

OCURRENCIA DE AFLATOXINA M₁ EN LECHES CRUDA, ULTRAPASTEURIZADA Y ORGÁNICA PRODUCIDAS Y COMERCIALIZADAS EN EL ALTIPLANO MEXICANO

J. Pérez¹, R. Gutiérrez¹, S. Vega^{1*}, G. Díaz¹, G. Urbán¹, M. Coronado¹ y A. Escobar²

¹Departamento de Producción Agrícola y Animal. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, México, D. F. ^{1*}E-mail: svega@correo.xoc.uam.mx; ²Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, La Habana, Cuba

RESUMEN: Muestras de leche procedentes del Altiplano Mexicano (9 cruda, 20 ultrapasteurizada y 15 orgánica) fueron analizadas para determinar la presencia de aflatoxina M₁ empleando columna de extracción de fase sólida (C18), prederivatización con ácido trifluoracético y cromatografía líquida acoplada a un detector fluorescente. Los resultados mostraron que el 59% de las muestras presentaron niveles de aflatoxina M₁ y todos los casos se encontraron por encima del límite máximo de residuo de 0.05 µg/Kg propuesto por la Unión Europea. Las medianas de aflatoxina M₁ encontradas en muestras de leche cruda, ultrapasteurizada y orgánica fueron 16.21; 16.1 y 23.1 µg/Kg respectivamente. El porcentaje de muestras por encima del límite máximo de residuo fue menor en leche de producción orgánica (20%) comparada con las leches crudas y ultrapasteurizadas que estuvieron por encima del 50 y 60% respectivamente.

(Palabras clave: aflatoxina M₁; leche orgánica; México)

OCCURRENCE OF AFLATOXIN M₁ IN RAW, ULTRAPASTEURIZED AND ORGANIC MILKS PRODUCED AND MARKETING IN MEXICO

ABSTRACT: Milk samples coming from the central zone of Mexico (9 raw, 20 ultrapasteurized (UHT) and 15 organic) were surveyed for determining the presence of aflatoxin M₁ using a solid phase extraction column (C18), prederivatization with trifluoroacetic acid and liquid chromatography coupled to a fluorescence detector. Analytical results showed that the 59% of the samples was contaminated with aflatoxin M₁ and all the cases were above the maximum level of 0.05 µg/Kg set by the European regulations for aflatoxin M₁ in liquid milk. The medians of aflatoxin M₁ found in raw, ultrapasteurized and organic milk samples were 16.21; 16.1 and 23.1 µg/Kg respectively. The percentage of samples above the maximum limit of residual was smaller in organic milk production (20%) compared with the raw and ultrapasteurized milks that were respectively above the 50 and 60%.

(Key words: aflatoxin M₁; organic milk; Mexico)

INTRODUCCIÓN

Cuando los rumiantes consumen alimentos contaminados con aflatoxinas del tipo B y G, estas son metabolizadas y excretadas en la leche como aflatoxinas M₁ y M₂ (2, 37; 16). La Agencia Internacional de Investigaciones de Cáncer (IARC) ha reportado a las aflatoxinas B₁ y M₁ como posible carcinógenos

humanos (19), estos reportes conjuntamente con otros que han demostrado el efecto tóxico de las aflatoxinas han llevado a que se establezcan límites máximos de residuo (LMR) en alimentos. La Unión Europea (UE) ha establecido un LMR para la aflatoxina M₁ en leche y productos lácteos de 0.05 µg/Kg (11), mientras el Codex Alimentarius de la FAO y la FDA de los Estados Unidos han propuesto valores de 0.5 µg/Kg (6; 42).

En el ámbito mundial son múltiples los reportes sobre la presencia de aflatoxina M_1 en leche y productos lácteos desde hace más de tres décadas (40, 48, 26, 35, 28, 27, 37, 33, 38, 7), tema que no ha perdido su vigencia, si se considera que la inocuidad alimentaria constituye hoy la prioridad principal de muchos países y de organismos internacionales (12).

