

DEPÓSITO LEGAL ppi 201502ZU4666

*Esta publicación científica en formato digital
es continuidad de la revista impresa*

ISSN 0041-8811

DEPÓSITO LEGAL pp 76-654

Revista de la Universidad del Zulia



Fundada en 1947
por el Dr. Jesús Enrique Lossada

Ciencias
Exactas
Naturales
y de la
Salud

Año 5 N° 12

Mayo - Agosto 2014

Tercera Época

Maracaibo - Venezuela

Detección de Aflatoxina M₁ en muestra de leche cruda y pasteurizada en el ganado vacuno de Mene Mauroa. Región Occidente de Venezuela

*Zoraida Medina**

Gresly Castro

Astrid Salcedo

Ricardo Alonso Silva

Marynés Montiel

RESUMEN

Las aflatoxinas son metabolitos tóxicos inmunosupresores y carcinógenos producidas en el metabolismo secundario de especies de *Aspergillus* (*A. flavus* y *A. parasiticus*, particularmente). En Mene Mauroa, el ganado vacuno es sustentado con alimento industrializado, vegetal fresco o combinaciones de ambas, esta última sobre todo durante la sequía. El objetivo de esta investigación se basó en detectar niveles de Aflatoxina M₁ en muestra de leche cruda y pasteurizada de ganado vacuno de Mene Mauroa de la Región Occidente de Venezuela. Los niveles de aflatoxina M₁ se midieron, mediante el método de Microelisa Rida screen Aflatoxin M₁, donde se procesaron 60 muestras de leche (30 de leche cruda y 30 de leche pasteurizada). Estas muestras se obtuvieron de cuatro

*Unidad de Investigaciones en Microbiología Ambiental (UIMA).
E-mail: zoraidamedina@hotmail.com

fincas que sustentaron al ganado vacuno con alimento vegetal (F1), comercializado (F2) y dos de ellas con ambas combinaciones (F3 y F4). En todas las muestras analizadas los niveles de aflatoxina M₁ para leche cruda y pasteurizada del ganado vacuno con los distintos sustentos alimentarios estuvieron dentro de los límites permisibles (0,05ppb y 0,5ppb respectivamente) de acuerdo a lo establecido en el *Codex Alimentarius* no representando riesgo a la salud del consumidor.

PALABRAS CLAVE: aflatoxinas, inmunosupresores, carcinógenos, microelisa, *Aspergillus*.

Detection of Aflatoxin M₁ in raw and pasteurized milk of bovine cattle from Mene Mauroa western region of Venezuela

ABSTRACT

The aflatoxins are immunosuppressive and carcinogenic toxic metabolites produced in the secondary metabolism of *Aspergillus* species, such as *A. flavus* and *A. parasiticus*. In Mene Mauroa, the bovine cattle are sustained with industrialized food, fresh vegetables or the combination of both, the latter especially during the drought station. The aim of this research was based on the detection of aflatoxin M1 levels in raw and pasteurized milk of bovine cattle from Mene Mauroa of the Western Region of Venezuela. The levels of aflatoxin M1 were measured by the method of Microelisa Rida screen Aflatoxin M1; where 60 samples of milk (30 of raw milk and 30 of pasteurized milk) were processed. These samples were obtained from 4 farms that sustained the bovine cattle with: vegetable food (F1), commercial food (F2), and 2 of them with the combination of both (F3 and F4). In all the analyzed samples the levels of aflatoxin M1 for raw and pasteurized milk of bovine cattle with the different food livelihoods were within the permissible limits (0,05 ppb and 0,5 ppb, respectively) representing no risk to consumer health, according to how is established in the *Codex Alimentarius*.

KEYWORDS: aflatoxins, immunosuppressiv, carcinogenic, microplate, *Aspergillus*.

Introducción

Las aflatoxinas (AF) son producidas en la etapa final del crecimiento exponencial de una colonia fúngica, son metabolitos secundarios de hongos y presentan un bajo peso molecular (Bolet y Socarras 2005; Martínez *et al* 2011; Landeros *et al* 2012; Reza *et al* 2013); básicamente estas micotoxinas son producidas por hongos del género *Aspergillus* (*A. flavus* y *A. parasiticus*) (Landeros *et al* 2012). Entre sus principales manifestaciones clínicas asociadas a la exposición de estas sustancias se encuentra el daño hepático y renal, mutagénesis, teratogénesis, carcinogénesis, inmunosupresión y citotoxicidad (Landeros *et al* 2012; Martínez *et al* 2011). Los factores para que un alimento sea contaminado con aflatoxinas son numerosos, caracterizados por temperaturas y humedades relativamente altas, condiciones de transporte y almacenamiento inadecuado y secado deficiente, por tanto la contaminación del producto puede ocurrir en cualquier punto de la cadena alimenticia, desde la cosecha, pasando por la recolección, almacenaje, transporte, elaboración y conservación (Requena *et al* 2005; Ortiz, 2009).

