



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

**CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**TESIS**

**FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS CON LA OCURRENCIA DE LA AFM<sub>1</sub> EN LA  
LECHE CRUDA DE VACA EN ESTABLOS DE LA REGIÓN EL LLANO, MÉXICO.**

**PRESENTA**

**Claudia Abril Miranda Castañeda**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS VETERINARIAS**

**COMITÉ TUTORAL**

**Dr. Raúl Ortiz Martínez (Tutor)  
Dr. Teódulo Quezada Tristán  
Dr. Arturo Gerardo Valdivia Flores**

**Aguascalientes, Ags., julio del 2015**



M. en C. GABRIEL ERNESTO PALLÁS GUZMAN  
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS  
AGROPECUARIAS  
P R E S E N T E

Por medio del presente como miembro del Comité Tutorial de la estudiante Claudia Abril Miranda Castañeda, con ID 41679, quien realizó la tesis titulada:

FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS CON LA OCURRENCIA DE LA AFM<sub>1</sub> EN LA LECHE CRUDA DE VACA EN ESTABLOS DE LA REGIÓN EL LLANO, MÉXICO.

y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el VOTO APROBATORIO, para que ella pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

*“Se Lumen Proferre”*

Aguascalientes, Ags., a 25 de junio de 2015.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Teódulo Quezada Tristán'.

Dr. Teódulo Quezada Tristán  
Integrante del Comité Tutorial

- c.c.p.- Interesado
- c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
- c.c.p.- Jefatura del Depto. de Clínica Veterinaria
- c.c.p.- Consejero Académico
- c.c.p.- Minuta Secretario Técnico



M. en C. GABRIEL ERNESTO PALLÁS GUZMAN  
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS  
AGROPECUARIAS  
P R E S E N T E

Por medio del presente como integrante del Comité Tutoral de la estudiante Claudia Abril Miranda Castañeda, con ID 41679, quien realizó la tesis titulada:

FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS CON LA OCURRENCIA DE LA AFM<sub>1</sub> EN LA LECHE CRUDA DE VACA EN ESTABLOS DE LA REGIÓN EL LLANO, MÉXICO.

y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el VOTO APROBATORIO, para que ella pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

*“Se Lumen Proferre”*

Aguascalientes, Ags., a 25 de junio de 2015.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'A. G. Valdivia Flores'.

Dr. Arturo G. Valdivia Flores  
Integrante del Comité Tutoral

- c.c.p.- Interesado
- c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
- c.c.p.- Jefatura del Depto. de Clínica Veterinaria
- c.c.p.- Consejero Académico
- c.c.p.- Minuta Secretario Técnico



M. en C. GABRIEL ERNESTO PALLÁS GUZMAN  
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS  
AGROPECUARIAS  
P R E S E N T E

Por medio del presente como Tutor de la estudiante Claudia Abril Miranda Castañeda, con ID 41679, quien realizó la tesis titulada:

FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS CON LA OCURRENCIA DE LA AFM<sub>1</sub> EN LA LECHE CRUDA DE VACA EN ESTABLOS DE LA REGIÓN EL LLANO, MÉXICO.

y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el VOTO APROBATORIO, para que ella pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

*“Se Lumen Proferre”*

Aguascalientes, Ags., a 25 de junio de 2015.

  
Dr. Raúl Ortiz Martínez  
Tutor

- c.c.p.- Interesado
- c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
- c.c.p.- Jefatura del Depto. de Clínica Veterinaria
- c.c.p.- Consejero Académico
- c.c.p.- Minuta Secretario Técnico



OFICIO NO. CCA-D-111500-189-15

**DRA. GUADALUPE RUÍZ CUÉLLAR**  
**DIRECTOR GENERAL DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**  
**P R E S E N T E .**

Por medio del presente me permito comunicarle a usted que la tesis titulada "FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS CON LA OCURRENCIA DE LA AFM, EN LA LECHE CRUDA DE VACA EN ESTABLOS DE LA REGION EL LLANO, MÉXICO", de la alumna CLAUDIA ABRIL MIRANDA CASTAÑEDA, 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 aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Jesús María, Aguascalientes., 30 de Junio del 2015.  
"Se Lumen Proferre"



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

c.c.p. Jefa del 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

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco de infinitamente el esfuerzo y dedicación que mostraron en mi formación de maestría en ciencias veterinarias los integrantes de mi Comité Tutorial, Dr. Arturo Gerardo Valdivia Flores, Dr. Teódulo Quezada Tristán y muy en especial al Dr. Raúl Ortiz Martínez quien como mi tutor siempre me apoyo de sobremanera y creyó en mí desde el principio.

Por su apoyo desinteresado y cordial a la Dra. María Carolina de Luna López quien de manera paciente y optimista me capacitó para desarrollar el trabajo de laboratorio, ya que sin su asistencia no hubiera podido desarrollar esta parte tan importante del estudio.

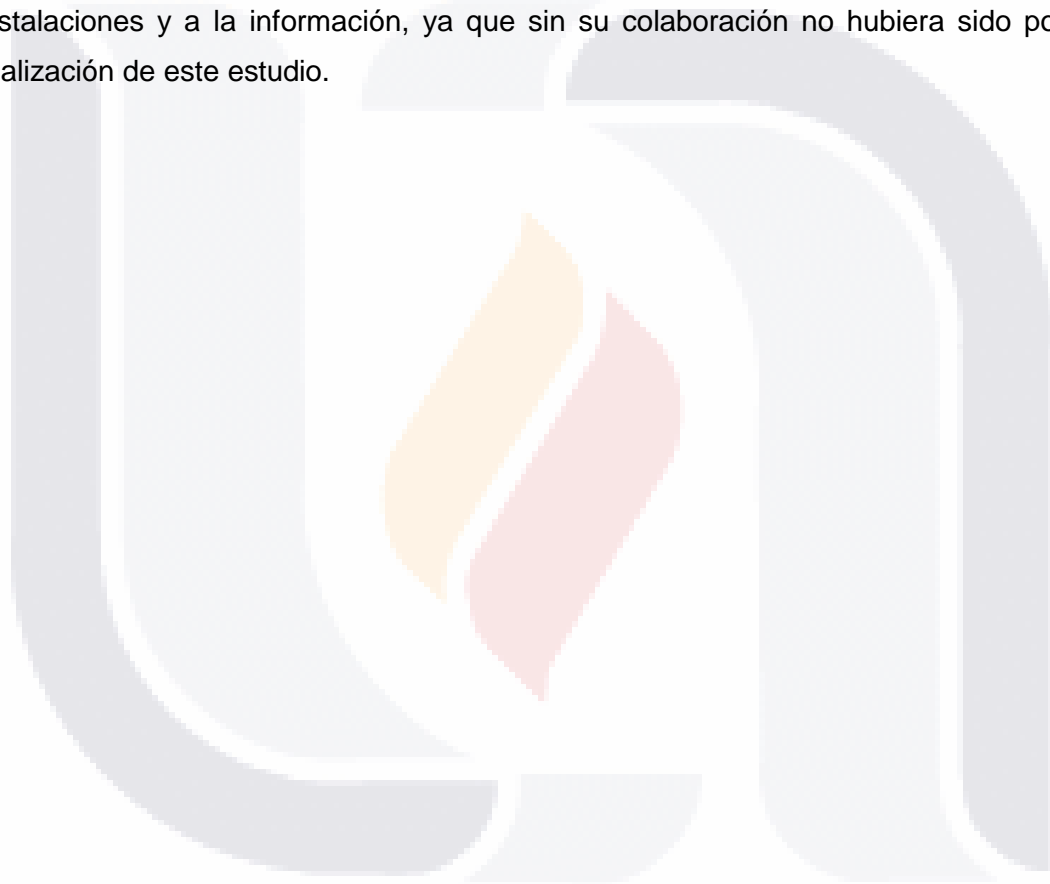
Hago un merecido reconocimiento a los profesores del Posgrado, porque con su asesoría, participación directa, colaboración técnica y con la disponibilidad que mostraron en la disipación de mis dudas logré llegar a esta fase final del proyecto de investigación.