En países de América Latina y el Caribe en la última década se ha reportado la presencia de aflatoxina M_1 en leche y productos lácteos (quesos), algunos de ellos son Argentina (24), Brasil (31, 37); Colombia (9), México (23, 4, 5) y en Trinidad y Tobago (30). En la mayor parte de los informes se evidenció una incidencia alta de aflatoxina M_1 en muestras analizadas, pero con porcentajes bajos de muestras con niveles de concentración superiores al propuesto por la UE (10).

En México los estudios de aflatoxina M_1 fueron realizados en el periodo entre 1996-1998 (5) y se desconoce como su comportamiento en los últimos años, además esto se agudiza ya que se ha mencionado que más del 25% de la producción de las cosechas de alimentos a nivel mundial están contaminadas con algún tipo de micotoxinas. Es de destacar que la agricultura orgánica está adquiriendo también creciente importancia en varios países en desarrollo, entre ellos México con la producción de diversos productos, entre lo que se destacan: café, granos de maíz azul y blanco, ajonjolí, hortalizas, maguey y otros (39). La ganadería orgánica recién comienza y los alimentos orgánicos constituyen una actividad comercial con buenas perspectivas a largo plazo (20,21); la definición de leche orgánica aun no se ha establecido, pero lo que se considera hasta ahora es que dicha leche proviene de una ganadería que cumple con un conjunto de requisitos y condiciones como son respeto al medio ambiente y a los animales, se evita el uso de agroquímicos y medicamentos sintéticos. El cumplimiento de estas medidas puede ser verificado por agencias certificadoras (3).

La producción anual se desconoce, pero se sabe que la superficie de la producción orgánica en México, creció de 25 000 a 220 000 hectáreas en el periodo de 1994 al 2004. De esas, alrededor del 80% están certificadas y el restante 20% en proceso de certificación (46). La superficie mundial dedicada a la producción orgánica alcanza las 22 811 267 hectáreas de las cuales el 21,4 % se encuentra en América Latina. El país que más hectáreas tiene en producción orgánica es Argentina que paradójicamente es el tercer lugar con 1.84% del total de su superficie agropecuaria, ocupando el primer lugar Uruguay con un 4% (18).

Pocas investigaciones se han conducido para evaluar la inocuidad de los alimentos orgánicos (25). En la producción orgánica no está autorizado el uso de fungicidas, por lo que es posible que aparezcan las micotoxinas como contaminantes naturales en los alimentos cuando existen condiciones climáticas propicias y, no se cumplen las buenas prácticas agrícolas de manejo y de almacenamiento. Lo anterior constituye un peligro para el sistema de producción de leche orgánica. En estudios realizados en leche orgánica y quesos producidos de la misma se ha reportado la presencia de aflatoxina M_1 (44; 17; 46).

Fue objetivo de este trabajo evaluar la presencia de aflatoxina M_1 en muestras de leche cruda, ultrapasteurizada y orgánica producidas y comercializadas en el Altiplano Mexicano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Un total de 35 muestras de leche ultra pasteurizadas de las cuales 15 fueron orgánicas, se obtuvieron en diferentes supermercados de la Ciudad de México durante el periodo de octubre del 2006 a febrero del 2007, además 9 muestras de leche cruda se colectaron en zonas de la Ciudad de México y Texcoco en el mismo periodo. La leche cruda se transportó al laboratorio en frascos plásticos en nevera con hielo y se almacenó a 4°C hasta su análisis. Todas las muestras fueron tomadas bajo las pautas establecidas en la Guía para el Muestreo de Leche y Productos Lácteos (29) y analizadas antes de la fecha de su vencimiento.

