



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

Tesis

**EVALUACIÓN *IN VITRO* DE SECUESTRANTES DE
AFLATOXINAS USADOS EN EXPLOTACIONES LECHERAS DEL
ALTIPLANO CENTRAL MEXICANO**

Presenta

MVZ EPCV ESTRELLA HERNÁNDEZ GARCÍA

**para obtener el grado de
MAESTRA EN CIENCIAS VETERINARIAS**

Tutor

DR. ARTURO GERARDO VALDIVIA FLORES

Comité Tutoral

**DR. TEÓDULO QUEZADA TRISTÁN
DR. RAÚL ORTÍZ MARTÍNEZ**

Aguascalientes, Ags., agosto de 2016.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

OFICIO NO. CCA-D-111500-201-16

DRA. GUADALUPE RUÍZ CUÉLLAR
DIRECTORA GENERAL DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
PRESENTE.

Por medio del presente me permito comunicarle a usted que la tesis titulada "EVALUACIÓN IN VITRO DE SECUESTRANTES DE AFLATOXINAS USADOS EN EXPLOTACIONES LECHERAS DEL ALTIPLANO CENTRAL MEXICANO", de la alumna ESTRELLA HERNÁNDEZ GARCÍA, egresada de la Maestría en Ciencias Agronómicas y Veterinarias, respeta las normas y lineamientos establecidos institucionalmente para su elaboración y su autor cuenta con el voto aprobatorio de su tutor y comité tutorial.

Sin más por el momento, agradezco de antemano su atención a la presente y aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

Jesús María, Aguascalientes., 17 de Agosto del 2016.

"Se Lumen Proferre"


M. en C. GABRIEL ERNESTO PALLÁS GUZMÁN
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

c.c.p. Departamento del Control Escolar
c.c.p. Sección de Certificados y Títulos
c.c.p. Secretario Técnico
c.c.p. Estudiante
c.c.p. Archivo



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

MC GABRIEL ERNESTO PALLÁS GUZMÁN
DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
P R E S E N T E

Por medio del presente, como integrante del Comité Tutorial designado de la egresada de la Maestría en Ciencias Agronómicas y Veterinarias, **MVZ EPCV ESTRELLA HERNÁNDEZ GARCÍA**, quien realizó la tesis titulada *EVALUACIÓN IN VITRO* DE SECUESTRANTES DE AFLATOXINAS USADOS EN EXPLOTACIONES LECHERAS DEL ALTIPLANO CENTRAL MEXICANO, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, estoy de acuerdo en emitir el presente **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla y continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y le envío un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"Se Lumen Proferre"
Aguascalientes, Ags., a 18 de julio de 2016

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'AG' or similar initials.

DR. ARTURO GERARDO VALDIVIA FLORES
Integrante del Comité Tutorial de tesis

c.c.p.- Interesada
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Jefatura del Departamento de Clínica Veterinaria
c.c.p.- Consejero Académico
c.c.p.- Secretario Técnico



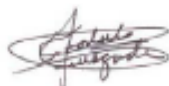
MC GABRIEL ERNESTO PALLÁS GUZMÁN
DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
P R E S E N T E

Por medio del presente, como integrante del Comité Tutorial designado de la egresada de la Maestría en Ciencias Agronómicas y Veterinarias, **MVZ EPCV ESTRELLA HERNÁNDEZ GARCÍA**, quien realizó la tesis titulada **EVALUACIÓN *IN VITRO* DE SECUESTRANTES DE AFLATOXINAS USADOS EN EXPLOTACIONES LECHERAS DEL ALTIPLANO CENTRAL MEXICANO**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, estoy de acuerdo en emitir el presente **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla y continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y le envío un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 18 de julio de 2016



DR. TEODULO QUEZADA TRISTAN
Integrante del Comité Tutorial de tesis

c.c.p.- Interesada
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Jefatura del Departamento de Clínica Veterinaria
c.c.p.- Consejero Académico
c.c.p.- Secretario Técnico

TESIS

TESIS

TESIS

TESIS

TESIS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

**MC GABRIEL ERNESTO PALLÁS GUZMÁN
DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
P R E S E N T E**

Por medio del presente, como integrante del Comité Tutorial designado de la egresada de la Maestría en Ciencias Agronómicas y Veterinarias, **MVZ EPCV ESTRELLA HERNÁNDEZ GARCÍA**, quien realizó la tesis titulada *EVALUACIÓN IN VITRO* DE SECUESTRANTES DE AFLATOXINAS USADOS EN EXPLOTACIONES LECHERAS DEL ALTIPLANO CENTRAL MEXICANO, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, estoy de acuerdo en emitir el presente **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla y continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y le envío un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"
Aguascalientes, Ags., a 18 de julio de 2016

DR. RAUL ORTIZ MARTINEZ
Integrante del Comité Tutorial

c.c.p.- Interesada
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Jefatura del Departamento de Clínica Veterinaria
c.c.p.- Consejero Académico
c.c.p.- Secretario Técnico

TESIS

TESIS

TESIS

TESIS

TESIS

RECONOCIMIENTOS

Ofrezco un especial reconocimiento a la Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA) y al Centro de Ciencias Agropecuarias por haberme brindado la oportunidad de realizar este posgrado, por el apoyo facilitado y por los recursos e instalaciones necesarias para realizar este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado para la realización de mis estudios de maestría con la beca 377558, así como el apoyo económico a través del proyecto "Mecanismo patogénico implicado en la interacción *Neospora caninum*-micotoxinas en ganado lechero infectado naturalmente" aprobado por CONACyT convocatoria 2012 en ciencias básicas.

A los integrantes de mi comité tutorial: Dr. Arturo Valdivia Flores, Teódulo Quezada Tristán y Raúl Ortiz Martínez por su gran apoyo y asesoría así como por brindarme la oportunidad de colaborar en el proyecto de investigación.

A los propietarios de las Unidades de Producción lechera por brindar la confianza al equipo de trabajo de ingresar a sus instalaciones, así como a todo el personal por facilitar la información y la toma de muestras para hacer posible la fase de campo del presente trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Al M.C. José Luis Moreno Hernández Duque del Laboratorio de análisis instrumental del Centro de Ciencias Básicas de la UAA por apoyo en el procesamiento de muestras y por su asesoría.

A la M.C. Liliana Barba de Alba del laboratorio de Suelos del Centro de Ciencias Agropecuarias de la UAA, por su ayuda y capacitación en el procesamiento de mis muestras.

A la Dra. Aurora Hilda Pérez Ramírez, al Dr. José René Rosiles Martínez, al M.C. Juan Carlos Ramírez Orejel y al Q.A. Moisés Talamantes Gómez del Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM por las facilidades brindadas para hacer posible mi estancia en el laboratorio, por su valiosa asesoría y por compartirme parte de sus conocimientos.

A la M.C. Angélica Sabel Hernández Zavala, al IBQ Ma. Del Socorro Castañeda Ramírez, al Dr. Isidoro Rubio Franchini y a todo el personal del Depto. de Control Ambiental del Laboratorio Estatal de Salud Pública de Aguascalientes, por su calidez, así como su ayuda en el procesamiento de mis muestras.

Dra. Angélica Hernández del Departamento de Estadística de la UAA, quien de manera desinteresada me asesoró para el análisis estadístico.

Al Ing. Daniel Calderón García de Alphatec, por su invaluable apoyo técnico durante el procesamiento de las muestras.

A la Dra. María Carolina de Luna López del Laboratorio de Fisiología Veterinaria e Investigación así como a la M.C. Ericka Rangel Muñoz, por sus enseñanzas, gran apoyo técnico y por su inapreciable amistad.

A todos los integrantes del equipo de trabajo del Laboratorio de Investigación y del Laboratorio de Diagnóstico, por las facilidades proporcionadas.

A todos mis compañeros de la maestría, por permitirme aprender de ellos y por su amistad, especialmente a las ahora maestras Martha Karina Fuentes Esparza y Adriana del Rosario Rodríguez Ramírez.

DEDICATORIA

A mi hija Citlalli, por su alegría y ternura, que me inspiraron para seguir adelante con este proyecto.

A Marco, por caminar a mi lado, por su amor y comprensión que me alentaron en esta etapa de mi vida.

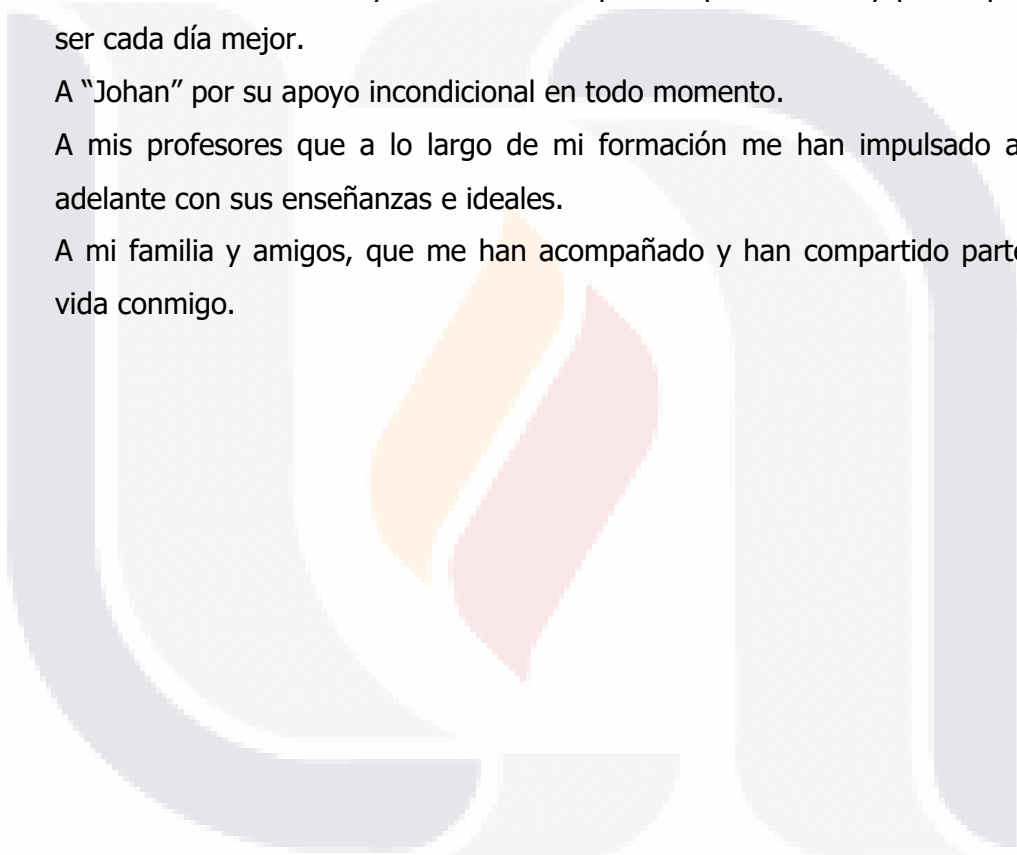
A mi mamá por su sacrificio, fortaleza y por siempre apoyarme para salir adelante.

A mis hermanos Carlos y Marco Antonio por ser parte de mí y por inspirarme a ser cada día mejor.

A "Johan" por su apoyo incondicional en todo momento.

A mis profesores que a lo largo de mi formación me han impulsado a seguir adelante con sus enseñanzas e ideales.

A mi familia y amigos, que me han acompañado y han compartido parte de su vida conmigo.



Índice General

INTRODUCCIÓN	10
1. ANTECEDENTES	13
1.1. PRODUCCIÓN DE LECHE BOVINA.....	13
1.1.1. Producción de leche en México y el mundo	13
1.1.2. Consumo de leche en México y el mundo	14
1.1.3. Importación de leche y derivados lácteos	14
1.1.4. Impacto económico y comercial de las aflatoxinas	15
1.2. GÉNERO <i>Aspergillus</i>	15
1.2.1. Características morfológicas	16
1.2.2. Características biológicas	17
1.2.3. Características moleculares	17
1.2.4. Distribución y ocurrencia	18
1.2.5. Condiciones para la producción de Aflatoxinas	18
1.2.6. Control de la infección fungal	20
1.3. PRINCIPALES MICOTOXINAS.....	21
1.3.1. Fumonisina	21
1.3.2. Ocratoxina	22
1.3.3. Tricotecenos	22
1.3.4. Zearalenona	23
1.4. CARACTERÍSTICAS DE LAS AFLATOXINAS	24
1.4.1. Físicoquímicas	24
1.4.2. Biológicas	25
1.4.3. Tipos de aflatoxinas	25
1.4.4. Toxicocinética	26
1.4.5. Efectos tóxicos	26

1.5. MÉTODOS DE DETECCIÓN.....	27
1.5.1. Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA)	27
1.5.2. Cromatografía de capa fina	28
1.5.3. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)	29
1.5.4. Moleculares	29
1.6. CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN POR ADSORBENTES.....	30
1.6.1. Definición de los agentes detoxificantes	30
1.6.2. Características de un buen secuestrante	30
1.6.3. Características de los silicatos	31
1.6.4. Tipos de agentes detoxificantes	34
1.7. OTROS MÉTODOS DE CONTROL DE AFLATOXINAS	36
1.8. EVALUACIÓN DE SECUESTANTES	38
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	41
2.1. HIPÓTESIS.....	41
2.2. OBJETIVOS	41
2.2.1. Objetivo General	41
2.2.2. Objetivos específicos	41
3. MATERIALES Y MÉTODOS	42
3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO	42
3.2. ETAPA DE CAMPO	42
3.2.1. Características de las unidades de producción lechera	42
3.2.2. Monitoreo de las UPL para el uso de secuestrantes	43
3.3. ENSAYO DE ADSORCIÓN <i>IN VITRO</i>	43
3.3.1. Técnica de ELISA	44
3.3.2. Técnica de HPLC	45
3.4. CÁLCULO DEL PORCENTAJE DE ADSORCIÓN.....	47
3.5. ANÁLISIS QUÍMICO DE LOS SECUESTANTES	47

3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	48
3.6.1. Comparación con análisis de varianza	48
3.6.2. Transformación de variables Box-Cox	48
3.6.3. Análisis no paramétrico	48
3.6.4. Regresión simple	48
3.6.5. Tabulación cruzada	49
4. RESULTADOS	50
4.1. ETAPA DE CAMPO	50
4.1.1. Análisis del uso de secuestrantes en las UPL	50
4.1.2. Uso de secuestrantes y concentración de AFM₁ en las UPL	55
4.1.3. Evaluación económica	57
4.2. EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN	58
4.2.1. Capacidad de adsorción con la técnica de ELISA	58
4.2.2. Capacidad de adsorción con la técnica de HPLC	59
4.2.3. Comparación de las técnicas ELISA Y HPLC	60
4.3. ANÁLISIS QUÍMICO DE LOS PRODUCTOS SECUESTRANTES	61
4.3.1. Calcio	62
4.3.2. Potasio	62
4.3.3. Sodio	63
4.3.4. Aluminio	64
4.3.5. Silicio	65
5. DISCUSIÓN	66
5.1. ETAPA DE CAMPO	66
5.1.1. Dosis recomendada por el fabricante	66
5.1.2. Uso de secuestrantes y concentración de AFM₁	67
5.1.3. Análisis económico	67
5.2. COMPARACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE ELISA Y HPLC	69

5.3. EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN..... 70

5.3.1. Capacidad de adsorción con la técnica de ELISA..... 70

5.3.2. Capacidad de adsorción con la técnica de HPLC..... 70

5.3.3 Tablas comparativas de estudios *in vitro*..... 71

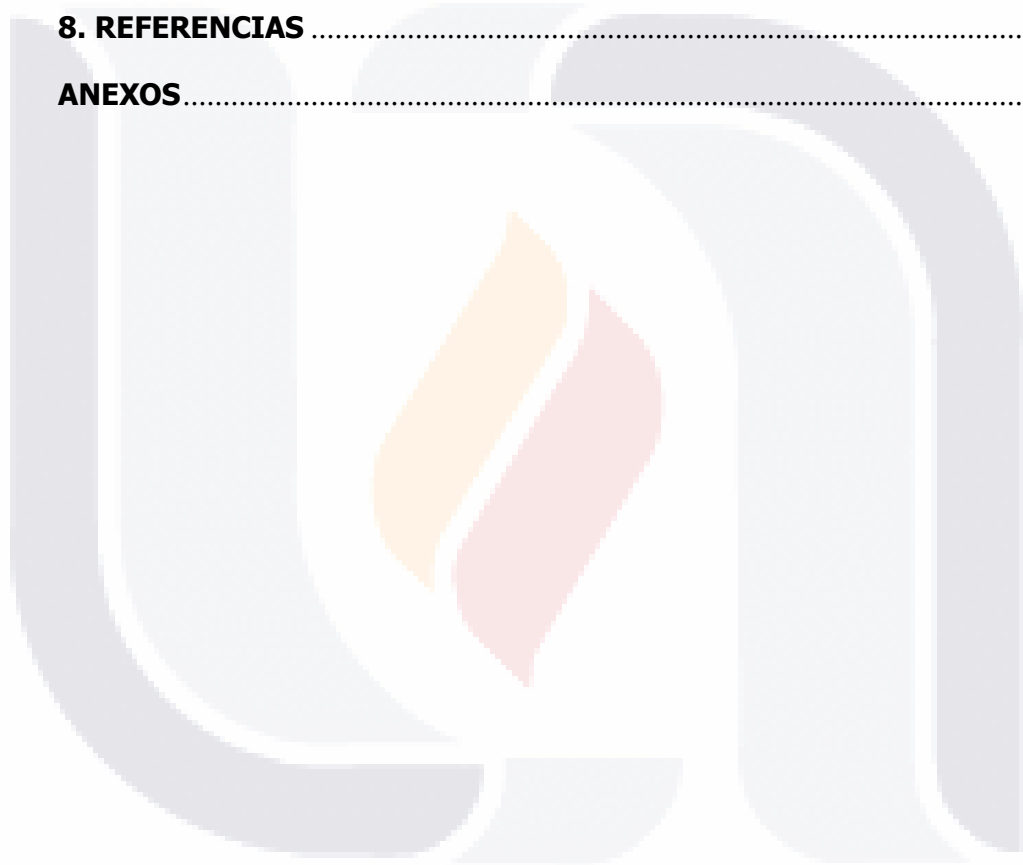
5.4. ANÁLISIS QUÍMICO DE LOS PRODUCTOS SECUESTRANTES 77

6. CONCLUSIONES..... 78

7. GLOSARIO..... 80

8. REFERENCIAS 83

ANEXOS..... 96



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Organización de las unidades de producción lechera _____ 43

Tabla 2. Secuestrantes usados en la evaluación in vitro _____ 43

Tabla 3. Secuestrantes usados en la evaluación in vitro, sus características, recomendación en bovinos y dosis empleada en las UPL _____ 50

Tabla 4. Comparación del porcentaje la dosis recomendada por el fabricante de cada secuestrante usado en las UPL _____ 51

*Tabla 5. Porcentaje de la dosis recomendada por el fabricante administrada por lote y sitio en las UPL (%)** _____ 54

*Tabla 6. Comparación del porcentaje de la dosis recomendada por el fabricante administrada en las UPL por año y mes (%)** _____ 55

Tabla 7. Comparación del promedio de la concentración de AFM₁ de acuerdo al sitio y lote de producción en donde se ubicaban las vacas _____ 56

Tabla 8. Análisis técnico y económico del uso de secuestrantes en las UPL _____ 58

Tabla 9. Resultados del ensayo de adsorción in vitro de AFB₁ de diez compuestos secuestrantes cuantificados con la técnica de (ELISA) _____ 59

Tabla 10. Resultados del ensayo de adsorción in vitro de AFB₁ de 10 compuestos secuestrantes (sec) cuantificados con la técnica de (HPLC) _____ 60

Tabla 11. Concentración promedio de calcio de los productos secuestrantes _____ 62

Tabla 12. Concentración promedio de potasio de los productos secuestrantes _____ 63

Tabla 13. Concentración promedio de sodio de los productos secuestrantes _____ 63

Tabla 14. Concentración promedio de aluminio de los productos secuestrantes _____ 64

Tabla 15. Comparación de resultados de estudios in vitro para Bentonitas, Montmorillonitas y Zeolitas como secuestrantes de AFB₁ _____ 73

Tabla 16. Comparación de resultados de estudios in vitro para Glucomananos y Glucomananos con aluminosilicatos como secuestrantes de AFB₁ _____ 75

Tabla 17. Comparación de resultados de estudios in vitro para la evaluación de HSCAS y organoaluminosilicatos _____ 76

Tabla 18. Respuesta de las soluciones estándar de AFB₁ para la elaboración de la curva de calibración _____ 99

Tabla 20. Condiciones del horno para la digestión ácida de las muestras _____ 104

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Perspectiva del crecimiento en la producción de leche al 2014. _____ 13

Figura 2. Característica del conidióforo de aspergillus. _____ 16

Figura 3. Estructura química de la ocratoxina A _____ 22

Figura 4. Estructura química de la zearalenona _____ 23

Figura 5. Estructura química de las aflatoxinas _____ 25

Figura 6. Estructura básica de los silicatos _____ 31

Figura 7. Estructuras básicas de arcillas. _____ 33

Figura 8. Esquema descriptivo de la preparación del ensayo in vitro para la evaluación de secuestrantes de aflatoxinas por la técnica de ELISA _____ 45

Figura 9. Esquema descriptivo de la preparación del ensayo in vitro para la evaluación de secuestrantes de aflatoxinas por la técnica de HPLC _____ 47

Figura 10. Frecuencia de uso de cada producto secuestrante usado en las UPL _____ 52

Figura 11. Frecuencia de uso de secuestrantes de micotoxinas de acuerdo al sitio y lote de producción en donde se ubicaban las vacas _____ 52

Figura 12. Relación entre la utilización de secuestrante de acuerdo a la dosis recomendada por el fabricante _____ 57

Figura 13. Gráfico del modelo ajustado _____ 61

Figura 14. Gráfica de calibración de las soluciones estándar de AFB₁ _____ 100

Figura 15. Regresión lineal de los estándares incluidos del kit de ELISA. _____ 103

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

AFB₁	Aflatoxina B ₁	ARN	Ácido ribonucleico
AFM₁	Aflatoxina M ₁	HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (siglas en inglés)
AS-BEN	Bentonita sílica y cristales de cuarzo	VHB	Virus de la hepatitis B
AS-MON	Montmorillonita refinada	LMP	Límite máximo permisible
AS-ZEO	Aluminosilicato, zeolita	SE	Secretaría de Economía
CAST	Council for Agricultural Science and Technology	IARC	International Agency for Research on Cancer
EFSA	European Food Safety Authority	OTA	Ocratoxina A
FAO	Food and agriculture organization	EAA	Espectroscopia de absorción atómica
GM	Glucomananos	DHS	Diferencia honestamente significativa
GM-AS	Aluminosilicatos y paredes celulares de levaduras	FEPALE	Federación panamericana de lechería
HSCAS	Aluminosilicato de calcio y sodio hidratado	FB₁	Fumonisina B ₁
O-AS-1	Organoaluminosilicato 1	UE	Unión Europea
O-AS-2	Organoaluminosilicato 2	UPL	Unidad de producción lechera
O-AS-3	Organoaluminosilicato 3	ADN	Ácido desoxirribonucleico
O-AS-4	Organoaluminosilicato 4	GST	Glutación S-Transferasa
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development	TCT	Tricotecenos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa	ELISA	Inmunoensayo enzimático

RESUMEN

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios que producen de forma natural algunos hongos filamentosos. Cuando están presentes en el alimento de los animales y el hombre son consideradas sustancias tóxicas. Los productos lácteos pueden servir como fuente indirecta de aflatoxinas cuando las vacas consumen alimento contaminado. Para evitar el efecto tóxico de éstas en el organismo, algunos agentes secuestrantes son adicionados en la alimentación de las vacas. Sin embargo, a pesar del uso de agentes secuestrantes en la dieta, diversos estudios han demostrado la presencia de residuos de aflatoxinas en la leche, provocando pérdidas económicas por la disminución en la calidad de producto, sumado al riesgo de salud pública. En este estudio se realizó una evaluación *in vitro* de 10 secuestrantes que son usados en establos del Altiplano Central Mexicano. Se empleó un estándar de aflatoxina B₁ con el método de inmunoensayo enzimático (ELISA) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se observó que todos los secuestrantes evaluados tienen la capacidad de adsorber AFB₁ en solución. Se determinó que las técnicas de ELISA y HPLC son comparables cualitativamente. Nueve de los diez agentes secuestrantes mostraron porcentajes de adsorción superiores al 50 %. En la evaluación técnica se observó que hay una tendencia por parte del productor a emplear una dosis menor a la recomendada por el fabricante. En la evaluación económica no fue posible determinar un costo-beneficio por el uso de los secuestrantes, debido a que en general el productor no empleó de manera adecuada el agente secuestrante, ni se usó la dosis recomendada. La evaluación *in vitro* de los secuestrantes es un apoyo para determinar el potencial que tiene un producto como adsorbente de micotoxinas y debe ser complementada con otros análisis de caracterización.

Palabras clave: Aflatoxina B₁, secuestrantes, adsorbentes, ELISA, HPLC.

ABSTRACT

Aflatoxins are considered as toxic substances when are present in animals and human feed. Dairy products can serve as an indirect source of aflatoxin when cows consumed contaminated food. Some sequestering agents are added in the crow food in order avoid aflatoxin adsorption by organism of those. However, even sequestering agents are added in the diet of cattle, some studies had demonstrated aflatoxin residues in the milk, this cause economic loses and risk of public health. In this study were carried out an *in vitro* evaluation of 10 adsorbent agents used in cowshed of Altiplano Central Mexicano. An aflatoxin B₁ standard where used. The *in vitro* model where evaluated by ELISA technique and high performance liquid chromatography (HPLC). It was observed that all tested sequestering agents bound AFB₁ in solution. ELISA and HPLC techniques are qualitatively comparable. Nine of ten sequestering agents showed absorption higher than 50 %. Technical evaluation showed that farmers administered lower doses than recommended. Through the economic evaluation was not possible to determine a cost-benefit by the use of sequestering agent, as the farmer not properly applied the sequestering agent. In vitro evaluation of sequestering is a support to determinated the potential of a product as mycotoxin adsorbent and should be complemented with other analyzes of characterization.

Keywords: Aflatoxin, sequestering agent, sorbent agents, ELISA, HPLC.

INTRODUCCIÓN

Las micotoxinas son metabolitos secundarios que producen de forma natural algunos hongos filamentosos (FAO, 2011). Se consideran sustancias tóxicas cuando están presentes en el alimento de animales y el hombre, por lo que su presencia tiene un gran impacto económico, en la salud humana y animal en todo el mundo (Bezerra y col., 2014). Las aflatoxinas están entre las principales micotoxinas que contaminan una cantidad importante de alimentos y cosechas, la aflatoxina B₁ es el más potente carcinógeno que se encuentra en forma natural y también es un inmunosupresor (Varga y col., 1999).

Los productos lácteos pueden servir como una fuente indirecta de aflatoxinas. Cuando las vacas consumen alimento contaminado con aflatoxinas, metabólicamente biotransforman la Aflatoxina B₁ en una forma hidroxilada llamada Aflatoxina M₁. La presencia de Aflatoxina M₁ indica que el animal ha estado en contacto Aflatoxina B₁ y por lo que disminuye el valor de la leche (EFSA, 2009).

Una de las prácticas que se realizan alrededor del mundo para hacer frente al problema de las micotoxinas es el uso de agentes secuestrantes en la dieta de las vacas. Esta estrategia sirve para reducir la absorción de las micotoxinas en el tracto gastrointestinal y disminuir su biodisponibilidad para reducir considerablemente su efecto tóxico (Huwig y col., 2001).

A pesar del uso de secuestrantes en explotaciones lecheras de Aguascalientes se ha encontrado la presencia de aflatoxina M₁ en la leche, por lo que los productores han tenido pérdidas por estímulos a la calidad; así como otros problemas de salud en las vacas, derivados del consumo de aflatoxinas.

La evaluación del potencial secuestrante de estos productos es una parte importante para enfrentar este problema, así como generar información que ayude a conocer la calidad de los mismos y de esta manera determinar cuál de éstos es el que mejor se adapta a las necesidades del productor.

Las aflatoxinas son compuestos tóxicos que se encuentran en los granos y cosechas infestados por hongos *Aspergillus* (Huwig y col., 2001). Las aflatoxinas B₁ y M₁ son carcinógenos para animales y humanos. La Aflatoxina M₁ está clasificada por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer como clase 2B, posibles carcinógenos en humanos, es por eso que la concentración de AFM₁ en la leche está regulada en muchos países (EFSA, 2004).

Cuando el alimento está contaminado con AFB₁ y es ingerido por rumiantes, la AFB₁ es principalmente transformada en AFM₁ la cual es excretada en la leche. La cantidad de AFM₁ que se encuentra en la leche normalmente es el 1 o 2% de la AFB₁ ingerida, aunque puede alcanzar el 6% en vacas altas productoras (Veldman y Meijs, 1992).

Una práctica que actualmente se usa alrededor del mundo es la adición de agentes secuestrantes o adsorbentes de micotoxinas en las formulaciones alimenticias (Galvano y col, 1996b; Ramos y Hernández, 1997).

Los productores del Estado de Aguascalientes han informado a la Universidad Autónoma de Aguascalientes, la preocupación por la eficacia de los secuestrantes que se están empleado para disminuir la presencia de AFM₁ en la leche y así reducir la pérdida de estímulos a la calidad; así como otros problemas de salud derivados del consumo de ensilaje y concentrado con cantidades pequeñas pero constantes de aflatoxinas.