También hago un reconocimiento especial a mis compañeras estudiantes de posgrado, quienes me brindaron su valiosa amistad y me apoyaron desinteresadamente: Erika Janet Rangel Muñoz y Monserrat de la Cerda Villar.

## RECONOCIMIENTOS

Por su apoyo financiero al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CVU: 514733) y a la Universidad Autónoma de Aguascalientes (Proyecto PIPSA 12-02).

A los propietarios, administradores, personal médico y operativo de las Unidades Productoras de Leche, por la disponibilidad que mostraron en permitirnos el acceso a las instalaciones y a la información, ya que sin su colaboración no hubiera sido posible la realización de este estudio.



## DEDICATORIA

A Dios por ser el guía de mi vida, el que siempre me alienta y el que nunca me desampara.

A mi esposo Eleazar y a mi hijo Alejandro, quienes son el motor de mi vida, por regalarme esas horas que les correspondían sin recibir ningún reproche, solo su amor y comprensión.

A mis padres Álvaro y Celia, porque desde siempre han sido mi apoyo en todos los sentidos, porque con sus consejos, su ejemplo y palabras de aliento nunca bajaron los brazos para que yo tampoco lo hiciera, aun cuando todo se complicaba.

A mis hermanos Selene, Alejandro y Wenceslao por estar siempre a mi lado apoyándome en cada proyecto que emprendo.



## ÍNDICE GENERAL

No.	Contenido	Página
	ÍNDICE GENERAL	1
	ÍNDICE DE CUADROS	4
	ÍNDICE DE FIGURAS	5
	ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS	6
	RESUMEN	7
	ABSTRACT	8
	INTRODUCCIÓN	9
1.	ANTECEDENTES	11
1.1.	CONTAMINACIÓN DE ALIMENTO PARA GANADO	11
1.2.	MICOTOXINAS	12
1.2.1.	Importancia de la presencia de micotoxinas en la alimentación Animales productores de leche	13
1.2.2.	Importancia sanitaria y económica de las micotoxinas	15
1.2.3.	Efecto de las micotoxinas en el ganado lechero	15
1.3.	SISTEMAS DE PREVENCIÓN Y CONTROL DE MICOTOXINAS	17
1.3.1.	Descontaminación de micotoxinas en alimentos	18
1.3.2.	Inhibición de la adsorción de micotoxinas en el tracto gastrointestinal	20
1.4.	AFLATOXINAS	26
1.4.1.	Tipos de aflatoxinas	27
1.4.2.	Características fisicoquímicas de las aflatoxinas	27
1.5.	AFLATOXINA B <sub>1</sub>	28
1.5.1.	Importancia de AFB <sub>1</sub>	29
1.5.2.	Trastornos de salud producidos por AFB <sub>1</sub>	29
1.5.3.	Impacto de AFB <sub>1</sub> en la ganadería lechera	30
1.5.4.	Absorción y distribución de AFB <sub>1</sub>	30
1.5.5.	Metabolismo de AFB <sub>1</sub>	31
1.6.	BIOMARCADORES DE AFB <sub>1</sub>	35
1.6.1.	Biomarcadores de exposición	35
1.6.2.	Biomarcadores de dosis interna y dosis biológicamente efectiva	35
1.7.	AFLATOXINA M <sub>1</sub>	36
1.7.1.	Importancia de AFM <sub>1</sub>	37
1.7.2.	Características de la AFM <sub>1</sub>	37
1.7.3.	Métodos para disminuir la concentración de AFM <sub>1</sub> en la leche	38
1.7.4.	Metabolismo de AFM <sub>1</sub>	38
1.8.	LIMITES MÁXIMOS PERMITIDOS DE AFB <sub>1</sub> POR LA COMUNIDAD EUROPEA	39

No.	Contenido	Página
1.8.1.	LIMITES MÁXIMOS PERMITIDOS DE AFM <sub>1</sub> POR LA COMUNIDAD EUROPEA	39
1.9.	LIMITES MÁXIMOS PERMITIDOS DE AFLATOXINAS POR LA FDA	39
1.9.1.	LIMITES MÁXIMOS PERMITIDOS DE AFM <sub>1</sub> POR LA FDA	40
1.10.	LIMITES MÁXIMOS PERMITIDOS DE AFM <sub>1</sub> POR MÉXICO	40
1.11.	MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAR AFM <sub>1</sub> EN LECHE	40
1.11.1.	Método analítico HPLC-FD	41
1.11.2.	Método analítico ELISA	41
1.12.	PRODUCCIÓN DE LECHE A NIVEL MUNDIAL	42
1.12.1.	Producción de leche en México	42
1.12.2.	Producción de leche en el Estado de Aguascalientes	43
1.13.	CONSUMO DE LECHE A NIVEL MUNDIAL	43
1.13.1.	Consumo de leche en México	44
2.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	45
2.1.	HIPÓTESIS	45
2.2.	OBJETIVOS	45
2.2.1.	Objetivo general	45
2.2.2.	Objetivos específicos	45
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	46
3.1.	TIPO DE ESTUDIO	46
3.2.	LUGAR DE ESTUDIO	46
3.2.1.	Selección de las unidades de producción de leche	47
3.3.	RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE LECHE	47
3.4.	RECOLECCIÓN DE DATOS	48
3.4.1.	Categorización de las condiciones de almacenamiento del alimento	48
3.4.2.	Uso de agentes secuestrantes	49
3.5.	CUANTIFICACIÓN DE AFM <sub>1</sub> EN MUESTRAS DE LECHE	49
3.6.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	49
3.6.1.	Análisis estadístico para determinar el grado de asociación entre las variables	49
3.6.2.	Análisis estadístico para determinar el grado o probabilidad de ocurrencia de AFM <sub>1</sub> en la leche	51
3.6.3.	Análisis estadístico para comparar el nivel de AFM <sub>1</sub> entre las UPL y estaciones del año	51
3.6.4.	Análisis estadístico para comparar el nivel de AFM <sub>1</sub> entre los lotes productivos y entre los diferentes agentes secuestrantes	52
4.	RESULTADOS	53

No.	Contenido	Página
4.1.	PRESENCIA DE AFM <sub>1</sub> EN LAS MUESTRAS DE LECHE	53
4.2.	PRESENCIA DE AF EN EL CONCENTRADO, EL ENSILAJE DE MAÍZ Y LA RACIÓN INTEGRAL	53
4.3.	GRADO DE ASOCIACIÓN ENTRE LAS VARIABLES CONSIDERADAS COMO FACTORES DE RIESGO Y LOS NIVELES DE AFM <sub>1</sub>	53
4.4.	COMPARACIÓN DEL NIVEL DE AFM <sub>1</sub> ENTRE LAS UPL	55
4.5.	COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE AFM <sub>1</sub> Y AF CON RELACIÓN A LAS ESTACIONES DEL AÑO	55
4.6.	COMPARACIÓN DEL NIVEL DE AFM <sub>1</sub> ENTRE LOS LOTES PRODUCTIVOS	56
4.7.	COMPARACIÓN DEL NIVEL DE AF Y AFM <sub>1</sub> CON RELACIÓN AL USO DE DIFERENTES AGENTES SECUESTRANTES	56
5.	DISCUSIÓN	58
5.1.	PRESENCIA DE AFM <sub>1</sub> EN LA LECHE CRUDA DE VACA	58
5.2.	FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS AL NIVEL DE AFM <sub>1</sub>	58
5.2.1.	Uso de agentes secuestrantes	58
5.2.2.	Calidad del almacenamiento del alimento	60
5.3.	CONCENTRACIÓN DE AFM <sub>1</sub> EN LA LECHE ASOCIADA AL NIVEL PRODUCTIVO DEL GANADO	61
5.4.	CONCENTRACIÓN DE AFM <sub>1</sub> EN LA LECHE ASOCIADA A LAS ESTACIONES DEL AÑO.	61
6.	CONCLUSIONES	63
7.	GLOSARIO	64
8.	BIBLIOGRAFÍA	66
9.	ANEXOS	85
	Anexo A: Formato para la categorización de las condiciones de almacenamiento	85
	Anexo B: Uso de agentes secuestrantes	86
	Anexo C: Fichas técnicas de los productos comerciales de agentes secuestrantes	88
	Anexo D: Procedimiento para la realización del método de ELISA de acuerdo a las especificaciones del fabricante	93
	Anexo E: Manuscrito de propuesta de artículo	95