Dentro de las aflatoxinas se encuentran los tipos B_1 , B_2 , G_1 y G_2 siendo la B_1 la más importante debido a su toxicidad (Martínez *et al* 2011). Cuando el animal ingiere este tipo de aflatoxina, la misma es biotransformada en el hígado por hidroxilación del carbono 4 a M_1 , siendo tan tóxico como la B_1 que a su vez es excretado en la leche. La cantidad de Aflatoxina M_1 encontrada en leche, generalmente es de 1% a 2% de la AFB_1 ingerida, y puede llegar hasta 6% (Ortiz, 2009; Reyes *et al* 2009).

La presencia de la AFM_1 genera problemas de salud pública ya que es clasificada por la Agencia Internacional de Investigaciones del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) como clase 2B, la cual incluye a las sustancias carcinogénicas para los humanos, además de producir intoxicaciones severas, abortos, vómitos, diarreas y hemorragias internas, y con el tiempo se van acumulando lo cual puede llevar a generar en el individuo enfermedades crónicas (Ortiz, 2009).

Los infantes tienen mayor riesgo de contaminación, ya que la leche se utiliza como fuente primordial en su alimentación, ocurriendo de forma similar con la población de adultos mayores por considerarse una fuente importante de calcio. Este producto de consumo no representa un riesgo para la salud humana, puesto que constituye una fuente nutritiva no superada por ningún otro alimento conocido (Ortiz, 2009), siendo importante su consumo en la población infantil y en los adultos mayores, los cuales no tienen suficientes mecanismos bioquímicos que permitan una adecuada detoxificación. En los niños el cerebro continúa su desarrollo durante muchos años después del nacimiento y esto puede causar una mayor susceptibilidad para que algunos tipos de micotoxinas tengan capacidad de afección al nivel del sistema nervioso central (SNC) (Gimeno, 2011).

En México, analizaron muestras de quesos procedentes de varias industrias por la técnica de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC), donde evidenciaron que todas las industrias queseras presentaron incidencia de AFM₁, los cuales se registraron en mayores porcentajes durante la época de lluvia, aspecto que puede relacionarse con las condiciones climáticas de humedad y temperatura lo cual permite la proliferación de los hongos (Urban *et al* 2009). Así mismo se ha registrado en algunos países de Europa la presencia de aflatoxina (M₁) en muestras de leche y derivados, lo cual también se relaciona a los períodos estacionales, presentándose en este caso durante el período de invierno, factor físico ambiental que permite una mayor proliferación de los hongos ambientales productores de esta toxina (Kamkar, 2005). En un estudio más reciente en Guadalajara, México, se detectó AFM₁ en el 100% de las muestras analizadas con niveles en el rango de < 0.005 a 0.100 µg/L y de < 0.005 a 0.637 µg/L en leche cruda y pasteurizada respectivamente (Landeró *et al* 2012).

En países como México y Europa, se han realizado investigaciones referentes a la detección de esta micotoxina en muestras de leche y sus derivados, en donde sugieren que la misma se presenta de forma frecuente, por lo cual las políticas sanitarias se deben intensificar ante esta problemática de salud pública (Urban *et al* 2009).

Actualmente en Venezuela no hay controles de calidad estrictos sobre la leche y sus derivados frente a la problemática de las micotoxinas, por esta razón el principal objetivo de esta investigación se basó en detectar niveles de Aflatoxina M₁ en muestra de leche cruda y pasteurizada de ganado vacuno de Mene Mauroa de la Región Occidente de Venezuela.

1. Metodología

1.1. Muestras

Con las medidas de asepsia se procesaron una totalidad de 60 muestras de las cuales, 30 fueron de leche líquida cruda (C), obtenidas en cuatro fincas del Municipio Mene Mauroa estado Falcón y 30 muestras de leche líquida pasteurizada (P) obtenidas de expendios comerciales. Para la misma se tomó en consideración, alimento de consumo del ganado bovino, la totalidad de animales existentes, la totalidad de vacas productoras y enfermedades aparentes (Tabla 1).