La necesidad de tener información del potencial secuestrante de los adsorbentes de micotoxinas justifica el presente trabajo, actualmente se están empleando en las explotaciones lecheras de la zona una variedad de secuestrantes, sin embargo existe poca información acerca del uso de secuestrantes en el Altiplano Central Mexicano y la evaluación de los procedimientos para el control de aflatoxinas.

El presente trabajo evaluó diferentes agentes secuestrantes de aflatoxinas, que actualmente se están utilizando explotaciones lecheras del Altiplano Central Mexicano. Se empleó un método *in vitro* que sentará las bases para su posterior estudio *in vivo*, de esta manera se puede justificar su inclusión en la dieta para proteger a los animales de los efectos tóxicos de AFB₁.

La evaluación *in vitro* de un producto secuestrante puede servir como referencia del comportamiento que tendrá *in vivo*, es importante resaltar que de ninguna manera es sustituto de las pruebas dentro del organismo vivo. La

aportación del presente trabajo es la obtención de información de relevancia que ayude a determinar la calidad de secuestrantes y proveer las herramientas de decisión para seleccionar el mejor procedimiento de adición de secuestrantes que se adapte a las necesidades del productor.



1. ANTECEDENTES

1.1. PRODUCCIÓN DE LECHE BOVINA

1.1.1. Producción de leche en México y el mundo

La producción mundial de leche de vaca es de 614.4 millones de toneladas. La producción lechera en América Latina ha mostrado un incremento en relación con el conjunto de la producción mundial. En los últimos 20 años en México aumentó el 70% la producción. En América Latina y El Caribe, México se encuentra entre los 3 países que producen el 66% de la producción, entre Brasil, Argentina y México (FAO-FEPALE, 2012).

La India es el principal productor de leche, representa el 18% de la producción total, seguido de Estados Unidos, China, Paquistán y Brasil (Knips, 2005). La producción mundial de leche se espera que incremente un 23% (175 miles de toneladas) para el 2024, este incremento se espera que provenga de países desarrollados (Knips, 2005 y OECD-FAO, 2015) (Figura 1).

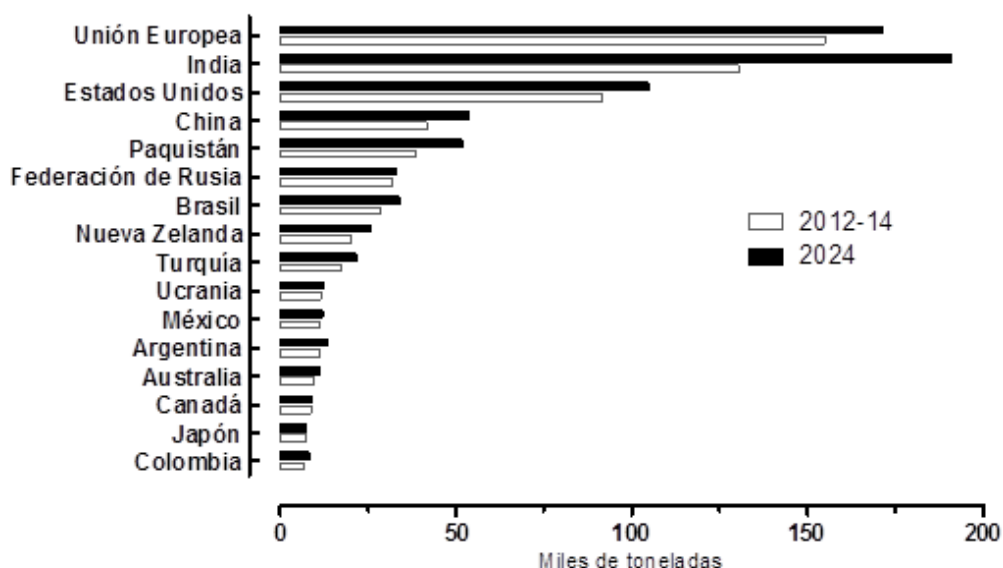


FIGURA 1. Perspectiva del crecimiento en la producción de leche al 2014 (Elaboración propia con información tomada de OECD, 2015).

En México, la producción lechera se lleva a cabo en todo su territorio, pero durante el periodo de 2005 a 2010 se concentró en cuatro estados, los que contribuyeron conjuntamente con el 45.0 % de la producción nacional en este período (destacándose Jalisco, Coahuila, Durango y Chihuahua). Cabe señalar que los estados de Coahuila y Durango se encuentran ubicados en la Región Lagunera, que es la más importante cuenca lechera del país y que ocupa el primer lugar en producción a nivel nacional (SE, 2012).

1.1.1.1. Estados productores de leche. Los principales estados productores de leche en orden de importancia son: Jalisco, Coahuila, Durango, Chihuahua, Veracruz, Guanajuato, México, Hidalgo, Aguascalientes y Puebla (SE, 2012). En Aguascalientes se cuenta con 239,222 cabezas de bovino. El 70.7% son vientres para producción de leche. Asimismo, Aguascalientes es considerado una cuenca lechera del país, ya que tiene una producción media diaria de leche de un millón 265 litros, la que lo coloca en el 9º lugar del país con una aportación del 3.7% a nivel nacional (INEGI, 2013).

1.1.2. Consumo de leche en México y el mundo

Actualmente la mayor parte del consumo de lácteos está concentrado en los países industrializados, como consecuencia de su mayor poder adquisitivo y de su mayor consumo *per cápita*. En los últimos diez años, el consumo humano total de leche ha crecido a una tasa media anual del 1.6%. La leche se consume principalmente en forma de productos lácteos frescos, lo cual representa el 70.0 % de la producción mundial. Esto continuará incrementándose en los próximos diez años debido al incremento en la producción de leche en países desarrollados (SE, 2012, OECD-FAO, 2015).

1.1.3. Importación de leche y derivados lácteos

En china, a pesar de su crecimiento en la producción de leche, ha mantenido la importación de leche en polvo para enfrentar anualmente su consumo nacional. Filipinas es uno de los principales importadores a nivel mundial de leche en polvo y continúan incrementando las importaciones 10.0 % cada año. En América Central México importa grandes volúmenes de leche descremada, a través de una compañía paraestatal, para ser distribuida ampliamente a la población de

bajos recursos. Otro importador importante se encuentra en el Norte de África, el cual ha venido creciendo la demanda en los últimos años (FAO, 2005)

En los países latinoamericanos hay una tendencia al aumento de importaciones de productos lácteos, México, Brasil y Venezuela son los que tienen el 90.0 % del déficit comercial de lácteos y Argentina y Uruguay tienen el mayor (SE, 2012).

1.1.4. Impacto económico y comercial de las aflatoxinas

Los costos económicos por micotoxinas son difíciles de calcular con exactitud, pero en Estados Unidos, la *Food and Drug Administration* (FDA) ha utilizado un modelo por computadora para estimar las pérdidas debidas por algunas micotoxinas. Sólo en Estados Unidos, el costo económico medio anual por pérdidas de cultivos de aflatoxinas, fumonisinas y deoxinivalenol está estimado en \$932 millones de dólares por año (CAST, 2003).

En un estudio realizado por Mitchel y col. (2016), estimó que la contaminación por aflatoxinas podría provocar pérdidas de entre 52.1 millones a 1.68 billones anualmente en los Estados Unidos. Sin embargo, las pérdidas económicas por aflatoxicosis son difíciles de estimar; ya que deben tomar en cuenta pérdidas como baja ganancia de peso, inmunosupresión en los animales de producción, así como pérdidas en animales de compañía (Robens y Cardwell, 2005).

Las aflatoxinas se convierten en otro metabolito tóxico que es excretado en la leche y es un aspecto de importancia económica a considerar en la aflatoxicosis en ganado lechero (EFSA, 2004).

1.2. GÉNERO *Aspergillus*

El género *Aspergillus* consiste en alrededor de 250 especies reconocidas, recibe su nombre por su característico conidióforo, basado en la similitud que tiene ésta estructura en el *aspergillum*, un implemento litúrgico usado para esparcir agua bendita (Figura 2) (Klich, 2007).

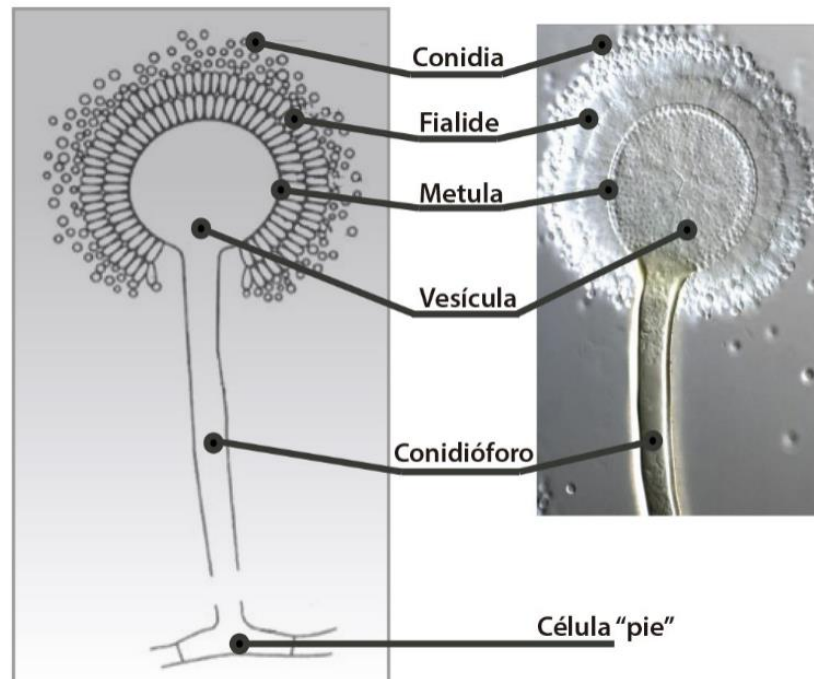


Figura 2. Característica del conidióforo de aspergillus. Fuente: adaptada de Klich, 2007 y Samson, 2014

1.2.1. Características morfológicas

Aspergillus flavus se caracteriza por su rápido crecimiento en medio de cultivo de colonias verde amarillas, que miden de 65-70 mm de diámetro después de 7 días de crecimiento en la oscuridad, a 25 °C en medio Czapek de extracto de levadura (CYA). El conidióforo normalmente mide de 400-800 μm de largo y es de pared rugosa. Las vesículas tienen forma globosa a elongada y miden normalmente 20-45 μm de diámetro (Klich, 2007).

A. flavus ha sido conocido como una especie asexual, que sólo produce esporas asexuales, conidias y cuerpos asexuales de hibernación o esclerocios, esta especie ha sido clasificada en dos grupos basado en el tamaño de sus esclerocios: (Tran-Dinh y col., 1999).

- Cepas L (Grupo I) con esclerocios >400 mm de diámetro
- Cepas S (Grupo II) con esclerocios <400 mm de diámetro

Algunos miembros del género producen teleomorfos (estadios sexuales) el estadio sexual de *A. flavus* y *A. parasiticus* ha sido clasificado como *Petromyces flavus* (Tran-Dinh y col., 1999).

1.2.2. Características biológicas

La mayoría de las especies del género *Aspergillus* son hongos filamentosos saprófitos que desempeñan un papel esencial en la degradación de la materia orgánica. Su hábitat natural es el suelo, donde sobreviven y se desarrollan sobre materia en descomposición. Este género es uno de los más abundantes en la naturaleza y puede encontrarse en cualquier ambiente, ya que ha sido aislado de una amplia variedad de zonas climáticas, aunque es más frecuentemente encontrado en zonas templadas (Klich, 2007). Se reproduce por conidios cuya germinación da origen a las hifas. Para su crecimiento, *Aspergillus* requiere de una humedad relativa entre el 70.0 y 90.0 %, en la semilla requiere un contenido de agua entre 15.0 y 20.0 %, además de un rango de temperatura amplio de 0 a 45 °C (Klich, 2002).

1.2.3. Características moleculares

El genoma de *Aspergillus flavus* es ligeramente mayor que el de *Aspergillus fumigatus*, aproximadamente 30 megabases (Mb), *Aspergillus terreus* (30 Mb), *Aspergillus niger* (34 Mb) y *Aspergillus nidulans* (31 Mb). A pesar de esta variación en los tamaños de los genomas, todas las especies de *Aspergillus* tienen ocho cromosomas. Aunque no se han secuenciado sus genomas, con base en estudios cariotípicos se ha sugerido similitud en el tamaño del genoma de *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus sojae* con respecto a *A. flavus* (Amaike y Keller, 2011).

Los genes para la biosíntesis de aflatoxinas, así como muchos metabolitos secundarios están agrupados (Cary, 2003). El grupo completo de 25 de genes se ha secuenciado y tiene 82 kb de longitud (Yu y col., 2004)

A nivel molecular, más de 25 genes conglomerados en una región de 70 Kb codifican las enzimas y proteínas reguladoras de la síntesis de aflatoxinas en *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*. Entre ellos, los genes *hexA*, *hexB* y *pksA* (Ehrlich y col., 2005).

1.2.4. Distribución y ocurrencia

Aspergillus flavus es un patógeno oportunista de cultivos, especialmente de los que contienen aceites, como el maíz, cacahuate y algodón. El hongo está presente en el suelo como conidia o sclerotia y en los tejidos de las plantas como micelio.

El hongo es aislado de una amplia variedad de zonas climáticas pero es más frecuentemente encontrado en climas templados (Klich, 2007).

El esclerocio, que es una masa compacta de micelio endurecido que contiene reservas alimenticias sobrevive en el suelo bajo severas condiciones medioambientales y produce conidias (posiblemente también ascosporas) (Horn, 2009), permitiendo que la población incremente en condiciones climáticas de calor y humedad (Payne y col., 1998).

Los micelios germinan del esclerocio, los cuales forman conidióforos. La dispersión de conidias por el aire está asociado con infección de la superficie del suelo de cultivo, como en el maíz; mientras que el movimiento del suelo y la dispersión por la lluvia son quizá más importantes para la infección de la semilla del cacahuate y algodón (Cotty, 2001). El hongo coloniza los estigmas (barbas) y el grano de la planta, en el caso del maíz. La incidencia de la colonización es mayor en granos de maíz maduro que en granos jóvenes (Payne y col., 1998).

1.2.5. Condiciones para la producción de Aflatoxinas

El género *Aspergillus* está dividido secciones. La sección Flavi contiene a los principales hongos productores de aflatoxinas: *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* (Bezerra y col., 2014). Hay especies menos comunes productoras de aflatoxinas en esta sección: *A. nonius*, *A. pseudotamarii*, *A. bombysis* y *A. parvisclerotigenus*. Hay cuatro especies que no están en la sección Flavi que se

conoce que producen aflatoxinas: *A. ochraceoroseus*, *A. rambelii*, *Emericella venezuelensis* y *E. astellata* (Frisvad y col., 2005).

Recientemente se han reportado dos nuevas especies productoras de aflatoxinas: *Aspergillus pseudocaelatus sp. Nov* y *Aspergillus pseudonomius sp. Nov.* (Varga y col., 2011).

1.2.5.1. Morfotipo y especie. La especie productora de aflatoxinas que causa mayores contaminaciones es *A. flavus*, dentro de la cual se han definido dos morfotipos denominados: L y S.

La producción de aflatoxinas en aislamientos L es muy variable con algunos aislamientos altamente productores de toxinas y otros que no producen toxinas; mientras que los aislamientos S producen altas y consistentes concentraciones de aflatoxinas (hasta 10,000 µg/kg) (Probst y col., 2010). Las cepas S y L de *A. flavus* producen aflatoxinas B₁ y B₂, pero las cepas S solo producen aflatoxinas G₁ y G₂ (Tran-Dinh, 1999).

1.2.5.2. Humedad y temperatura. Las altas temperaturas y el estrés por sequía, durante el periodo de desarrollo de la semilla y la maduración, son factores que permiten que la planta se agriete, permitiendo la entrada de esporas fungales (Codex Alimentarius, 2003).

1.2.5.3. Relación con insectos. Otro factor estresante es el daño por insectos (Bezerra, 2014). Los insectos que se asocian con aumento en las infecciones por *Aspergillus* son: el gusano barrenador menor del tallo de maíz *Elasmopalpus lingosellus* Zeller, escarabajos *Nitidulid* y gorgojo del arroz *Sitophilus zeamais* (LaPrade y Manwiller, 1977).

1.2.6. Control de la infección fúngal

Los posibles orígenes de la infección fúngal a la planta son diversos. Deben llevarse a cabo estrategias que prevengan la contaminación por hongos y micotoxinas de manera integral a lo largo de la cadena alimenticia. Se han identificado tres puntos en los que se puede intervenir: la prevención, debe realizarse antes de que ocurra cualquier infestación fúngal.

El segundo punto es durante el periodo de invasión fúngal a la planta y la producción de micotoxinas. El tercer punto es iniciado cuando los productos agrícolas han sido identificados como fuertemente contaminados. Los esfuerzos deben encaminarse a los dos primeros puntos, ya que una vez que las micotoxinas están presentes, es difícil de eliminarlas de manera práctica (Jouany, 2007).

1.2.6.1. Plantación. El uso de técnicas de cultivo apropiadas puede reducir el riesgo de contaminación fúngal, como la remoción de desperdicios, para prevenir la contaminación en los siguientes cultivos, ya que el principal reservorio de inoculación fúngal son los residuos de cultivos previos (Munkvold, 2003). La semilla debe estar libre de plagas y enfermedades antes de la plantación para asegurar plantas saludables, que sean capaces de resistir el ataque durante la temporada de crecimiento. Pueden seleccionarse variedades de granos por su habilidad para resistir el ataque de hongos (Clements y White, 2004). La fecha de siembra tiene un efecto indirecto en la producción e infección por esporas (Codex Alimentarius, 2003).

1.2.6.2. Precosecha. Se han propuesto diferentes microorganismos como agentes biocontrol de aflatoxinas en la precosecha, como por ejemplo *Aspergillus flavus*, ya que las cepas no aflatoxigénicas de las mismas especies podrían ser agentes biocompetitivos, mostrando que el tratamiento del suelo con aislamientos de *A. flavus* y *A. parasiticus* reducen significativamente la contaminación con aflatoxinas (Dorner y Cole, 2002). Otra forma de control, es elegir el momento adecuado de la cosecha, cuando el grano se encuentre en la madurez y tenga baja humedad (Nahm, 1995), esto permitirá evitar la contaminación fúngal durante el almacenaje (Jouany, 2007).

1.2.6.3. Postcosecha. El almacenaje es crítico en la prevención del crecimiento de hongos y la producción de micotoxinas en forrajes cosechados. Mantener el grano con una humedad menor al 15.0 % a bajas temperaturas, evitar mezclar granos y almacenarlos durante largos períodos de tiempo (Kabak, 2006).

Se debe realizar el ensilaje con forraje con una humedad apropiada, el silo debe ser llenado rápidamente, compactarse adecuadamente y sellarse completamente. El ensilaje debe darse a los animales inmediatamente después de removido y lo que no se consuma debe limpiarse de los comederos regularmente (Jouany, 2007).

1.3. PRINCIPALES MICOTOXINAS

Las toxinas producidas por hongos filamentosos son llamadas micotoxinas. Las micotoxinas son metabolitos secundarios, sin una función aparente en el metabolismo normal de estos hongos. Son producidas cuando el hongo alcanza su madurez, aunque no de forma exclusiva (Bezerra, 2014).

El término micotoxinas, por consenso general, es usado exclusivamente para las toxinas de los hongos asociados con productos alimenticios y alimentación animal, excluyendo las toxinas producidas por hongos comestibles (FAO, 2011).

1.3.1. Fumonisina

Las fumonisinas (principalmente FB₁ y FB₂) son metabolitos secundarios sintetizados *Fusarium proliferatum* y *Fusarium verticillioides*. El maíz es el principal producto afectado por este grupo de toxinas, también se ha encontrado en sorgo y arroz (CAST, 2003). Las áreas afectadas muestran una "pudrición de color rosado". Las semillas con daño por aves, insectos u otro tipo de rotura del grano, son las que con frecuencia tienen altos niveles de toxina (Richard, 2007).

Se ha demostrado que la FB₁, causa inmunosupresión, neurotoxicidad, hepatotoxicidad, nefrotoxicidad y teratogenicidad. La FB₁ ha sido relacionada en animales domésticos con leucoencefalomalacia equina y con edema pulmonar del cerdo, origina hepatotoxicidad y nefrotoxicidad en roedores y cáncer esofágico en el hombre (Martínez y Anadón, 2012).

1.3.2. Ocratoxina

Las ocratoxinas tienen una estructura química similar a las aflatoxinas, son metabolitos producidos por diferentes especies del género *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, la más importante es la ocratoxina A (OTA) que es producida por *A. ochraceus*, *P. verrucosum* y *P. viridicatum* (Bayman y col., 2002). La contaminación por OTA ha sido observada en productos agrícolas tales como granos de cereales y granos de café verde, productos de carne fermentada y vinos (Pitt, 2000).

La producción de OTA se favorece bajo condiciones de humedad y temperatura moderadas. La OTA se absorbe a través del tracto gastrointestinal y pasa a la circulación sistémica, detectándose niveles en sangre y tejidos. Las concentraciones más altas se alcanzan en riñón, seguido de hígado, músculo y grasa (Martínez y Anadón, 2012). Ha sido asociada con nefropatías en todos los animales estudiados hasta la fecha (Reddy y Bhoola, 2010).

La ocratoxina tiene una estructura química similar a las aflatoxinas, son derivados 3,4-dihidrometil isocumarina unidos con un enlace amida a un grupo amino de la L-β fenilalanina (estructura fenilalanina-cumarinas) (Figura 3) (Richard, 2007).

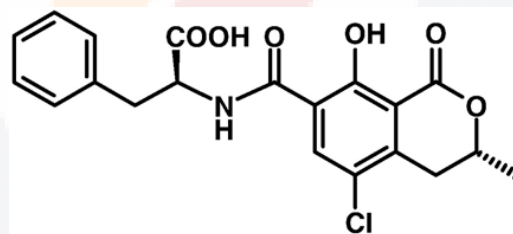


Figura 3. Estructura química de la ocratoxina A (Richard, 2007)

La OTA está asociada con nefropatías en todos los animales en los que se ha estudiado. En humanos es común encontrarlo en suero, debido a que esta sustancia tiene una vida media en relación a su eliminación (Reddy y Bhoola, 2010). Es teratógena en el ratón, rata, hamster y pollos. Tiene propiedades genotóxicas e inmunosupresoras (Martínez y Anadón, 2012).

1.3.3. Tricotecenos

Los tricotecenos (TCT) comprenden un grupo de alrededor de 100 metabolitos fungales con la misma estructura básica. Muchos géneros fungales son capaces de producir TCT, pero muchos de ellos han sido aislados de *Fusarium spp.* Todos

los tricotecenos contienen un epóxido en la posición C_{12,13}, que es responsable de su actividad toxicológica. Los TCT afectan células en división celular, como las células del revestimiento gastrointestinal, la piel, células linfocíticas y eritrocíticas.

La acción tóxica de los TCT resulta en necrosis extensiva de la mucosa oral y la piel en contacto con la toxina, disminución de la función inmunológica y de la médula ósea (Schwarzer, 2009). A nivel celular, el principal efecto tóxico de los TCT, tienen una fuerte capacidad de inhibir la síntesis de proteínas en células eucarióticas (Stafford, 1973).

Los TCT han sido detectados en maíz, trigo, cebada, avena, arroz, centeno, vegetales y otros cultivos. Son contaminantes comunes de alimento y piensos de aves de corral (Leeson y col., 1995). Ejemplos de TCT tipo A incluyen toxina T-2 y toxina HT-2, y diacetoxiscirpenol (DAS), Fusarenone-X, deoxinivalenol (DON) y nivalenol (NIV) son de las más comunes del tipo B. Los tipos A y B se distinguen por la presencia o ausencia de un grupo carbonil en la posición C₈, respectivamente (Schwarzer, 2009).

1.3.4. Zearalenona

Es un metabolito secundario producido principalmente por *Fusarium graminearum*, además de otras especies como *Fusarium culmorum*, *Fusarium equisetii* y *Fusarium crookwellense*. Estas especies fungales son ampliamente encontradas como contaminantes en muchos países. Su estructura es parecida al 7B-estradiol, la principal hormona producida por el ovario humano. La zearalenona podría ser mejor clasificada como un estrógeno no esterooidal o un micoestrogeno (Figura. 4) (Bennet y Klich, 2003).

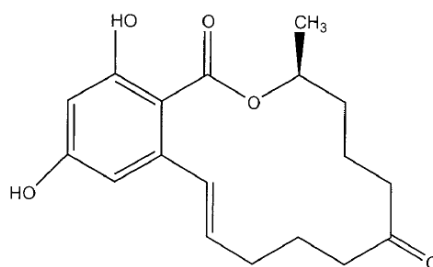


Figura 4. Estructura química de la zearalenona (Bennet y Klich, 2003)

Esta toxina es encontrada con mayor frecuencia en el maíz, aunque también se encuentra en trigo, cebada, sorgo y centeno (CAST, 2003). Los granos afectados muestran un color rosado asociado con la producción de un pigmento rosado que se produce simultáneamente con la zearalenona (Richard, 2007).

El efecto más notable de la zearalenona es que causa desarrollo precoz de glándula mamaria y otros efectos estrogénicos en cerdas jóvenes, así como alargamiento prepucial en cerdos jóvenes. Los cerdos son más sensibles a la zearalenona que los ratones y otras especies como vacas y aves de corral.

Cuando las cerdas consumen alimento contaminado durante la gestación los efectos tóxicos se han relacionado con el nacimiento de lechones débiles y camadas de tamaño pequeño. También se han observado problemas reproductivos en vacas y ovinos (Nezami y col., 2002).

1.4. CARACTERÍSTICAS DE LAS AFLATOXINAS

Las principales características de las aflatoxinas se describen a continuación.

1.4.1. Fisicoquímicas

Las aflatoxinas (AF) son cristales sólidos de color blanco al amarillo, sin olor, sin sabor ni color, son insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos (metanol, cloroformo, acetona, acetonitrilo y dimetilsulfóxido). Son estables por años en cloroformo o benceno en refrigeración y oscuridad. Las AF en solución son sensibles a la luz, se descomponen en el aire, oxígeno, soluciones alcalinas o de ácidos suaves (OPS-OMS, 1983).

Las aflatoxinas (AF) entran al organismo con la comida, a través de la piel o son inhaladas, resisten altas temperaturas, se descomponen de 237 °C a 306 °C, según el tiempo de calentamiento, la humedad del alimento y el pH. Las AF no se rompen con la ultrapasteurización, cocción, freído o hervido, fermentación, ni nixtamalización, pero se pueden destruir si se calientan en autoclave con amonio o hipoclorito de sodio (OPS-OMS, 1983).

Durante la nixtamalización (pH de 8 a 12), el anillo de lactona de las AF se abre y pierden su fluorescencia, por lo que se puede pensar que están ausentes; pero en contacto con soluciones ácidas (pH de 1 a 3) como el jugo

gástrico y regresando después a un pH neutro, las AF se reactivan y fluorescen otra vez (Price y Jorgensen, 1985).

1.4.2. Biológicas

Las aflatoxinas se comportan biológicamente como inmunosupresores que inhiben la fagocitosis y la síntesis de proteínas. Interrumpen la formación del DNA, RNA y las proteínas en el ribosoma (Carvajal, 2013). Por tal razón, la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC, 2013, por su siglas en inglés), en 1988 clasificó a las AF en el grupo 1 de micotoxinas que incluye sustancias o mezclas de ellas con alto poder cancerígeno en humanos.

1.4.3. Tipos de aflatoxinas

Las aflatoxinas pertenecen al grupo de difuranocumarinicos, son moléculas con estructuras de simples anillos heterocíclicos con peso molecular por arriba de 50 Da, que no muestran inmunogenicidad (Bezerra y col., 2014). Contienen en su molécula una mitad dihidrofurano o tetrahydrofurano unida a un anillo cumarina. Las aflatoxinas se dividen en 2 grupos principales: Grupo B, con un anillo ciclopentanona y Grupo G, con un anillo lactona (Figura 5) (Martínez y Anadón, 2012).

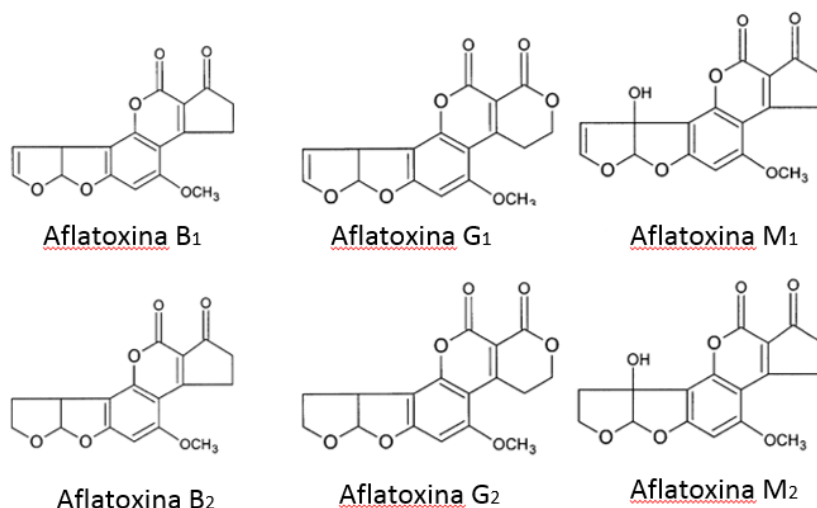


Figura 5. Estructura química de aflatoxina B (Aflatoxina B₁ y Aflatoxina B₂), aflatoxina G (Aflatoxina G₁ y Aflatoxina G₂) y aflatoxina M (Aflatoxina M₁ y Aflatoxina M₂) Fuente: Adaptado de Martínez (2012)

Aspergillus flavus produce AFB₁ y AFB₂ y *Aspergillus parasiticus* AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂, las letras hacen referencia al color de su fluorescencia bajo

luz ultravioleta de onda larga (B=blue, G=green) y los números indican la distancia relativa de migración en cromatografía de capa fina (Moss, 2002).