Las muestras de leche fueron analizadas para determinar su contenido de aflatoxina M_1 por HPLC con detector de fluorescencia de acuerdo a lo establecido en el método 986.16 de la AOAC (1). La aflatoxina M_1 se extrajo de la leche previamente diluida y caliente a 80°C sobre una columna de extracción de fase sólida C18, se lavó la columna con agua:acetonitrilo (95:5 v/v) y se eluyó la Aflatoxina M_1 con éter dietílico sobre otra columna de sílica gel (40-120 mesh), seguidamente se eluyó con diclorometano:metanol (95:5 v/v). La Aflatoxina M_1 extraída con diclorometano:metanol se llevó a sequedad por roto evaporación. Al residuo seco se le adicionaron 100 μ L de hexano y se agitó en vortex por 1 minuto, posteriormente se agregaron 50 μ L de ácido trifluoroacético (TFA), se agitó nuevamente en vortex por 1 minuto y se colocó en baño térmico a 40 °C por 30 minutos. Posteriormente se evaporó bajo nitrógeno y se resuspendió en 500 μ L de la fase móvil para su análisis por HPLC. Del estándar de aflatoxina M_1 se tomaron 50 μ L de la concentración conocida y se procedió de la misma forma anteriormente descrita.

Se empleó un cromatógrafo líquido de la firma comercial Merck-Hitachi con detector fluorescente (longitud de excitación y emisión de 365 y 425 nm respectivamente) y una columna de fase reversa (Lichrocart100 C18 5µm 250x0.4 cm), como fase móvil se empleó una mezcla de acetonitrilo:metanol:agua en una proporción de 20:20:60 v/v/v, el flujo fue 1 mL/min y se aplicaron 50 µL de estándar de referencia o de la muestra previamente filtrada por 0.45µm de diámetro de poro. Los cromatogramas fueron registrados usando una interfase Perkin Elmer NCI 900 y procesados con el software TOTALCHROM (Versión 6.2).

Todos los reactivos utilizados fueron de calidad reactivo de la firma comercial Burdick & Jackson y los disolventes metanol y acetonitrilo fueron grado HPLC. El ácido trifluoroacético fue de JT Baker calidad HPLC. El patrón comercial de aflatoxina M_1 fue suministrado por Sigma-Aldrich (Sigma, St Louis MO, USA) se diluyó en acetonitrilo benceno (90:10 v/v) y se comprobó su concentración midiendo su densidad óptica a 350 nm acorde con lo planteado en la AOAC (1) (Method 971.22 a-Preparación de soluciones y b-Determinación de la concentración). La columna Lichrocart RP18 (250-4.6 mm di 5µm) fue obtenida de Merck (Darmstadt Germany) y la columna de extracción de fase sólida C18 (5g) fue conseguida de Phenomenex (StratTM).

Se evaluó la eficacia del método analítico evaluando la linealidad en un intervalo de 0.1 a 1 µg/mL por triplicado en cada punto y el recobrado en muestras de leche empleando un nivel de contaminación de 40 ng/g.

Linealidad: Se procesaron cuatro concentraciones en un intervalo de 0.1, 0.25, 0.5 y 1.0 µg/mL del patrón de referencia por triplicado para determinar la pendiente, el intercepto y el coeficiente de determinación entre el área y la concentración del analito.

Para la determinación del límite de detección y cuantificación (LD, LC) se procesaron curvas en el intervalo de la determinación (0.1-1µg/mL) y en una cercana al límite de detección (0.05, 0.1 y 0.2 µg/mL) por triplicado en cada uno de los puntos. Se procedió a determinar los valores de LD y LC y se consideraron tres y diez desviaciones estándares del blanco para (n) medidas individuales (Ecuaciones 1 y 2) (34).

$$\text{Límite de detección} = (Y_{bl} + 3 S_{bl}) / b \quad (1)$$

$$\text{Límite de cuantificación} = (Y_{bl} + 10 S_{bl}) / b \quad (2)$$

Donde:

Y_{bl} = Estimado de la respuesta del blanco

S_{bl} = Desviación estándar del blanco

b = Pendiente de la curva de calibración.