TABLA 1. Descripción de la muestra

Muestra	Cant	Descripción de la muestra
Finca 1 (F1)	10	ALIMENTO: pasto. 45 vacas productoras de leche. 346 animales en total. Sin enfermedades aparentes. Hora de toma de Muestra 1:13 pm.
Finca 2 (F2)	5	ALIMENTO: alimento concentrado. 13 vacas productoras de leche. 38 animales en total. Sin enfermedades aparentes. Hora de toma de Muestra 1:52 pm.
Finca 3 (F3)	5	ALIMENTO: pasto y alimento concentrado. 11 vacas productoras de leche. 21 animales en total. Sin enfermedades aparentes. Hora de toma de Muestra 2:08 pm.
Finca 4 (F4)	10	Recolecta leche del municipio, para la fabricación de quesos distribuidos en la zona. Hora de toma de Muestra 3:48 pm.
Marca 1 (M1)	17	Tomada de expendio comercial en la zona norte de la ciudad de Maracaibo. Envases de Cartón sometidos a refrigeración.
Marca 2 (M2)	13	Tomada de expendio comercial en la zona sur de la ciudad de Maracaibo. Envases de Cartón sometidos a refrigeración.

De contenedores de aluminio se realizó la colecta de leche líquida cruda en frascos de vidrios estériles de capacidad de 250mL. Para esto, la muestra se agito antes de ser colectada para tener mejor homogenización. Posterior al mismo se colocó en una cava provista de hielo en barra para el mantenimiento de la temperatura y el posterior traslado al laboratorio para su respectivo análisis. Para el análisis, se agito la muestra y se extrajeron 10mL de cada uno de los frascos que contenían la leche colectada por finca, donde fueron colocados en tubos de ensayo estériles.

Para la colecta de la leche pasteurizada se agitó el envase contenedor de 500 y 1000mL, hasta homogeneizarla, luego se extrajeron 5 ml de muestra y se colocaron en tubos estériles. Así mismo, se registraron características básicas como: fecha de vencimiento, lote y marca (COVENIN, 1998).

1.2. Preparación inicial

Cada muestra se centrifugó en una centrifuga modelo DINAC™ III por 10 min/ 3500g/ a una temperatura de 10°C aproximadamente (ésta se obtuvo por refrigeración previa), siguiendo las recomendaciones de la casa comercial Ridascreen Aflatoxin M1 30/15 (R-Biopharm, Alemania). Antes del uso todos los reactivos se mantuvieron a temperatura ambiente (20°C-25°C/68°F-77°F).

1.3. Cuantificación de la AFM₁

Se realizó por el método Microelisa Ridascreen AflatoxinM₁ 30/15 (R-Biopharm, Alemania) (Ortiz, 2009; Reyes *et al* 2009; Fernández *et al* 2000; Celik *et al* 2005), que comprende: colocar suficientes pozos en el soporte de la microplaca, para proceder al análisis de las muestras, en cada pocillo, se añadió 100 microlitros de las muestras procesadas anteriormente. Se mezcló la placa suavemente por rotación y luego se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C) en oscuridad. Posterior a esto, se eliminó el líquido de los pocillos con golpes suaves de la microplaca y se colocó hacia abajo sobre un papel absorbente hasta asegurar la remoción completa del líquido. Posterior a ello, se adicionaron 250 uL de buffer lavado, en los pocillos y este proceso se repitió dos veces en el cual se adicionaron 100 uL del conjugado enzimático diluido para luego mezclar suavemente por rotación manual, y se incubó a temperatura ambiente (20-25 °C) en oscuridad por 15 minutos, de la misma manera se eliminó el líquido de los pocillos y se dejó la microplaca hacia abajo sobre un papel absorbente hasta asegurar la remoción completa del líquido, donde luego se le adicionaron 250 uL de la solución buffer de lavado, repitiendo el procedimiento dos veces más. Nuevamente se agregaron 100 uL del sustrato-cromógeno a cada pozo mezclando suavemente la placa en forma manual, y se incubó a temperatura ambiente (20-25 °C) por 15 minutos, en oscuridad; luego se agregaron 100 microlitros de solución de parada a cada pocillo, y se mezclaron suavemente por rotación manual. Finalmente se leyó la absorbancia a 650 nm, dentro de los 15 minutos posteriores a la adición de la solución pasada, con un lector de Elisa, marca Epson, modelo ELx800.