## INDICE DE CUADROS

No.	Contenido	Página
1	Contaminantes naturales del alimento para ganado	11
2	Contaminantes antropogénicos del alimento para ganado	12
3	Micotoxinas de importancia mundial	13
4	Micotoxinas en ensilajes (2000-2011)	14
5	Efectos de las micotoxinas en vacas lecheras	17
6	Métodos físicos para la descontaminación de micotoxinas	18
7	Métodos químicos para la descontaminación de micotoxinas	19
8	Métodos biológicos para la descontaminación de micotoxinas	20
9	Clasificación de adsorbentes naturales	21
10	Productos comerciales a base de aluminosilicatos	22
11	Productos comerciales a base de carbón activado	25
12	Productos comerciales a base de pared celular de levadura	25
13	Incidencia de AFB <sub>1</sub> en alimentos para humanos y animales	28
14	Dosis letal media oral (LD <sub>50</sub> ) para AFB <sub>1</sub>	29
15	Límites máximos permitidos de AFB <sub>1</sub> por la Comunidad Europea	39
16	Límites máximos permitidos de aflatoxinas por la FDA	40
17	Grado de asociación entre las variables consideradas como factores de riesgo y los niveles de AFM <sub>1</sub>	54
18	Diferencia de la concentración media de AFM <sub>1</sub> entre las tres UPL	55
19	Diferencia de la concentración media de AF y AFM <sub>1</sub> entre las estaciones del año	56
20	Diferencia observada en la concentración media de AF y AFM <sub>1</sub> al utilizar diferentes agentes secuestrantes	57

**INDICE DE FIGURAS**

<b>No.</b>	<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
1	Microscopía electrónica de barrido de <i>Aspergillus flavus</i> y <i>Aspergillus parasiticus</i>	26
2	Estructura química de las cuatro aflatoxinas producidas de forma natural	27
3	Esquema del metabolismo completo de AFB <sub>1</sub> en humanos	32
4	Biomarcadores de dosis interna y de dosis biológicamente efectiva	36
5	Incremento pronosticado para el 2019 en la producción de leche a nivel mundial	42
6	Producción media diaria de leche por principales municipios de Aguascalientes	43
7	Localización de la región de El Llano	46
8	Curva patrón para la concentración de aflatoxina M <sub>1</sub> en leche de bovino	94



## ACRÓNIMOS

<b>AELC</b> Asociación Europea de Libre Comercio	<b>LD<sub>50</sub></b> Dosis Letal Media
<b>AFB<sub>1</sub></b> Aflatoxina B <sub>1</sub>	<b>Mg</b> miligramo
<b>AFBO</b> 8,9-epóxido-AFB <sub>1</sub>	<b>µg</b> microgramo
<b>AFG<sub>1</sub></b> Aflatoxina G <sub>1</sub>	<b>OTA</b> Ocratoxina
<b>AFM<sub>1</sub></b> Aflatoxina M <sub>1</sub>	<b>PH</b> Potencial de hidrógeno
<b>AFP<sub>1</sub></b> Aflatoxina P <sub>1</sub>	<b>ppb</b> Partes por billón
<b>AFQ<sub>1</sub></b> Aflatoxina Q <sub>1</sub>	<b>TLC</b> Cromatografía de Capa Fina
<b>AFs</b> Aflatoxinas	<b>UE</b> Unión Europea
<b>aw</b> Actividad de agua	<b>UPL</b> Unidad productora de leche
<b>CYP450</b> Citocromo P450	<b>ZEA</b> Zearalenona
<b>DON</b> Deoxinivalenol	
<b>ELISA</b> Ensayo inmunoenzimático	
<b>FAO</b> Food and Agriculture Organization	
<b>FDA</b> Food and Drug Administration	
<b>GSH</b> Glutation reducido	
<b>GST</b> Glutation S-transferasa	
<b>HPLC</b> Cromatografía Líquida de Alta Resolución	
<b>IARC</b> Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer	
<b>Kg</b> Kilogramo	
<b>L</b> Litro	

## RESUMEN

### **Factores de riesgo asociados con la ocurrencia de la AFM<sub>1</sub> en la leche cruda de vaca en establos de la región El Llano, México**

La contaminación de alimentos para consumo humano y animal ocurre frecuentemente, se pueden contaminar con sustancias naturales y/o antropogénicas. Un tipo de contaminación natural es la que ocurre con micotoxinas, siendo las aflatoxinas (AF) unas de las más frecuentes. Entre la variedad de aflatoxinas, la B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) se ha identificado como un potente carcinógeno. Si el ganado consume alimento con AFB<sub>1</sub>, se produce un metabolito que excreta en la leche, la aflatoxina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>), que tiene también potencial carcinogénico; pero también es un biomarcador de AFB<sub>1</sub>. A nivel internacional se han establecido Límites Máximos Permisibles (LMP) de AFM<sub>1</sub> para evitar el consumo humano de leche contaminada con esta toxina. El objetivo del estudio fue evaluar factores de riesgo asociados tales como el uso de secuestrantes y la calidad de almacenamiento del alimento, con nivel de AFM<sub>1</sub> en la leche. De tres establos de en la región El Llano, México, se recolectaron 216 muestras de leche; para el estudio los establos se denominaron convencionalmente como Unidades de Producción Lechera (UPL). Se recabó información sobre el uso de secuestrantes, las condiciones de almacenamiento de alimentos, la cantidad de leche de acuerdo a los lotes productivos y el nivel de aflatoxinas totales (AF) en los alimentos. El nivel de AFM<sub>1</sub> fue analizado por el método de ELISA competitiva. El 54.16% de las muestras tuvieron niveles detectables de AFM<sub>1</sub>. Ninguna muestra superó el LMP (0.5 µg/L) establecido por la Norma Oficial Mexicana (NOM); sin embargo 27.31% sí superó el LMP (0.05 µg/L) establecido por la Unión Europea (UE). Se encontró una asociación estadísticamente significativa entre los niveles de AFM<sub>1</sub>, con la calidad de almacenamiento del alimento y con el adición de la dosis del secuestrante indicada por el fabricante; se observó también una influencia estacional en la ocurrencia de AF ( $P < 0.05$ ). Los resultados muestran que la dosis adecuada del secuestrante y de la buena calidad del almacenamiento del alimento, debe ser considerado como factores determinantes para disminuir la ocurrencia de AFM<sub>1</sub> en la leche.

**Palabras clave:** aflatoxina M<sub>1</sub>, biomarcador, agente secuestrante, aflatoxina B<sub>1</sub>

## ABSTRACT

### **Risk factors associated to the occurrence of the AFM<sub>1</sub> in raw cow's milk in dairy farms in the region of El Llano, Mexico**

The contamination of food and feed for human and animal with natural or anthropogenic substances occurs frequently. A type of natural contamination occurs with mycotoxins and one of the more frequent is aflatoxins. Aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) is recognized as a potent carcinogen among aflatoxins. After AFB<sub>1</sub> was consumed, it is eliminated as aflatoxin M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) in milk and urine. AFM<sub>1</sub> is a potential carcinogen but it is a biomarker of AFB<sub>1</sub> also. Allowed limits to AFM<sub>1</sub> have been determinate internationally, in order to avoid human consumption of milk contaminated with this toxin. The objective of our study was to evaluate risk factors associated (feed quality storage, aflatoxin binders usage, and feed consumption) with AFM<sub>1</sub> levels in milk. 216 milk samples were collected in tree dairies in El Llano region, along a year. Additional information about aflatoxin binders usage, feed storage conditions, feed consumption, milk production, and level of aflatoxins, were obtained in each dairy. The milk samples were analyzed via a competitive ELISA kit. The main results are following: the 54.16% of milk samples had detectable levels of AFM<sub>1</sub> but none was higher than Norma Oficial Mexicana Level (0.5µg/L). There were a statistical significant association between AFM<sub>1</sub> levels and the feed storage quality and the usage of indicated aflatoxin binder doses; there was a seasonal influence ( $P<0.05$ ). These results show that correct usage of aflatoxin binders and the feed storage quality must be considered as determinant factor to low AFM<sub>1</sub> levels in milk.