Exactitud: Se preparó un nivel de concentración de 40 µg/Kg por triplicado para el análisis de recobrado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se presenta el perfil cromatográfico de las aflatoxinas M_1 y B_1 cuando la muestra es prederivatizada con ácido trifluoroacético, con tiempos de retención de 3.08 ± 0.10 y 5.21 ± 0.10 respectivamente. La curva de calibración ($y = 103281x - 5948.7$) mostró una linealidad significativa ($p < 0.05$) en un intervalo de 0.1 a 1 µg/Kg con un coeficiente de determinación de 0.9982. Los límites de detección y cuantificación fueron 26.5 y 30.1 ng/µL respectivamente. El recobrado (exactitud) de aflatoxina M_1 en leche fue de 91% para un nivel de 40 µg/Kg con una precisión del 5%. Trabajos similares donde se ha empleado este método oficial para la determinación de aflatoxina M_1 en leche muestran límite de detección de 15 ng/Kg, valores de recobrados por encima del 90% y valores de precisión entre 7-9% (16; 48). Las mayores diferencias encontradas fueron en los tiempos de retención debido a cambios en la composición de la mezcla de la fase móvil, las características de la fase reversa empleada en la columna y el flujo empleado, sin embargo estos resultados obtenidos en el laboratorio muestran que el método fue eficiente para evaluar la presencia de aflatoxina M_1 en los niveles que exige la UE y la FDA para 0.05 y 0.5 µg/Kg respectivamente. Además, existe la posibilidad de proponer métodos no oficiales para el análisis de AFM1 y validarlos bajo las pautas indicadas en la Norma ISO 17025, a través de pruebas de proeficiencia e intralaboratorio. Su aplicación se debe hacer en muestras problema, un ejemplo de ello se presenta en el trabajo de Gallo *et al.* (13).

En la Tabla 1 se muestra un resumen del número de muestras en diferentes intervalos de contenidos de aflatoxina M_1 en las muestras de leches cruda, ultrapasteurizada y orgánica producidas y comercializadas en el Altiplano Mexicano, donde el 59.1% de todas las muestras presentaron niveles de aflatoxina M_1 superior al LMR establecido por la UE (10). El 20% de las muestras de leche orgánica presentaron niveles superiores al valor establecido por la UE y la FDA, mientras que los porcentajes de las muestras de leche cruda y ultrapasteurizada fueron 66 y 50%, respectivamente.

Los resultados logrados difieren a lo informado por Carvajal *et al.* (4) para leches pasteurizada y

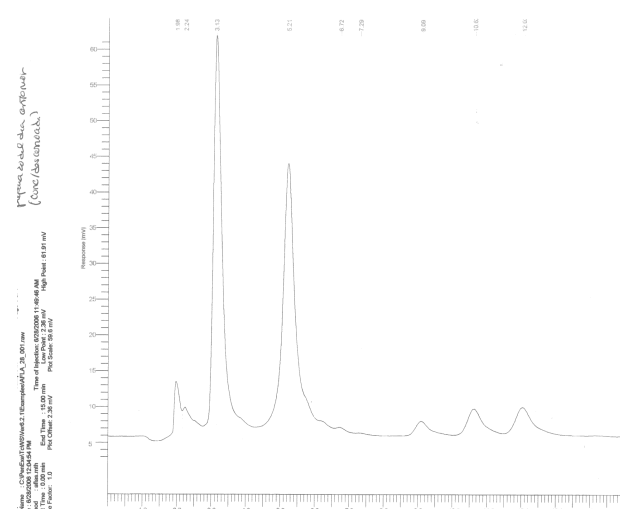


FIGURA 1. Perfil cromatográfico de las derivatizaciones de Aflatoxina M_1 y B_1 con ácido trifluoroacético./ *Chromatography profile of aflatoxins M_1 and B_1 derivatized with trifluoroacetic acid.*

ultrapasteurizada. Estos investigadores encontraron contenidos de AFM1 mayores a 0.05 $\mu\text{g/Kg}$ en 13% de sus muestras estudiadas ($n = 290$), en tanto que en este estudio el 52.3% de las muestras ($n = 44$) presentaron niveles superiores a 0.05 $\mu\text{g/Kg}$, incluso la leche con categoría de orgánica presentó en 20% de los casos ($n = 15$) valores superiores al límite señalado, lo cual pone en evidencia que la presencia de aflatoxina M_1 en leche es una problemática actual en México.