1.4. Elaboración de la curva patrón.

Se realizó con 6 pozos sensibilizados con anticuerpos anti-aflatoxinas a concentraciones de 0 ppb (estándar 1), 5 ppb (estándar 2), 10 ppb (estándar 3), 20 ppb (estándar 4), 40 ppb (estándar 5), 80 ppb (estándar 6), por duplicado (12). De esta forma se enfrentaron las absorbancias obtenidas en cada muestra con la curva patrón.

2. Resultados y discusión

Como se puede observar en la Tabla 2, la cual hace referencia a la finca 1 (F1), de las diez muestras analizadas, las mismas se encontraban dentro de los parámetros establecidos por la Comisión del *Codex Alimentarius* (2001), donde el límite de AFM₁ en leche cruda y pasteurizada es de 0,05 ppb y 0,5 ppb, respectivamente; el promedio de concentración de esta finca fue de 0,003 ppb.

TABLA 2. Resultados de AFM1 en leche pasteurizada

Marca	Muestra	Ppb
	Promedio M1	0,0075
	Promedio M2	0,021

M1= muestra 1; M2= muestra 2; P= envase de leche pasteurizada

En esta finca las vacas lecheras fueron alimentadas únicamente con pasto, por tanto, es probable que el vegetal fresco sea menos propenso a la contaminación de AFM₁ debido a que no es un sustrato apropiado para el crecimiento de *Aspergillus flavus*. Numerosos estudios han demostrado que las vacas lecheras alimentadas con pasto, están menos expuestas a contaminación por aflatoxinas por tanto no representan un riesgo para la salud del animal y del ser humano, tal como se demuestra en este estudio (Fernández *et al* 2000; López *et al* 2003).

Para la finca dos (F2), como se observa en la Tabla 2, la concentración de AFM₁ tuvo un promedio de 0,030ppb, determinando de esta forma que la misma no sobrepasó los límites establecidos por la UE y la FDA sin embargo, al compararlas con la F1, la misma presentó una mayor concentración de AFM₁.

Cabe destacar que en esta finca las vacas eran alimentadas con alimento concentrado comercial, observándose un incremento del 10% en relación a la concentración de AFM₁ en el alimento concentrado, esto se debe a su disposición de vulnerabilidad de colonización de especies de *Aspergillus flavus* (Celik, 2005; López *et al* 2003; Rahimi *et al* 2012). En Venezuela por ser un país con clima tropical, la alimentación diaria de las vacas productoras de leche es variada, ya que en el año se presentan épocas de sequía extrema donde los pastizales no proveen del alimento necesario para mantener en buenas condiciones al ganado, por tanto los suplementos concentrados desempeñan un papel importante en su dieta ya que permite elevar el consumo total de energía y proteínas del animal.

En otros estudios han demostrado que el consumo de este tipo de alimento (concentrado) aumenta el riesgo de contaminación con AFB₁ llevando a mayor metabolización de AFM₁. En este estudio se demuestra que las concentraciones encontradas de AFM₁ en la leche de vacas que consumían este tipo de alimento, están bajo los parámetros establecidos por la UE y la FDA. Lo cual sugiere que la leche cruda analizada es segura para la elaboración de alimentos derivados. Sin embargo, a pesar de que las concentraciones AFM1 en las leches analizadas se encontraron dentro de los límites establecidos por los organismos reguladores internacionales, se

deben considerar las condiciones climáticas de los distintos países para de esta manera establecer los niveles de concentraciones que sean seguros de AFM₁ (Celik *et al* 2005; Zavieso, 2006; Montaña *et al* 2007).

Es importante que tanto los productores de alimentos para ganadería, como los productores agropecuarios sean conscientes de la importancia que representan las aflatoxinas en relación a la salud pública, por lo que se hace necesario monitorear permanentemente la presencia de estas micotoxinas en los productos de consumo alimenticio (Urban *et al* 2009), sobre todo en las épocas de lluvias, donde algunos estudios realizados han demostrado la presencia e incremento de esta AF durante estos períodos (Urban *et al* 2009), ocurriendo lo mismo en países Europeos durante períodos de inviernos (Urban *et al* 2009).