1.4.4. Toxicocinética

Las aflatoxinas al ser ingeridas en el alimento se absorben en el tracto gastrointestinal por que son altamente liposolubles (IARC, 2002). Posteriormente se transporta a la sangre, através de los glóbulos rojos y proteínas plasmáticas hasta llegar al hígado (Moudgil y col., 2013). En el hígado se biotransforman por enzimas del citocromo P450. Las principales enzimas que llevan a cabo la bioactivación de aflatoxina B₁ a AFB₀ son 1A2 Y 3A4. La enzima 1A2 forma principalmente endoepóxido y la AFM₁. La enzima 3A4 interviene en la formación de exo-hepóxido y el metabolito AF1Q1. La AFM₁ se excreta dentro de las siguientes 48 horas de la ingestión del 1 al 4% de la AFB₁ ingerida (IARC, 2002).

En los rumiantes la AFM₁ y AFM₂ son metabolitos hidroxilados de AFB₁ y AFB₂, que se encuentran en particular en la leche de consumo procedente de animales que han ingerido pienso contaminado (Martínez y Anadón, 2012). En el rumen, la AFB₁ es convertida en aflatoxicol. La AFB₁ que escapa a la degradación ruminal es parcialmente convertida por metabolismo hepático en AFM₁ (4-hidroximetabolito de AFB₁) (Kuilman y col., 2000).

La protección al efecto dañino del epóxido aflatoxina en el hígado se lleva a cabo por la enzima detoxificante S-transferasa AFB₀-Glutation, que cataliza la conjugación de AFB₀ con glutatión (Ausubel y col., 2003). Hay defectos específicos en la detoxificación de AFB₀ mediada por esta enzima, esto enfatiza el mecanismo de excesiva sensibilidad de los pavos domésticos a alimentos contaminados con aflatoxinas (Klein y col. 2000).

1.4.5. Efectos tóxicos

Los efectos tóxicos de la AFB₁ ocurren después de la bioactivación, que permite la formación del epóxido reactivo AFB₁, el cual actúa mediante la interacción con el DNA y algunas enzimas para alterar el gen P53 e inhibir las actividades enzimáticas, que se conjugan con proteínas y glutatión (Mishra y Das, 2003).

Las aflatoxinas son mutagénicas debido a que su estructura es afín a los ácidos nucleicos y proteínas, formando enlaces covalentes. Esto ocasiona alteraciones en la transcripción y traducción, así como la formación de un aducto de ADN. Por esta razón las aflatoxinas ocasionan a nivel celular la inhibición del ADN, ARN, mitosis y alteraciones cromosómicas, provocando efectos carcinogénicos, teratogénicos y mutagénicos (Carvajal, 2013; Moudgil y col., 2013).

Las aflatoxinas contribuyen a la ocurrencia de aplasia tímica (ausencia congénita del timo y paratiroides con la consecuencia de deficiencia en células inmunitarias, también conocida como síndrome Di George's (Raisuddin, 1993).

Las aflatoxinas tienen propiedades oncogénicas e inmunosupresoras que inducen infecciones en la gente que consume alimento contaminado con estas sustancias. En un estudio realizado en África y Asia se encontró que contribuye significativamente al incremento en el riesgo de cáncer de hígado en la gente infectada de forma crónica con hepatitis B (VHB) (Groopman y col., 2008).

1.5. MÉTODOS DE DETECCIÓN

El proceso de análisis de micotoxinas en productos consiste en varias etapas. El primer paso es el muestreo. Posteriormente es necesario preparar las muestras (molido y limpieza preliminar) y extraer las micotoxinas que serán estudiadas, generalmente con solventes orgánicos, como acetonitrilo, acetona y cloroformo, La extracción es seguida por la purificación, la cual es parte esencial de muchos de los métodos físicos y químicos de análisis (Urosov y col., 2010).

1.5.1. Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA)

Los inmunoensayos son métodos muy apropiados por su rapidez en el análisis de rutina para la detección de aflatoxinas (Li y col., 2009).

La técnica de ELISA se usa con el propósito de descartar la presencia de una toxina específica en una muestra. También para evaluar la presencia por arriba de cierta concentración o bien la ausencia de una micotoxina en la muestra. Hay pruebas cualitativas, semicuantitativas y cuantitativas.

En el caso de la ELISA generalmente no se requiere un procedimiento de limpieza previa de la muestra, como en otras técnicas analíticas. Se puede usar directamente un homogenizado de una muestra que contenga la toxina. Se cuantifica utilizando una microplaca estandarizada, un tubo de ensayo o una membrana, dependiendo del formato de la ELISA. Las muestras sospechosas deben ser confirmadas con técnicas analíticas clásicas como HPLC (Magan y Olsen, 2004).

La ELISA comúnmente está basada en un formato competitivo en el que se usa un conjugado o una micotoxina acoplada a una enzima o un anticuerpo primario específico para la toxina a analizar. Los pozos en la microplaca contienen un anticuerpo contra micotoxinas.

El reactivo es un complejo covalente de micotoxina y enzima, comúnmente de peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina. El reactivo se mezcla con un extracto de una muestra, posteriormente la mezcla es colocada en el pozo. En el pozo control sin micotoxina, el conjugado enzima-micotoxina puede saturar el anticuerpo unido, después al adicionar el sustrato cromógeno, da como resultado el desarrollo de color. En el pozo de prueba, las moléculas libres de micotoxinas en el extracto compiten con el conjugado en el anticuerpo unido, permitiendo un ligero desarrollo de color. Las columnas de inmunoafinidad pueden ser usadas para purificar y concentrar las muestras de micotoxinas (Strark, 2009).

1.5.2. Cromatografía de capa fina

Es un método muy popular para el análisis de micotoxinas, ya que permite analizar un gran número de muestras en un corto período de tiempo (Cigié y Prosen, 2009).

Se utiliza para el análisis cualitativo y semi-cuantitativo, tiene un bajo costo de operación e identifica compuestos que se encuentran bajo el espectro de luz UV-visible. Se utilizan comúnmente placas de gel de sílica. Al igual que otras cromatografías, consiste de una fase estacionaria y una fase móvil y el principio es el mismo: la sustancia de interés se adherirá a la fase estacionaria o se moverá con la fase móvil, viajando a una distancia que es inversamente proporcional a la afinidad por la fase estacionaria. La fase estacionaria más

comúnmente usada es una capa de gel de sílica. La fase móvil es un solvente que puede ser agua, un solvente orgánico o una mezcla de ambos (Berny, 2005).

1.5.3. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

Actualmente el análisis de micotoxinas se basa principalmente en HPLC, el cual emplea varios adsorbentes dependiendo de la estructura física y química de la micotoxina (Valenta, 1998).

Este método tiene una alta sensibilidad y especificidad. Por ejemplo: permite cuantificar una aflatoxina de forma individual, por lo que se puede obtener una mayor información, comparado con otros métodos, que solo permiten cuantificar las aflatoxinas totales. Esto es muy importante cuando se requiere el análisis de AFB₁ (Muscarella y col., 2009).

Para la separación se emplean columnas fase normal y reversa dependiendo de la polaridad de la toxina (Cigié y Prosen, 2009). Los protocolos usados para la detección de micotoxinas son muy similares. Los detectores más comúnmente usados son los de fluorescencia o de luz UV, basándose en la presencia de un cromatóforo en las moléculas de forma natural de algunas micotoxinas (Valenta, 1998).

1.5.4. Moleculares

Las especies fungales capaces de sintetizar aflatoxinas se pueden identificar mediante la comparación de la secuencia del ADN y ADNc (ADN complementario), con el fin de determinar si los genes para la biosíntesis de micotoxinas están expresados o no. El estudio del ADNc también puede usarse para determinar qué grupo de genes están expresados para la biosíntesis de aflatoxinas (Bhatnagar y col., 2006).

Hay 25 genes que están involucrados en la regulación y biosíntesis de aflatoxinas (Bhatnagar y col., 2006). Se han usado iniciadores que tienen secuencias afl-2, afl-D, afl-M y afl-P (apa-2, nor-2, vor-2 y omt-2 respectivamente para la detección e identificación de aislamientos de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* que producen aflatoxinas, en muestras de colonias o extractos de alimentos (Chen y col., 2002).

1.6. CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN POR ADSORBENTES

Actualmente no hay tecnología disponible que elimine por completo la contaminación con micotoxinas (Yiannikouris y col., 2003). Son sustancias muy estables, no hay tratamiento físico o químico que se pueda aplicar sin alterar el valor nutricional del grano o alcanzar un alto costo. Lo más común es el uso de técnicas para reducir la biodisponibilidad mediante el uso de agentes secuestrantes o adsorbentes (EFSA, 2009).

1.6.1. Definición de los agentes detoxificantes

La Comisión de Regulación no. 386/2009 el 12 de mayo de 2006 del Consejo del Parlamento Europeo, definió a los agentes detoxificantes de micotoxinas como un nuevo grupo funcional de aditivos alimenticios: *"sustancias para reducir la contaminación de alimentos por micotoxinas: sustancias que pueden suprimir o reducir la absorción, promover la excreción de micotoxinas o modificar su modo de acción"*.

1.6.2. Características de un buen secuestrante

Un secuestrante efectivo es aquel que puede unir la micotoxina en un tiempo corto (Pimpukdee y col., 2004). La AFB₁, después de ser ingerida por el animal, es absorbida rápidamente a través del tracto gastrointestinal y llega al hígado vía vena porta. Las concentraciones de toxinas en el hígado generalmente alcanzan la más alta concentración después de la ingestión, entre media y una hora (Ding, 1996) La unión de aflatoxina B₁ al secuestrante debe ser en un período corto de tiempo para que sea considerado como un buen secuestrante (van Rensburg y col., 2006).

Otra característica de un buen secuestrante es que debe unirse firmemente a la micotoxina en alimentos contaminados sin disociarse en el tracto gastrointestinal del animal; por lo que el complejo adsorbente-toxina debe pasar a través del tracto digestivo y ser eliminado por las heces. De ésta manera se previene y minimiza la exposición del animal a la micotoxina (Díaz y col., 2003).

1.6.3. Características de los silicatos

El 95% de la corteza terrestre está formada por silicatos, esta clase de mineral es la más frecuente en los suelos. Es importante en los suelos ya que es la fracción más rica en especies minerales. Los minerales de arcilla forman parte de esta clase mineralógica (Porta, 2008).

Los compuestos del suelo están formados por pocos elementos, el oxígeno y el silicio son los más abundantes, constituyen del 70.0 al 90.0 % de la masa mineral (Sylvia, 1997).

La unidad estructural de los silicatos es un tetraedro regular con un núcleo de silicio unido a 4 átomos de oxígeno por enlaces covalentes que se encuentran en los vértices (Porta, 2008) (Figura 6).

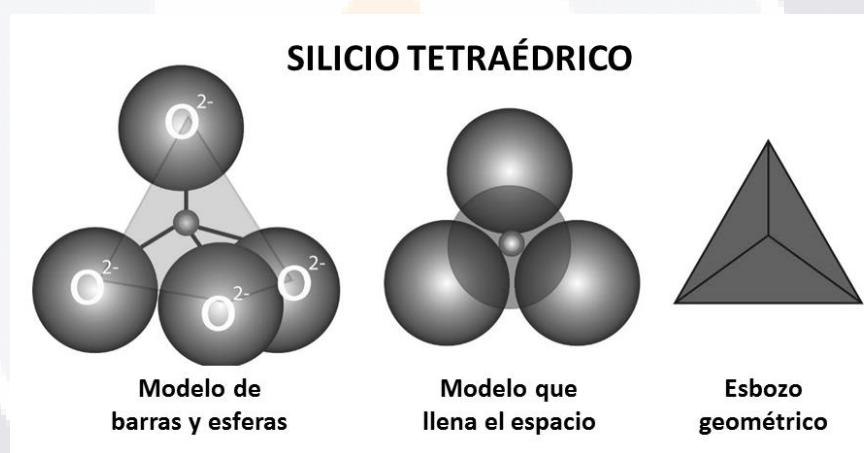


Figura 6. Estructura básica de los silicatos. El catión silicio se encuentra al centro y está rodeado de 4 aniones de oxígeno. Tomado de: http://www.visionlearning.com/library/module_viewer.php?mid=140&l=s

Los tetraedros pueden unirse entre ellos compartiendo oxígenos y pueden formar diversas estructuras incluyendo anillos (ciclosilicatos), cadenas (inosilicatos), hojas (filosilicatos) o arreglos tridimensionales (tectosilicatos) (Shulze, 1989).

1.6.3.1 Filosilicatos. Esta subclase presenta estructuras laminares apiladas en forma de paquetes, como hojaldre.

Son minerales muy importantes en los suelos y en la industria ya que constituyen los minerales de arcilla. Determinan muchas de las propiedades químicas y físicas de los suelos (Porta, 2008).

Los filosilicatos son la única clase de minerales que han sido incorporadas a una variedad de procesos en la industria. La funcionalidad de esta clase de minerales es resultado de sus diferencias estructurales y propiedades químicas de las capas de silicatos (Porta, 2008; Franco, 2009).

Las láminas de los silicatos están formadas por el apilamiento de capas, la primera está formada por cristales regulares cuya estructura básica es el tetraedro de silicio (Franco y Maspoch, 2009). El tetraedro se encuentra eléctricamente descompensado, ya que el silicio aporta 4 cargas positivas, frente a las 8 cargas negativas de los cuatro oxígenos presentes en los vértices, por lo que debe unirse a otros cationes para neutralizar sus cargas (Schulze, 1989; Franco, 2009) (Figura 7a).

La segunda capa está formada por octaedros de silicio y aluminio, cuyos vértices están ocupados por oxígenos. Al igual que los tetraedros los octaedros están eléctricamente descompensados, puesto que tienen 2 cargas positivas (si el catión es Mg^{2+}) o 3 cargas positivas (si el catión es Al^{3+} , frente a las 12 cargas negativas aportadas por sus 6 vértices. Para que se neutralicen, los vértices tienen que compartirse entre sí formando una capa octaédrica (Franco, 2009) (Figura 7b).

Las distintas combinaciones de ambas láminas y la naturaleza de unión entre ellas son lo que distingue los diferentes tipos de filosilicatos.

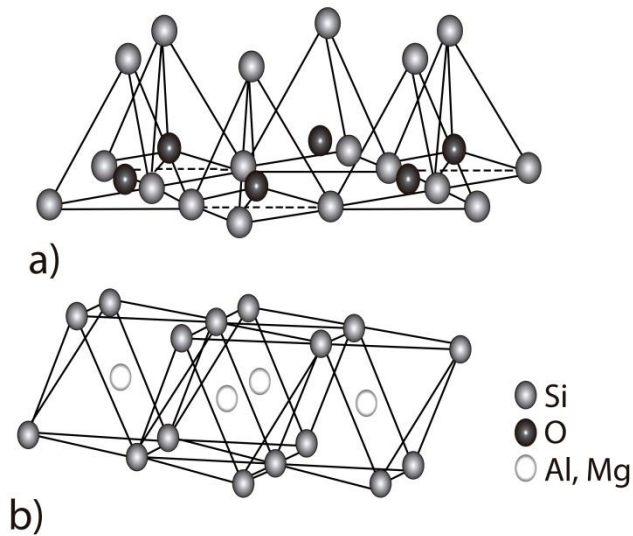


Figura 7. Estructuras básicas de arcillas: a) capa tetraédrica y b) capa octaédrica. Tomada de Franco, 2009).

1.6.3.2. Adsorción de micotoxinas en superficie de las arcillas Los responsables de los procesos de adsorción son los grupos funcionales existentes en la superficie del adsorbente. En el caso de las partículas de arcilla, la existencia de carga eléctrica puede ser debida a sustituciones isomórficas (sustitución de cationes por otros de distinta carga), en cuyo caso, los grupos funcionales implicados son Al-OH (aluminol) y Si-OH (silanol) y a cargas no compensadas en los bordes de las arcillas debidas a la ionización de grupos OH, estas últimas cargas dependen del pH del medio (Porta, 2008; McBride, 1989).

Las micotoxinas pueden ser adsorbidas en la estructura porosa de las arcillas y quedar atrapadas por cargas eléctricas elementales, puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals y captura o unión física. La tasa de adsorción dependerá del tamaño y carga eléctrica de la toxina considerando la estructura de la arcilla (Phillips y col., 1990).

El mecanismo de adsorción de AFB₁ por la montmorillonita Nova Sil, es un mecanismo de electrón donador aceptor. Las láminas de Nova Sil están cargadas negativamente debido a sustitución isomórfica y además de que atraen iones cargados positivamente para balancear esta carga. Los compuestos con áreas de deficiencias de electrones (áreas parcialmente positivas) pueden ser atraídas por las láminas (Haderlein, 1996).

Los carbonos que comprenden el sistema dicarbonil en las aflatoxinas son parcialmente positivos y han mostrado ser esenciales en el proceso de adsorción (Phillips, 2008).

Por otro lado, Deng (2010) propuso dos mecanismos de unión de aflatoxina con esmectita: a) La interacción de un ion dipolo entre dos oxígenos en el extremo carbonil con intercambio de cationes y b) La unión entre el grupo funcional carbonil e intercambio de cationes hidratados en la molécula de agua (Deng, 2010).

Cabe señalar que las arcillas pueden adsorber micronutrientes y tener efectos negativos en la biodisponibilidad de minerales y elementos traza (Moshtaghian y col., 1991).

1.6.4. Tipos de agentes detoxificantes

Hay dos tipos de agentes detoxificantes: los agentes biotransformadores que actúan degradando las micotoxinas en metabolitos menos tóxicos, estos pueden ser bacterias, hongos o enzimas, por otro lado están los agentes adsorbentes, que reducen la exposición a las micotoxinas disminuyendo su biodisponibilidad, también son conocidos como secuestrantes, estos pueden ser compuestos inorgánicos a base de silicatos o arcillas o pueden ser orgánicos como por ejemplo a base de carbón o paredes celulares de levaduras, entre otros (EFSA, 2009).

1.6.4.1. Levaduras y extractos de levaduras. Las paredes celulares de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, además de tener un excelente valor nutricional, son usadas en la dieta como producto secuestrante. La adsorción de micotoxinas puede ser mejorada con el uso de las paredes celulares en lugar de la célula completa. Las paredes celulares consisten prácticamente en proteínas y carbohidratos completos. La fracción del carbohidrato está compuesta principalmente por glucosa, manosa y N-acetilglucosamina. Los glucanos y mananos son los dos principales polisacáridos que se encuentran en la misma concentración en *Saccharomyces cerevisiae*. También contienen lípidos. Todos estos componentes tienen muchos centros de adsorción fácilmente accesibles así

como diferentes mecanismos de unión, como por ejemplo, puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas (Huwig y col., 2001).

Yiannikouris y col., (2004) demostraron que la fracción B-D-glucano de las paredes celulares de levaduras está involucrada directamente en el proceso de unión a micotoxinas y que la estructura organizacional de los β -D-glucanos modula la solidez de la unión. Se ha demostrado que los puentes de hidrogeno y las fuerzas de Van der waals están involucradas y son estables a las condiciones de la digestión (Yannikouris y col., 2004).

1.6.4.2. Bentonitas. Las bentonitas se originan de ceniza volcánica (Ramos y Hernández, 1996). Pertenecen al grupo de los filosilicatos y son agentes adsorbentes con una microestructura cristalina estratificada y composición variable. Las bentonitas son generalmente arcillas impuras que consisten principalmente de montmorillonita. Debido a su contenido de montmorillonita, las bentonitas se hinchan formando geles tixotrópicos, ésta es una propiedad que exhiben ciertos geles de volverse líquidos cuando son agitados o mezclados (Díaz y Smith, 2005). Contienen sustitución isomórfica en la lámina octaédrica. Estas arcillas son naturalmente abundantes y tienen un área de superficie de 800 m²/g, haciéndolas un adsorbente ideal (Phillips y col., 2002).

1.6.4.3. Montmorilonitas. Son silicatos estratificados que adsorben sustancias orgánicas tanto en su superficie externa como en su espacio interlaminar (Ramos y Hernández, 1996). Los nanocompuestos modificados de montmorilonita (NMM) son un nuevo adsorbente, estos están desarrollados con técnicas de nanomodificación. Los NMM tienen un área de superficie considerable, alta porosidad y fuerte intercambio de cationes, actividad que trae consigo más sitios activos dando como resultado una adsorción más eficiente (Feng, 2007).

1.6.4.4. Zeolitas. Son tectosilicatos. La característica de su estructura es un armazón tridimensional tetraédrico de silicio. Estos minerales también experimentan sustitución de SiO₄ con AlO₃, resultando en una carga negativa neta que es balanceada por cationes intercambiables (Huwig y col., 2001). Al igual que los filosilicatos, las zeolitas son materiales adsorbentes debido a su gran superficie interna y volumen vacío (Ming y Mumpton, 1989).

1.6.4.5. Aluminosilicato hidratado de calcio y sodio (HSCAS). Es uno de los agentes secuestrantes más estudiados y pertenece a las arcillas minerales. (Galvano y col., 2001). Es uno de los adsorbentes más efectivos para aflatoxinas, y es el más comúnmente usado como aditivo en la alimentación animal. Se obtiene de forma natural o mediante tratamiento térmico de silicato de calcio (Huwig, 2001). En su estructura, las moléculas de agua unidas a un centro metálico o cristalizadas con un complejo metálico.

La evidencia sugiere que la aflatoxina puede reaccionar en diferentes sitios de la partícula de HSCAS, especialmente en la región interlaminar (Jaynes, 2007), ya que tienen numerosos grupos OH expuestos en su superficie octahédrica así como en los bordes, en éste sitio las cargas dependen del pH del medio. La adhesión del hidrógeno es un importante mecanismo de adsorción a las superficies (Koskinen y Harper, 1990). La deficiencia de cargas positivas característica de los aluminosilicatos, le confieren un gran potencial para adsorber compuestos cargados positivamente (Huwig, 2001).

El mecanismo de adsorción de aflatoxinas por HSCAS se basa en el proceso electron donador y aceptor, la adsorción se lleva a cabo por donación de electrones de cationes metálicos de la superficie negativa de la arcilla con los carbonos que conforman el sistema β -dicarbonil en la aflatoxina, formando un complejo (Phillips, 1999).

La adecuada orientación de AFB₁ es probablemente planar en la superficie interlaminar, esto podría favorecer la adsorción en la superficie del HSCAS (Phillips, 2008).

Se han realizado estudios con compuestos denominados organoaluminosilicatos, los cuales presentan su superficie modificada, los cuales pueden ser más efectivos para remover contaminantes orgánicos del agua que los aluminosilicatos no tratados (Jaynes y Zartman, 2011).

1.7. OTROS MÉTODOS DE CONTROL DE AFLATOXINAS

Algunos tratamientos físicos o químicos pueden transformar las micotoxinas en productos no tóxicos, los más estudiados se presentan a continuación:

1.7.1. Tratamiento térmico y radiación

El tratamiento con calor puede reducir, pero no eliminar las aflatoxinas. La temperatura debe estar cercana a la que normalmente se cocinan los alimentos y su eficacia depende de otros factores como el contenido de humedad del producto. Un proceso de cocción que disminuye drásticamente a las aflatoxinas es el proceso de nixtamalización (el maíz se remoja y cocina en una solución alcalina) es usado para preparar tortillas (Méndez y col., 2004). La radiación también ha sido usada para reducir aflatoxinas con diferentes grados de éxito (Klich, 2007). La pasteurización es ineficiente para remover aflatoxinas (CAST, 2003).

1.7.2. Amoniación

La amoniación del maíz es usado para disminuir el nivel de aflatoxinas en el alimento y ha sido usado por muchos años. Este proceso es particularmente efectivo contra Aflatoxina B₁ si se lleva a cabo a alta temperatura y presión. Uno de los productos de degradación es AFD1 el cual es menos tóxico que la Aflatoxina B₁. Sin embargo puede ser costoso además de dañar la calidad del alimento debido a un exceso en la concentración de amonía (Huwig y col., 2001).

1.7.3. Oxidación y reducción

Los agentes oxidantes reaccionan con numerosos grupos funcionales. Algunos agentes oxidantes como el ozono y el peróxido de hidrógeno han sido usados para disminuir la contaminación por micotoxinas. (McKenzie y col., 1997). El uso de agentes reductores como ácido ascórbico, bisulfito sódico y metabisulfito de sodio, también disminuyen los niveles de aflatoxinas (Kabak y col., 2006).

1.7.4. Otros

Las fibras micronizadas obtenidas de materiales vegetales, son otro tipo de agentes adsorbentes, están constituidos principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina, pueden ser obtenidas en partículas muy finas, así como polímeros como la colestiramina (Aoudia y col., 2009; Underhill y col, 1995).

1.8. EVALUACIÓN DE SECUESTRANTES

1.8.1. Métodos *in vitro*

Los métodos de adsorción *in vitro* tienen como ventaja principal la capacidad de demostrar si el agente secuestrante tiene un poco o ninguna afinidad para AFB₁.

Si el agente secuestrante no se une a AFB₁ *in vitro*, no será capaz de hacerlo en un ambiente *in vivo* (Díaz y col., 2003).

Los experimentos *in vitro* han sido realizados como herramienta de screening; sin embargo, deben ser complementados por estudios *in vivo* diseñados para demostrar tanto seguridad como eficacia (Taylor, 2001).

Existe un riesgo asociado a la inclusión de agentes secuestrantes no específicos, por lo que todos los secuestrantes de aflatoxinas deben ser probados en modelos que aseguren su eficacia, seguridad e interacción con nutrientes (Phillips y col. 2002).

1.8.1.1. Adsorción simple. El método de una sola concentración es simple de realizar, se utiliza menos toxina y es el método *in vitro* más ampliamente usado. Mide la adsorción en preparaciones de toxina purificada en un medio acuoso, donde se conoce la cantidad de micotoxina la cual reacciona con el secuestrante a una concentración conocida en solución acuosa. Generalmente el resultado es reportado como porcentaje de adsorción, lo cual corresponde a la fracción de toxina unida al agente secuestrante (Lemke y col., 2001, Díaz, 2003, EFSA, 2009; Gallo y Masoero, 2010; Li y col., 2010).

1.8.1.2. Estudios isotérmicos de adsorción. En este tipo de estudios la cantidad de micotoxina adsorbida por unidad de peso es marcada contra la concentración de micotoxina en solución a temperatura constante, bajo condiciones estables. También se han realizado estudios isotérmicos modificados a manera de comparar la adsorción de micotoxinas en presencia o ausencia de una matriz de alimento, con el fin de conocer si la contaminación con micotoxinas puede afectar la eficiencia de la adsorción. El resultado de los estudios isotérmicos normalmente se interpreta por curvas adecuadas usando modelos (Ramos y Hernández, 1996; Lemke y col., 1998; Yiannikouris y col., 2003, EFSA, 2009;).

1.8.1.3. Modelos gastrointestinales. En estos estudios las micotoxinas son sujetas a un modelo que simula el tracto gastrointestinal, el cual es usado para identificar condiciones fisiológicas que son importantes en para probar la eficacia de agentes secuestrantes, los cuales pueden ser usados para seleccionar materiales adsorbentes con potencial para el secuestro de micotoxinas (EFSA, 2009). Un ejemplo de este tipo de estudios es el realizado por Gallo (2010), en el que evaluó 8 agentes secuestrantes mediante distintos métodos incluyendo un modelo ruminal y un modelo gastrointestinal monogástrico. La recuperación de AFB₁ Y AFG₁ en los controles fue de 62.0 y 81.9 %. Esto soporta la idea que existen factores en el líquido ruminal que podrían estar involucrados en el secuestro de Aflatoxinas.

1.8.2. Métodos in vivo en rumiantes

En los estudios *in vivo* los agentes adsorbentes son evaluados tomando en cuenta la toxicocinética de las micotoxinas, en los que se evalúan parámetros específicos tales como: biodisponibilidad de la toxina por análisis de la micotoxina y sus metabolitos, excreción y adsorción de la toxina y transferencia de toxinas a productos animales.