Otros estudios realizados en los últimos 7 años en países como Brasil (16; 31); Colombia (9); Italia (13; 14; 32); Grecia (36) y Corea (22), manifiestan incidencia alta de aflatoxina M_1 en muestras de leche y productos lácteos (>75%), sin embargo los niveles de concentración (ng/Kg) son bajos y no sobrepasan en muchos de los casos los límites establecidos por la UE. En este trabajo no obstante presentar una inci-

dencia del 50%, las medianas obtenidas para las muestras de leches cruda y ultra pasteurizada fueron mayores al LMR. Una posible causa de estos valores pueden ser las variaciones de la humedad relativa en el ambiente, que favorecen la presencia de hongos toxigénicos en los alimentos destinados al consumo animal. Otro factor que influye en los resultados obtenidos, pudo tener como origen el consumo de granos y concentrados, donde existe una probabilidad de la presencia de estas toxinas en los mismos. La presencia de micotoxinas en México en alimentos del consumo animal y humano ha sido reportada por varias décadas (15; 8; 41; 23).

En estudios anteriores se ha podido constatar que concentraciones bajas de aflatoxina M_1 pueden deberse a la dilución de lotes altamente contaminados con numerosos lotes libres o con bajos niveles de contaminación con aflatoxina M_1 , que hace que aparezca una incidencia alta con bajos niveles (32; 33).

Los análisis realizados en muestras de leche orgánica mostraron un valor de su mediana superior a los registrados para las leches cruda y pasteurizada (Tabla 2), esto pudo deberse a que el factor de dilución a que fue sometido la muestra es mucho menor, sin embargo su incidencia solo fue del 20% (Tabla 1). Los hallazgos están en correspondencia con los encontrados por otros autores, donde se plantea que la frecuencia de aparición de leche orgánica debe ser menor al resto de la leche, siempre y cuando se cumplan las buenas prácticas agropecuarias (43; 44). La producción de leche orgánica representa una opción para la agroindustria, ya que un sector de los consumidores ha modificado en los últimos años sus preferencias, en la búsqueda por encontrar en el mercado alternativas que no representan riesgos a corto y a largo plazo para su salud. No obstante, es probable que aun cuando los productores de leche cumplan con las características de la producción orgánica aprobadas y establecidas por organismos certificadores,

TABLA 1. Frecuencias de ocurrencia de aflatoxina M_1 en leches cruda, ultrapasteurizada y orgánica por intervalo de concentración ($\mu\text{g/Kg}$)./ *Frequencies of aflatoxin M_1 occurrence in raw, ultrapasteurized and organic milk by concentration range ($\mu\text{g/Kg}$)*

	nd-0.05	0.051-0.49	0.5-9.9	10-50	>50
L. ultrapasteurizada (n=20)	8	1	1	7	3
L. orgánica (n=15)	9	1	2	2	1
L. cruda (n=9)	1	1	1	5	1
SUMA	18	3	4	14	5
Porcentaje (%)	40.9	6.8	9.0	32.0	11.3

nd : no detectado

TABLA 2. Valores de las medianas, mínimos y máximos de los contenidos de aflatoxina M_1 ($\mu\text{g/Kg}$) en muestras de leches cruda, ultrapasteurizada y orgánica comercializadas en el Altiplano Mexicano./ *Values of the medians, maximum and minimum of aflatoxin M_1 ($\mu\text{g/Kg}$) in raw, ultrapasteurized and organic milk samples marketed in the central zone of Mexico*

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

la aflatoxina M_1 y otras sustancias tóxicas puedan estar presentes en la leche y alimentos orgánicos (45). Este estudio demuestra que la leche orgánica no está exenta de contaminarse con micotoxinas.