Key words; aflatoxin M<sub>1</sub>, biomarker, aflatoxin binder, aflatoxin B<sub>1</sub>.



## INTRODUCCIÓN

Las aflatoxinas son producto del metabolismo secundario de hongos del género *Aspergillus* spp. (Deshpande, 2002) que afectan la inocuidad de una gran variedad de productos agrícolas utilizados para consumo humano y animal (*Codex Alimentarius*, 2012).

La aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) es la de mayor importancia, ya que está considerada como el carcinógeno natural más potente que existe (Roze y col., 2013) y junto con su derivado metabólico, la AFM<sub>1</sub>, han sido clasificadas por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) dentro del grupo 1, considerando sus características cancerígenas para humanos (IARC, 2002).

Una de las rutas metabólicas de eliminación de la AFB<sub>1</sub> produce AFM<sub>1</sub>, es excretada en la leche de mamíferos que consumieron AFB<sub>1</sub> en el alimento, lo cual conduce a una contaminación de la leche y que se mantiene en los productos lácteos para consumo humano (Rahimi y col., 2010)

En México, se ha reportado una elevada incidencia de AFM<sub>1</sub> en leche cruda. Pérez y col., (2008), detectaron a la AFM<sub>1</sub> en el 50% de las muestras analizadas, en un rango de 0.05 a >50 µg/L. Reyes y col., (2009), encontraron una incidencia del 80%, fluctuando la concentración de AFM<sub>1</sub> de 0.006 a 0.065 µg/L y un estudio más reciente reveló una contaminación del 100% de las muestras, con niveles en el rango de <0.005 a 0.100 µg/L (Landeros y col., 2012).

Se ha observado que las condiciones climáticas influyen en la concentración de AFM<sub>1</sub> en la leche (Polychronaki y col., 2007), así como la etapa de producción de leche, detectándose mayor eliminación de AFM<sub>1</sub> en etapas de alta producción comparativamente con las de baja (Britzi y col., 2013).

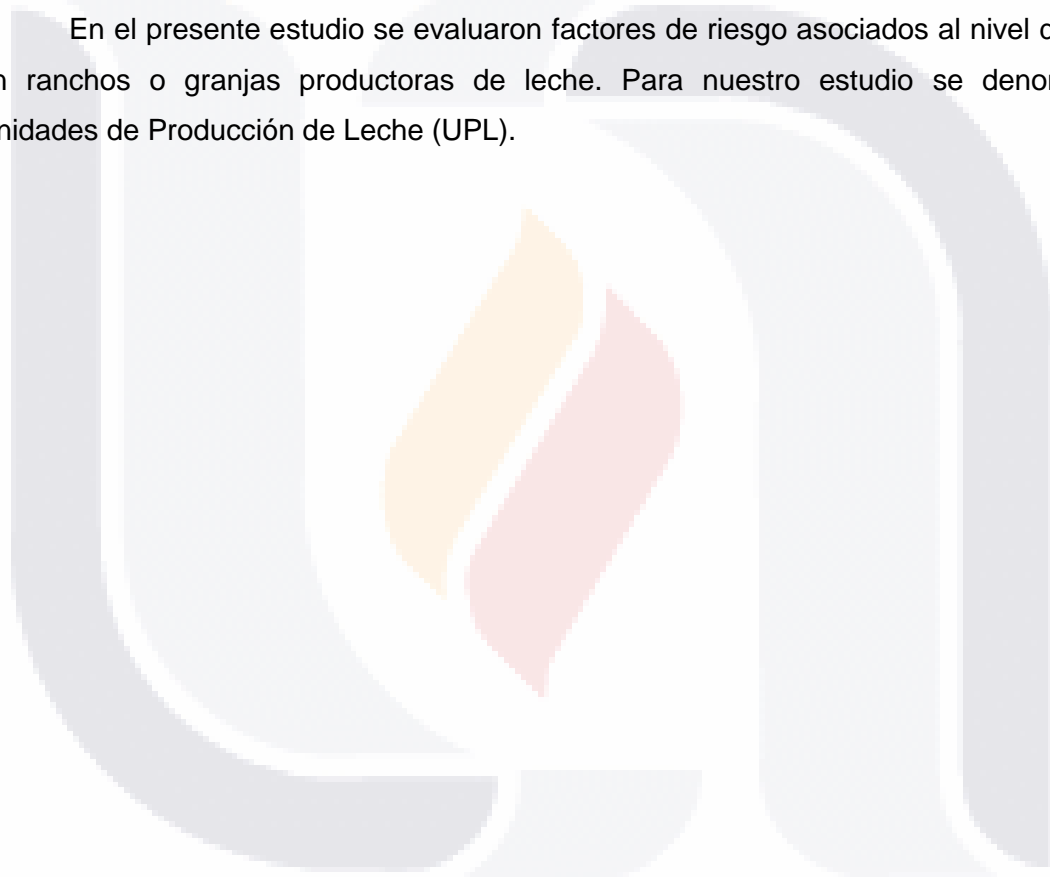
Por lo tanto, al ser la leche un alimento importante, principalmente para la población infantil, el nivel de AFM<sub>1</sub> en la leche y productos lácteos es regulado en varios países; el límite de la Unión Europea de 0.05 µg/L sigue siendo el más bajo del mundo (European Community, 2006). En México, la NOM-243-SSA1-2010 especifica que el máximo nivel permitido es de 0.5 µg/L.

En la actualidad, no existe un método físico simple para eliminar a la AFM<sub>1</sub> de la leche; no es afectada por pasteurización o procesos como los que se necesitan para fabricar queso o yogurt (Moosavy y col., 2013). De acuerdo con el *Codex Alimentarius* (2012), las buenas prácticas agrícolas (BPA) constituyen la primera línea de defensa

contra la contaminación por aflatoxinas, seguida por la aplicación de buenas prácticas de fabricación (BPF) durante la manipulación, el almacenamiento y la distribución de los cereales destinados a la alimentación humana y animal.

Una alternativa para una evaluación más precisa de la exposición a aflatoxinas en alimento, es medir la presencia de AFM<sub>1</sub> en la leche materna (Adejumo y col., 2013). Al ser un biomarcador de exposición, se utiliza de manera importante para evaluar, *in vivo*, la eficacia de las estrategias de desintoxicación (secuestrantes, microorganismos y enzimas) (Hassan y Kassaify, 2014).

En el presente estudio se evaluaron factores de riesgo asociados al nivel de AFM<sub>1</sub> en ranchos o granjas productoras de leche. Para nuestro estudio se denominaron Unidades de Producción de Leche (UPL).



## 1. ANTECEDENTES

### 1.1. CONTAMINACIÓN DE ALIMENTO PARA GANADO

En términos globales, los alimentos y forrajes para ganado contienen una amplia gama de contaminantes los cuales son originados de diversas fuentes (Farré y Barceló, 2012). Un contaminante se define como cualquier sustancia que hace a otra, impura o no apta para su uso. De acuerdo con el *Códex Alimentarius*, un contaminante es cualquier sustancia presente en el alimento, la cual no fue añadida intencionalmente y que puede presentarse en cualquier etapa de la producción de los alimentos y sus ingredientes. El término no incluye a fragmentos de insectos, pelos de roedores y otra materia extraña (*Códex Alimentarius*, 2010).

De acuerdo con Kvesitadze y col., (2006), las fuentes de contaminación de origen químico se clasifican en dos grupos: Naturales y Antropogénicas. Las primeras son el resultado de procesos elementales tales como la emisión de gases tóxicos durante una erupción volcánica, así como la actividad metabólica de algunos organismos que excretan compuestos tóxicos (Cuadro No.1); mientras que las segundas son producto de la actividad humana (Cuadro No. 2).