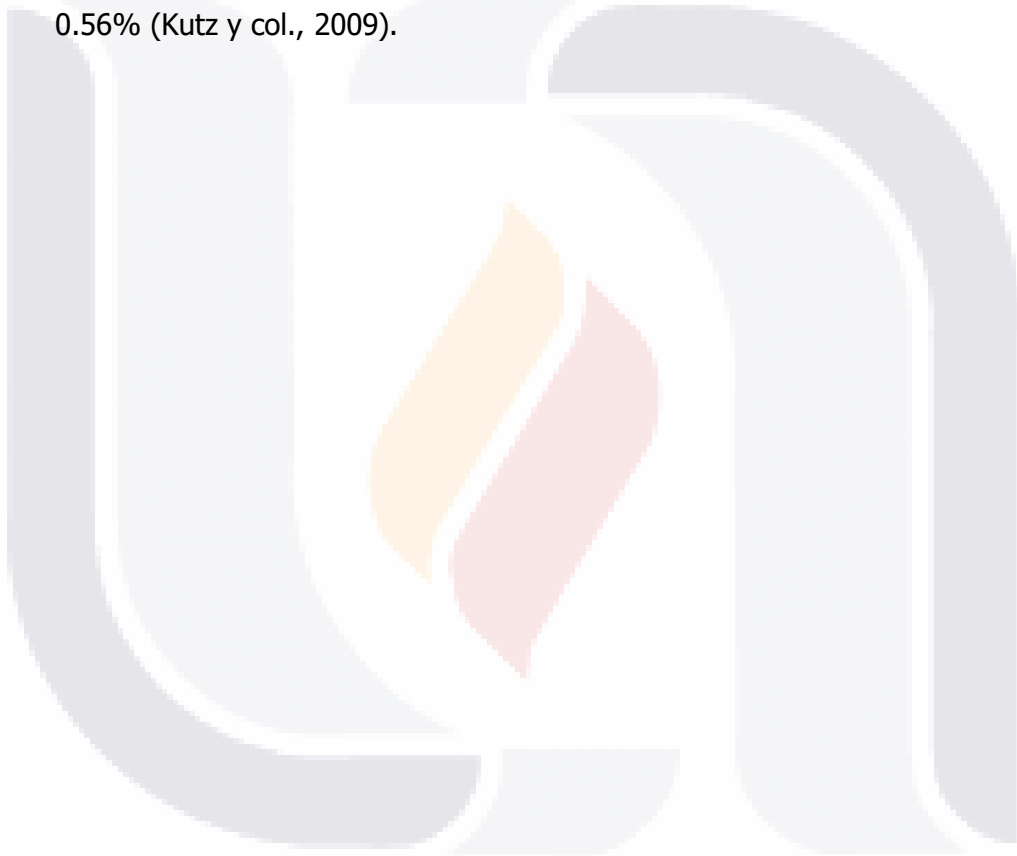
También son evaluados parámetros no específicos para estimar el impacto negativo de las micotoxinas y efectos benéficos de los agentes detoxificantes, tales como: parámetros productivos, morbilidad, mortalidad, parámetros hematológicos, bioquímicos e histológicos.

La mayoría de los estudios en rumiantes se han hecho para el estudio de la AFM₁, ya que la presencia de micotoxinas en alimentos puede implicar un riesgo a los consumidores si estas toxinas o sus metabolitos son excretadas y acumuladas en productos animales como la leche (EFSA, 2009). En el estudio realizado por Díaz y col. (2004), evaluó in vivo 6 diferentes secuestrantes en vacas lecheras, administrando una dieta contaminada con AFB₁. Cinco de los seis secuestrantes disminuyeron significativamente la contaminación de AFB₁ en la leche.

1.8.2.1. Agentes inorgánicos. Muchos experimentos *in vivo* reportan que agentes inorgánicos tienen la capacidad de reducir la concentración de AFM₁ en

la leche sin modificar la cantidad de leche producida, como por ejemplo el uso de aluminosilicatos (HSCAS) en diferentes porcentajes de inclusión en la dieta han reportado reducción en la concentración de AFM₁ (Galvano y col., 1996; Kutz y col., 2009), al igual que el uso de bentonitas de sodio (Díaz y col., 2004).

1.8.2.2. Agentes orgánicos. El uso de glucomananos con diferentes porcentajes de inclusión en la dieta (0.05%) redujo la concentración de AFM₁ 58.5% (Díaz y col., 2004), mientras que otro experimento no mostró una disminución significativa (4 %) de AFM₁ con un porcentaje de inclusión del 0.56% (Kutz y col., 2009).



2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS

Los productos secuestrantes de aflatoxinas empleados usualmente en la ración integral de vacas lecheras del Altiplano Central Mexicano adsorben *in vitro* proporciones superiores al 50.0 % de las aflatoxinas.

2.2. OBJETIVOS

2.2.1. Objetivo General

Evaluar la capacidad de adsorción *in vitro* de agentes secuestrantes de micotoxinas usados en vacas lecheras del Altiplano Central Mexicano.

2.2.2. Objetivos específicos

2.2.2.1. Evaluar técnica y económicamente la eficacia de las dosis empleadas para cada uno de los agentes secuestrantes en diferentes etapas productivas de las vacas lecheras.

2.2.2.2. Evaluar la capacidad de adsorción *in vitro* de secuestrantes de micotoxinas para unirse a Aflatoxina B₁.

2.2.2.3 Comparar la concordancia entre las técnicas HPLC y ELISA para cuantificar la capacidad de los secuestrantes para unirse a aflatoxina B₁ en solución.

2.2.2.4. Analizar la composición química elemental de los secuestrantes, para complementar la evaluación de la capacidad de adsorción.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

El presente trabajo se llevó a cabo en dos etapas: La primer etapa correspondió a la de campo, en donde se realizó el monitoreo del uso de secuestrantes en diferentes etapas productivas en los establos lecheros, durante un año. Esta parte del estudio fue de carácter descriptivo, longitudinal y no experimental.

En segunda etapa se trabajó con el ensayo de adsorción *in vitro*, para evaluar la capacidad de adsorción de diez productos secuestrantes, cinco de los cuales fueron empleados en las unidades de producción lechera durante la etapa de campo. Esta parte del estudio es cuantitativa con un alcance explicativo. El ensayo de adsorción *in vitro* se realizó por la técnica de inmunoensayo enzimático (ELISA) y por la técnica de cromatografía de líquidos (HPLC).

3.2. ETAPA DE CAMPO

La etapa de campo se realizó en dos unidades de producción de bovinos productores de leche ubicadas en la región del Altiplano Central Mexicano.

3.2.1. Características de las unidades de producción lechera

Se eligieron dos unidades de producción, cuyo manejo zootécnico es similar, usando el método no probabilístico por conveniencia se seleccionaron dos unidades de producción lechera (UPL), que se encuentran ubicadas en Aguascalientes y Lagos de Moreno, Jalisco.

3.2.1.1. Unidad de producción lechera A (UPL A). Organizada en tres sitios, se evaluó un solo sitio que fue donde estaban ubicadas las vacas en producción, las características productivas se describen en la Tabla 1.

3.2.1.2. Unidad de producción lechera B (UPL B). Está organizada en dos sitios de producción: B-1 y B-2, las características productivas se describen a continuación (Tabla 1).

Tabla 1. Organización de las unidades de producción lechera, número de vacas y producción promedio de litros de leche (2013-2014)

UPL	Sitio	Vacas en ordeño (promedio)	Producción promedio	
			L/día hato	L/día vaca
A	A-1	1,006	27,713	27
B	B-1 B-2	1,508	43,845	29

UPL Unidad de producción lechera

3.2.2. Monitoreo de las UPL para el uso de secuestrantes

Se realizó un monitoreo del uso de productos secuestrantes las diferentes etapas productivas de las UPL, los productos que se evaluaron en el ensayo *in vitro* de adsorción se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Secuestrantes usados en la evaluación *in vitro*

Identificación	Tipo	Producto secuestrante	Compañía
AS-BEN	Bentonita sílica y cristales de cuarzo.	Astra Ben 20	Prince Agri Products
AS-MON	Montmorillonita altamente refinado	Calibrin A	Amlan International
AS-ZEO	Aluminosilicato, Zeolita	Quitaflax Zeo	Técnica mineral
GM	Glucomananos	Mycosorb	Alltech Inc.
GM-AS	Glucomananos y Aluminosilicatos	Capture	Comercial, RB Nutrition
O-HSCAS	Aluminosilicato de calcio y sodio hidratado	Zeolex extra	Nutec
O-AS-1	Organoaluminosilicato	Zeotec	Nutec
O-AS-2	Organoaluminosilicato	Celtic Zeta	Holland
O-AS-3	Arcilla organofílica purificada	Mycoad ZT	Avimex
O-AS-4	Organoaluminosilicato	Duotek	Nutec

3.3. ENSAYO DE ADSORCIÓN *IN VITRO*

La capacidad de unión a aflatoxina de los productos secuestrantes fue realizada con un ensayo de adsorción *in vitro* y posteriormente fue evaluada por la técnica de ELISA y HPLC. Primero se preparó una suspensión de cada producto en metanol y se ajustó el pH. Posteriormente se preparó una solución de trabajo de AFB₁ que fue incubada junto con el secuestrante. Finalmente se determinó la concentración de aflatoxina con la técnica de ELISA y HPLC. A continuación se

describe el desarrollo del ensayo iniciando con la técnica de ELISA después para HPLC.

3.3.1. Técnica de ELISA

Se realizó la evaluación de los productos secuestrantes con la técnica de ELISA. En el primer paso se preparó una suspensión al 0.5 % de cada uno de los productos, posteriormente se preparó una solución de trabajo de AFB₁ y después se llevó a cabo el procedimiento de adsorción, en el que se dejó incubando durante una hora el secuestrante en suspensión con la solución de AFB₁. Finalmente se centrifugaron las muestras para sedimentar el secuestrante y el sobrenadante fue trabajado con un kit de ELISA de tipo comercial.

3.3.1.1. Preparación de la suspensión de productos secuestrantes. Cada producto secuestrante fue preparado por triplicado en una suspensión al 0.5 % en metanol al 70.0 %. Se ajustó el pH a 7.0 y mezclaron durante toda la noche y al siguiente día se volvió a ajustar el pH en caso necesario.

3.3.1.2. Preparación de la solución de trabajo de AFB₁. Mediante un procedimiento adaptado de Díaz (2003), se evaporaron 10 µL de una solución estándar de AFB₁ de 20 µg/mL (Sigma-Aldrich Co., St. Louis MO) en tubos de centrífuga en baño maría a 80°C. Se reconstituyó en 10 mL de metanol al 70.0 %, se obtuvo una concentración de trabajo para la técnica de ELISA de 0.02 µg/mL.

3.3.1.3. Procedimiento de adsorción. La suspensión de cada agente secuestrante se colocó en tubos de vidrio para centrífuga en alícuotas de 4,500 µL y se agregaron 500 µL de la solución de trabajo de AFB₁ descrita en el punto anterior. Para el control sin secuestrante se colocaron 4,500 µL de metanol al 70.0 % y 500 µL de la solución de trabajo de AFB₁. El control sin aflatoxina se preparó con 4,500 µL de la suspensión de secuestrante y 500 µL de metanol al 70.0 %. Los tubos fueron mezclados por 10 segundos en un vortex (Figura 8).

Las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente (25 °C) durante una hora mezclando cada 15 minutos. Los tubos fueron centrifugados al final del

período de incubación (1,500 rpm) por 10 minutos para sedimentar el complejo agente secuestrante-aflatoxina.

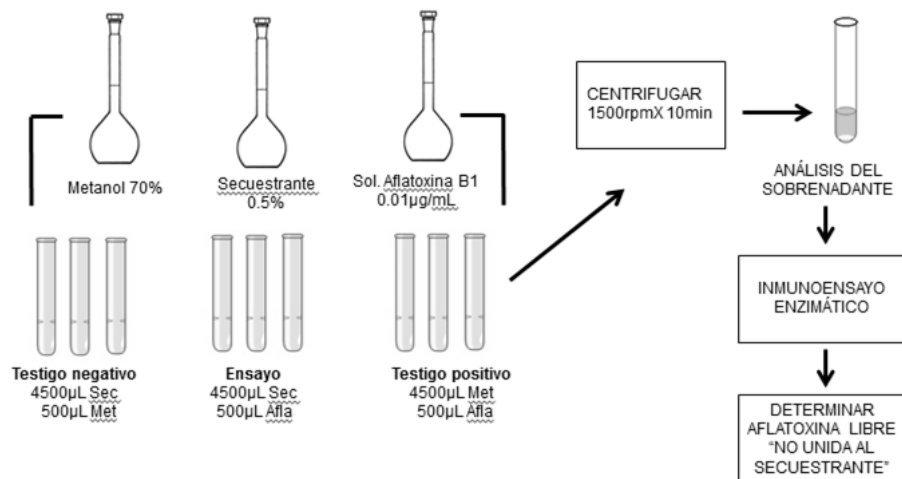


Figura 8. Esquema descriptivo de la preparación del ensayo *in vitro* para la evaluación de secuestrantes de aflatoxinas por la técnica de ELISA (Adaptado de Díaz, 2003). Fuente: Elaboración propia

3.3.1.4. Determinación de aflatoxinas con la técnica de ELISA. El cálculo de las concentraciones de las muestras se realizó con un análisis de regresión lineal con los estándares incluidos en el kit de ELISA: 0, 1.7, 5.0, 15.0 y 45.0 µg/mL por cada prueba realizada de acuerdo a lo descrito en el Anexo C.

Con base en la curva estándar se realizó el cálculo de las concentraciones de aflatoxina en el ensayo *in vitro*, por interpolación con un análisis de regresión lineal.

3.3.2. Técnica de HPLC

La capacidad de unión a aflatoxina de los productos secuestrantes fue evaluada por la técnica de HPLC. Inicialmente se preparó una suspensión de cada producto en metanol y se ajustó el pH a 7.0. Posteriormente se preparó una solución de trabajo de AFB₁ que fue incubada junto con el secuestrante. Finalmente se determinó la concentración de aflatoxina por la técnica de HPLC.

3.3.2.1. Preparación de la suspensión de productos secuestrantes. Cada producto secuestrante fue preparado por triplicado en una suspensión al 1.0 %

en metanol al 10 %. Se ajustó el pH a 7.0 y mezclaron durante toda la noche y al siguiente día se volvió a ajustar el pH, en caso necesario.

3.3.2.2. Preparación de la solución de trabajo de AFB₁. Se utilizó una solución estándar de AFB₁ de 1 µg/µL (Sigma-Aldrich Co., St. Louis MO) en cloroformo. Se colocaron 200 µL de la solución de trabajo en tubos de centrifuga en baño maría a 80 °C. Las muestras fueron congeladas a -20 °C hasta su uso.

3.3.2.3. Procedimiento de adsorción. Se trabajó con una metodología adaptada de Díaz (2003), se adicionaron 500 µL de metanol a cada tubo que contenía AFB₁ (descrito en el punto 3.3.2.2) y a los controles con y sin secuestrante. Se mezcló con un vortex durante 10 segundos. Posteriormente se adicionaron 4500 µL de la suspensión del producto secuestrante al 1.0 % en metanol al 10.0 % (punto 3.3.2.1). A los tubos control se les adicionó únicamente metanol al 10.0 %. Una vez resuspendida la solución de trabajo quedó preparada a una concentración de 40 µg/mL (Figura 9).

Las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente (25 °C), durante una hora mezclando cada 15 minutos. Los tubos fueron centrifugados al final del período de incubación (1,500 rpm) por 10 minutos para sedimentar el complejo agente secuestrante-aflatoxina. El sobrenadante fue analizado por la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución de acuerdo a lo descrito en el anexo B.

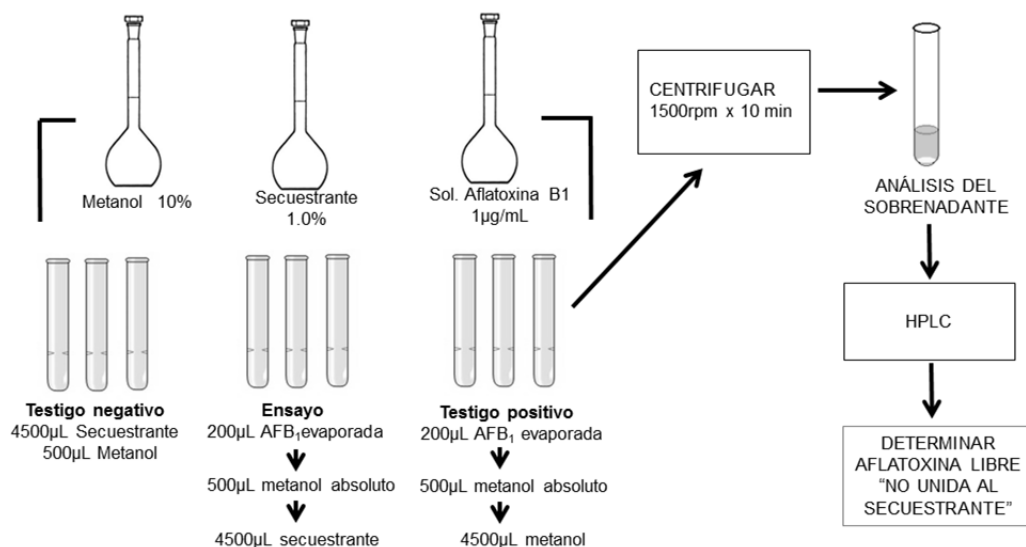


Figura 9. Esquema descriptivo de la preparación del ensayo *in vitro* para la evaluación de secuestrantes de aflatoxinas por la técnica de HPLC (Adaptado de Díaz y col., 2003) Fuente: Elaboración propia.

3.3.2.4. Cuantificación de aflatoxinas por HPLC. Las muestras de sobrenadante obtenido en el procedimiento de incubación fueron procesadas para la cuantificación de AFB₁. Se procesaron por triplicado y se inyectaron al sistema hasta obtener tres repeticiones consecutivas. Las muestras fueron comparadas contra una gráfica de calibración de AFB₁ así como controles positivos y negativos. La cuantificación de aflatoxinas se realizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), según el método de la AOAC (1995).

Se usó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución con detector de fluorescencia, bomba binaria Varian ProStar, FP 2020, Varian Associates Inc., Victoria Australia. Columna fase reversa C-18 de 15 cm de longitud, 4.6 mm de diámetro, fase móvil acetonitrilo:metanol:agua (1:1:2, v/v/v); flujo 1 mL/min, 6,000 psi, 25°C, volumen de inyección 20 µL (Anexo B).

3.4. CÁLCULO DEL PORCENTAJE DE ADSORCIÓN

La capacidad de unión del secuestrante a la aflatoxina se realizó mediante el cálculo de la concentración de AFB₁ en el sobrenadante, considerada como aflatoxina libre o no unida al secuestrante. La concentración de AFB₁ en el control sin secuestrante correspondió al 100 % y por diferencia con la cantidad de AFB₁ libre se calculó el porcentaje de adsorción como se indica en las fórmulas: (Díaz y col., 2003; García y col., 2003).

$$Aflatoxina\ libre = Af\ sin\ sec - Af\ con\ sec$$

$$\% adsorción = \frac{Af\ libre * 100}{Af\ sin\ sec}$$

3.5. ANÁLISIS QUÍMICO DE LOS SECUESTRANTES

Se analizó el contenido silicio en los productos secuestrantes, con una metodología gravimétrica (Anexo A), el contenido de calcio, potasio, sodio y aluminio se determinó por espectroscopía de adsorción atómica (Anexo D). Para los cálculos de la concentración de los elementos medidos, se calculó una curva

de regresión lineal utilizando los valores de absorbancia de estándares de concentración conocida, se consideró la masa de las muestras, volúmenes de aforo y diluciones.

3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

3.6.1. Comparación con análisis de varianza

Se realizó un análisis de varianza de un solo factor o ANOVA simple, para determinar si hubo diferencia estadísticamente significativa con las variables: porcentaje de adsorción, sodio, potasio, calcio y aluminio. Se realizó un ANOVA para cada variable para los 10 secuestrantes. Si el valor P fue menor que 0.05, existió una diferencia estadísticamente significativa para la variable a evaluar con un 95.0 % de confianza. Con la prueba de Fisher se calculó la diferencia entre cada par de medias.

3.6.2. Transformación de variables Box-Cox

Las variables aluminio, sodio, potasio y calcio no cumplieron con los supuestos del análisis de varianza, por lo que fueron analizados con la transformación Box-cox, con el paquete estadístico "R", con el objetivo de buscar un valor " λ " para elevar la variable hasta encontrar la desviación estándar más cercana a cero y de esta manera obtener una nueva variable con una distribución más normal (Febrero y col., 2008). Una vez transformados los datos de acuerdo a su valor de " λ " se procedió a realizar el análisis de varianza.

3.6.3. Análisis no paramétrico

La variable porcentaje de adsorción HPLC, no cumplió con los supuestos del análisis de varianza aún realizada la transformación Box-cox, por lo que los datos fueron analizados en el programa estadístico "R" mediante la metodología no paramétrica de arreglo factorial, utilizando el paquete "nparLD" descrita por Noguchi (2012).

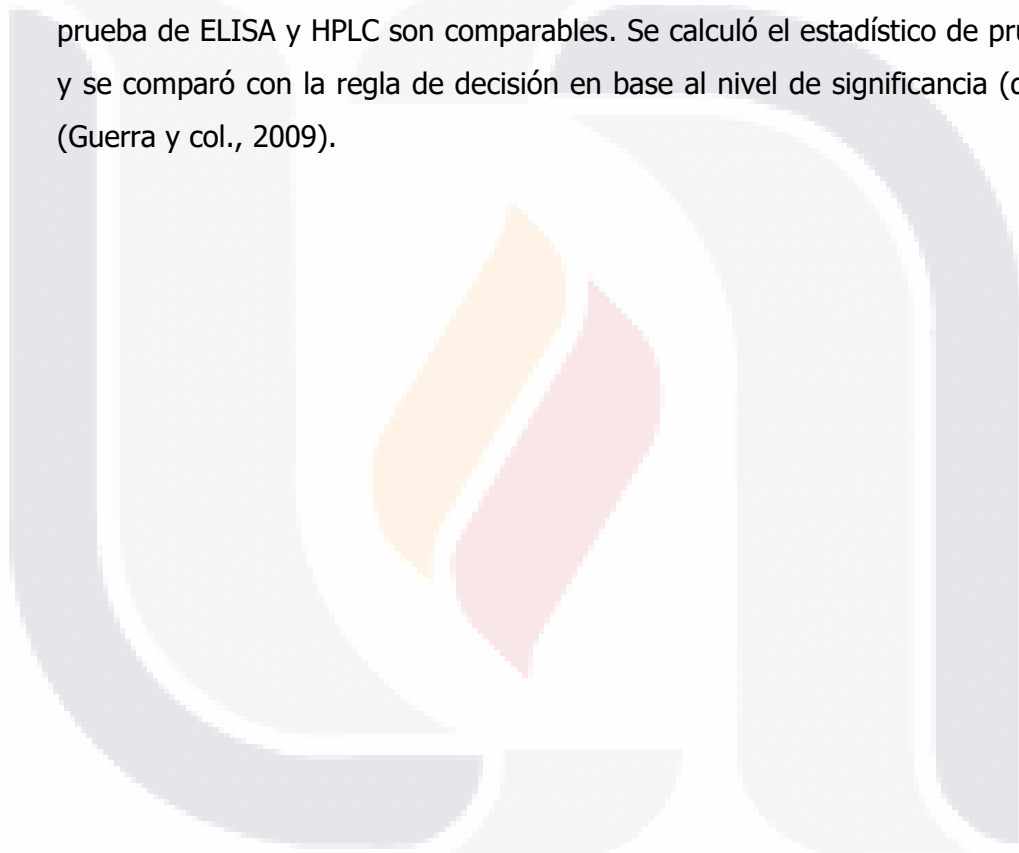
3.6.4. Regresión simple

Se realizó una comparación de los porcentajes de adsorción obtenidos con la técnica de ELISA y con la técnica de HPLC. Se relacionó la variable dependiente

ELISA (Y) en función de la variable HPLC (X), para predecir los valores de una variable en función de la otra y el grado de precisión de estas predicciones (Zar, 1984).

3.6.5. Tabulación cruzada

Se realizó el análisis de tabulación cruzada para evaluar cualitativamente los resultados de la prueba de ELISA contra los de HPLC, se realizaron pruebas de hipótesis de independencia para datos categóricos con el fin de determinar si la proporción de muestras con porcentajes de adsorción >50 % obtenidos con la prueba de ELISA y HPLC son comparables. Se calculó el estadístico de prueba X^2 y se comparó con la regla de decisión en base al nivel de significancia ($\alpha=0.05$) (Guerra y col., 2009).



4. RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados obtenidos en la etapa de campo sobre el monitoreo del uso del secuestrantes y su relación con la concentración de AFM₁ en la leche. Posteriormente se muestra la evaluación de la capacidad de adsorción de los productos secuestrantes y finalmente los resultados del análisis químico elemental.

4.1. ETAPA DE CAMPO

4.1.1. Análisis del uso de secuestrantes en las UPL

La información obtenida de las UPL durante los monitoreos mensuales fue registrada en una base de datos (Anexo F). Se obtuvieron 10 muestras de productos secuestrantes que se usaron en las UPL. Se analizaron los datos obtenidos de septiembre del 2013 a septiembre del 2014. A continuación se especifican sus nombres comerciales, compañía productora, tipo de secuestrante y dosis recomendada en bovinos así como la dosificación usual empleada en las UPL. Es importante notar que de los 6 secuestrantes que se usaron durante el período de observación únicamente el secuestrante O-AS-3 se administró de acuerdo a la dosis recomendada por el fabricante, GM-AS se administró a una dosis mayor, el resto de los secuestrantes se administraron a una dosis menor a la recomendada por el fabricante (Tabla 3).

Tabla 3. Secuestrantes usados en la evaluación *in vitro*, sus características, recomendación en bovinos y dosis empleada en las UPL

Identificación	Tipo	Dosis recomendada (g/vaca/día)
AS-BEN	Bentonita sílica y cristales de cuarzo.	45.0-225.0
AS-MON	Montmorillonita altamente refinado	37.5-75.0
AS-ZEO	Aluminosilicato, zeolita	105.0-175.0
GM	Glucomananos	90.0
GM-AS	Aluminosilicatos y paredes celulares de levaduras	30.0
HSCAS	Aluminosilicato de calcio y sodio hidratado	20.0-80.0
O-AS-1	Organoaluminosilicato	10.0-20.0
O-AS-2	Organoaluminosilicato	10.0-20.0
O-AS-3	Arcilla organofílica purificada	10.0-30.0
O-AS-4	Organoaluminosilicato	10.0-20.0

* Dosis recomendada por el fabricante para ser administrado diariamente a las vacas.

4.1.1.1. Dosis recomendada por tipo de secuestrante. Se realizó un análisis de varianza para comparar la dosis de secuestrante. Se consideró el porcentaje de la dosis recomendada por el fabricante para cada secuestrante usado en las UPL, independientemente del lote y sitio en que se ubicaron las vacas. Existió una diferencia estadísticamente significativa P (<0.05) entre la media del porcentaje de la dosis recomendada para cada secuestrante con un nivel del 95.0 % de confianza. El secuestrante O-AS-3 fue el único que se administró al 100 % de la dosis recomendada por el fabricante, el secuestrante AS-GM se aplicó por arriba de la dosis recomendada (134.0 %) y el resto de los secuestrantes se aplicaron por debajo de la dosis recomendada por el fabricante (Tabla 4).

Tabla 4. Comparación del porcentaje la dosis recomendada por el fabricante de cada secuestrante usado en las UPL

Identificación secuestrante	Monitoreos (Núm.)	Dosis empleada (% DR)*	CV (%)	Mínimo (% DR)	Máximo (% DR)
No se administró	25	N/A ^e	N/A	N/A	N/A
AS-BEN	3	85.0 ^b ± 0	0.00	85.0	85.0
AS-GM	34	134.0 ^a ± 26.5	19.70	116.0	233.0
AS-MON	4	50.0 ^d ± 0.00	0.00	50.0	50.0
O-AS-3	19	100.0 ^b ± 0.00	0.00	100.0	100.0
O-AS-4	30	67.0 ^c ± 0.00	0.00	67.0	67.0
Otro	2	80.0 ^{bc} ± 0.00	0.00	80.0	80.0
Total	117	73.8		71.1	87.9

UPL Unidad de producción lechera, DR Dosis recomendada por el fabricante, *DR Promedio (± DE) de la dosis recomendada por el fabricante (%), administrada diariamente a las vacas. N/A No aplica.

^{a-b} Dosis empleada con diferente literal muestran diferencias significativas con otros secuestrantes, los promedios se compararon con la prueba de Fisher.

4.1.1.2. Frecuencia de uso de los productos secuestrantes. El secuestrante que más se utilizó en las UPL fue AS-GM, seguido del OAS-4. De los secuestrantes evaluados, el que se utilizó con menor frecuencia fue AS-BEN (Figura 10).