Debido a la alta incidencia de aflatoxina M_1 encontrada en el presente estudio en muestras de leche comercializadas en el Altiplano Mexicano se recomienda desarrollar un programa de pesquiasje permanente con la meta de prevenir lotes de leche contaminadas con niveles de aflatoxina M_1 por encima del nivel regulatorio establecido en México ($0.5 \mu\text{g/Kg}$) que evite que la misma pase a la cadena alimentaria.

REFERENCIAS

1. AOAC (1995): Aflatoxins M_1 y M_2 in fluid milk. Liquid Chromatographic Method. Method 986.16 En: *Official Method of Analysis of AOAC International 16th Edition* Volumen II Ed. Patricia Cunniff Cap. 49 Natural Toxin Peter M. Scott. Pag. 34-35.
2. Battacone, G.; Nudda, A.; Palomba, M.; Pascale, M.; Nicolussi, P. y Pulina, G. (2005): Transfer of aflatoxin B_1 from feed to milk and from milk to curd and whey in dairy sheep fed artificially contaminated concentrates. *J Dairy Sci.* 88(9): 3063-9.
3. Brunnet, L.; García, L.; Vega, S.; De León, F. y Castillo, H. (2003) La producción de leche orgánica, una primera aproximación documental. En: Cavallotti B., Palacios B. En: Ganadería mexicana en el nuevo milenio. Situación, alternativas productivas y nuevos mercados. Universidad Autónoma Chapingo, Estado de México. pp. 231-239.
4. Carvajal, M.; Rojo, F.; Méndez, I. y Bolaños, A. (2003a): Aflatoxin B_1 and its interconverting metabolite aflatoxicol in milk: the situation in Mexico. *Food Addit Contam.* 20(11):1077-86.
5. Carvajal M.; Bolaños A.; Rojo F. y Méndez I. (2003b): Aflatoxin M_1 in pasteurized and ultrapasteurized milk with different fat content in Mexico. *J Food Prot.* 66(10): 1885-92.
6. Codex Alimentarius (1988): General Standard for Contaminants and Toxins in Foods. Codex Standard 193-195. Annex IV-B (Rome: Food and Agriculture Organization and World Health Organization of the United Nations). P. 45.
7. Cohen, H.; Lapointe, M. y Fremy, J.M. (1984) Determination of aflatoxin M_1 in milk by liquid chromatography with fluorescence detection. *J Assoc Anal Chem.* 67: 49-51.
8. Cortes-Rocha, M.O.; Ramírez-Astudillo, W.R.; Sánchez-Mariñez, R.I.; Rosas-Burgos, E.C.; Wong-Corral, F.J.; Borboa-Flores, J.; Castellón-Campaña, L.G.; Tequida-Meneses, M. (2003) Fumonisin and fungal species in corn from Sonora Mexico. *Bull Environ Contam Toxicol.* 70: 668-673.
9. Diaz, G.J. y Espitia, E. (2006): Occurrence of aflatoxin M_1 in retail milk samples from Bogota, Colombia. *Food Addit Contam.* 23(8): 811-5.
10. EC reg N466/01 *Official Journal of the European Communities* L313:30 November 2001.
11. Elgerbi, A.M.; Aidoo, K.E.; Candlish, A.A. y Tester, R.F. (2004) Occurrence of aflatoxin M_1 in randomly selected north African milk and cheese. *Food Addit Contam.* 21(6): 592-7.
12. FAO (2000): Inocuidad y calidad de los alimentos en relación con la agricultura orgánica 22^a Conferencia Regional de la FAO para Europa. Oporto, Portugal, 24-28 de julio de 2000.
13. Gallo, P.; Salzillo, A.; Rossini, C.; Urbani, V. y Serpe, L. (2006) Aflatoxin M_1 determination in milk: Method validation and contamination levels in samples from southern Italy. *Ital. J Food Sci.* 3(18):251-259.
14. Galvano, F.; Galofaro, V.; Ritieni, A.; Bognanno, M.; De Angelis, A.; Galvano, G. (2001): Survey of the occurrence of aflatoxin M_1 in dairy products