En la F3, los resultados obtenidos se encuentran dentro de los límites establecidos por la UE y la FDA, siendo el promedio de 0,013ppb, estos representan un valor medio entre los resultados obtenidos en las dos fincas anteriores (F1 y F2), esto puede deberse al tipo de alimentación mixta de estas vacas, ya que ingerían alimento concentrado y pasto.

La mezcla de dos tipos de alimento, redujo significativamente la concentración de AFM₁ como se demuestra en los resultados. Numerosos autores (Reyes *et al* 2009; Celik, 2005; Montaña *et al* 2007; Combita y Mildenberg 2009) han reportado que la alimentación mixta representa un beneficio para los productores de leche, ya que permite alimentar al ganado de manera segura manteniendo bajos riesgos de contaminación y además aporta todos los nutrientes necesarios para mantener las vacas en buen estado de salud, debido a que mejora la digestión del animal, la disponibilidad de nutrientes consumidos en el pasto, y por tanto la ganancia de peso y el aumento de la producción de leche sin aumentar el riesgo en la salud del animal o del consumidor.

En la F4, los resultados obtenidos se encontraron dentro de los límites permisibles (0,013ppb), notándose que en el sitio se elabora queso artesanal, y la leche es obtenida de varios productores de la zona estudiada, además que el ganado en este sitio consume alimento mixto.

Además, de la influencia que tiene el alimento en la concentración de AFM₁, existen otros factores inherentes al animal como la susceptibilidad a la presencia de las AF que puede influir en su salud de manera negativa. Así mismo el consumo constante del alimento con concentraciones de AFM₁ puede provocar daños a la salud del animal, por estas razones es probable que los datos obtenidos en la F4, sean al igual que la F3, un valor medio en comparación con la F1 y la F2.

Para este estudio, el análisis estadístico descriptivo se efectuó con el paquete Statistix 8.0; el valor de la media es de 0,008ppb y los valores mínimo y máximo de 0,003ppb y 0,030ppb respectivamente, el valor del

mínimo se obtuvo en la finca donde las vacas eran alimentadas solo con pasto y el valor máximo donde las vacas consumían solo alimento concentrado.

Por otro lado, según la prueba de normalidad, el número de muestras analizadas y los datos obtenidos, presentan una dispersión normal en el espacio representando la realidad de la zona estudiada. Por tanto existen altas probabilidades de que todas las fincas de la zona tengan situaciones similares en cuanto a la presencia de AFM₁ en la leche.

Hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las fincas con relación a la presencia de AFM₁ y la prueba de Tukey confirmó que todas las fincas diferían en cuanto a la presencia de AFM₁ ($F_2 > F_3 > F_4 > F_1$).

En relación a la leche pasteurizada, las concentraciones obtenidas en la M1 mostraron un promedio de AFM₁ 0,0075ppb. En el caso de la M2, las concentraciones obtenidas, aunque más elevadas que la muestra anterior, se encontraban también por debajo de los límites establecidos por la UE y la FDA, con un promedio de 0,021ppb.

La leche pasteurizada, es una de las principales formas de consumir la leche de vaca por los humanos, ya que el método de pasteurización, ofrece al consumidor inocuidad y duración del producto. Sin embargo, estudios han demostrado que el almacenamiento y procesado de la leche para la obtención de los distintos productos lácteos, no afecta la estabilidad y distribución de la AFM₁ (Díaz, 2006; Prado *et al* 2008; Rahim, 2009).

La estabilidad de la AFM₁ durante el tratamiento con calor como la pasteurización o tratamiento directo de calor no se ve afectada, por lo tanto la estructura se mantiene estable. La AFM₁ puede estar presente en la leche y sus derivados, pero su concentración puede ser alterada por los procesos de dilución a la cual es sometida, y a la separación de sus componentes para elaborar sus productos. (Kamkar, 2005; Díaz, 2006).

Los resultados obtenidos no representan un riesgo para la salud ya que es probable que las industrias procesadoras de estas leches mantengan controles de calidad continuos que permita tener niveles bajos de AFM₁. No obstante, la manera más efectiva para evitar la contaminación por AFM₁ es controlar diariamente la alimentación de las vacas productoras de leche.