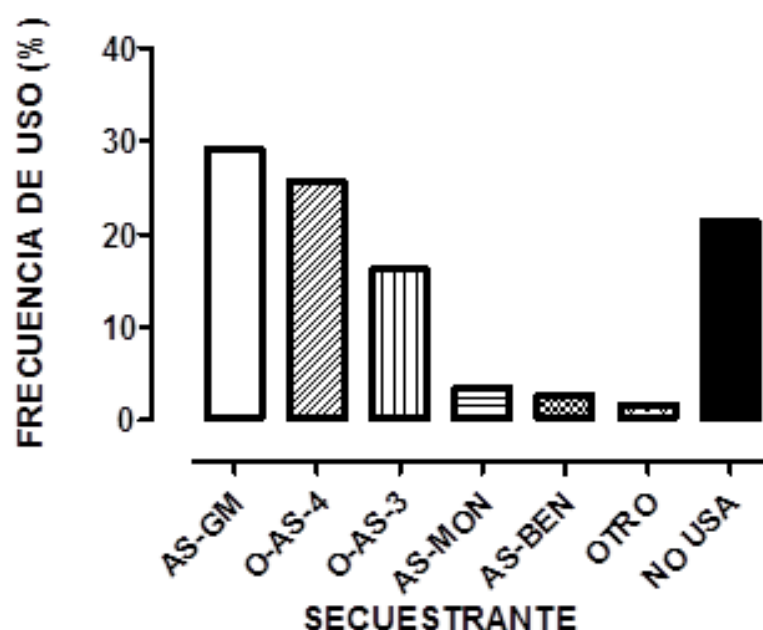


Figura 10. Frecuencia de uso de cada producto secuestrante usado en las UPL durante 2013 a 2014 (117 Monitoreos)

4.1.1.3. Uso de secuestrante por lote y sitio. Se realizó una prueba de tabulación cruzada para determinar la relación entre el uso de secuestrante por lote productivo de las vacas (alta, media y baja producción de leche), así como por el sitio de producción (A1, B1 y B2); puesto que el valor de "P" fue 0.000 en la prueba de independencia (χ^2), se rechazó la hipótesis nula de que ambos factores no estuvieran asociados, con un nivel de confianza del 95.0 %. Por lo tanto, el uso de secuestrante estuvo relacionado con el lote y el sitio (Figura 11).

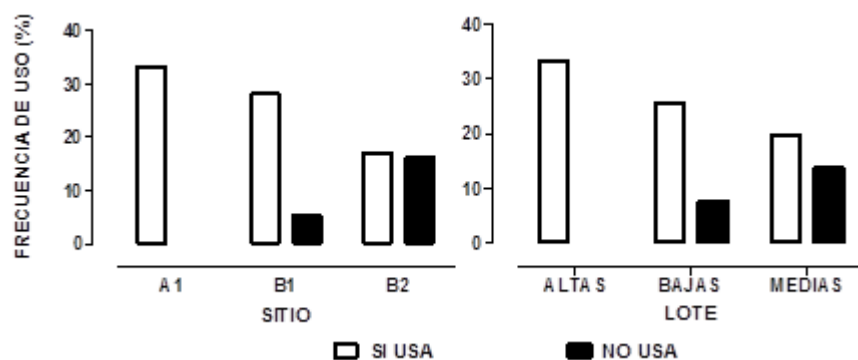


Figura 11. Frecuencia de uso de secuestrantes de micotoxinas de acuerdo al sitio y lote de producción en donde se ubicaban las vacas (117 monitoreos, 2013-2014)

4.1.1.4. Comparación de la dosis recomendada por el fabricante. Se observó que las UPL evaluadas no usan la dosis completa que indica fabricante en la etiqueta del producto, por lo que se evaluó el porcentaje de la dosis recomendada por el fabricante, siendo el 100 % la dosis recomendable. Se realizó un análisis de varianza para comparar el promedio de la dosis recomendada por sitio (UPL A o B) y lote de producción de las vacas (altas, medias y bajas) productoras de leche. La UPL-A1 administró la menor dosis de secuestrante y la misma dosis independientemente del lote de producción, en contraste con las UPL B1 y B2, que administraron el 100 % de la dosis recomendada por el fabricante, pero únicamente al lote de vacas altas productoras de leche, el resto de los lotes fue variable y hubo lotes a los que no se les administró secuestrante (Tabla 5).

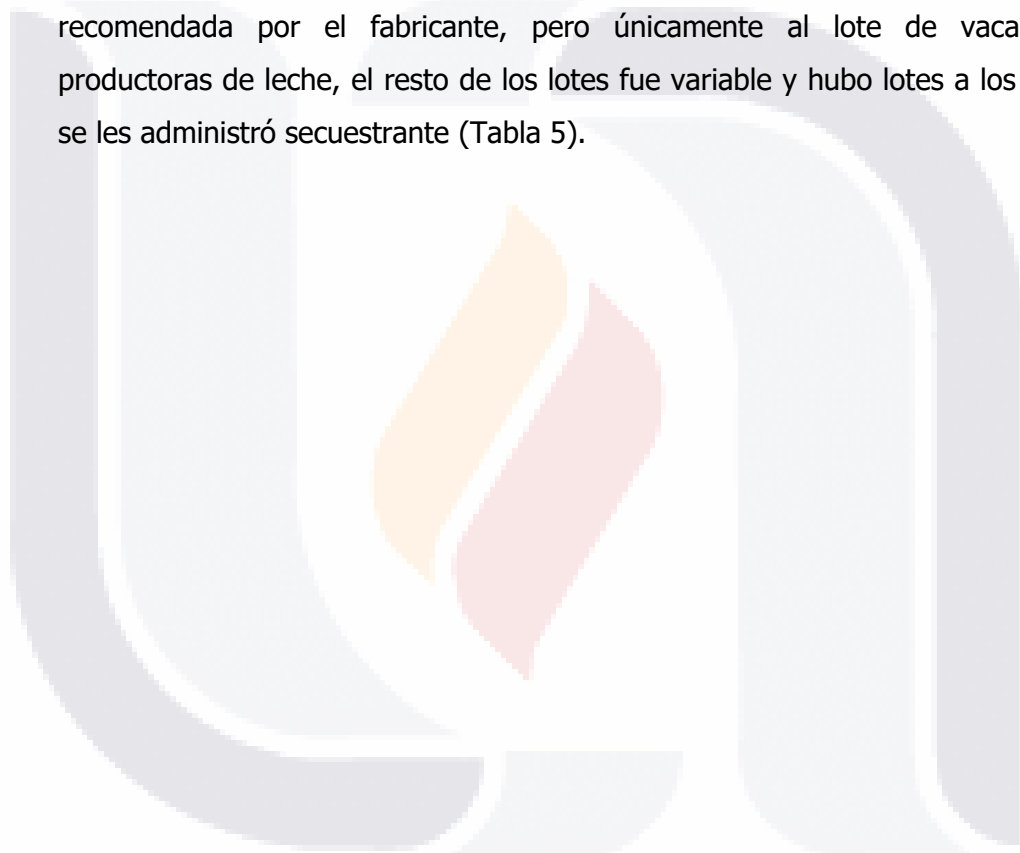


Tabla 5. Porcentaje de la dosis recomendada por el fabricante administrada por lote y sitio en las UPL (%)*

Sitio	Lote de producción	Promedio	DE	CV	Mediana	Mínimo	Máximo
UPL-A1	Altas	65.5 ^a	8.5	13.0	66.6 ^a	50.0	85.0
	Medias	67.8 ^a	8.0	11.9	66.6 ^a	50.0	85.0
	Bajas	67.8 ^a	8.0	11.9	66.6 ^a	50.0	85.0
	Total	67.0 ^B	8.0	12.0	66.6 ^C	50.0	85.0
UPL-B1	Altas	110.0 ^a	36.9	33.5	100.0 ^a	100.0	233.0
	Medias	0.0 ^c	0.0	0.0	0.00 ^a	0.0	0.0
	Bajas	53.8 ^b	51.9	96.4	100.0 ^a	0.0	100.0
	Total	54.7 ^B	57.9	106.0	100.0 ^B	0.0	233.0
UPL-B2	Altas	138.0 ^a	31.8	23.1	127.0 ^a	116.0	233.0
	Medias	97.4 ^a	55.5	57.0	127.0 ^a	0.0	127.0
	Bajas	97.4 ^a	55.5	57.0	127.0 ^a	0.0	127.0
	Total	111.0 ^A	51.3	46.3	127.0 ^A	0.0	233.0

^{A-B} Sitios con diferente literal muestras diferencias significativas con un nivel de confianza del 95 %. Los promedios se comparan con la prueba de la diferencia mínima significativa de Fisher; las medianas con la prueba de Mood.

^{a-b} Lotes de producción con diferente literal muestran diferencias significativas con otros lotes de producción dentro del mismo sitio con un nivel de confianza del 95 %. Los promedios se comparan con la prueba de la diferencia mínima significativa de Fisher; las medianas con la prueba de Mood.

* Promedio de la dosis recomendada por el fabricante (%) administrado diariamente a las vacas.

4.1.1.5. Porcentaje de la dosis recomendada por año y mes. Se realizó un análisis de varianza para comparar el promedio de la dosis recomendada por año y mes durante el período de observación. No se observaron diferencias significativas en la administración del secuestrante por mes y año (Tabla 6).

Tabla 6. Comparación del porcentaje de la dosis recomendada por el fabricante administrada en las UPL por año y mes (%)*

MES	Monitoreos (Núm.)	Promedio	DE	CV	Mediana	Mínimo	Máximo
2013							
SEP	9	51.8 ^a	45.9	88.6	50.0 ^a	0.00	116.0
OCT	9	53.8 ^a	61.0	113	50.0 ^a	0.00	175.0
NOV	9	65.3 ^a	77.1	118	85.0 ^a	0.00	233.0
DIC	9	90.3 ^a	72.7	80.5	86.6 ^a	0.00	233.0
Total 2013	36	65.3 ^A	64.3	98.5	66.6 ^A	0.00	233.0
2014							
ENE	9	75.5 ^a	50.1	66.3	86.6 ^a	0.00	127.0
FEB	9	75.5 ^a	50.1	66.3	86.6 ^a	0.00	127.0
MAR	9	75.5 ^a	50.1	66.3	86.6 ^a	0.00	127.0
ABR	9	86.6 ^a	41.6	48.0	100.0 ^a	0.00	127.0
MAY	9	86.6 ^a	41.6	48.0	100.0 ^a	0.00	127.0
JUN	9	86.6 ^a	41.6	48.0	100.0 ^a	0.00	127.0
JUL	9	86.6 ^a	41.6	48.0	100.0 ^a	0.00	127.0
AGO	9	86.6 ^a	41.6	48.0	100.0 ^a	0.00	127.0
SEP	9	86.6 ^a	41.6	48.0	100.0 ^a	0.00	127.0
Total 2014	81	82.9 ^A	42.7	51.4	100.0 ^A	0.00	233.0
Total	117	77.5	50.7	65.4	100.0	0.00	233.0

^a Meses con la misma literal no mostraron diferencias significativas con un nivel de confianza del 95%. Los promedios se comparan con la prueba de la diferencia mínima significativa de Fisher; las medianas con la prueba de Mood.

^{A-B} Años con la misma literal no mostraron diferencias significativas con un nivel de confianza del 95%. Los promedios se comparan con la prueba de la diferencia mínima significativa de Fisher; las medianas con la prueba de Mood.

* Promedio de la dosis recomendada por el fabricante (%) administrado diariamente a las vacas.

4.1.2. Uso de secuestrantes y concentración de AFM₁ en las UPL

Se realizó una comparación de la concentración de AFM₁ en la leche de las vacas a las que se les administró el secuestrante y con el lote de producción. Se evaluó si existió relación del uso adecuado del secuestrante y que la leche sobrepase el límite máximo permisible de AFM₁. Los resultados se describen a continuación.

4.1.2.1. Comparación de la concentración de AFM₁ por lote de vacas. Se realizó un análisis de varianza para comparar la concentración promedio de AFM₁ (µg/L) en la de leche las vacas por sitio (UPL A o B) y lote de producción (altas, medias y bajas). No se observó diferencia significativa entre la concentración promedio de AFM₁ y el lote y sitio de producción (Tabla 7).

Tabla 7. Comparación del promedio de la concentración de AFM₁ de acuerdo al sitio y lote de producción en donde se ubicaban las vacas

Sitio	Lote de producción	Concentración promedio AFM ₁ (µg/L)	DE (µg/L)	CV (%)	MEDIANA (µg/L)	Mínimo (µg/L)	Máximo (µg/L)
UPL-A1	Altas	0.032 ^a	0.037	118	0.00 ^a	0.00	0.08
	Medias	0.027 ^a	0.037	135	0.00 ^a	0.00	0.08
	Bajas	0.025 ^a	0.035	138	0.00 ^a	0.00	0.08
	Total A1	0.028 ^A	0.035	126	0.00 ^A	0.00	0.08
UPL-B1	Altas	0.022 ^a	0.027	124	0.01 ^a	0.00	0.06
	Medias	0.028 ^a	0.035	126	0.01 ^a	0.00	0.08
	Bajas	0.014 ^a	0.017	120	0.01 ^a	0.00	0.04
	Total B1	0.021 ^A	0.027	127	0.01 ^A	0.00	0.08
UPL-B2	Altas	0.029 ^a	0.030	104	0.02 ^a	0.00	0.08
	Medias	0.024 ^a	0.025	102	0.01 ^a	0.00	0.07
	Bajas	0.015 ^a	0.024	159	0.04 ^a	0.00	0.08
	Total B2	0.023 ^A	0.026	115	0.01 ^A	0.00	0.08
UPL A y B	Altas	0.028 ^a	0.031	113	10.0	0.0	80.0
	Medias	0.027 ^a	0.031	120	10.0	0.0	80.0
	Bajas	0.018 ^a	0.026	143	10.0	0.0	80.0
	Total A y B	0.024 ^A	0.029	123	10.0	0.0	80.0

^{A-B} Sitios con diferente literal muestran diferencias significativas con un nivel de confianza del 95%. Los promedios se comparan con la prueba de la diferencia mínima significativa de Fisher; las medianas con la prueba de Mood.

^{a-b} Lotes de producción con diferente literal muestran diferencias significativas con otros lotes de producción dentro del mismo sitio con un nivel de confianza del 95 %. Los promedios se comparan con la prueba de la diferencia mínima significativa de Fisher; las medianas con la prueba de Mood.

4.1.2.2. Límite máximo permisible (LMP) de AFM₁ y uso adecuado del secuestrante. Se realizó una prueba de tabulación cruzada para determinar si se rechaza o no la idea de que la leche sobrepase el LMP de AFM₁ de acuerdo a la norma europea (0.05 µg/L) (EC, 2006), si no se usa adecuadamente el secuestrante (uso de una dosis mayor o igual al 100.0 % de la dosis recomendada por el fabricante). Puesto que el valor "P" (0.0254) es menor que 0.05 en la prueba de chi cuadrada, se rechaza la hipótesis de que ambos factores son independientes, con un nivel de confianza del 95.0 %. Por lo tanto, el valor observado de sobrepasar el LMP está relacionado con el uso no adecuado de secuestrante (Figura 12).

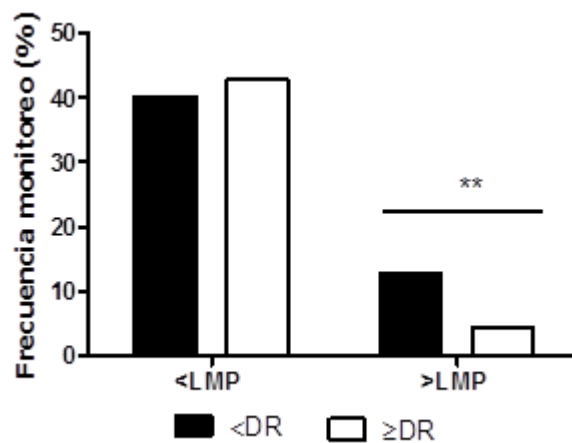


Figura 12. Relación entre la utilización de secuestrante de acuerdo a la dosis recomendada por el fabricante (DR; frecuencia de monitoreos; n = 117) y la concentración de aflatoxina M₁ en la leche por arriba del límite máximo permisible (LMP; 0.050 µg/kg; ** P x2 = 0.03; OR = 3.19)

4.1.3. Evaluación económica

A continuación se presenta una tabla con un análisis económico del uso de los secuestrantes en las UPL. El valor anual de la dosis de secuestrante empleada en la UPL A (\$67.53) fue menor que en la UPL B (\$522.8) y (\$626.50), debido a que en la UPL A es más común usar una dosis menor a la recomendada por el fabricante.

Es posible que los productores no administren la dosis completa de secuestrante por su alto costo, de manera que sólo lo administraron a algunos lotes o en un momento del día (Tabla 8). No fue posible determinar un costo-beneficio por el uso de los secuestrantes, debido a que el productor no los empleó de manera constante, además de que no en todas las ocasiones se administró la dosis recomendada por el fabricante.

Tabla 8. Análisis técnico y económico del uso de secuestrantes en las UPL

		UPL A	UPL B		
			SITIO 1	SITIO 2	
A Secuestrante					
A-1	Dosis empleada/día/vaca (g)	6.70	10.00	29.50	
A-2	Dosis empleada/día/vaca (\$)	0.18	1.43	1.75	
A-3	Dosis empleada valor anual (\$)	67.53	522.80	626.50	
B Leche					
B-1	Valor producción/día/vaca (%)	a	176.50	134.10	155.40
		m	96.80	95.30	101.50
		b	68.10	64.10	83.80
B-2	Valor anual (\$)	a	64,470	48,965	56,739
		m	35,332	34,803	37,047
		b	24,856	23,397	30,605
B-3	Valor estímulo anual (\$)	a	645.00	489.00	567.00
		m	353.00	348.00	370.00
		b	249.00	234.00	306.00
C Eficiencia					
C-1	Dosis empleada (%)	67.00	100.00	98.20	
C-2	Adsorción (%)	90.50	89.50	99.90	

UPL Unidad de producción de leche, Lotes de producción (a) altas, (m) medias y (b) bajas, dosis empleada y porcentaje de adsorción en promedio.

4.2. EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN

4.2.1. Capacidad de adsorción con la técnica de ELISA

Con base en la curva estándar se realizó el cálculo de la concentración de aflatoxina B₁ en el ensayo *in vitro*, por interpolación con un análisis de regresión lineal.

Se realizó un análisis de varianza de un factor. Los datos de ELISA cumplieron con los supuestos de normalidad y homosedasticidad del análisis de varianza. Se observó una diferencia estadísticamente significativa P (<0.005) entre la media del porcentaje de adsorción de los secuestrantes con el 95.0 % de confianza. Con la prueba de Fisher se calculó la diferencia entre cada par de medias (Tabla 9). Todos los productos secuestrantes mostraron habilidad para unirse a AFB₁.

Tabla 9. Resultados del ensayo de adsorción *in vitro* de AFB₁ de diez compuestos secuestrantes de micotoxinas (sec) cuantificados con la técnica de inmunoensayo enzimático (ELISA)

Producto secuestrante	Respuesta promedio (µg/kg)		Adsorción (%)	DE (%)	Intervalos de confianza 95% de Fisher	
	Sin sec	Con sec			Mínimo (%)	Máximo (%)
AS-BEN	13.67	1.70	87.5 ^b	0.40	87.1	87.9
AS-MON	13.26	1.77	85.3 ^b	3.03	81.8	87.2
AS-ZEO	38.25	23.60	38.2 ^e	3.80	34.3	41.9
GM	7.68	1.76	77.0 ^c	2.11	75.7	79.4
GM-AS	38.25	2.05	94.6 ^a	0.93	93.6	95.4
HSCAS	7.68	1.70	77.8 ^c	1.82	75.8	79.4
O-AS-1	13.67	1.90	86.1 ^b	2.12	83.7	87.6
O-AS-2	7.68	1.75	77.1 ^c	2.93	73.8	79.4
O-AS-3	13.26	1.70	86.0 ^b	1.88	83.8	87.2
O-AS-4	7.68	2.59	66.1 ^d	1.45	65.2	67.8

^{a-e} medias de absorción con literales diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con la prueba de Fisher se encontró la diferencia entre cada par de medias. Shapiro ($P = 0.1914$), Bartlett (0.466).

4.2.2. Capacidad de adsorción con la técnica de HPLC

Se realizó la determinación de aflatoxina del ensayo de adsorción *in vitro* por la técnica de HPLC. Existió diferencia estadísticamente significativa entre las medias del porcentaje de adsorción, para conocer cuáles medias son diferentes se realizó la metodología no paramétrica de arreglo factorial "nparLD" (Tabla 10). Todos los productos secuestrantes mostraron habilidad para unirse a AFB₁.

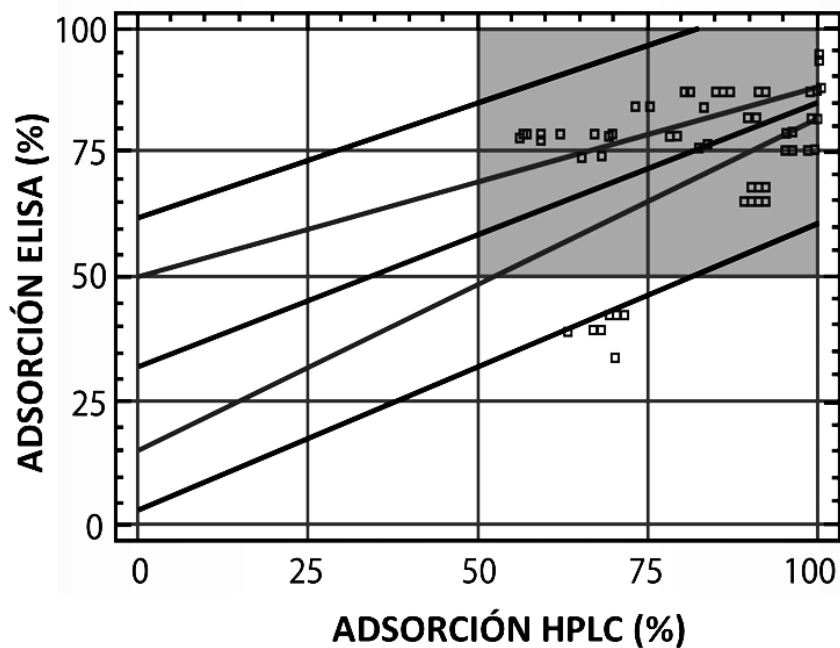
Tabla 10. Resultados del ensayo de adsorción *in vitro* de AFB₁ de 10 compuestos secuestrantes (sec) cuantificados con la técnica de cromatografía de líquidos (HPLC)

Producto Secuestrante	Respuesta promedio (µg/kg)		Adsorción (%)	DE (%)	Intervalos de confianza 95% de Fisher	
	Sin sec	Con sec			Mínimo (%)	Máximo (%)
AS-BEN	0.213	0.001	99.7 ^{ab}	0.32	99.1	100.0
AS-MON	0.283	0.001	99.6 ^{ab}	0.43	98.9	100.0
AS-ZEO	0.213	0.069	67.7 ^e	2.62	63.3	71.1
GM	0.216	0.006	96.9 ^c	1.64	95.1	99.3
GM-AS	0.213	0.000	99.9 ^a	0.20	99.5	100.0
HSCAS	0.307	0.070	76.7 ^g	6.40	66.9	83.8
O-AS-1	0.283	0.057	79.7 ^g	3.70	73.1	85.2
O-AS-2	0.216	0.080	62.5 ^e	5.02	55.5	68.9
O-AS-3	0.283	0.030	89.4 ^d	2.09	86.4	92.2
O-AS-4	0.307	0.029	90.5 ^d	1.00	89.0	92.3

^{a-e} medias de absorción con literales diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas (p<0.05), de acuerdo a la metodología no paramétrica de arreglo factorial "nparLD".

4.2.3. Comparación de las técnicas ELISA Y HPLC

Se realizó una comparación de la técnica de ELISA con la técnica de HPLC, mediante un análisis de regresión. Se observó una baja determinación de los valores de HPLC y ELISA, ya que la R² alcanzó un valor de 25.05 % y un coeficiente de correlación de 50.9 %. En el cuadrante superior derecho, se observa que todos los secuestrantes tuvieron un porcentaje de adsorción mayor al 50 % en la prueba de HPLC; así como en ELISA, excepto el secuestrante a base de zeolita AS-ZEO que obtuvo un valor de 38.2 ± DE (Figura 13).



**Figura 13. Gráfico del modelo ajustado ($ELISA=32.4621+0.53068*HPLC$). Se sombrea el cuadrante superior derecho donde se encuentra la tendencia de los porcentajes de adsorción al ser comparadas las pruebas de HPLC y ELISA
Fuente: Elaboración propia.**

4.2.3.1. Comparación cualitativa de las técnicas de ELISA y HPLC

Se realizaron pruebas de hipótesis de independencia para datos categóricos con el fin de determinar si la proporción muestras con porcentajes de adsorción > 50 % obtenidos con la prueba de ELISA y HPLC son comparables. Se calculó el estadístico de prueba X^2 y se comparó con la regla de decisión en base al nivel de significancia ($\alpha=0.05$). No se rechazó la hipótesis nula debido a que ($P>0.05$). Por lo tanto, se considera que la proporción de resultados con porcentaje de adsorción > 50 % obtenidos por la técnica de no son estadísticamente diferentes a la proporción de los obtenidos por HPLC. La proporción de concordancia alcanzó un 90.0 % de las muestras tuvieron una evaluación semejante.

4.3. ANÁLISIS QUÍMICO DE LOS PRODUCTOS SECUESTRANTES

Se realizó un análisis químico elemental de los productos secuestrantes con la técnica de espectrometría de absorción atómica y un método gravimétrico, los resultados se compararon con lo declarado por el fabricante y en referencias citadas en artículos.

4.3.1. Calcio

La concentración de calcio fue muy variable, el secuestrante AS-BEN y O-AS-3 obtuvieron resultados cercanos a la referencia, el resto de los secuestrantes (Tabla 11). Los datos no cumplieron con los supuestos del análisis de varianza, por lo que se realizó una transformación de los datos.

Tabla 11. Concentración promedio de calcio de los productos secuestrantes de micotoxinas, detectada por espectroscopía de absorción atómica (g/kg±DE)

Producto secuestrante	Calcio (g/kg ± DE)	CV (%)	Referencia (g/kg)	Comparación (Media/referencia)
AS-BEN	5.4 ^f ± 0.38	7.0	4.0*	1.35
AS-MON	2.1 ⁱ ± 0.16	7.7	6.4-9.7* ¹	0.21-0.32
AS-ZEO	8.9 ^e ± 0.33	3.7	42.0*	0.21
GM	2.8 ^a ± 0.15	5.4	S/D	S/D
GM-AS	2.2 ⁱ ± 0.17	8.0	S/D	S/D
HSCAS	12.2 ^d ± 0.28	2.3	33.0-49.0*	0.24-0.37
O-AS-1	19.9 ^b ± 0.52	2.6	1.0-4.0*	0.49-19.9
O-AS-2	3.5 ^h ± 0.28	8.0	15.0-25.0*	0.14-23
O-AS-3	4.1 ^g ± 0.57	13.9	2.00* ²	2.00
O-AS-4	17.6 ^c ± 0.19	1.1	52.0	0.33

* Declaración del fabricante, *¹ Marroquín, 2009, *² Döll, 2005, S/D Sin dato.

^{a-i} medias de absorción con literales diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas a la prueba de Fisher (p< 0.01) a partir de datos transformados (log), Shaphiro (P=0.3845), Bartlet (P=0.1601).

4.3.2. Potasio

La concentración promedio de potasio también fue muy variable. Los productos secuestrantes que se encuentran dentro del intervalo de referencia dada por el fabricante fueron O-AS-1 y O-AS-2 (Tabla 12). Los datos fueron transformados, ya que no se cumplieron los supuestos del análisis de varianza.

Tabla 12. Concentración promedio de potasio de los productos secuestrantes, detectada por espectroscopía de absorción atómica (g/kg±DE)

Producto secuestrante	Potasio (g/kg ± DE)	CV (%)	Referencia (g/kg)	Comparación (Media/referencia)
AS-BEN	2.6 ^f ± 0.31	12.1	1.6* ¹	1.62
AS-MON	3.3 ^e ± 0.19	5.9	9.4-20.8* ²	0.15-0.35
AS-ZEO	18.0 ^a ± 0.79	4.4	9.4* ³	0.15
GM	9.8 ^b ± 0.04	0.4	S/D	S/D
GM-AS	6.3 ^d ± 0.94	15.0	S/D	S/D
HSCAS	7.5 ^c ± 0.33	4.4	18-28*	0.26-0.41
O-AS-1	1.4 ^g ± 0.12	8.6	0.30-3.0*	0.46-4.66
O-AS-2	3.7 ^e ± 0.05	1.4	2.5-50.0*	0.74-1.48
O-AS-3	0.6 ^h ± 0.05	8.2	15.0* ⁴	0.04
O-AS-4	10.9 ^b ± 0.24	2.2	43.0*	0.25

*Declaración del fabricante, S/D Sin dato; *¹Miazzo, 2005, *²Marroquín, 2009, *³Papaioannou, 2002. ^{a-h} medias de absorción con literales diferentes, muestran diferencias estadísticamente significativas a la prueba de Fisher (p<0.01). Datos transformados (log). Shaphiro (P=0.2283), Bartlet (P=0.01179).

4.3.3. Sodio

Los productos O-AS-1 y O-AS-2 obtuvieron concentraciones de sodio de acuerdo a lo indicado por el fabricante. El producto AS-ZEO obtuvo un valor muy cercano a la referencia (Tabla 13). Los datos fueron transformados para cumplir con los supuestos del análisis de varianza.