**Cuadro No. 1. Contaminantes naturales del alimento para ganado**

Contaminantes	Descripción
Dioxinas	Subproductos de diversos procesos industriales y fenómenos naturales de combustión. Son ubicuas en el medio ambiente y tienen una resistencia extrema a la biodegradación.
Micotoxinas	Sustancias químicas producto del metabolismo secundario de varios géneros de hongos. Pueden estar presentes en los productos agrícolas durante toda la cadena alimenticia. Algunas como las aflatoxinas, son ubicuas y presentan estabilidad a temperaturas elevadas.

Adaptado de: Deshpande, 2002; Farré y Barceló, 2012.

**Cuadro No.2. Contaminantes antropogénicos del alimento para ganado**

Contaminantes	Descripción
Metales pesados	Son sustancias con potencial bioacumulativo, originadas por actividades industriales que utilizan masivamente plomo, zinc, cadmio, cromo, mercurio, cobre y arsénico.
Pesticidas	Son producidos y utilizados por toneladas como pesticidas en la agricultura, como carbamaros, tiocarbamatos, triazinas, fenoxiacetatos, cumarinas, nitrofenoles y pirazoles. Se clasifican de acuerdo a su acción: acaricidas, fungicidas, insecticidas, herbicidas, fitorreguladores, bactericidas o desinfectantes.

Adaptado de: Li y col., 2005; Kvesitadze y col., 2006; Borchers, 2010; Tiwari y Sinha, 2010; Pongratz y col., 2011.

**1.2. MICOTOXINAS**

Las micotoxinas son contaminantes ambientales naturales, ubicuos, producto del metabolismo secundario de hongos (Deshpande, 2002), que contaminan productos agrícolas, afectando la calidad de los mismos y produciendo una gran variedad de efectos perjudiciales en animales, además de los riesgos transmitidos por los alimentos a los seres humanos (Sultana y Hanif, 2009).

Las micotoxinas son producidas por una gran variedad de hongos, principalmente por los géneros *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp y *Fusarium* spp. (Deshpande, 2002). Cada uno tiene una prevalencia geográfica ya que tienen requerimientos ambientales específicos para su crecimiento (D'Mello, 2004).

A la fecha se reportan alrededor de 400 micotoxinas (Chi y Broomhead, 2009) y de acuerdo con la FAO (2004), tiene importancia mundial por su capacidad para tener efectos adversos sobre la salud humana y animal. Los efectos adversos en la salud animal incluyen efectos sobre la productividad de los animales. Los tipos de micotoxinas de importancia mundial, se muestran en el Cuadro No. 3.

**Cuadro No 3. Micotoxinas de importancia mundial**

<b>Micotoxinas</b>	<b>Hongo que las produce</b>
Aflatoxinas B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> y G <sub>2</sub>	<i>Aspergillus parasiticus</i>
Aflatoxinas B <sub>1</sub> y B <sub>2</sub>	<i>Aspergillus flavus</i>
Toxina T-2; Desoxinivalenol (nivalenol); Zearalenona	<i>Fusarium sporotrichioides</i>
Fumonisina B <sub>1</sub>	<i>Fusarium moniliforme (F. verticillioides)</i>
Ocratoxina A	<i>Penicillium verrucosum</i>
Ocratoxina A	<i>Aspergillus ochraceus</i>

Adaptado de FAO, 2004.

**1.2.1. Importancia de la presencia de micotoxinas en la alimentación de animales productores de leche.**

Se ha establecido que más del 25% de la producción de las cosechas de alimentos a nivel mundial están contaminadas con algún tipo de micotoxina (FAO, 2004; Pérez y col., 2008). El maíz, trigo, cebada, arroz, avena, frutos secos, cacahuates y semilla de algodón son los productos frecuentemente contaminados (Zheng y col., 2006).

En las Unidades de Producción Lechera (UPL), es necesario tener como ingredientes básicos para la alimentación del ganado productos agrícolas como alfalfa verde, ensilado de maíz, salvado de trigo, algunas pastas (coco, harinolina) y granos (maíz, sorgo), además de complementar con alimentos comerciales balanceados o concentrado (SAGARPA, 2013). Una consecuencia directa de la composición compleja y variable de la dieta del ganado lechero es el riesgo de exposición a más de una micotoxina (Gremmels, 2008a).

Como se muestra en el Cuadro No. 4, la presencia de micotoxinas en los ensilajes es de las más estudiadas, ya que el ensilaje de maíz se incluye en una proporción alta en la alimentación de ganado lechero (Alonso y col., 2013).

**Cuadro No. 4. Micotoxinas en ensilajes (2000-2011)**

<b>País</b>	<b>Tipo de ensilaje</b>	<b>Micotoxina encontrada</b>	<b>Referencia</b>
Argentina	Maíz y sorgo	AFs, DON	Amigot y col., 2006
Argentina	Maíz	AFs	Alonso y col., 2009
Argentina	Maíz	AFB <sub>1</sub> , ZEA, DON, FBs, patulina	Gonzalez Pereyra y col., 2008, 2011
Brasil	Maíz y Sorgo	AFB <sub>1</sub>	Sassahara y col., 2005
Bélgica	Maíz	DON, FBs, ZEA	Van Pamel y col., 2011
Dinamarca	Maíz	ZEA, DON, GLY, fumiclavina A, roquefortina A y C, ácido micofenólico	Rasmussen y col., 2010
Egipto	Maíz	AFs, T2	EI-Shanawany y col., 2005
Francia	Maíz	AFB <sub>1</sub> , ZEA, DON, CIT	Garon y col., 2006
Francia	Maíz	GLY, DON, CIT	Richard y col., 2007
Francia	Maíz	AFB <sub>1</sub> , DON, CIT	Richard y col., 2008
Alemania	Maíz	Tricotecenos, ZEA	Schollenberger y col., 2006
Italia	Maíz	AFB <sub>1</sub>	Decastelli y col., 2007
México	Maíz	AFB <sub>1</sub> , OTA, FBs, DON, ZEA	Reyes-Velázquez y col., 2008
Los países bajos	Maíz y pasto	ZEA, DON, Roquefortina C, ácido micofenólico	Driehuis y col., 2008
Eslovaquia	Maíz	AFs, DON, FBs, T2, ZEA, OTA	Bíro y col., 2009
EEUUAA	Maíz	FBs	Kim y col., 2004

Adaptado de Alonso y col., 2013.

Además de los ensilajes, los concentrados también son susceptibles a la contaminación por micotoxinas y forman parte importante en la alimentación del ganado, ya que pueden representar hasta en un 70% de la ración diaria de alimento (Gremmels, 2008a). Esta situación incrementa el riesgo de exposición del ganado a las micotoxinas con las consecuentes afectaciones a la salud y a la producción. Es importante señalar que una vez que se producen las micotoxinas en productos agrícolas, la contaminación no es homogénea, lo que dificulta su detección (FAO, 2007).

### **1.2.2. Importancia sanitaria y económica de las micotoxinas**

Desde la perspectiva de la industria lechera, las micotoxinas en los alimentos y sus ingredientes son de doble preocupación. En primer lugar, cuando los animales ingieren micotoxinas, algunos metabolitos con capacidad tóxica, pueden excretarse en los alimentos para consumo humano, lo que provoca preocupación de salud pública (Chi y Broomhead, 2009).

En segundo lugar, las micotoxinas pueden tener un efecto perjudicial en la salud animal, teniendo un impacto negativo en la productividad del ganado lo que ocasiona pérdidas económicas (Driehuis y col., 2008), ya que cuando las micotoxinas son consumidas en el alimento generan una intoxicación conocida como “micotoxicosis” (Rai y col., 2012) que se manifiesta clínicamente por diferentes cuadros o síndromes (Lazo y Sierra, 2008), dependiendo de la cantidad ingerida, tiempo de exposición y la susceptibilidad del animal (Valencia y col., 2012).

En general, aunque la incidencia natural de micotoxinas es importante (57%), en algunos trabajos los niveles de micotoxinas reportados son bajos y no causan problemas de mortalidad de animales. Sin embargo, la presencia de micotoxinas en niveles subclínicos, también es importante ya que puede reflejarse en reducciones crónicas perjudiciales para los parámetros productivos de granjas productoras de leche (Flores y col., 2003).

