology for assuring food safety. *Proceedings of International Symposium of Mycotoxicology, Kag*, 2003, 295–302.
- Zheng, Z., Humphrey, C. W., King, R. S. y Richard, J. L. (2005). Validation of an ELISA test kit for the detection of total aflatoxins in grain and grain products by comparison with HPLC. *Mycopathologia*, 159, 255–263.
- Zinedine, A. y Mañes, J. (2009). Occurrence and legislation of mycotoxins in food and feed from Morocco. *Food Control*, 20, 334–344.
- Zinedine, A., Blesa, J., Mahnine, N., El Abidi, A., Montesano, D., y Mañes, J. (2010). Pressurized liquid extraction coupled to liquid chromatography for the analysis of ochratoxin A in breakfast and infants cereals from Morocco. *Food Control*, 21, 132-135.
- Zinedine, A., González-Osnaya, L., Soriano, J.M., Molto, J.C., Idrissi, L. y Manes, J. (2007). Presence of Aflatoxin M₁ in Pasteurized Milk from Morocco. *International Journal of Food Microbiology*, 114 (1), 25-29.

- Zöllner, P. y Mayer-Helm, B. (2006). Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography-atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1136, 123–169.