Tabla 13. Concentración promedio de sodio de los productos secuestrantes, detectada por espectroscopía de absorción atómica (g/kg±DE)

Producto secuestrante	Sodio (g/kg ± DE)	CV (%)	Referencia (g/kg)	Comparación (Media/referencia)
AS-BEN	6.3 ^b ± 0.16	2.5	9.0*	0.70
AS-MON	0.6 ^h ± 0.08	14.7	5.4-13.7* ¹	0.043-0.1
AS-ZEO	2.0 ^f ± 0.24	11.8	2.4*	0.83
GM	4.6 ^d ± 0.55	12.2	S/D	S/D
GM-AS	2.9 ^e ± 0.8	2.8	S/D	S/D
HSCAS	7.7 ^a ± 0.38	4.9	16.0-29.0*	0.26-0.48
O-AS-1	1.3 ^g ± 0.08	6.0	0.1-5.0*	0.26-13.0
O-AS-2	5.7 ^c ± 0.03	0.5	5.0-10.0*	0.57-1.14
O-AS-3	7.7 ^a ± 0.43	5.6	35.0* ²	0.22
O-AS-4	2.2 ^f ± 0.01	0.7	18.0*	0.12

*Declaración del fabricante, S/D sin dato, *¹ Marroquín,2009, *²Döll, 2005.

^{a-h} medias de absorción con literales diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas a la prueba de Fisher (p< 0.01). Datos transformados (\sqrt{y}), Shaphiro (P=0.6755), Bartlet (P=0.0156).

4.3.4. Aluminio

Los productos AS-ZEO y AS-MON fueron los que más se acercaron a la referencia, la concentración del resto de los productos fue superior a lo indicado por la referencia (Tabla 14). Los datos cumplieron con los supuestos del análisis de varianza.

Tabla 14. Concentración promedio de aluminio de los productos secuestrantes, detectada por espectroscopía de absorción atómica (g/kg±DE)

Producto secuestrante	Aluminio (g/kg±DE)	CV (%)	Referencia (g/kg)	Comparación (Media/referencia)
AS-BEN	36.13 ^{ab} ± 4.2	11.52	14*	2.58
AS-MON	9.9 ^f ± 0.2	1.66	15*	0.66
AS-ZEO	7.94 ⁱ ± 2.2	27.85	6.9*	1.15
GM	9.68 ^g ± 2.2	22.92	S/D	S/D
GM-AS	8.66 ^h ± 2.1	24.23	S/D	S/D
HSCAS	38.74 ^a ± 5.7	14.80	10.8-17.2*	2.19-3.49
O-AS-1	31.30 ^{bc} ± 3.8	12.11	13-15*	2.08-2-40
O-AS-2	25.63 ^d ± 1.7	6.46	1.5-2.5* ¹	10.25-17.08
O-AS-3	11.08 ^e ± 1.8	16.28	42.0*	0.28
O-AS-4	29.55 ^{cd} ± 4.6	15.50	S/D	S/D

*Declaración del fabricante, S/D Sin dato, *¹ Döll, 2005.

^{a-i} medias de absorción con literales diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas a la prueba de Fisher (p< 0.01), Shaphiro (P=0.1271), Bartlet (P=0.0911).

4.3.5 Silicio

Los productos AS-MON, AS-ZEO, HSCAS, O-AS-2 obtuvieron concentraciones de sodio cercanos a la referencia indicada por el fabricante (Tabla 15). Los datos cumplieron con los supuestos del análisis de varianza.

Tabla 15. Concentración promedio de silicio de los productos secuestrantes, detectada por gravimetría (g/kg±DE)

Secuestrante	Silicio (g/kg ± DE)	CV (%)	Referencia (g/kg) *	Comparación (Media/referencia)
AS-BEN	71.76 ^b ±1.05	1.46	59*	1.21
AS-MON	64.95 ^d ±0.99	1.52	78*	0.83
AS-ZEO	79.80 ^a ±0.16	0.20	66*	1.20
GM	9.73 ⁱ ±0.27	2.76	S/D	S/D
GM-AS	38.06 ^g ±0.52	1.36	S/D	S/D
HSCAS	67.99 ^c ±1.12	1.65	57.3-64.2*	1.05-1.18
O-AS-1	60.74 ^e ±0.83	1.37	40-50*	1.21-1.51
O-AS-2	29.65 ^h ±0.43	1.46	30-35*	0.84-0.98
O-AS-3	39.64 ^f ±0.15	0.37	S/D	S/D
O-AS-4	65.46 ^d ±0.79	1.21	S/D	S/D

*Declaración del fabricante, S/D Sin dato.

^{a-i} medias de absorción con literales diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas a la prueba de Fisher ($p < 0.01$), Shapiro ($P=0.5503$), Bartlett ($P=0.2276$).

5. DISCUSIÓN

5.1. ETAPA DE CAMPO

5.1.1. Dosis recomendada por el fabricante

Durante el período de observación de trece meses, se observó que las UPL usaron seis diferentes productos secuestrantes, únicamente el secuestrante O-AS-3 se administró de acuerdo a la dosis recomendada por el fabricante, GM-AS se administró a una dosis mayor y el resto de los secuestrantes se administraron a una dosis menor a la recomendada por el fabricante.

También se observó que el uso del secuestrante estuvo relacionado con el lote de vacas y sitio de producción, con un 95.0 % de confianza. Se evaluó la frecuencia de uso de los secuestrantes y se determinó que el secuestrante se usó siempre en el lote de las vacas altas, independientemente del sitio de producción.

Respecto a la frecuencia de uso por sitio se determinó que la UPL 1 siempre usaba el secuestrante aunque a una dosis menor a la recomendada por el fabricante. La UPL B1 fue la única que administró el 100.0 % de la dosis de secuestrante; pero sólo al lote de vacas altas. Se revisaron estudios relacionados con la evaluación de adopción de tecnologías y manejo en ganado bovino de doble propósito.

En el estudio de Cuevas y col. (2013), encontró que existieron diferencias estadísticamente significativas entre el promedio de innovaciones en tres tipos de unidades de producción analizadas, lo cual significa que los tipos de productores identificados son diferentes entre sí en el uso promedio de innovaciones. Por otro lado, en el estudio de Galindo encontró que dependiendo del grupo al que pertenecían los productores fue el grado de implementación de transferencia tecnológica (Galindo, 2001).

Existen diversos factores que influyen en la adopción de tecnologías por parte de los productores de ganado de doble propósito. El estudio de Galindo indica que algunos productores pueden quedarse en las primeras etapas o durante el proceso de adopción de una tecnología, es decir, que no necesariamente las adoptan de manera gradual. Los productores adoptarán una

tecnología en particular si consideran que es útil y se adapta a sus circunstancias particulares (Galindo, 2001, Cuevas y col., 2013).

5.1.2. Uso de secuestrantes y concentración de AFM₁

Respecto a la concentración de AFM₁ no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la concentración promedio de AFM₁ y el lote y sitio de producción.

Se realizó una prueba de tabulación cruzada para determinar si se rechaza o no la idea de que la leche sobrepase el límite máximo permisible de AFM₁ de acuerdo a la norma europea (0.05 µg/L), si no se usa adecuadamente el secuestrante (uso de una dosis mayor o igual al 100% de la dosis recomendada por el fabricante). Puesto que el valor "P" (0.0254) es menor que 0.05 en la prueba de Chi cuadrada, se rechaza la hipótesis de que ambos factores son independientes, con un nivel de confianza del 95 %. Por lo tanto, el valor observado de sobrepasar el LMP está relacionado con el uso adecuado de secuestrante.

Diversos estudios se han realizado donde se observa que los secuestrantes pueden disminuir la AFM₁ en la leche de vacas alimentadas con raciones contaminadas por AFB₁ a las concentraciones recomendadas por el fabricante, los secuestrantes disminuyeron significativamente las concentraciones de AFM₁ en la leche del 31-61% (Díaz, 2004). En otro estudio, la concentración de AFM₁ en la leche se redujo significativamente con la inclusión de adsorbentes de origen mineral (Rojo y col., 2014).

En el estudio realizado por Miranda (2015) se observó una dependencia altamente significativa ($P < 0.01$) de superar o no el nivel máximo permisible de AFM₁ si se cumple o no con las indicaciones de la dosis del producto secuestrante, sin embargo existen otros factores relacionados como la calidad de las condiciones de almacenamiento del alimento (Miranda, 2015).

5.1.3. Análisis económico

El valor anual de la dosis de secuestrante empleada en la UPL A (\$67.53) fue menor que en la UPL B (\$522.80) y (\$626.50), debido a que en la UPL A, fue

más común el uso de una dosis menor a la recomendada por el fabricante. Como se mencionó anteriormente, en el estudio de Galindo y col., 2001, hay factores diversos que pueden influir en la adopción de tecnologías entre los productores de ganado de doble propósito, entre las que se encuentran el considerar la utilidad y adaptación a sus propias necesidades. Posiblemente los productores no utilizan adecuadamente el secuestrante por falta de asesoría o por su costo elevado. En este caso no fue posible determinar un costo-beneficio por el uso del secuestrante, debido a que no se usaban de manera constante y no se usó la dosis recomendada.



5.2. COMPARACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE ELISA Y HPLC

Se realizó una comparación de las técnicas de HPLC y ELISA con un análisis de regresión, se observó una baja determinación de los valores de HPLC Y ELISA, ya que la R^2 alcanzó un valor de 25.05 % y un coeficiente de correlación de 50.9 %, sin embargo, nueve de los diez secuestrantes mostraron la tendencia de obtener porcentajes de adsorción mayores al 50.0 %. Con la prueba de Chi cuadrada se consideró que la proporción de los resultados porcentajes de adsorción mayores al 50 % no son estadísticamente diferentes con el 95.0 % de confianza.

Se han realizado diversos estudios de análisis de micotoxinas en los que se compara el desempeño de las pruebas de ELISA y HPLC. En el estudio realizado por Rosy y col. (2007) se evaluó la confiabilidad de la prueba de ELISA para la determinación de AFM_1 en la leche, utilizando como método de referencia HPLC. Ambas pruebas mostraron valores parecidos en cuanto coeficiente de variación (0.9-8.0 %), recuperación (96.8-108.0 %) y coeficiente de regresión (0.993) en muestras que contenían menos de 70 ng/L de AFM_1 . En concentraciones altas de AFM_1 por arriba de 100 ng/L se encontró que la prueba de ELISA tiene una ligera sobreestimación, un coeficiente de variación (7.0-21.0 %) y R^2 0.876. Sin embargo este estudio se encontró que ELISA es un método confiable (Rosy y col., 2007).

El método de ELISA es un método confiable para la determinación de aflatoxinas, tanto en leche como en muestras de alimento, en nuestro estudio ambas técnicas pudieron ser comparables cualitativamente, con un 90.0 % de concordancia. Los resultados inmunoquímicos pueden sufrir del llamado efecto de matriz o matriz de interferencia, debido a interacciones no específicas de anticuerpos con sustancias distintas al analito, llegando a provocar una sobreestimación o subestimación, por esta razón, las muestras que se presumen positivas deben ser confirmadas por HPLC (Rosy y col., 2007).

Lo anterior pudo haber provocado los resultados falsos negativos que se obtuvieron en la prueba de ELISA. Los resultados obtenidos por la técnica dieron una idea del potencial que tiene el producto de adsorber aflatoxinas, sin embargo es más conveniente realizar el estudio de evaluación de secuestrantes con la técnica de HPLC.

5.3. EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN

5.3.1. Capacidad de adsorción con la técnica de ELISA

Todos los secuestrantes mostraron habilidad para unirse a AFB₁, con porcentajes de adsorción de 38.2 (AS-ZEO) al 94.6 % (GM-AS). Hubo diferencias estadísticamente significativas "P" (0.000) de las medias de los porcentajes de adsorción entre los secuestrantes.

Con la técnica de ELISA, se han realizado algunos estudios para evaluar la adsorción de secuestrantes y se han determinado las concentraciones de AFB₁ mediante el método modificado de Asis, que es una técnica de ELISA modificada (Janes y col., 2007, Janes y col., 2011). Estos estudios han sido realizados mediante isothermas de adsorción con diferentes concentraciones de aflatoxinas, en contraste con nuestro estudio que fue realizado con una sola concentración de aflatoxina.

De acuerdo a las recomendaciones en el diseño de estudios *in vitro* (EFSA, 2009), el nivel de inclusión debe asegurar la adsorción de por lo menos 20 y preferiblemente el 50.0 % de la toxina presente. En el presente estudio la proporción de secuestrante (0.5 %) usada en el ensayo *in vitro* con la técnica de ELISA fue adecuada, ya que todos los secuestrantes mostraron afinidad para unirse a AFB₁ en solución.

5.3.2. Capacidad de adsorción con la técnica de HPLC

Todos los secuestrantes mostraron habilidad para unirse a AFB₁, los porcentajes de adsorción que se obtuvieron fueron del 62.5 (O-AS-1) al 99. 9% (GM-AS). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas (P<0.05) entre las medias de los porcentajes de adsorción entre los secuestrantes.

Se han realizado diversos estudios para evaluar la capacidad de adsorción de los secuestrantes a las micotoxinas con la técnica de HPLC, entre los que se encuentran: Dogi y col., 2011, Díaz y col., 2003, Moschini y col., 2008, Li y col., 2010, ya que el análisis de micotoxinas se basa principalmente en ésta técnica (Valenta, 1998). También se han realizado trabajos de evaluación de

secuestrantes con la técnica de espectrofotometría UV-visible (Lemke y col., 2001).

5.3.3 Tablas comparativas de estudios *in vitro*

A continuación se presentan unas tablas con los resultados de algunos trabajos reportados en la literatura. Se trata de experimentos *in vitro* de una sola concentración como el presente trabajo. Se comparó la concentración del secuestrante (C Sec), la concentración de AFB₁ con la que se trabajó (C AFB₁), tipo de solvente, pH y porcentaje de adsorción (Tablas 15 a 17).

Los datos antes mencionados son importantes para el cálculo del Coeficiente de distribución (Kd), el cual es definido como "La proporción de toxina unida y toxina libre, que no depende de ningún modelo y provee una base universal para la comparación cuantitativa de afinidad" (EFSA, 2009).

El valor aproximado del Coeficiente de distribución fue estimado mediante la siguiente fórmula:

$$Kd = (\%_{ads} / \%_{aq}) / C_{sec} \text{ (g/mL)}$$

Donde *% ads* corresponde al porcentaje de adsorción, *% aq* es el porcentaje de toxina libre o no unida y *C sec* (la concentración del secuestrante en g/mL).

El coeficiente de distribución puede interpretarse como el inverso de BC₅₀, "*binding concentration 50 %*" (por sus siglas en inglés), que es la concentración del agente secuestrante, que unirá al 50% de la toxina presente" (EFSA, 2009). El valor aproximado de BC₅₀ fue calculado con la siguiente fórmula:

$$BC_{50} = 1/Kd$$

Las tablas están divididas por tipos de secuestrante en las que se compararon los resultados del presente estudio, HPLC y ELISA (en negritas) con los de otros trabajos reportados en la literatura.

5.3.3.1 Estudios *in vitro* para bentonitas, montmorillonitas y zeolitas.

En lo que respecta a las Bentonitas, el estudio realizado por Gallo (97 %), (2010), mostró resultados muy similares a nuestro estudio con HPLC (99.7 %), aunque la concentración de AFB₁ y secuestrante en nuestro estudio fue mayor.

En general los resultados de Díaz (2003) y Gallo (2010) para las Bentonitas mostraron resultados muy similares a nuestro estudio (95.1 – 98.5 %) (Tabla 15).

En el caso de la montmorillonita, el presente trabajo (HPLC) obtuvo un porcentaje de adsorción (99.6) parecido al de Dakovic y col. (2012), que fue del 96 %.

En el caso de la Zeolita, el resultado obtenido en nuestro estudio fue el que obtuvo los porcentajes de adsorción más bajos, por la técnica de ELISA y HPLC (38.2 y 67.7), Gallo (2010) obtuvo un porcentaje de adsorción mucho más bajo (<10%) utilizando un buffer, en contraste con el resultado obtenido en el mismo trabajo pero utilizando agua como solvente, con el que se obtuvo un porcentaje de adsorción más alto (80 %) (Tabla 16).

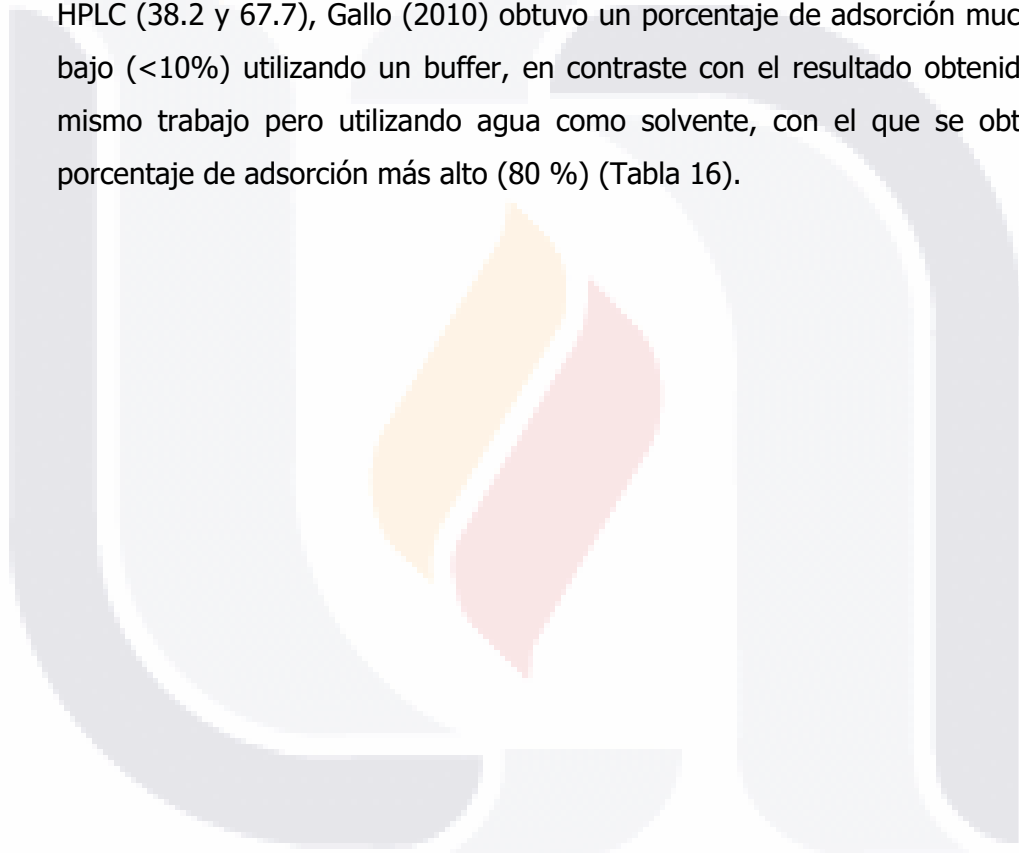


Tabla 16. Comparación de resultados de estudios *in vitro* de una sola concentración para la evaluación de Bentonitas, Montmorillonitas y Zeolitas como secuestrantes de AFB₁

Secuestrante	C Sec (g/L)	C AFB ₁ (µg/mL)	Solvente	pH	Ads (%)	Kd (g/mL)	BC ₅₀ (g/mL)
Bentonita (AS-BEN)*	5	0.02	MeOH 70%	7	87.5	1400	0.71
Bentonita (AS-BEN)**	10	40	MeOH 10%	7	99.7	33233	0.04
Bentonita de Na (FG) ³	10	5	MeOH 10%	3,7,10,SA	95.1	1491	0.52
Bentonita de Na (AB-20) ³	10	5	MeOH 10%	3,7,10,SA	98.0	4900	0.20
Bentonita de Na (MS) ³	10	5	MeOH 10%	3,7,10,SA	98.4	6150	0.16
Bentonita de Ca (RC) ³	10	5	MeOH 10%	3,7,10,SA	98.5	6567	0.15
Bentonita de Ca ⁴	0.82	0.821	H ₂ O	7	48.0	1126	0.89
Bentonita de Ca ⁴	0.82	0.821	buffer	2 y 7	97.0	39431	0.03
Montmorillonita (AS-MON)*	5	0.02	MeOH 70%	7	85.3	1161	0.86
Montmorillonita (AS-MON)**	10	40	MeOH 10%	7	99.6	24900	0.04
Montmorillonita modificada ⁵	0.5	5.0	PBS 0.1M	3 Y 7	96.00	48000	0.02
Zeolita (AS-ZEO)*	5	0.02	MeOH 70%	7	38.2	124	8.09
Zeolita (AS-ZEO)**	10	40	MeOH 10%	7	67.7	210	4.77
Zeolita ⁴	0.82	0.821	H ₂ O	7	80	4878	0.21
Zeolita ⁴	0.82	0.821	buffer	2y7	<10	<136	<7.38

Adaptado de EFSA, 2009.

Secuestrante (Sec), Concentración (C), Coeficiente de distribución (Kd), pH sin ajustar (SA), Concentración de secuestrante 50% (BC₅₀), Solución amortiguadora de fosfatos (PBS).

En negritas resultados obtenidos con el presente estudio (ELISA)*,(HPLC)**,

³Díaz y col., 2003,⁴Gallo y col., 2010, ⁵Dakovic y col, 2012

5.3.3.2 Estudios *in vitro* para Glucomanos. En el caso del secuestrante a base de Glucomanos, el resultado de nuestro estudio con HPLC (96.9 %), fue muy similar al reportado por Díaz y col. (2003) (96.6 %), ambos estudios se

trabajaron bajo condiciones similares, a excepción de la concentración de AFB₁ que en el presente trabajo fue más alta (40 µg/mL). En contraste, el trabajo de Li (2010) obtuvo porcentajes de adsorción más bajos, se evaluó la estabilidad de la unión a los 10 y 60 minutos y se obtuvieron 28.9 y 63.6 % respectivamente (Tabla 16).

El secuestrante fabricado a base de la combinación de Glucomananos y aluminosilicatos fue el que obtuvo el porcentaje de adsorción más alto (Tabla 16), tanto con la técnica de ELISA (94.6 %) como con HPLC (99.9 %).

En contraste, en el trabajo de Li (2010), se observó que la combinación de HSCAS con pared celular de levadura no tuvo afinidad a AFB₁, ya que permaneció sin cambios a los 60 minutos (Tabla 17).

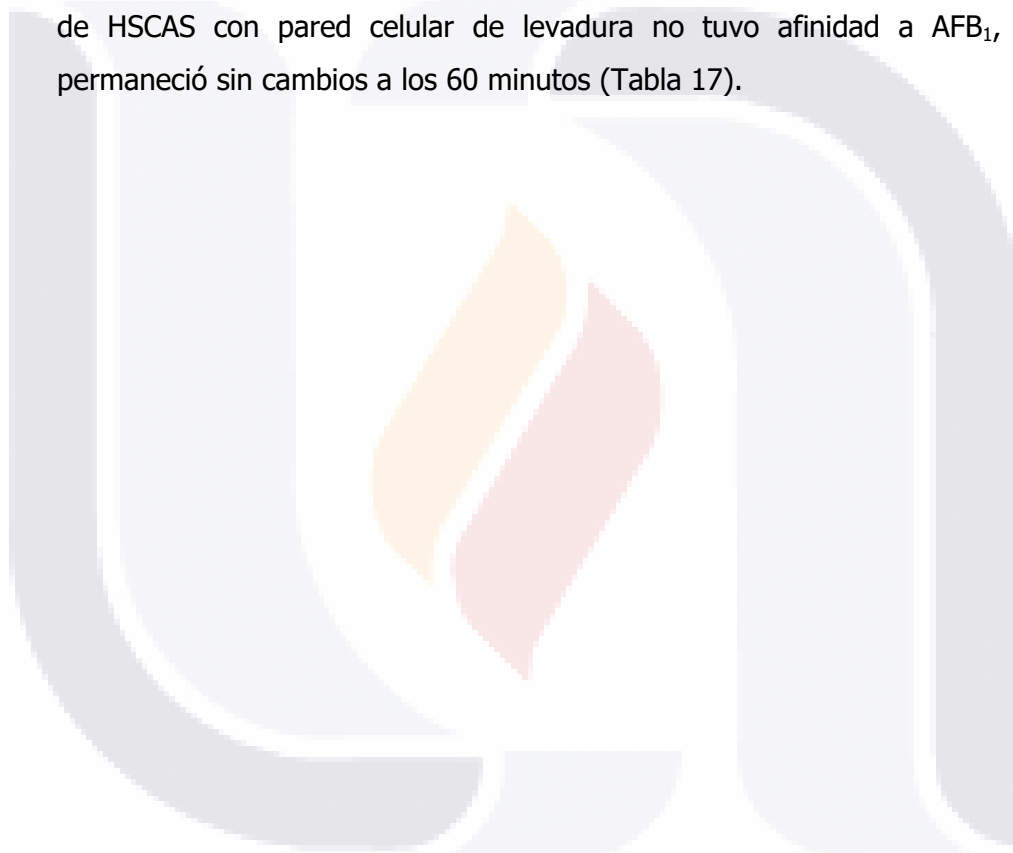


Tabla 17. Comparación de resultados de estudios in vitro de una sola concentración para la evaluación de Glucomananos y Glucomananos con aluminosilicatos como secuestrantes de AFB₁

Secuestrante	C Sec (g/L)	C AFB ₁ (µg/mL)	Solvente	pH	Ads (%)	Kd (g/mL)	BC ₅₀ (g/mL)
Glucomananos (GM)*	5	0.02	MeOH 70%	7	77.0	670	1.49
Glucomananos (GM)**	10	40	MeOH 10%	7	96.9	3126	0.32
Glucomananos ⁶	7.5	20	PBS	8	28.93 10min ^a	54	18.42
Glucomananos ⁶	7.5	20	PBS	8	63.64 60min ^a	233	4.29
Glucomananos (MTB-100) ³	10	5	MeOH 10%	7	96.6	2,841	0.35
GM y aluminosilicato (GM-AS)*	5	0.02	MeOH 70%	7	94.6	3504	0.29
GM y aluminosilicato (GM-AS)**	10	40	MeOH 10%	7	99.9	99,900	0.01
GM y Aluminosilicato ⁶	7.5	20	PBS	8	Sin cambios a los 60 minutos-		

Adaptado de EFSA, 2009.

Secuestrante (Sec), Concentración (C), Coeficiente de distribución (Kd), Solución amortiguadora de fosfatos (PBS), Concentración de secuestrante 50% (BC₅₀), Tendió a mostrar balance con el tiempo^a

En negritas resultados obtenidos con el presente estudio (ELISA)*,(HPLC)**,

³Díaz y col., 2003, ⁶Li, y col., 2010.

5.3.3.3 Estudios *in vitro* para HSCAS y organoaluminosilicatos. El HSCAS en el presente trabajo obtuvo porcentajes de adsorción muy similares (76.7) y (77.8) con las técnicas de (HPLC y ELISA) respectivamente, otros estudios han obtenido porcentajes de adsorción superiores a 90 (Lemke y col., 2001, Li y col., 2010).

Se ha reportado que los HSCAS tienen la capacidad de absorber selectivamente aflatoxina durante el proceso digestivo, por lo que la aflatoxina no está disponible para ser absorbida en el tracto gastrointestinal (Kubena y col. 1990). Es uno de los adsorbentes más efectivos para aflatoxinas, y es el más comúnmente usado como aditivo en la alimentación animal (Huwig y col., 2001) (Tabla 18).

Tabla 18. Comparación de resultados de estudios *in vitro* de una sola concentración para la evaluación de HSCAS y organoaluminosilicatos como secuestrantes de AFB₁

Secuestrante	C Sec (g/L)	C AFB ₁ (µg/mL)	Solvente	pH	Ads (%)	Kd (g/mL)	BC ₅₀ (g/mL)
HSCAS*	5	0.02	MeOH 70%	7	77.8	701	1.43
HSCAS**	10	40	MeOH 10%	7	76.7	329	3.04
HSCAS ⁵	0.2	7.86	H ₂ O	7	91.2	51818	0.02
HSCAS ⁶	7.5	20	PBS	8	98.0	6533	0.15
Organoaluminosilicato (O-AS-1)*	5	0.02	MeOH 70%	7	86.1	1239	0.81
Organoaluminosilicato (O-AS-1)**	10	40	MeOH 10%	7	79.7	393	2.55
Organoaluminosilicato (O-AS-2)*	5	0.02	MeOH 70%	7	77.1	673	1.49
Organoaluminosilicato (O-AS-2)**	10	40	MeOH 10%	7	62.5	167	6.00
Organoaluminosilicato (O-AS-3)*	5	0.02	MeOH 70%	7	86.0	1299	0.81
Organoaluminosilicato (O-AS-3)**	10	40	MeOH 10%	7	89.4	843	1.19
Organoaluminosilicato (O-AS-4)*	5	0.02	MeOH 70%	7	66.1	390	2.56
Organoaluminosilicato (O-AS-4)**	10	40	MeOH 10%	7	90.5	953	1.05

Adaptado de EFSA, 2009. Secuestrante (Sec), Concentración (C), Coeficiente de distribución (Kd), Concentración de secuestrante 50% (BC₅₀), Solución amortiguadora de fosfatos (PBS).

En negritass resultados obtenidos con el presente estudio(ELISA)*, (HPLC)**

⁵Lemke y col., 2001, ⁶Li y col., 2010

De acuerdo a las recomendaciones en el diseño de estudios *in vitro* (EFSA, 2009), el nivel de inclusión debe asegurar la adsorción de por lo menos 20 % y preferiblemente el 50 % de la toxina presente. En el presente estudio la proporción de secuestrante usada en el ensayo *in vitro* (1 %) fue adecuada, ya que todos los secuestrantes mostraron afinidad para unirse a AFB₁ en solución

tanto por la técnica de ELISA como HPLC, además de que la concentración de AFB₁ fue más alta (40 µg/mL) que la reportada por otros autores.