### **1.2.3. Efecto de las micotoxinas en el ganado lechero**

Los efectos observados a menudo están relacionados con los niveles de dosis y duración de la exposición a las micotoxinas (Zain y col., 2011), las cuáles también presentan tropismo hacia varios órganos, siendo el hígado y el riñones unos de los más afectados, así como el sistema inmune y el nervioso (Valdivia y col., 2012).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Los efectos de una micotoxicosis también son dependientes de la especie, edad y sexo; así como por factores dietéticos y ambientales (Patterson, 1983; Paterson y Lima, 2010; Almeida y col., 2013). Sisman (2006) coincide con los mismos factores además de considerar también el peso del animal.

Adicionalmente, la patogenia de una micotoxicosis está determinada por una secuencia de procesos que comprenden desde la ingestión de las micotoxinas, absorción, transformación, farmacocinética, interacciones moleculares, distribución y excreción de la toxina y sus metabolitos (Zain, 2011; Valdivia y col., 2012).

Por lo anterior, las micotoxicosis pueden presentarse de forma aguda o crónica; los efectos agudos se producen si se consumen cantidades altas de micotoxinas y se manifiestan con hepatitis, hemorragias, nefritis, necrosis del epitelio oral y entérico, y muerte. Estos efectos pertenecen a los órganos diana generalmente afectados por micotoxinas específicas (Valdivia y col., 2012).

Los efectos crónicos, son resultantes de niveles de ingesta moderados o bajos de micotoxinas durante mucho tiempo. Las condiciones crónicas tienen un impacto mucho mayor, ya que causan una reducción de la productividad (FAO, 2004). El consumo de bajos niveles de micotoxinas induce síndromes muy poco evidentes y que se pueden confundir fácilmente con deficiencias nutricionales, raciones mal balanceadas o infecciones por microorganismos (Loste y col., 2002; 2012).

Los síntomas incluyen en general anorexia, disminución del peso vivo y de la eficiencia en la conversión alimenticia. El sistema inmune puede afectarse favoreciendo el desarrollo de infecciones y los signos clínicos no se observan hasta que el animal muere debido a una infección poco importante (Valdivia y col., 2012). La disminución de la producción de leche es un efecto evidente e inmediato ante una infección asociada con micotoxinas (Asher, 2008).

La susceptibilidad de las vacas lecheras a las micotoxinas depende en gran parte en la eliminación pre-sistémica de las micotoxinas ingeridas por la microflora del rumen (Gremmels, 2008b). En el Cuadro No. 5, se presentan los efectos de las micotoxinas en vacas lecheras.



**Cuadro No. 5. Efectos de las micotoxinas en vacas lecheras**

<b>Efectos</b>	<b>Síntomas</b>	<b>Micotoxina</b>
Sabor adverso del pienso contaminado con hongos	Consumo reducido de alimento.	Metabolitos de hongos volátiles.
Actividad antimicrobiana	Reducción de la fermentación ruminal.	Patulina, ácido fusárico.
Lesiones del hígado (colestasis), cirrosis hepática	Lipidosis hepática.	Aflatoxinas, Fumonisinias.
Deterioro de la inmunidad innata	Deterioro de la inmunidad innata	Tricotecenos, ocratoxinas, aflatoxinas, ácido micofenólico, gliotoxina.
Efectos pro-inflamatorios y alérgicos de esporas (conidia)	Incremento en la incidencia de infecciones respiratorias.	<i>A. fumigatus</i>
Efectos pro-inflamatorios	Aumento en la incidencia de mastitis y laminitis.	Tricotecenos Local: dermatotoxicidad Sistémica: si la degradación del rumen es incompleta.
Efectos hormonales (estrogénicos)	Deterioro de la fertilidad.	Zearalenona y metabolitos.

Adaptado de: Gremmels, 2008b

**1.3. SISTEMAS DE PREVENCIÓN Y CONTROL DE MICOTOXINAS**

De acuerdo con el *Codex Alimentarius* (2012), es importante que los productores sean conscientes de que las buenas prácticas agrícolas (BPA) constituyen la primera línea de defensa contra la contaminación de los cereales por micotoxinas, seguida por la aplicación de buenas prácticas de fabricación (BPF) durante la manipulación, el almacenamiento y la distribución de los cereales destinados a la alimentación humana y animal ya de esta manera se puede disminuir significativamente la producción de micotoxinas.

Conforme con la FAO (2001), para que este Código de Prácticas sea eficaz, será necesario que los productores de cada país consideren los principios generales que en él se enuncian teniendo en cuenta los cultivos, condiciones climáticas y prácticas agrícolas locales, antes de intentar aplicar las disposiciones del Código.

**1.3.1. Descontaminación de micotoxinas en alimentos**

Hasta la fecha no ha habido ninguna aceptación oficial generalizada de un tratamiento de descontaminación destinado a reducir los niveles de micotoxinas en alimentos para animales (*Codex Alimentarius*, 2012); sin embargo, dado que la contaminación por micotoxinas puede ser difícil de prevenir, se han propuesto numerosas estrategias para su detoxificación mediante métodos físicos, químicos y biológicos (Bozoglu, 2011). Los métodos comunes disponibles son los siguientes:

**1.3.1.1. Métodos físicos.** Son procesos encaminados a eliminar las fracciones más contaminadas de las materias primas. Consisten en la segregación, clasificación, lavado, pelado, descascarado y tratamientos térmicos (FAO-OMS, 1999; Abrunhosa y col., 2010).

En el Cuadro No. 6, se mencionan algunos tratamientos en cuanto a métodos físicos se refiere para la descontaminación/detoxificación de micotoxinas.

**Cuadro No. 6. Métodos físicos para la descontaminación de micotoxinas**

<b>Método</b>	<b>Descripción y nivel de efectividad</b>
Limpieza/separación física	Separación de granos que estén infestados. Método incompleto.
Segregación y selección con luz negra	Prueba de “luz negra” para la aflatoxina. Método engañoso.
Segregación por densidades y lavado	Método no específico e incompleto. Adecuado para moler en húmedo y para la elaboración alcalina del maíz y cerveza, de lo contrario, el costo de secado de las semillas sería elevado.
Degradación térmica	Método incompleto para la mayoría de las micotoxinas porque son bastante resistentes a ciertas temperaturas. Además, son afectadas las vitaminas y proteínas del alimento.
Irradiación	La irradiación por rayos X, UV, gamma, haz de electrones y energía solar producen cambios en las estructuras moleculares. Los resultados han sido prometedores. Sin embargo, tiene limitaciones para los granos secos o granos secos de destilería.

Adaptado de: FAO-OMS, 1999; Kabak, 2010; Murata y col., 2011.

**1.3.1.2. Métodos químicos.** Se incluyen ácidos, bases, reactivos oxidantes, agentes reductores, agentes de cloración y reactivos diversos (FAO-OMS, 1999).

En el Cuadro No.7, se presentan algunos tratamientos en cuanto a métodos químicos se refiere para la descontaminación/detoxificación de micotoxinas.

**Cuadro No. 7. Métodos químicos para la descontaminación de micotoxinas**

<b>Método</b>	<b>Descripción y nivel de efectividad</b>
Nixtamalización	Proceso tradicional con propiedades alcalinas por el cual se obtienen las tortillas. Se han obtenido resultados que confirman una efectividad en la inactivación de aflatoxinas. Sin embargo existe controversia por otros autores donde mencionan solo una degradación parcial persistiendo la toxicidad.
Ozonización	El ozono es un oxidante fuerte. Se considera de uso seguro para el control efectivo de micotoxinas. Sin embargo, se requiere alta concentración y largo tiempo de tratamiento.
Amoniación	Para aflatoxinas en maíz es un método aprobado en México, Sudáfrica y varios estados de los EE.UU. Tal vez no sea eficaz para descontaminar maíz con fumonisinas.
Tratamiento hidrotérmico en presencia de bisulfito de sodio/hidróxido de calcio y metilamina	El bisulfito es un aditivo alimentario común. Destruye a la AFB <sub>1</sub> . La combinación de bisulfito/metilamina/hidróxido de sodio resultaron eficaces para el deoxinivalenol y la combinación bisulfito/metilamina funcionó para zearalenona.