- marketed in Italy: Second year of observation. *Food Addit Contam.* 18: 644.
15. Garcia, S. y Heredia, Norma (2006): Mycotoxins in Mexico: Epidemiology, management, and control strategies. *Mycopathology.* 162: 255-264.
 16. Garrido, N.S.; Iha, M.H.; Santos Ortolani, M.R.; Duarte, F. (2003): Occurrence of aflatoxins M₁ and M₂ in milk commercialized in Ribeirao Preto SP Brazil. *Food Addit Contam.* 20(1): 70-3.
 17. Ghidini, S.; Zanardi, E.; Battaglia, A.; Varisco, G.; Ferretti, E.; Campanini, G.; y Chizzolini, R. (2005) Comparison of contaminant and residue levels in organic and conventional milk and meat products from northern Italy. *Food Addit Contam.* 22(1):9-14.
 18. Gudynas, E. (2003): Producción orgánica en América Latina, crecimiento sostenido con énfasis exportador En: Observatorio del Desarrollo. CLAES Centro Latino Americano de Ecología Social www.ambiental.net
 19. IARC (International Agency for Research on Cancer) (1997): Naturally occurring aflatoxins (Group1), aflatoxin M₁ (Group 2B) 08/21/1997. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some Naturally Occurring Substances: Food Tems and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. Vol. 56 (Lyon: IARC), 5.1-5.5.
 20. IFOAM (2000): Statistics Central y Eastern Europe; http://www.ifoam.de/statistics/statistics_ee.htm
 21. ITC (1999): Product and Market Development. Organic Food and Beverages. World Supply and Major European Markets. Geneva.
 22. Kim, E.; 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 Addit Contam.* 17:59-64.
 23. López, J.; Carvajal, M.; Ituarte, B. (1995): Supervising programme of aflatoxin in Mexica corn. *Food Addit Contam.* 12(3): 297-312.
 24. López, C.; Ramos, L.; Ramadán, S.; Bulacio, L. y Perez, J. (2001): Distribution of aflatoxin M₁ in cheese obtained from milk artificially contaminated. *Int J Food Microbiol.* 64: 211.
 25. Malmauret, L.; Parent-Massin, D.; Hardy, J.L. y Verger, P. (2002): Contaminants in organic and conventional foodstuffs in France. *Food Addit Contam.* 19: 524-532.
 26. Manetta, A.C.; Di Giuseppe, L.; Giammarco, M.; Fusaro, I.; Simonella, A.; Gramenzi, A. y Formigoni, A. (2005): High-performance liquid chromatography with post-column derivatisation and fluorescence detection for sensitive determination of aflatoxin M₁ in milk and cheese. *J Chromatogr A.* 1083(1-2): 219-22.
 27. Martins, M.L. y Martins, H.M. (2004): Aflatoxin M₁ in yoghurts in Portugal. *Int J. Food Microbiol.* 91(3): 315-7.
 28. Nakajima, M.; Tabata, S.; Akivama, H.; Itoh, Y.; Tanaka, T.; Sunagawa, H.; Tyona, T.; Yoshizawa, T. y Kumagai, S. (2004): Occurrence of aflatoxin M₁ in domestic milk in Japan during the winter season *Food Addit Contam.* 21(5): 472-8.
 29. Norma Mexicana NMX-F-718-COFOCALEC-2006. Sistema producto leche- Producto leche- Alimentos- Lácteos- Guía para el muestreo de leche y productos lácteos. México. P. 31.
 30. Offiah, N. y Adesiyun, A. (2007): Occurrence of aflatoxins in peanuts, milk, and animal feed in Trinidad. *J Food Prot.* 70(3): 771-5.
 31. Oliveira, C.A.; Rosmaninho, J. y Rosim R. (2006): Aflatoxin M₁ and cyclopiazonic acid in fluid milk traded in Sao Paulo, Brazil. *Food Addit Contam.* 23(2): 196-201.
 32. Palermo, D.; Palermo, C. y Rotunno T. (2001): Survey of aflatoxin M₁ level in cow milk from Puglia Italy. *Ital J Food Sci.* 4(13): 435-442.
 33. Panariti, E. (2001): Seasonal variations of aflatoxina M₁ in the farm milk in Albania. *Arh Hig Rada Toksikol.* 52(1): 37-41.
 34. Quattrocchi, O.A.; Abelaira, Sara I. y Felipe, R. (1992): Validación de métodos En: Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica. Ed Artes Gráficas Farro SA. Buenos Aires, Cáp. 12. Pág. 301-328.
 35. Rodríguez Velazco, M.L.; Calonge Delso, M.M. y Ordóñez, E. (2003): ELISA and HPLC determination of the occurrence of aflatoxin M₁ in cow's raw milk. *Food Addit Contam.* 20(3): 276-280.