Sin embargo, es importante complementar los ensayos de adsorción con otros análisis de caracterización *in vitro* (Marroquín y col., 2009), ya que existen diversos factores que influyen en el proceso de adsorción, como la estructura física del adsorbente, la carga total y distribución, tamaño del poro, accesibilidad a la superficie y de la micotoxina como su polaridad, solubilidad, peso molecular y distribución de cargas (Jard y col., 2011).

Una vez evaluado *in vitro* deben realizarse estudios *in vivo* para evaluar su seguridad y eficacia bajo concentraciones realistas de micotoxinas así como asegurar que tengan una mínima interacción con nutrientes (Marroquín y col., 2009).

5.4. ANÁLISIS QUÍMICO DE LOS PRODUCTOS SECUESTRANTES

El contenido de calcio de los diez secuestrantes estimado en este estudio fue muy variable 2.1-19.9 g/kg; ocurrió la misma situación con el potasio (0.6-18), sodio (0.6-7.7) y aluminio (8.6-36.1) g/kg. El contenido de calcio de AS-BEN y O-AS-3 y AS-MON es más parecido a la referencia declarada por el fabricante y reportado en la literatura.

El contenido de potasio de los secuestrantes AS-BEN, O-AS-1 y O-AS-2 fueron los más cercanos al valor de referencia. En lo que se refiere a la concentración de sodio fueron AS-BEN, AS-ZEO, O-AS-1 y O-AS-2 los más cercanos a la referencia. El secuestrante AS-ZEO tuvo una concentración dentro del intervalo de referencia para aluminio. Cabe señalar que la referencia reportada por los fabricantes no en todos los casos está dada como un intervalo, sino como un valor puntual, por lo que la comparación fue más complicada.

La composición mineralógica y química de los aluminosilicatos podría explicar su eficacia (Rojo y col. 2014), ya que los responsables de los procesos de adsorción son los grupos funcionales existentes en la superficie del adsorbente (Porta, 2008).

En algunos casos la diferencia encontrada pudo ser atribuida a la existencia de una variación natural, ya que estos productos son obtenidos de depósitos originales de arcillas en los que no es posible controlar la composición química (Tamames, 2000).

6. CONCLUSIONES

Se realizó una evaluación técnica de los secuestrantes, en el que se observó que los productores no siempre usan la dosis que recomienda el fabricante en todos los lotes de vacas. Fue más común el uso de una dosis menor a la recomendada. Se observó que hay una relación con el valor observado de sobrepasar el LMP y el uso no adecuado del secuestrante.

En la evaluación económica se encontró que el valor de la dosis empleada en uno de los sitios analizados puede llegar a ser muy parecido al valor anual del estímulo económico por la calidad de la leche. Esto pudiera parecer un costo alto y ser alguna razón por la cual los productores no usen la dosis recomendada en todos los lotes, sin embargo se tendría que analizar más a fondo el costo-beneficio en cada uno de los casos y de ésta manera convencer al productor de que adopte la tecnología del uso adecuado del secuestrante entre otras prácticas que le permitan tener un control adecuado de aflatoxinas.

Se realizó la evaluación de la capacidad de adsorción *in vitro* de productos secuestrantes y se observó que todos los secuestrantes evaluados tienen una adecuada afinidad de unirse a AFB₁ en solución.

Se comparó la concordancia de las técnicas de HPLC y ELISA para evaluar la capacidad de los secuestrantes para unirse a AFB₁ en solución. Se determinó que ambas técnicas son comparables cualitativamente, sin embargo el uso de la técnica de HPLC es lo más adecuado, ya que permite realizar un análisis a diferentes concentraciones tanto de secuestrante como de aflatoxina.

Se analizó la composición química de los secuestrantes, en el que se encontró una gran variación en la concentración de sodio, potasio, calcio y aluminio al ser comparados con el valor de referencia reportado por el fabricante o en la literatura. Es importante que el fabricante proporcione la referencia como un intervalo y no un valor puntual, así como verificar se cumplimiento, ya que la composición química puede explicar la eficacia del secuestrante así como otros análisis de caracterización *in vitro*.

La evaluación *in vitro* de los secuestrantes es un apoyo para conocer el potencial que tiene un producto como adsorbente de micotoxinas y debe ser complementada con otros análisis de caracterización *in vitro*. Finalmente la evaluación *in vivo* ayudará a decidir si el secuestrante puede ser usado en las

unidades de producción como una de las diversas herramientas existentes para el control de aflatoxinas.

Se determinó que los productos secuestrantes de flatoxinas empleados usualmente en la ración integral de vacas lecheras del Altiplano Central Mexicano tienen la capacidad de adsorber *in vitro* proporciones superiores al 50 % de AFB1 en solución.



7. GLOSARIO

Absorción: Retención de una sustancia por las moléculas de otra ya sea en estado líquido o gaseoso.

Adsorción: Proceso mediante el cual átomos, iones o moléculas quedan atrapados o retenidos en la superficie de un material o entre dos fases.

Carcinógeno: Agente físico, químico o biológico potencialmente capaz de producir cáncer al exponerse a tejidos vivos.

Citocromo P-450: Es una gran familia de proteínas de la sangre, presentes en numerosas especies, desde bacterias hasta mamíferos, responsable del metabolismo oxidativo de los xenobióticos.

Columna de inmunoafinidad: Es un método de separación cromatográfica, las columnas de inmunoafinidad contienen anticuerpos monoclonales capaces de "atrapar" y purificar micotoxinas de diferentes sustratos

Conidióforo: Estructura de los hongos que produce de manera asexual esporas llamadas conidios.

Cumarinas: Compuesto químico orgánico perteneciente a la familia de las benzopironas (sustancias con su acción linfocinética, reducen el edema y la reacción inflamatoria crónica). Las cumarinas se consideran un grupo de metabolitos secundarios de las plantas.

Epóxido: Compuesto químico éter cíclico formado por un átomo de oxígeno unido a dos átomos de carbono, que a su vez están unidos entre sí mediante un solo enlace covalente.

Esclerocio: Estructura de los hongos de consistencia dura que contiene reservas alimenticias para sobrevivir a condiciones ambientales extremas.

Fase estacionaria: Es la sustancia que está fija en una posición durante la cromatografía. Un ejemplo es la capa de gel de sílice en la cromatografía en capa fina.

Fase móvil: En la cromatografía es un medio físico que permite la separación de la muestra. Es la fase que se mueve en una dirección definida. Puede ser un líquido (cromatografía de líquidos), un gas (cromatografía de gases) o un fluido supercrítico (cromatografía de fluidos supercríticos).

Cromatografía fase normal: Tipo de cromatografía que se caracteriza por separar los compuestos en base a su polaridad. Esta técnica utiliza una fase estacionaria polar y una fase móvil apolar y se utiliza cuando el compuesto de interés es bastante polar.

Cromatografía fase Reversa: Tipo de cromatografía que consiste en una fase estacionaria apolar y una fase móvil de polaridad moderada.

Fialide: Célula terminal del conidióforo en forma de botella, que se une por su base a la métula.

Gel tixotrópico: Algunos geles y coloides se consideran materiales tixotrópicos, pues muestran una forma estable en reposo y se tornan fluidos al ser agitados

Glutati6n: Es un tripéptido no proteínico constituido por 3 aminoácidos: cisteína, glutamato y glicina. Es el principal antioxidante de las células. Ayuda a protegerlas de las especies reactivas del oxígeno.

Grupo carbonil: Es un grupo estructural que consiste en un átomo de carbono con un doble enlace a un átomo de oxígeno.

Hidroxilaci6n: es una reacci6n química en la que se introduce un grupo hidroxilo (OH) en un compuesto reemplazando un átomo de hidrógeno, oxidando al compuesto.

Hifas: Son una red de filamentos cilíndricos que conforman la morfología del cuerpo de los hongos multicelulares

Hongos filamentosos: Grupo de hongos formado por una serie de ramas tubulares llamadas hifas, el conjunto de las cuales forman el micelio. Se reproducen por la formaci6n de esporas.

Kilobase: Unidad de longitud de ácidos nucleicos correspondiente a 1000 nucleótidos. Se abrevia como kb para ácidos nucleicos de hebra simple y kbp (kilo par de bases) para ácidos nucleicos de doble hebra.

Megabase: Longitud de ADN de doble cadena que contiene dos millones de nucleótidos (un millón en cada hebra). Una longitud de ARN monocatenario que contiene un millón de nucleótidos

Metabolito: Es cualquier molécula utilizada o producida durante el metabolismo.

Métula: Célula de un conidióforo que lleva las fiálides.

Micelio: Es la masa de hifas que constituye el cuerpo vegetativo de un hongo.

Morfotipo: Cualquiera de un grupo de diferentes tipos de individuos de la misma especie en una población.

Nanocompuesto: Material compuesto donde una de las fases tiene una, dos o tres dimensiones de menos de 100 nanómetros (nm).

Silicatos: Grupo de minerales de mayor abundancia, pues constituyen más del 95.0 % de la corteza terrestre.

Teratógeno: Sustancia o medicamento que administrado a una mujer o un animal en estado de gestación puede ocasionar malformaciones en el feto.

Vesícula: Engrosamientos de forma variada que presentan las hifas de un hongo.

8. REFERENCIAS

- Amaike, S. and Keller, N.P. (2011). *Aspergillus flavus*. *Annual Review of Phytopathology*, 49:107-133.
- AOAC (Asociation of Official Analytical Chemists) (1995). Official Methods of Analysis. Natural Toxins, Aflatoxin. 49, 1-40.
- AOAC (Asociation of Official Analytical Chemists) (2000). Official Methods of Analysis. Natural Toxins, Aflatoxin. 49.2.01, 1-33.
- Aoudia, N., Callu, P., Grosjean, F. & Larondelle, Y. (2009). Effectiveness of mycotoxin sequestration activity of micronized wheat fibres on distribution of ochratoxin A in plasma, liver and kidney of piglets fed a naturally contaminated diet. *Food and Chemical Toxicology*. 47(7), 1485-1489.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D. & Seidman, J.G. (2003). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York, E.U.: John Wiley and Sons. Recuperado de http://www.aun.edu.eg/molecular_biology/Proceeding_Dec2011/Current%20Protocols%20in%20Mol.%20Biol..pdf
- Bayman, P., Baker, J. L., Doster, M. A., Michailides, T. J., & Mahoney, N. E. (2002). Ochratoxin production by the *Aspergillus ochraceus* group and *Aspergillus alliaceus*. *Applied Environmental Microbiology*. 68(5), 2326-2329.
- Bennet, J.W. & Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*. 16(3), 497-516.
- Berny, P. J., 2005. Mycotoxin Analysis by TLC. *Encyclopedia of Chromatography*. 2nd Ed. 230; 1091-1093.
- Bezerra, R. M, Chagas, O.F., Feitosa, M. F., Florindo, G.M. & Rondina, D. 2014. Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control*, 36 (1):159-165.
- Bhatnagar, D., Cary, J.W., Ehrlich, K., Yu, J. & Cleveland, T.E. (2006). Understanding the genetics of regulation of aflatoxin production and *Aspergillus flavus* development. *Mycopathologia*. 162(3), 155-166.
- Carvajal, M. (2013). Transformación de la Aflatoxina B1 de alimentos en el cancerígeno humano aducto AFB1-ADN. *Revista Especializada en ciencias Químico-Biológicas*. 16(2),109-120.

- Cary, J.W. (2004). Secondary metabolite gene clusters in filamentous fungi. En Kilip, K.A. (Ed.). *Handbook of Fungal Biotechnology* (92-105). New York, E. U.: Marcel Dekker.
- CAST (Council for Agricultural Science and Technology). (2003). Mycotoxins: Risks in Plant, Animal and Human systems. *Council for Agricultural Science and Technology*. Task Force Report No. 139, Ames, Iowa, USA. Recuperado de http://www.trilogylab.com/uploads/Mycotoxin_CAST_Report.pdf
- Chen, R. S., Tsay, J. G., Huang, Y. F. & Chiou, R. Y. (2002). Polymerase chain reaction-mediated characterization of molds belonging to the *Aspergillus flavus* group and detection of *Aspergillus parasiticus* in peanut kernels by a multiplex polymerase chain reaction. *Journal of Food Protection*. 65(5), 840-844.
- Cigié, I.K. & Prosen, H., (2009). An overview of conventional and emerging analytical methods for the determination of mycotoxins. *International Journal of Molecular Science*. 10(1),62-115.
- Clements, M.J. & White, D.G. (2004). Identifying sources of resistance to aflatoxin and fumonisin contamination in corn grain. *Journal of Toxicology Toxin Reviews*, 23(2-3) 381-396.
- Codex Alimentarius (2003). Code of practice for a prevention and reduction of mycotoxin contamination in cereals, including annexes on ochratoxin A, zearalenona, fumonisins and trichothecenes. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. CAC/RCP 51-2003.
- Cotty, P.J. (2001). Part 1. Infectious diseases, cottonseed losses and mycotoxins. *In Cotton compendium* (9-13). Rothrock, C.S., Kirkpatrick T.L. (Ed.). American Phytopathological Society. St. Paul, Minnessota, E.U.
- Cuevas, R. V., Baca, D, J., Cervantes, E. F., Espinoza, G. J. A., Aguilar Avila, J. y Loaiza, M. A. (2013). Factores que determinan el uso de innovaciones tecnológicas en la ganadería de doble propósito en Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 4(1), 31-46.
- Dakovic, A, Kragović, M, Rottinghaus, G.E, Ledoux, D.R., Butkeraitis, P., Dubravka, Z.D., Snezana, D.Z. & Ljubisav, S. (2012). Preparation and characterization of zinc-exchanged montmorillonite and its effectiveness as aflatoxin B1 adsorbent. *Material Chemistry Physics*, 137, 213–220.

- De Luna, L.M., Valdivia, F.G., Jaramillo, J.F., Reyes, J.L., Ortiz, M. R., Quezada, T. T. (2013). Association between *Aspergillus flavus* colonization and aflatoxins production in immature grains of maize genotypes *Journal of food Science and Engineering*. 3(1), 688-698.
- Deng, Y., Barrientos, V. , Billes, F. & Dixon, B.J. (2010). Bonding mechanisms between aflatoxin B1 and smectite. *Applied Clay Science*. 50(1), 92-98.
- Díaz, D.E., Hagler, W.M, Hopkins, B.A. & Whitlow, L.W. (2003). Aflatoxin Binders I. In vitro binding assay for aflatoxin B1 by several potential sequestering agents. *Micopathologia*. 156(3), 223-226.
- Díaz, D.E., Hagler, W.M, Blackwelder, J.T., Eve, J.A., Hopkins, B.A., Anderson, K.L., Jones, F.T. & Whitlow, L.W. (2004). Aflatoxin Binders II: Reduction of aflatoxin M1 in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed. *Micopathologia*. 157(2), 233-241.
- Díaz, D.E. & Smith, T.K. (2005). Mycotoxin sequestering agents: practical tools for the neutralisation of mycotoxins. In Díaz, D. E. (Ed.), *The Mycotoxin Blue Book*. (323-339). Nottingham, UK.: Nottingham University Press.
- Dogi, C.A., Armando, R., Ludueña, R., Moreno, L.B.A., Rosa, C.A.R., Dalcero, A. & Cavaglieri, L. (2011). *Saccharomyces cerevisiae* strains retain their viability and aflatoxin B₁ binding ability under gastrointestinal conditions and improve ruminal fermentation. *Food Additives and Contaminants*. 28(12), 1705-1711.
- Dorner, J.W. & Cole, R.J. (2002). Effect of application of nontoxigenic strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* on subsequent aflatoxin contamination of peanuts in storage. *Journal of Stored Products Research*. 38(4), 329-339.
- EFSA (European Food Safety Authority) (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. Request N° EFSA-Q-2003-035. Recuperado de <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/39>
- EFSA (European Food Safety Authority) (2009). Review of mycotoxin-detoxifying agents used as feed additives: mode of actions, efficacy and feed/food safety. Scientific Report. *The European Food Safety Authority Journal*, 19-46.

Request No. CFP/EFSA/FEEDAP/2009/01 Recuperado de <https://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/22e>

Ehrlich, K.C., Yu, J. & Cotty, P.J., (2005). Aflatoxin biosynthesis gene clusters and flanking regions. *Journal of Applied Microbiology*. 99(3),v518-527.

European Community (2006). Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Commission Regulation (EC), No 1881/2006 of 19 December 2006. *Official Journal of the European Union*. L 364, 5-24.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2005). Dairy Market Assessment. Commodities and Trade Division, June 2005. *Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Rome*.

FAO-FEPALE (Food and Agriculture Organization of the United Nations, Federación Panamericana de Lechería. (2012). Situación de la lechería en América Latina y el Caribe en 2011, p 10-16. Observatorio de la cadena lechera. *Oficina Regional de la FAO para América Latina y El Caribe, División de Producción y Salud Animal*.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2003). Worldwide regulations for micotoxins in FAO 2003. Food and Nutrition Paper, 81. *Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome*. Recuperado de <http://www.fao.org/docrep/007/y5499e/y5499e00.htm>

Febrero, B.M., Galeano, S. P., González, D. J. y Pateiro, L. B. (2008). Prácticas de estadística en R. p. 114. *Departamento de estadística e investigación operativa*. Universidad de Santiago de Compostela, España. Recuperado de <http://eio.usc.es/pub/pateiro/files/pubdocentepRACTICASestadistica.pdf>

Feng, J., Shan, M., Du, H., Han, X. & Xu, Z. (2007). *In vitro* adsorption of zearalenone by cetyltrimethyl ammonium bromide-modified montmorillonite nanocomposites. *Microporous and Mesoporous Materials*. 113(1-3), 99-105.

Franco, U. E. y Maspoch, R. M. (2009). Estructura general de las arcillas utilizadas en la preparación de nanocompuestos poliméricos. *Ingenierías*. 11(44), 35-41.

Frisvad, J. C., Skouboe, P. & Samson, R.A., 2005. Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B₁, sterigmatocystin and 3-O-metilsterigmatocistina, *Aspergillus rambelii* sp. nov. *Syst., Apply Microbiology*. 28(5), 442-453.

- Galindo, G.G. (2001). Uso de innovaciones en el grupo de ganaderos para la validación y transferencia de tecnología "Joachin", Veracruz, México. *Tierra Latinoamericana*. 19 (4), 385-392.
- Galvano, F., Pietri, A., Bertuzzi, T., Fusconi, G., Galvano, M., Piva, A. & Piva G. (1996). Reduction of carryover of aflatoxin from cow feed to milk by addition of activated carbons. *Journal of Food Protection*. 59(5), 551-554.
- Galvano, F., Piva, A., Ritieni, A. & Galvano, G. (2001). Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins: A review. *Journal of Food Protection*. 64(1), 120-131.
- Gallo, A. & Masoero, F. (2010). In vitro models to evaluate the capacity of different sequestering agents to adsorb aflatoxins. *Italian Journal of Animal Science*. 9(1), 109-116.
- García, A.R., Avila, E., Rosiles, R. & Petrone, V.M, (2003). Evaluation of two mycotoxin binders to reduce toxicity of broiler diets containing ochratoxin A and T-2 toxin contaminated grain. *Avian Disease*. 47(3), 691-699.
- Groopman, J. D., Kensler, T. W. & Wild, C. P. (2008). Protective interventions to prevent aflatoxin-induced Carcinogenesis in developing countries. *Annual Review of Public Health*. 29(1), 187-203.
- Guerra, B., Caridad, W., Menéndez, A.E. & Barrero, M.R. (2009). *Estadística*. Félix Varela (Ed.), p. 213-218. ProQuest ebrary. La Habana, Cuba
- Haderlein, S.B., Weissmahr, K., Scharzenbach, R. P., 1996. Specific adsorption of nitroaromatic explosives and pesticides to clay minerals. *Environmental science and technology*. 30(2), 612-622.
- Horn, B.W., Ramírez, P. & Carbone, I. (2009). The sexual state of *Aspergillus parasiticus*. *Mycologia* 101(2), 275–280.
- Huwig, A., Freimund, S., Käppeli, O. & Dutler, H. (2001). Mycotoxin detoxification of animal feed by different adsorbents. *Toxicology Letters*. 122(2), 179-188.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). (2002). Overall evaluations of carcinogenicity. En *IARC Monographs* (82), 171-179. IARC Press, Lyon, France.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática). (2013). Los bovinos en Aguascalientes: *Censo Agropecuario 2007*, p.16-18. INEGI, México.

- Jard, G., Liboz, T., Mathieu, F., Guyonvarc'h & Lebrihi, A. (2011). Review of mycotoxin reduction in food and feed: from prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation. *Food Additives and Contaminants*. 28(11), 1590-1609.
- Jaynes, W.F. & Zartman, R.E. (2011). Aflatoxin Toxicity Reduction in Feed by Enhanced Binding to Surface-Modified Clay Additives. *Toxins*. 3(6), 551-565.
- Jouany, J.P. (2007). Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 137(3-4), 342-362.
- Kabak, B., Dobson, A.D.W. & Var, I., 2006. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 46(8), 493-619.
- Klein, P.J., Buckner, R., Kelly, J. & Coulombe, R.A. (2000). Biochemical basis for the extreme sensitivity of turkeys to aflatoxin B. *Toxicology Apply Pharmacology*. 165(1), 45-52.
- Klich, M. A. (2007). *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. *Molecular plant Pathology*. 8(6), 713-722.
- Klich, M.A. (2002). Identification of Common *Aspergillus* Species. 1st Ed. *Centraalbureau voor Schimmelcultures*, pp.166, Utrecht, The Netherlands.
- Koskinen, W. C. & Harper, S. S. (1990). The retention process: Mechanisms, in Pesticides in the soil Environment: Process, Impacts and Modeling. En Cheng (Ed.). *Soil Science Society of America*, p. 51-77, Madison, WI
- Knips, V. (2005). Developing Countries and the Global Dairy Sector. Part I, Global Overview. Pro-Poor Livestock Policy Initiative. FAO (30), 1-49, Disponible en: <http://www.fao.org/ag/againfo/programmes/en/pplpi/docarc/wp30.pdf>
- Kubena, L.F., Harvey, R.B., Huff, W.E., Corrier, D.E., Phillips, T.D. & Rottinghaus, G.E. (1990). Efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the toxicity of aflatoxin and T-2 toxin. *Poultry Science*. 69(7), 1078-1086.
- Kuilman, M.E., Maas, R.F., Fink, G.J. (2000). Cytochrome P450 mediated metabolism and cytotoxicity of aflatoxin B₁ in bovine hepatocytes. *Toxicology in Vitro*. 14(4), 321-327.

- Kutz, R.E., Sampson, J.D., Pompeu, L.B., Ledoux, D.R., Spain, J.N., Vazquez, A.M., Rottinghaus, G.E. (2009). Efficacy of Solis, NovasilPlus, and MTB-100 to reduce aflatoxin M₁ levels in milk of early to mid lactation dairy cows fed aflatoxin B₁. *Journal of Dairy Science*. 92(8), 3959-3963.
- LaPrade, J.C. & Manwiller, A. (1977). Relation of insect damage, vector, and hybrid reaction to aflatoxin B₁ recovery from field corn. *Phytopathology*. 67, 544-547.
- Leeson, S., Diaz, G.J. & Summers, J.D., 1995. Trichothecenes. In University Books (Ed.). *Poultry Metabolic Disorders and Mycotoxins*. p.190-226. Guelph, Ontario, Canadá.
- Lemke, S. L., Grant, P. G. & Phillips, T. D. (1998). Adsorption of zearalenone by organophilic montmorillonite clay. *Journal of Agricultural and Food chemistry*. 46(9), 3789-3793.
- Lemke, S.L., Ottinger, S. E., Mayura, C.L., Ake, C.L., Pimpukdee, K., Wang, N. & Phillips, T.D. (2001). Development of a multi-tiered approach to the *in vitro* prescreening of clay-based enterosorbents. *Animal Feed Science and Technology*. 93(1-2), 17-29.
- Li, P., Zhang, Q. & Zhang, W. (2009). Immunoassays for aflatoxins. *Trends in Analytical Chemistry*. 28 (9), 1115-1126. Doi:10.1016/j.trac.2009.07.003.
- Li, J., De-cheng, S. & Xiao-ou, S. (2010). Binding Capacity for Aflatoxin B₁ by Different Adsorbents. *Agricultural Science in China*. 9(3), 449-456.
- Magan, N., Olsen, M. & Patel, P. (2004). Micotoxin analysis: current and Emergin technologies. In CRC Press (Ed.). *Mycotoxins in food, Detection and Control*. (p.88-110). Boca Ratón, Boston, N.Y.
- Marroquín, C. A., Deng, Y., Taylor, J. F., Hallmark, C. T., Johnson, N. M. & Phillips, T. D. (2009). *In vitro* and *in vivo* characterization of mycotoxin-binding additives used for animal feeds in México. *Food additives and Contaminants*. 26(5), 733-743.
- Martínez, L. A. y Anadón, M. R. (2012). Micotoxinas en los alimentos. En Soriano, C. (Ed.). *Micotoxinas* (p. 292-295). España, Díaz de Santos.
- McBride, M. B. (1989). Surface chemistry of soil minerals. An introduction to soil mineralogy. En Dixon, J. B. and Weed, S. B. (Ed.). *Minerals in Soil Environments*. (p. 1-34). Madison, E. U., Soil Science Society of America.

- Méndez, A., Arámbula, V., Loarca, P., González, H., Castano, T. & Moreno, M. (2004). Aflatoxin's fate during the nixtamalization of contaminated maize by two tortilla-making processes. *Journal of Stored Products Research*. 40(1), 87–94.
- Ming, D. W. & Mumpton, F.A. (1989). Zeolites in soils. An introduction to soil mineralogy. En Dixon, J.B. and Weed, S. B. (Ed.). *Minerals in Soil Environments*. (p. 1-34). Madison, E.U. Soil Science Society of America.
- Miranda, C. (2015). Factores de riesgo asociados con la ocurrencia de la AFM₁ en la leche cruda de vaca en establos de la región El Llano, México. Tesis de Maestría no publicada. Centro de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, México.
- Misra, H.N., & Das, C. (2003). A review on biological control and metabolism of aflatoxin. *Critical Review in food Science and Nutrition*, 43(3), 245-264.
- Mitchel, N. J., Bowers, E., Hurburgh, C. & Wu, F. (2016). Potential economic losses to the US corn industry from aflatoxin contamination. *Food additives and Contaminants Part A, Chemistry Analisis Control Exposure and Risk Assessment*. 33(3), 540-550. DOI:10.1080/19440049.2016.1138545.
- Moschini, M., Gallo, A., Piva, G. & Masoero, F. (2008). The effects of rumen fluid on the *in vitro* aflatoxin binding capacity of different sequestering agents and *in vivo* release of sequestered toxin. *Animal Feed Science and Technology*. 147(4), 292-309.
- Moss, M. O. (2002). Mycotoxin review. *Aspergillus and Penicillium. Mycologist*, 16(3), 116-119.
- Moshtaghian, J., Parsons, C. M. Leeper, R. W., Harrison, P. C. & Koelkerberck, K. W. (1991). Effect of sodium Aluminosilicate on phosphorus utilization by chicks and laying hens. *Poultry Science*. 70(4), 955-962.
- Moudgil, V., Redhu, D., Dhanda, S. & Singh J. (2013). A review of molecular mechanisms in the development of hepatocellular carcinoma by aflatoxin and hepatitis B and C viruses. *Journal of Environmental pathology, Toxicology and Oncology*. 32(2), 165-175.
- Munkvold, G.P. (2003). Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize. *Annual Reviews of Phytopathology*. 41(1), 99-116.
- Muscarella, M., Iammarino, M., Nardiello, D., Lo Magro, S. & Palermo, C. (2009). Validation of a confirmatory analytical method for the determination of

aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in foods and feed materials by HPLC with on-line photochemical derivatization and fluorescence detection. *Food Additives and Contaminants*. 26(10), 1402–1410

Nahm, K.H. (1995). Possibilities for preventing mycotoxicosis in domestic fowl. *World Poultry Science Journal*. 51(2), 177-185.

Nezami, H., Polychronaki, N., Salminen, S. & Mykkanen, H. (2002). Binding rather than metabolism may explain the interaction of two food-grade Lactobacillus strains with zearalenone and its derivative α -zearalenol. *Applied Environmental Microbiology*. 68(7), 3545-3549.

Noguchi, K., Gel, Y. R., Brunner, E. & Konietzschke, F. (2012). nparLD: An R Software Package for the Nonparametric Analysis of Longitudinal Data in Factorial Experiments. *Journal of Statistical Software*. 50(12), 1-21.

OECD-FAO (Organization for Economic Cooperation and Development-Food and Agriculture Organization for the United Nations). (2015). "Dairy". En OECD Publishing (Ed.). *OECD-FAO Agricultural Outlook 2015*, (p. 121-138).Paris. Recuperado de http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2015-11.

OPS-OMS (Organización Panamericana de la Salud-Organización mundial de la salud) (1983). Micotoxinas. Criterios de la salud ambiental 11. *En OMS Publicación Científica 453* (p. 131). Washington, USA. ISBN 92-75-31453-5.

Papaioannou, D.S., Kyriakis, C.S., Papasteriadis, A. & Roumbies, N. (2002). A field study on the effect of in-feed inclusion of a natural zeolite (clinoptilolite) on health status and performance of sows/gilts and their litters. *Research in Veterinary Science*. 72(1), 51-59.