Por otra parte, la Agencia Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC) ha reportado a la AFB1 y AFM1, como compuestos carcinógenos para seres humanos. La presencia de AFM1 en la leche, constituye un riesgo para la población, particularmente en niños debido a la importancia de este producto en su alimentación y a que son considerados más susceptibles a sus efectos adversos, ya que su capacidad de biotransformación de los compuestos carcinógenos es generalmente más lenta que en adultos (Prandiniet *al* 2009; Landero *et al* 2012).

En Venezuela la información sobre los riesgos de contaminación con AFM₁ es limitada y esta situación sugiere que se deben intensificar los estudios que permitan conocer la concentración de AFB₁ en los productos lácteos (Montaño *et al* 2007).

Según el análisis estadístico, la media para estos resultados es de 0,013ppb, el valor mínimo es de 0,006ppb obtenido en la M₁ y el máximo es de 0,037ppb obtenido en la M₂. Al igual que la leche cruda, las muestras tomadas tienen una distribución normal por lo que los datos obtenidos son representativos en base a la población estudiada.

La correlación existente en este estudio, para las dos variables (leche cruda y leche pasteurizada), según Pearson es de 1, lo que significa que existe una correlación perfecta, indicando dependencia total entre las variables ya que cuando la concentración de AFM₁ aumenta en la leche cruda también aumenta en la leche pasteurizada.

En cuanto a la concentración de AFM₁ no existen diferencias significativas entre la leche cruda y la leche pasteurizada ($P > 0.05$), es decir que independientemente del tipo de leche la AFM₁ está presente en concentraciones similares, por lo tanto éstas concentraciones no son afectadas por los procesos a la cual es sometida la leche cruda para la pasteurización o para la obtención de todos sus derivados.

Conclusiones

El 100% de la leche cruda y pasteurizada analizadas presentaron niveles de concentración de AFM₁ dentro de los límites establecidos por la FDA y la UE. El tipo de alimento consumido por el animal influye en la contaminación de la leche con AFM₁, donde la alimentación con pasto disminuye la concentración en las muestras de leche cruda. La alimentación del animal con alimentos mixtos (pasto y Alimentos concentrado) redujo el 50% aproximadamente la concentración de AFM₁ en la leche cruda. La incidencia de AFM₁ tanto en leche cruda como pasteurizada en las zonas estudiadas fue baja. La leche cruda y pasteurizada distribuida en la región estudiada representa un alimento seguro al consumidor por contener concentraciones de AFM₁ dentro de los límites establecidos. No obstante, se sugiere monitoreo en otras fincas y hacia otras regiones del país, lo cual permita establecer parámetros en relación a los niveles de aflatoxina, la cual representa en países como México y algunos países Europeos un problema de salud pública; asimismo se considera que es necesario un monitoreo en las épocas de lluvia, ya que durante este lapso pluvial aumenta la humedad y baja la temperatura, condiciones bioclimáticas que permiten mayor proliferación de hongos ambientales productores de aflotoxinas.