36. Roussi, V.; Govaris, A.; Varagouli, A. y Botsoglou, N.A. (2002): Occurrence of aflatoxin M₁ in raw milk market milk commercialized in Greece. *Food Addit Contam.* 19: 863-868.
37. Sassahara, M.; Pontes Netto, D. y Yanaka, E.K. (2005): Aflatoxin occurrence in foodstuff supplied to dairy cattle and aflatoxin M₁ in raw milk in the north of Parana state. *Food Chem Toxicol.* 43(6): 981-4.
38. Scott, P. (1989): *Mycotoxigenic fungal contaminants of cheese and other dairy products. Mycotoxins in Dairy Products*, edited by H.P. van Egmond (New York: Elsevier). Pp. 193-259.
39. SIAP (2007): Análisis Agropecuario Productos Orgánicos. www.siap.sagarpa.gob.mx/InfOMer/analisis/organico.html consultado julio/2007.
40. Tajkarimi, M.; Shojaee Aliabadi, F.; Salah Nejad, M.; Pursoltani, H.; Motallebi, A.A. y Mahdavi, H. (2007): Seasonal study of aflatoxin M₁ contamination in milk in five regions in Iran. *Int J Food Microbiol.* 116(3): 346-9.
41. Torres Espinosa, E.; Acuña, A.K.; Torres, N.L.R.; Montoya, O.R. y Castrellón, S.A.J.P. (1995): Quantification of aflatoxin in corn distributed in the city of Monterrey, Mexico. *Food Addit Contam.* 12(3): 383-386.
42. US Food and Drug Administration (FDA). (1996): Sec. 527.400 whole milk, low fat skim milk-aflatoxin M₁ (CPG 7106.210). FDA Compliance Policy Guides (Washington D.C.: FDA). p. 219.
43. Valeeva, N.I.; Meuwissen, P.M.; Oude-Lansink, A.G.J.M.; Huirne, R.B.M. (2005): Improving food safety within the Dairy Chain: An Application of conjoint analysis. *J Dairy Sci.* 88: 1601-1612.
44. Vallone, L.; Boscarol y Dragoni, I. (2006): Aflatoxins in Organic Milk and Dairy Products. *Vet Res Communications.* 30 (Suppl 1): 369-370.
45. Vega, S.; Coronado, M.; Gutiérrez, R.; Díaz, G.; Salas, J.; Pérez, J.; Ramírez, A. y Ramírez, L. (2007): Calidad e inocuidad de alimentos orgánicos y la contaminación ambiental. *Industria Alimentaria.* 29(3): 10-17.
46. Woese, K.; Lange, D.; Boess, C. y Bögl, K.W. (1997): A comparison of organically and conventionally grown foods - results of a review of the relevant literature. *J Sci Food Agric.* 74: 281-293.
47. Zamorano, J. (2005): Evolución y perspectivas de la agricultura orgánica en México. En: *Claridades Agropecuarias.* 140: 3-19.
48. Zinedine, A.; Gonzalez-Osnaya, L.; Soriano, J.M.; Molto, J.C.; Idrissi, L. y Manes, J. (2007): Presence of aflatoxin M₁ in pasteurized milk from Morocco. *Int J Food Microbiol.* 28; 114(1): 25-9.

(Recibido 5-9-2007; Aceptado 8-2-2008)