Adaptado de: Gomaa y col., 1997; FAO-OMS, 1999; Anguiano y col., 2005; Jian y col., 2013; Rempe y col., 2013.

A pesar de la disponibilidad de los métodos, se ha descrito que el utilizar productos químicos produce una reducción significativa de la palatabilidad y calidad nutritiva de los productos tratados (Abrunhosa y col., 2010).

**1.3.1.3. Métodos biológicos.** Utilizan microorganismos, que pueden degradar, transformar o adsorber micotoxinas para desintoxicar productos contaminados o para evitar los efectos tóxicos cuando se ingieren las micotoxinas (Hernández-Mendoza y col., 2009; Abrunhosa y col., 2010; McCormick, 2013). En el Cuadro No. 8, se presentan algunos tratamientos en cuanto a métodos biológicos se refiere para la descontaminación/detoxificación de micotoxinas.

**Cuadro No. 8. Métodos biológicos para la descontaminación de micotoxinas**

<b>Método</b>	<b>Descripción y nivel de efectividad</b>
Fermentación etanólica	No es eficiente. Las toxinas en el grano contaminado, se pueden incrementar proporcionalmente.
Bacterias probióticas	Suplementos alimentarios microbianos como <i>Lactobacillus</i> y el <i>Propionibacterium</i> que pueden reducir la biodisponibilidad de algunas micotoxinas, como aflatoxina.
Levaduras	Con ciertas cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , se ha demostrado la biodegradación de deoxinavalenol, ocratoxina A y fumonisina B <sub>1</sub> .

Adaptado de: Bennett y Richard, 1996; FAO-OMS, 1999; Styriak y col., 2001; McCormick, 2013.

Los métodos biológicos son tecnologías de elección para la descontaminación porque son muy específicos, eficientes, respetuosos del medio ambiente y preservan la calidad nutritiva del alimento (Abrunhosa y col., 2010; Corassin y col., 2013).

### **1.3.2. Inhibición de la adsorción de micotoxinas en el tracto gastrointestinal**

Una alternativa para cuando todas las normas de prevención fallaron y en consecuencia los agricultores sospechan que los piensos están contaminados con micotoxinas, el uso de aditivos adsorbentes pueden ser recomendables (Pierre, 2007).

Cuando el alimento es ingerido por los animales, ocurre un proceso de unión adsorbente-micotoxina en el tracto gastrointestinal del animal donde se forman compuestos estables, inertes e irreversibles que son eliminados por las heces (Juan-juan, 2010).

Esta estrategia disminuye la biodisponibilidad de las micotoxinas, lo que conduce a una reducción de su absorción, así como la distribución en la sangre y de los órganos diana (EFSA, 2009).

La eficacia de estos adsorbentes en el proceso de adsorción de micotoxinas, tiene que ver con su estructura física, es decir, la carga total y la distribución de la carga, el tamaño de los poros y la accesibilidad al área de superficie. Del mismo modo, las propiedades del adsorbato (micotoxinas), como la polaridad, solubilidad, tamaño, forma y en el caso de compuestos ionizados, la distribución de carga y constantes de disociación también juegan un papel importante (Huwig y col., 2001; Sabater-Vilar, 2007).

Juan-juan y col. (2010) obtuvieron resultados importantes donde el valor de pH influyó significativamente la capacidad de algunos adsorbentes para aglutinar

micotoxinas, destacándose el pH alcalino (6.0 a 8.0) por tener mayor eficiencia. El Cuadro No. 9, muestra la clasificación de adsorbentes naturales utilizados para disminuir la cantidad de micotoxinas en el alimento.

**Cuadro No. 9. Clasificación de adsorbentes naturales**

<b>Clasificación</b>	<b>Adsorbente y nivel de efectividad</b>
Aluminosilicatos	<p>Aluminosilicatos hidratados de calcio y sodio (HSCAS): Reducen la toxicidad de aflatoxinas, no es así con otro tipo de micotoxinas. Existe el riesgo de que puedan unirse a nutrientes esenciales, disminuyendo su disponibilidad para el animal.</p> <p>Bentonita de Na, bentonita de Ca, bentonita organofílica y bentonitas ácido 1,4-tratado: Reducen la concentración y efectos adversos de las aflatoxinas. La inclusión de 0.4% en la dieta puede ser suficiente.</p> <p>Zeolitas: Elementos microporosos alcalinos o alcalinotérreos tales como sodio, potasio y calcio. Existen alrededor de 150 tipos de zeolitas naturales y sintéticas con diversas propiedades, incluyendo intercambio catiónico, adsorción, tamizado molecular y deshidratación. La zeolita del tipo clinoptilolita, es eficaz para la degradación de AFB<sub>1</sub>. La organozeolita, es eficaz para zearalenona y ocratoxina.</p> <p>Montmorillonita (HSCAS hidratados de magnesio): Es comúnmente el principal constituyente de la bentonita. Tiene alta capacidad en diferentes concentraciones para la adsorción de AFB<sub>1</sub>.</p>
Carbón vegetal activado	<p>Producto de la pirolisis de materiales orgánicos. Aunque funciona para micotoxinas, es inespecífico y los nutrientes esenciales son también absorbidos.</p>
Pared celular de levaduras	<p>Glucomananos: Ingrediente activo de paredes celulares de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>. Las paredes de las células que albergan polisacáridos, proteínas y lípidos presentan numerosos centros de adsorción. Adsorben a la AFB<sub>1</sub>, pero en menor eficacia que los HSCAS.</p>

Adaptado de: Dakovic y col., 2005; Gowda y col., 2007; Quang y col., 2008; Abbes y col., 2008; Husing y Hartmann, 2009; EFSA, 2009; Juan-juan y col., 2010.

No existe hasta el momento ningún adsorbente con la capacidad de aglutinar varias micotoxinas ya que son muchos los factores involucrados en la formación del complejo adsorbente-adsorbato (micotoxina).

Como se muestra en los cuadros No. 10, 11 y 12, Existen productos comerciales disponibles en el mercado a base de aluminosilicatos, carbón activado y paredes de levaduras, respectivamente.

**Cuadro No. 10. Productos comerciales a base de aluminosilicatos**

<b>Producto (Marca y tipo)</b>	<b>Espectro</b>
Agrabond (aluminosilicato de calcio y sodio)	AFB <sub>1</sub> , ZEA, FUM
Alquerfeed antitox (aluminosilicato de sodio y calcio hidratado)	AFB <sub>1</sub> , DON, T-2, OTA, ZEA
Astra Ben 20® (bentonita de sodio)	AFB <sub>1</sub> , AFM <sub>1</sub>
Atox® (Combinación de esmectita y sepiolita)	AFB <sub>1</sub>
Bentonita	AFB <sub>1</sub>
Bentonita de sodio	AFB <sub>1</sub>
Calibrin-A (Montmorilonita altamente refinada )	AFB <sub>1</sub>
Calibrin-Z (Montmorilonita altamente refinada )	ZEA
Championite® (bentonita de sodio)	AFB <sub>1</sub>
Clinoptilolita	AFB <sub>1</sub>
Clinoptilolita-huelanditavolcanica	OTA, NIV, DAS, T-2, ZEA, AFB <sub>1</sub>
Duotek® (organoaluminosilicato)	ZEA, OTA, FUM B <sub>1</sub> , T-2, AFB <sub>1</sub>
Fixat® (aluminosilicato)	AFB <sub>1</sub>
Flo-bond (aluminosilicato hidratado de calcio y sodio)	AFB <sub>1</sub> , T-2, DON, OTA, ZEA
Flow Guard® (bentonita de sodio)	AFB <sub>1</sub> , AFM <sub>1</sub>
Klinsil® (aluminosilicato)	OTA
Mexsil® (aluminosilicato hidratado de calcio y sodio)	AFB <sub>1</sub>