Referencias

- Bolet, M., Socarras, M. (2005). Aflatoxinas: mecanismo de toxicidad en la etiología del cáncer hepático celular. *Rev Cubana Invest Biomed.* 24(1): 54-9. <http://scielo.sld.cu/pdf/ibi/v24n1/ibi07105.pdf>
- Çelik, T., Sarımehtetoğlu, B., Küplülü O. Aflatoxin M1 contamination in pasteurised milk. *VETERINARSKI ARHIV.* 75(1): 57-65. 2005.
- Combata, A., Mildenberg, S. (2009). Detección de aflatoxina M₁ en leches frescas comercializadas en la zona del Valle de Cauca (Colombia) mediante la técnica de ELISA (Para obtener el Título de Microbiología Industrial). Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javariana. Bogotá (Colombia). 111 pp.
- Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). (1998). Leche pasteurizada (2ª Revisión). 798-1994. Caracas, Venezuela.
- Comisión Europea. (2006). Reglamento (CE) N° 401/2006 de la Comisión de 23 de febrero de 2006 por el que se establecen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea, L 70, 12-34.
- Comisión del Codex Alimentarius. (2001). Observaciones sobre el proyecto de nivel máximo para la aflatoxina M1 en la leche. Informe de la 33ª reunión del Comité del Codex sobre aditivos alimentarios y contaminantes de los alimentos, La Haya, Países Bajos.
- Díaz, G.J., Espitia, E. (2006). Occurrence of aflatoxin M1 in retail milk samples from Bogotá, Colombia. *Food Additives and Contaminants*, 23(8), 811-815.
- Fernández, G., Negrón, G., Isea, G., Sánchez, E. 2000. Reporte de análisis cuantitativo de aflatoxinas por el método de ELISA en muestras de materias primas de alimento balanceado para aves provenientes de una planta ubicada en el municipio Mara del estado Zulia, Venezuela. *Rev. Cient.* 10 (1): 63-68.
- Gimeno, A., Martins M. (2011). Micotoxinas y micotoxicosis en animales y humanos 3ª edición. Special nutrient, INC. Miami FL, USA.
- Kamkar, A. (2005). The study on the contamination of aflatoxin in White cheese marketed in tehran by thin layer chromatography. *Iran J. Food Sci Technol.* 2: 71-8.
- Landeros, P., Noa, M., López, Y., González, DG., Noa, E., Real, M., Juárez, C., Medina MS. (2012). Niveles de aflatoxina m1 en leche cruda y pasteurizada comercializada en la zona metropolitana de Guadalajara, México. *Rev. Salud Anim.* 34(1): 40-45. <http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v34n1/rsa06112.pdf>
- López, C., Ramos, L., Ramadan, S., Bulacio, L. (2003). Presence of aflatoxin M1 in milk for human consumption in Argentina. *Food Control.* 14: 31-34.
- Martínez, R., Berruga Fernández, M.I., Molina Casanova., M. (2011). Incidencia de Aflatoxina M₁ en leche de ovejas Manchegas. *Sitio Argentino de Producción Animal.* 1-5. http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_ovina/produccion_ovina_leche/27-aflatoxina.pdf
- Montaño, V., Chirino, I., Gemio, R. (2007). Estudio toxicológico de presencia de aflatoxinas m1 en leche bovina recolectada del municipio de achacachi. *Bolivian Journal Of Chemistry.* 24(1) 89-93.

- Ortiz, C. (2009). Análisis de aflatoxina m1 en leche fresca de establos lecheros de arequipa. *RevInvVet Perú*. 20 (1): 139-141.
- Prado, G., Silva, M., Souza, A., Aprigio, A. (2008). Occurrence of aflatoxin M₁ in parmesan cheese consumed in Minas Gerais, Brazil. *Ciênc. agrotec*. 32(6): 1906-1911.
- Prandini A., Tansini G., Sigolo S., Filippi L., Laporta M., Piva, G. (2009). On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food Chem Toxicol*. 2009;47(5):984-991.
- Rahimi E., Mohammadosseini M., Alimoradi M., Rezaei P., Arab M., Goudarzi M., Tarkesh M., Torki Z. (2012). Aflatoxin M1 in Pasteurized Milk and White Cheese in Ahvaz, Iran. *Global veterinaria*. 9(4): 384-387.
- Rahim, E., Shakerian, A., Jafariyan, M., Ebrahimi, M. and Riahi, M. (2009). Occurrence of aflatoxin M1 in raw, pasteurized and UHT milk commercialized in Esfahan and Shahre Kord, Iran. *Food Security* 1: 317-320.
- Requena, F., Saume, E., León, A. (2005). Micotoxinas: riesgos y prevención. *Zootecnia Trop*. 23(4): 57-64.
- Reyes-Velázquez, W., Martínez, P., Espinosa, V., Nathal, M., Palacios, L., Rojo, F. (2009). Aflatoxinas totales en raciones de bovinos y AFM1 en leche cruda obtenida en establos del estado de Jalisco, México *Técnica Pecuaria en México*. 47(2): 223-230. 20(11):1077-86.
- Reza, D., Marjan, M. (2013). Aflatoxin M1 Contamination in Dairy Products. *Journal of Science and today's world*. 2(5): 500-514. .
- Urban, G., Pérez, J., Martínez, F., Salas, J., Díaz, G., Ramírez, M., Castro G., Vega, S., Gutiérrez, R., Escobar, A. (2009). Niveles de aflatoxina m1 en quesos frescos producidos en diferentes zonas de México. *Rev Salud Anim*. 31(2): 115-121.
- Urrego, J., Díaz G. (2006). Micotoxinas y cáncer. *Rev Fac Med UnivNacColomb*. 54(2): 109-116. <http://scielo.sld.cu/pdf/ibi/v24n1/ibi07105.pdf>
- Zaviezo, D. (2006). Consideraciones técnicas sobre la problemática de las micotoxinas y las micotoxicosis aviares. *Ciencia y Trabajo*. 8(22): 154-158.