Payne, G.A. (1998). Process of contamination by aflatoxin-producing fungi and their impacts on crops. In Sinha, K.K, and Bhatnagar, D. (Ed.). *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety* (p. 279-306). New York E. U.. Marcel Dekker.

Perkin-Elmer. (1994). Analytical methods for atomic absorption spectrophotometry, Connecticut, USA.

Phillips, T.D., Clement, B.A., Kubena, L.F. & Harvey, R.B. (1990). Detection and detoxification of aflatoxins: prevention of aflatoxicosis and aflatoxin residues with hydrated sodium calcium aluminosilicates. *Veterinary and Human Toxicology*. 32(1), 15-19.

- Phillips, T. D., Kubena L. F., Harvey R.B., Taylor, D. R. and Heidelbaugh, N.D. (1998). Hydrated Sodium Calcium Aluminosilicate: A high affinity sorbent for aflatoxin. *Poultry Science*. 67(2), 243-247.
- Phillips, T. D. (1999). Dietary clay in the chemoprevention of aflatoxin-induced disease. *Toxicology Science*. 52(2), 118-126.
- Phillips, T. D., Lemke, S. L. & Grant, P. G. (2002). Characterization of Clay-Based Enterosorbents for the Prevention of Aflatoxicosis. In DeVries, J.W., Trucksess, M.W. and Jackson, L.S. *Mycotoxins and Food Safety* (p.157-170), New York, E. U. Springer Science and Business Media.
- Phillips, T. D., Afriyie, G.E., Williams, J., Huebner, H., Ankrah, N. A., Ofori, A.D., Jolly, P., Johnson, N., Taylor, J., Marroquin, C.A., Xu, L., Tang, L., & Wang, J.S. (2008). Reducing human exposure to aflatoxin through the use of clay: A review. *Food Additives and contaminants Part A*. 25(2), 134-145.
- Pimpukdee, K., Kubena, L.F., Bailey, C. A., Huebner, H. J., Afriyie, G. E. & Phillips, T.D. (2004). Aflatoxin-induced toxicity and depletion of vitamin A in young broiler chicks: Protection of chicks in the presence of low levels of Novasil PLUS in the diet. *Poultry Science*. 83(5), 737-744.
- Pitt, J.I. (2000). Toxigenic fungi: which are important?. *Medical Mycology*. 38(1), 17-22.
- Price, R.L. & Jorgensen, K.V. (1985). Effects of processing on aflatoxins levels and on mutagenic potential of tortillas made from naturally contaminated corn. *Journal of Food Science*. 50(2), 347-349.
- Probst, C., Schulthess, F. & Cotty, P.J. (2010). Impact of *Aspergillus* section Flavi community structure on the development of lethal levels of aflatoxins in Kenyan maize (*Zea mays*). *Journal of Applied Microbiology*. 108(2), 600-610.
- Porta, C. J. (2008). Propiedades químicas y fisicoquímicas y comportamiento del suelo. En *Introducción a la edafología: uso y protección del suelo* (p.191-221) Madrid, España. Mundi-Prensa.
- Raisuddin, S. (1993). Toxic responses to aflatoxins in a developing host. *Journal of Toxicology Toxin Reviews*. 12(2), 175-201.
- Ramos, A.J., Hernández, E. (1997). Prevention of aflatoxicosis in farm animals by means of hydrated sodium calcium aluminosilicate addition to feedstuffs: a review. *Animal Feed Science and Technology*. 65(1-4), 197-206.

- Ramos, A.J., Hernandez, E. (1996). *In vitro* aflatoxin adsorption by means of a montmorillonite silicate. A study of absorption isotherms. *Animal Feed Science and Technology*. 62(1), 263-269.
- Reddy, L., & Bhoola, K. (2010). Ochratoxins-Food Contaminants: Impact in human health. *Toxins (Basel)*. 2(4), 771-779.
- Richard, J. L., (2007). Some major mycotoxins and their mycotoxicoses. An overview. *International Journal of food Microbiology*. 119(1-2). 3-10.
- Robens, J. & Cardwell, K. F. (2003). The costs of mycotoxin management in the United States. *Toxin Reviews*. 22(2-3), 139-152
- Rojó, F., Martínez, S. P., Espinoza, V. H., Nathal, V. A., De Lucas, P. E. y Reyes, V. W. (2014). Evaluación de adsorbentes para la reducción de aflatoxina M₁ en leche de vacas alimentadas con dietas contaminadas artificialmente con AFB₁. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 5(1), 1-15.
- Rosy, P., Borsari, A., Lasi, G., Lodi, S., Galanti, A., Fava, A., Girotti, S. & Ferri, E. (2007). Aflatoxin M₁ in milk: Reliability of the immunoenzymatic assay. *International Dairy Journal*. 17(5), 429-435.
- Samson, R. A., Visagie, C. M., Houbraken, J., Hong, S. B., Hubka, V., Klaassen, C. H. W., Perrone, G., Seifert, K. A., Susca, A., Tanney, J. B., Varga, J., Kocsub, S., Szigeti, G., Taguchi, T. & Frisvad, J. C. (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*. 78(1), 141-173.
- Schulze, D. G. (1989). An introduction to soil mineralogy. In Dixon, J.B. and Weed, S. B. (Ed.). *Minerals in Soil Environments* (p.1-34). Wisconsin, E.U. Soil Science Society of America.
- Schwarzer, K. (2009). Harmful effects of mycotoxins on animal physiology. In *17th Annual ASAIM SEA Feed Technology and Nutrition Workshop*. (p. 155-19). Hue, Vietnam.
- SE (Secretaría de Economía). (2012). Dirección General de Industrias Básicas. Análisis del sector lácteo en México, Marzo. Recuperado de http://www.economia.gob.mx/files/comunidadnegocios/industria/comercio/informacionSectorial/analisis_sector_lacteo.pdf
- Stafford, M. E. & McLaughlin, C. S. (1973). Trichodermin, a possible inhibitor of the termination process of protein synthesis. *Journal of Cell Physiology*. 82(1), 121-124.

- Strark, A. A. (2009). Molecular Mechanism of Detection of Aflatoxin and Other Mycotoxins. In Mahendra, R. and Ajit, V. (Ed.). *Mycotoxin in Food, Feed and Bioweapon* (p.21-37). New York, E.U. Springer.
- Sylvia, D., Fuhrmann, J., Hartel, P. & Zuberer, D. (1997). Principles and applications of Soil Microbiology. Prentice Hall Publishers, Upper Saddle River, N. J.,
- Tamames, F. (2000). Química de las arcillas. *Industria Avícola*. 47(1), 20-22.
- Taylor D.R. (2001). New research on mineral adsorbents. *Feed Management*, July/August.
- Tran-Dinh N., Pitt, J.I. & Carter, D.A. (1999). Molecular genotype analysis of natural toxigenic and nontoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *Mycological Research*. 103(11), 1485–1490.
- Underhill, K.L., Rotter, B.A., Thompson, B.K., Prelusky, D.B. & Trenholm, H.L. (1995). Effectiveness of cholestyramine in the detoxification of zearalenone as determined in mice. *Bulletin of Environmental contamination and toxicology*. 54(1), 128-134.
- Urosov, A.E., Zherdev, A.V. & Dzantiev, B.B. (2010). Immunochemical Methods of Mycotoxin Analysis. Review. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 46(3), 253-266.
- Yiannikouris, A. Francois, J., Poughon, L., Dussap, C.G., Bertin, G., Jeminet, G. & Jouany, J.P., (2004). Adsorption of zearalenona by B-D-glucans in the *Saccharomyces cerevisiae* cell Wall. *Journal of Food Protection*. 67(6), 1195-1200.
- van Rensburg, C.J., van Rensburg, C.E.J. & van Ryssen, J.B.J. (2006). *In vitro* and *in vivo* assessmet of humic acid as an aflatoxin binder in broiler chickens. *Poultry Science*. 85(9), 1576-1583.
- Varga, J., Frisvad, JC. & Samnon, R.A. (2011). Two New aflatoxin producing species and an overview of *Aspergillus* section Flavi. *Studies in Mycology*. 69(1), 57-80.
- Valenta, H. (1998). Chromatographic methods for the determination of Ocratoxin A in animal and human tissues and fluids. *Journal of Chromatography A*. 815(1), 75-92

Veldman, A.J. & Meijs, A.C. (1992). Carry-over of aflatoxin from cows' food to milk. *Animal Production*. 55(2), 163-168.

Yiannikouris, A., Poughon, L., Cameleyre, X., Dussap, C. G., Francois, J., Bertin, G. & Jouany, J. P. (2003). A novel technique to evaluate interactions between *Saccharomyces cerevisiae* cell wall and mycotoxins: application to zearalenone. *Biotechnology Letters*. 25(10), 783-789.

Yu, J., Bhatnagar, D. & Cleveland, T.E (2004) Completed sequence of aflatoxin pathway gene cluster in *Aspergillus parasiticus*. *FEBS Letters*. 564(1-2), 126-130.

Zar, J. H. (1984). *Biostatistical Analysis*. 2nd Edition, Prentice-Hall, Inc. New Jersey, pp.718



ANEXOS

ANEXO	Contenido
A	Análisis gravimétrico para la determinación de silicio
B	Técnica para cromatografía líquida de alta resolución para aflatoxinas en alimento
C	Determinación cuantitativa de aflatoxinas en alimento con la técnica de inmunoensayo enzimático
D	Análisis químico por espectroscopía de absorción atómica
E	Base de datos para el registro de datos productivos de las unidades de producción lechera y uso de secuestrantes
F	Propuesta de artículo científico

ANEXO A. Análisis gravimétrico para la determinación de silicio**Preparación de la muestra**

1. Lavar un crisol de platino, llevarlo a peso constante, dejar que tome la temperatura ambiente en el desecador y posteriormente se pesa (M1).
2. Pesar 1 g de muestra en el crisol de platino (M2) y se adicionan 2 g de carbonato de sodio y 2 g de carbonato de potasio. Posteriormente se somete a 100 °C en mufla durante 4 horas.
3. Reconstituir la muestra calcinada en un vaso de precipitado con 100 mL de ácido clorhídrico al 30%, calentar hasta sequedad y reconstituir nuevamente con 100 mL de ácido clorhídrico al 30 %. Filtrar la solución, calcinar en papel filtro y pesar las cenizas (M3).

Determinación

4. De acuerdo a los puntos anteriores se realiza el cálculo de la concentración de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$SiO_2 (g) = \frac{M3 (g) - M1 (g)}{M2 (g)} * 100 - (\%) SiO_2 \text{ Blanco reactivo}$$

ANEXO B. Técnica para cromatografía líquida de alta resolución para aflatoxinas en alimento

Preparación de material

El material de vidrio que va a ser expuesto a una solución acuosa de aflatoxina, debe ser lavado en ácido para evitar pérdida de aflatoxina. Antes de usar el material de vidrio debe ser lavado con una solución de ácido sulfúrico 2 M durante varias horas y después realizar varios lavados con agua destilada para remover los residuos de ácido (AOAC, 2000).

Procedimiento de extracción

1. Utilizar tubos en fase sólida (SPE) para la extracción de AFs. Pasar 0.5mL de extracto a través del tubo SPE de 1.0 mL, acondicionado con 2.0 mL de ácido acético en agua al 0.5 %, dos veces. Posteriormente lavar la muestra con 0.5 mL de tetrahidrofurano (THF) al 20 % en ácido acético 0.5%, luego con 2.0 mL de hexano y 3.0 mL de THF al 25 % en hexano; al terminar el lavado el tubo SPE se dejar secar.
2. Utilizar una solución de elusión con 2.0 mL de cloruro de metileno: THF (99:1).

Derivatización

3. Evaporar el eluato a sequedad en baño maría a 80°C.
4. Resuspender con 200µL de hexano y 50µL de ácido trifluoroacético (TFA). Mezclar con el vortex durante 30 segundos y dejar reposar 5 minutos.
5. Agregar 1.95mL de agua:acetonitrilo 9:1, mezclar con el vortex durante 30 segundos y permitir la separación de las fases mediante reposo durante 10 min.

Determinación

Una vez derivatizadas las muestras se inyectaron al Cromatógrafo de líquidos de alta resolución con detector de fluorescencia, Bomba binaria Varian ProStar y detector de fluorescencia Varian, FP-2020, Varian Associates Inc., Victoria, Australia; Columna Supelcosil HPLC LC-18, Supelco Inc.. Condiciones del sistema cromatográfico: Columna (LC-18, USP LI) de 25 cm x 4.6 mm y empaque de 5.0 µm, con guarda columna (LC-18), 2.0 cm x 4.6 mm, mismo empaque, temperatura 25 °C. Fase móvil acetonitrilo: metanol: agua (22.5: 22.5: 55), flujo 1.0 mL/min, presión 2,755 psi, muestra 20 µL, detector de fluorescencia a 360 nm de excitación y 440 nm de emisión (De Luna y col. 2013).

Preparación de la gráfica de calibración

6. Evaporar a sequedad 10µL de la solución estándar de 1µg/µL en tubos de vidrio preparados como se indicó en el punto de preparación de material
7. Resuspender en diferentes volúmenes de benceno:acetonitrilo de acuerdo a la concentración deseada
8. Tomar 10µL de la dilución y realizar la derivatización de acuerdo a lo descrito anteriormente
9. Inyectar por triplicado en el sistema cromatográfico

Desinfección del material

10. El material expuesto a la aflatoxina debe ser lavado con hipoclorito de sodio al 1 %.
11. Dejar reposar en una solución de hipoclorito de sodio al 1 % durante 2 horas.
12. Adicionar 5 % de acetona al volumen total del punto anterior, dejar reaccionar 30 minutos y después lavar.

A continuación se presenta la respuesta de las soluciones estándar de AFB₁, preparadas para la elaboración de la curva estándar, en el sistema cromatográfico bajo las condiciones antes mencionadas (Tabla 19).

Tabla 19. Respuesta de las soluciones estándar de AFB₁ en el sistema cromatográfico para la elaboración de la curva de calibración (promedio de inyecciones por triplicado).

Concentración AFB₁ (µg/20µL)	Tiempo ±DE (min)	Altura (µV)	Área (µV/min)	Área CV (%)
0.0002	3.62±0.20	744	311	3.93
0.0005	3.62±0.05	1758	826	1.96
0.0010	3.66±0.01	2908	1235	3.59
0.0026	3.72±0.02	5529	2798	8.14
0.0034	3.69±0.04	8736	4743	2.45
0.0051	3.70±0.02	10152	5806	1.23

GRÁFICA DE CALIBRACIÓN

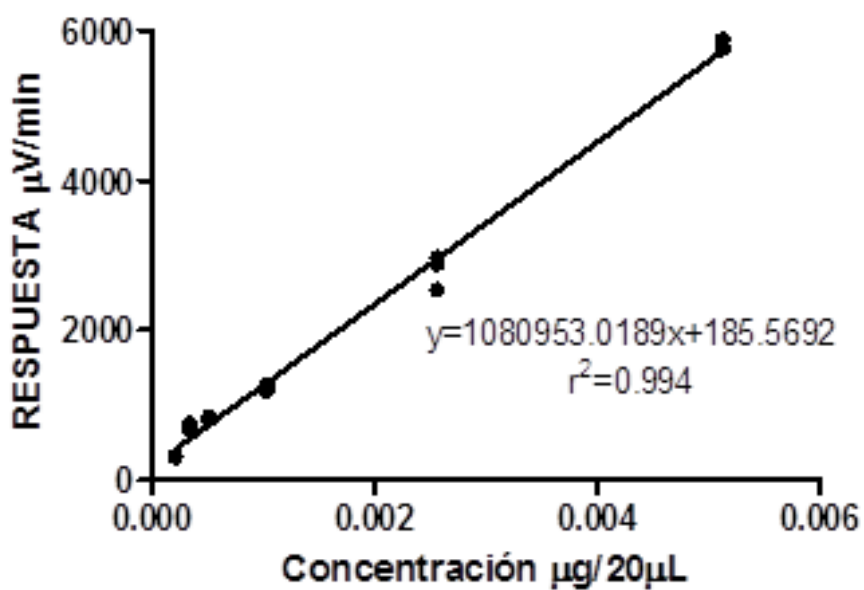


Figura 14. Gráfica de calibración de las soluciones estándar de AFB₁ con la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución.
Fuente: elaboración propia

Anexo C. Determinación cuantitativa de aflatoxinas en alimento con la técnica de inmunoensayo enzimático

Implementación del ensayo

1. Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente (20 a 25) °C antes de su uso.
2. Solución de lavado PBS-Tween. Disolver el contenido completo del sobre en un litro de agua destilada. La solución se mantiene estable entre 4 y 6 semanas a una temperatura de (2 a 8) °C.
3. Regresar todos los reactivos a temperatura de (2 a 8) °C inmediatamente después de ser utilizados.
4. Los estándares de aflatoxina se encuentran listos para su uso.

Procedimiento del ensayo

1. Un lavado exhaustivo es muy importante. No permitir que los pocillos se sequen completamente. Evitar intervalos prolongados entre los pasos de trabajo.
2. Cubrir los pocillos durante los períodos de incubación evitando así la exposición directa a la luz del sol.
3. Colocar suficientes pocillos en el soporte de la microplaca para los estándares y para las muestras a analizar. Marcar la posición de los estándares y las muestras.
4. Agregar 50 µL de los estándares y de las muestras a analizar los pocillos correspondientes. Utilizar una punta de pipeta nueva para cada estándar y para cada muestra.
5. Agregar 50 µL del conjugado aflatoxina-enzima a los pocillos correspondientes.
6. Agregar 50 µL del anticuerpo anti-aflatoxina a los pocillos correspondientes, mezclar el contenido de la microplaca suavemente e incubar durante 10 min±1 a temperatura ambiente (20-25) °C.
7. Vaciar los pocillos y golpear luego enérgicamente (tres veces consecutivas) el marco portapocillos sobre un papel absorbente limpio para asegurar la eliminación completa de restos líquidos. Lavar los pocillos (250 µL por pocillo) con la solución de lavado con pipeta

multicanal y vaciar nuevamente los pocillos como se mencionó anteriormente. Repetir este paso 2 veces más.

8. Agregar 100 μL de substrato/cromógeno a cada pocillo. Mezclar el contenido de la micropipeta suavemente e incubar 5 min en la oscuridad a temperatura ambiente (20-25) $^{\circ}\text{C}$.
9. Agregar 100 μL de la solución de stop a cada pocillo. Mezclar el contenido de la microplaca suavemente y medir la absorción a 450 nm en el transcurso de los siguientes 10 min.

Principio del ensayo

La base del ensayo es la reacción antígeno-anticuerpo. Los pocillos de la microplaca están sensibilizados con anticuerpos de captura dirigidos contra anticuerpos anti-aflatoxina. Se agregan los estándares de aflatoxina o la solución de las muestras, el conjugado aflatoxina-enzima y los anticuerpos anti-aflatoxina a los pocillos. El aflatoxina libre y el conjugado alfatoxina-enzima compiten por los sitios de unión de los anticuerpos anti-aflatoxina.

Al mismo tiempo, los anticuerpos anti-aflatoxina se unen a los anticuerpos de captura inmovilizados. Cualquier conjugado enzimático no unido se remueve en el paso de lavado.

Se agrega substrato/cromógeno a los pocillos. El conjugado enzimático unido convierte al cromógeno en un producto azul. La adición de la solución stop lleva a un cambio de color del azul al amarillo. La medición se hace fotométricamente a 450 nm. La absorbancia es inversamente proporcional a la concentración de aflatoxinas en la muestra (Figura 15).

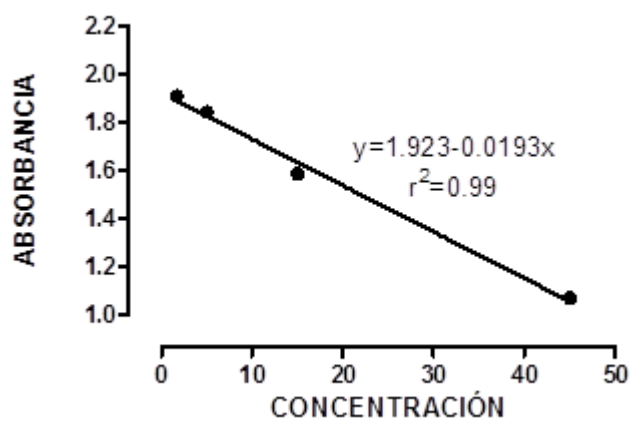
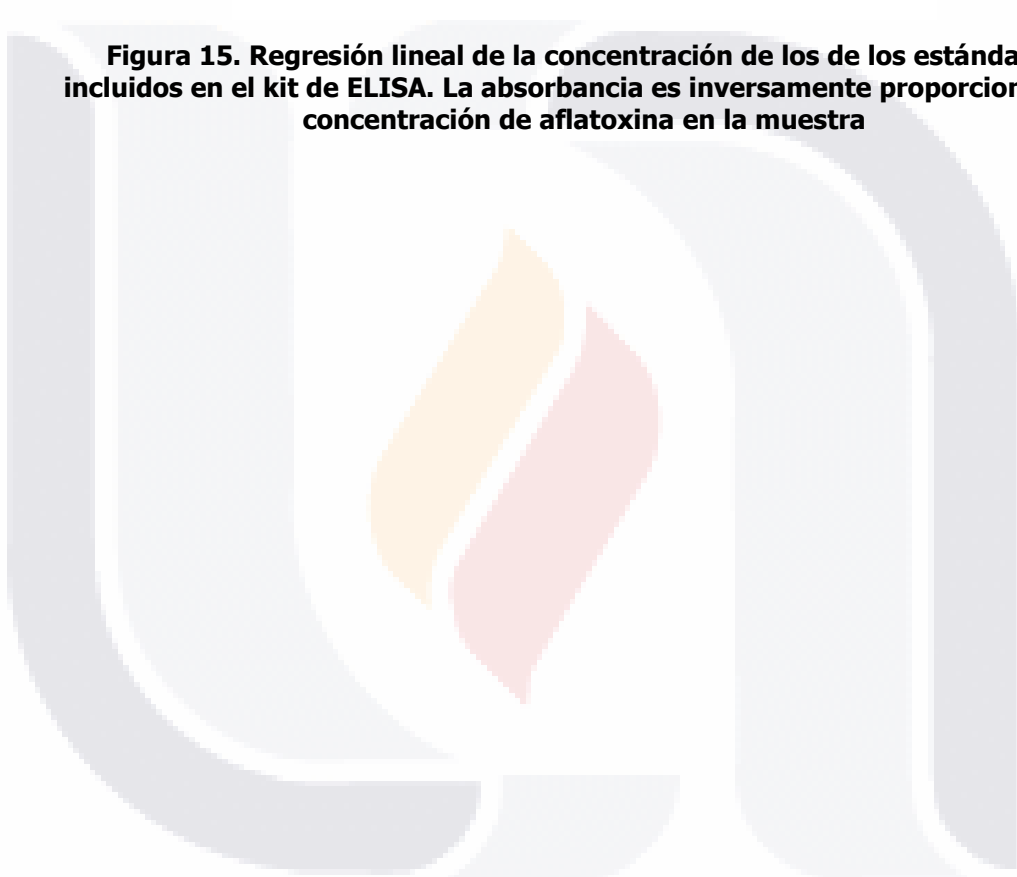


Figura 15. Regresión lineal de la concentración de los de los estándares incluidos en el kit de ELISA. La absorbancia es inversamente proporcional a la concentración de aflatoxina en la muestra



ANEXO D. Análisis químico por espectroscopía de absorción atómica

Digestión

1. Pesar por triplicado 200 mg de muestra
2. Adicionar 10 mL de ácido nítrico grado reactivo
3. Colocar en el Horno de digestión MARS-5 Marca CEMA. Realizar la digestión bajo las siguientes condiciones (Tabla 20).

Aforo

4. Diluir y Filtrar las muestras con agua bidestilada hasta llegar a un volumen de 50 mL.

Tabla 20. Condiciones del horno para la digestión ácida de las muestras de secuestrantes

Etapa	Potencia (w)	Potencia (%)	Rampa	Presión (PSI)	Temp (°C)	Mantenimiento
			Tiempo (min)			Tiempo (min)
1	600	100	8:00	100	75	4:00
2	600	100	8:00	200	120	4:00
3	600	100	8:00	320	200	4:00

Determinación

Las muestras de calcio y aluminio se analizaron por absorción atómica con horno de grafito, utilizando la lámpara correspondiente y flama aire acetileno para calcio, mientras que para aluminio se utilizó flama acetileno-óxido nitroso.

Las muestras de sodio y potasio se analizaron por emisión atómica, utilizando una flama aire-acetileno.

Las determinaciones de sodio, potasio y calcio se realizaron con un espectrofotómetro de absorción atómica GBC®, modelo Avanta Σ , Australia. La determinación de aluminio se realizó con un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer, modelo PinAAcle 900 T, USA.

Cálculo de la concentración

Para los cálculos de la concentración de los elementos medidos, se calculó la curva de regresión lineal utilizando los valores de absorbancia de estándares a concentración conocida, considerando el peso de las muestras, las diluciones realizadas y los volúmenes de aforo (Perkin-Elmer, 1994).

Anexo D. Base de datos para el registro de datos productivos de las unidades de producción lechera y uso de secuestrantes

NOMBRE DE LA UNIDAD DE PRODUCCIÓN LECHERA					
Ingrediente	Cantidad (kg/vaca/día)				Cambio en la dieta (s)
	Altas	Frescas	Bajas	Secas	
Silo de Maíz					
Silo de Trébol					
Silo de Alfalfa					
Alfalfa Hemicidada					
Silo rye grass					
Maíz Rolado					
Canola					
Soya					
Minerales					
Semilla de Algodón					
Grano de Maíz Seco Dest.					
Concentrado					
Booster					
Avena seca					
Secuestrante () (kg/vaca)					
Secuestrante (kg/ton)					
Secuestrante (kg/vaca)					
Secuestrante (kg/ton)					
Ración Total					

II. PRODUCCIÓN				
INDICACIÓN: PROMEDIO DE PRODUCCIÓN POR VACA DE ACUERDO A SU ESTADO PRODUCTIVO				
UPL	Altas	Frescas	Bajas	Sub-Total
N° de Vacas				
Producción diaria (L)				
Promedio (L/vaca día)				
PRODUCCIÓN PROMEDIO DEL HATO:				
UPL	Altas	Frescas	Bajas	Sub-Total
N° de Vacas				
Producción diaria (L)				
Promedio (L/vaca día)				
PRODUCCIÓN PROMEDIO DEL HATO:				

Total

Anexo E. Propuesta de artículo científico

1 Evaluación *in vitro* de secuestrantes de aflatoxinas usados en explotaciones
2 lecheras del Altiplano Central Mexicano
3 In vitro evaluation *in vitro* evaluation of aflatoxin sequestering agents used in
4 dairy farms of the Central Mexican Plateau
5

6 Resumen

7 Las aflatoxinas son sustancias tóxicas que están presentes en granos y
8 cosechas contaminados por hongos del género *Aspergillus*. Afectan la
9 salud pública y la economía pecuaria por disminución de la calidad de los
10 productos. Una alternativa para reducir la exposición a aflatoxinas es el
11 uso de compuestos secuestrantes, que al ser adicionados en el alimento,
12 suprimen o reducen su absorción. La evaluación *in vitro* de secuestrantes
13 de micotoxinas es una herramienta útil para evaluar posibles agentes
14 secuestrantes. Se evaluó la capacidad de adsorción *in vitro* de diez
15 productos secuestrantes de aflatoxinas empleados en la alimentación de
16 vacas lecheras en establos de Aguascalientes, México. Se empleó un
17 estándar de AFB₁ con el método de inmunoensayo enzimático (ELISA) y
18 cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se observó que todos los
19 secuestrantes evaluados tienen la capacidad de adsorber AFB₁ en
20 solución. Se determinó que las técnicas de ELISA y HPLC son
21 comparables cualitativamente, ya que con ambas técnicas se obtuvieron
22 porcentajes de adsorción superiores al 50%. La evaluación *in vitro* de los
23 secuestrantes es un apoyo para conocer el potencial que tiene una
24 producto como adsorbente de micotoxinas y debe ser complementada
25 con otros análisis de caracterización.

26 Palabras clave: micotoxinas, inmunoensayo enzimático, ELISA,
27 secuestrantes de aflatoxinas, alimento, adsorción.

1 **Abstract**

2 Aflatoxins are considered as toxic substances when are present in animals and
3 human feed. Dairy products can serve as an indirect source of aflatoxin when
4 cows consumed contaminated food. Some sequestering agents are added in
5 the crow food in order avoid aflatoxin adsorption by organism of those.
6 However, even sequestering agents are added in the diet of cattle, some
7 studies had demonstrated aflatoxin residues in the milk, this cause economic
8 loses and risk of public health. In this study were carried out an *in vitro*
9 evaluation of ten sequestering agents used in cowshed of Altiplano Central
10 Mexicano. An AFB₁ standard where used. The *in vitro* model where evaluated
11 by ELISA technique and high performance liquid chromatography (HPLC).
12 It was observed that all tested sequestering agents have the ability to adsorb
13 AFB₁ solution. It was determined that the HPLC and ELISA techniques are
14 qualitatively comparable, since both adsorption percentages higher than 50%
15 were obtained. The *in vitro* evaluation of sequestering agents is a support to
16 know the potential of a product as micotoxin adsorbent and should be
17 supplemented with other characterization techniques.

18

19 **Keywords:** Aflatoxin, sequestering agent, sorbent agents, ELISA, HPLC.