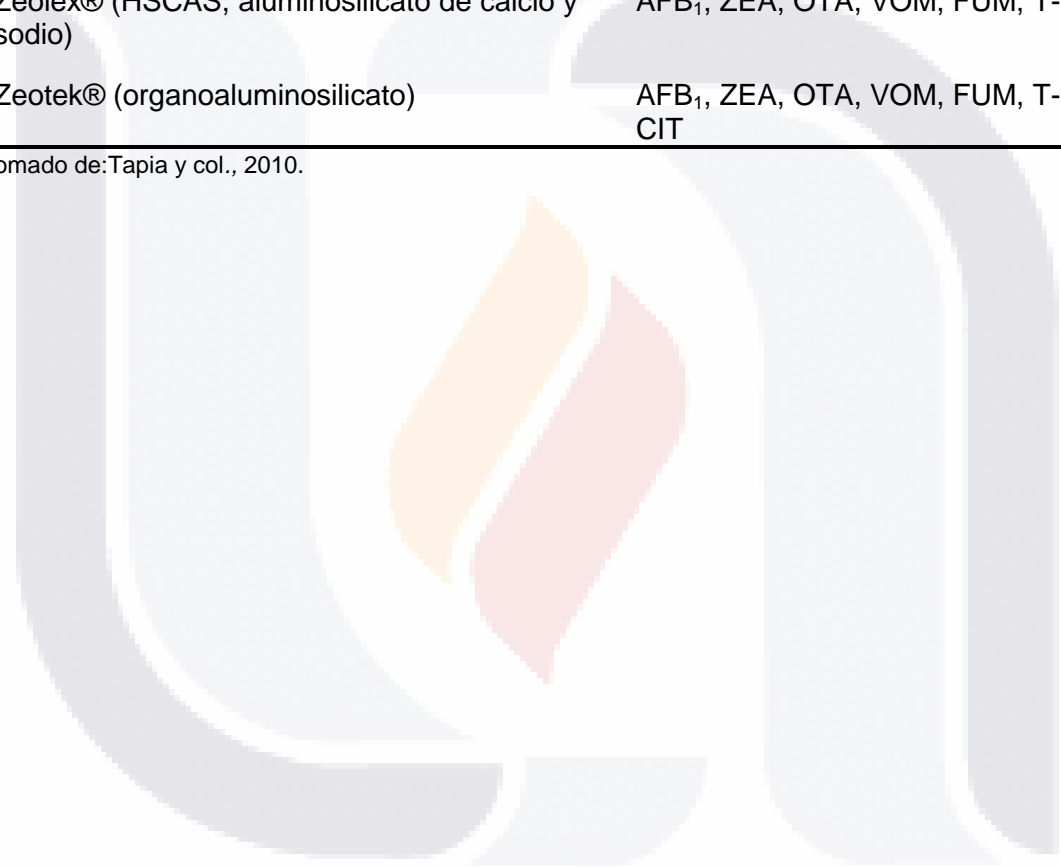
Continuación...

<b>Producto (Marca y tipo)</b>	<b>Espectro</b>
Milbond-TX® (HSCAS)	AFB <sub>1</sub>
Montmorillonita	AFB <sub>1</sub>
Montmorillonita de calcio y sodio	AFB <sub>1</sub> , ZEA
Montmorillonita nanocompuesta modificada	AFB <sub>1</sub> DON, ZEA
Montmorillonita organofilica modificada	
Myco-Ad® (combinación de dos HSCAS y mezcla de illita y cloritas)	AFB <sub>1</sub> , T-2, OTA
Myco-Ad® A-Z (combinación de dos HSCAS y mezcla de illita y cloritas donde ha removido las fracciones no arcillosas)	AFB <sub>1</sub> , T-2, OTA, ZEA
Mycosil® (HSCAS)	AFB <sub>1</sub>
Mycobond R (mezcla de minerales)	AFB <sub>1</sub>
Neosil® (aluminosilicato hidratado de calcio y sodio y minerales de sodio de calcio, magnesio, hierro)	AFB <sub>1</sub>
NovaSil™ (HSCAS, Ca-montmorillonita)	AFB <sub>1</sub> , AFM <sub>1</sub>
Promisil IP-A (aluminosilicato de sodio y calcio)	OTA
Quitaflax ZEO® (aluminosilicato hidratado de calcio y sodio)	ZEA, FUMB <sub>1</sub> , OTA, VOM, AFB <sub>1</sub> , T-2
Red Crown® (bentonita de calcio)	AFB <sub>1</sub> , AFM <sub>1</sub>
Sintox® (aluminosilicato de calcio y sodio)	AFB <sub>1</sub> , T-2, DON, ZEA, OTA
Sorb-IT® (Bentonita + montmorillonita)	AFB <sub>1</sub> , T-2, ZEA, OTA, FUM
Swy-2: Wyoming bentonita de sodio	AFB <sub>1</sub>
Topsil (aluminosilicato de sodio y calcio)	ZEA, OTA, AFB <sub>1</sub> , FUM
Toxinor® (combinación de montmorillonita, sepolita y diatomita)	AFB <sub>1</sub> , ZEA, OTA, FUM, DON, T-2

Continuación...

<b>Producto (Marca y tipo)</b>	<b>Espectro</b>
Trisox	AFB <sub>1</sub> , DON, T-2, ZEA, OTA, FUM
Trisox II	AFB <sub>1</sub> , OTA, ZEA
Volclay FD-181 (bentonita de sodio)	AFB <sub>1</sub>
Zeolex extra® ( aluminosilicato de calcio y sodio hidratado y activado químicamente )	AFB <sub>1</sub> , OTA, T-2, FUM B <sub>1</sub> , ZEA
Zeolex® (HSCAS, aluminosilicato de calcio y sodio)	AFB <sub>1</sub> , ZEA, OTA, VOM, FUM, T-2,CIT
Zeotek® (organoaluminosilicato)	AFB <sub>1</sub> , ZEA, OTA, VOM, FUM, T-2, CIT

Tomado de:Tapia y col., 2010.





**Cuadro No. 11. Productos comerciales a base de carbón activado**

<b>Producto</b>	<b>Espectro</b>
Aquacarb 207EA	AFB <sub>1</sub>
Carbón activado	ZEA, FB <sub>1</sub> , FB <sub>2</sub> , OTA, DON, AFB <sub>1</sub> , AFM <sub>1</sub>
Carbón superactivado	AFB <sub>1</sub> , T-2
Darco KB-B	AFB <sub>1</sub> , OTA
Filtrisorb 400	AFB <sub>1</sub>
GCN 1240	AFB <sub>1</sub>
Norit GCN	AFM <sub>1</sub>
Nuchar SA-20	AFB <sub>1</sub> , AFM <sub>1</sub>
Sorbopor MV 125	AFB <sub>1</sub>

Tomado de Tapia y col., 2010.

**Cuadro No. 12. Productos comerciales a base de pared celular de levadura**

<b>Producto</b>	<b>Características</b>	<b>Espectro</b>
Beta	Fracción purificada seca de beta-glucano de paredes celulares.	OTA
Detoxaplus	Complejo multienzimático proveniente de <i>S. telluris</i> que contiene además paredes de levaduras compuestas por manooligosacáridos y $\beta$ Glucanos.	AFB <sub>1</sub> , T-2, DON, ZEA, OTA
Ecocell	Mananoligosacáridos y $\beta$ glucanos extraídos de <i>S. cerevisiae</i>	AFB <sub>1</sub>
EX16	Vinasa conteniendo 16% de líquido de paredes celulares de levaduras.	OTA
inteWall	B-glucanos, mananos.	No indicado, actúa también como inmunoestimulante.
LEC	Fracción de paredes celulares de levaduras.	OTA

Continuación...

Producto	Características	Espectro
LEC	Fracción de paredes celulares de levaduras.	OTA
MTB-100	Glucomanano polimérico extraído de paredes celulares de levaduras	OTA, FB <sub>1</sub> , Moniliformina, ZEA, AFB <sub>1</sub> , AFM <sub>1</sub> , T-2, DAS, ácido fusárico
Mycofix plus	Levadura de T. mycotoxinivorans	AFB <sub>1</sub> , ZEA, DON, NIV, DAS, T-2, OTA
Mycosorb	Glucomannano polimérico de levadura de cerveza <i>S. cerevisiae</i> .	AFB <sub>1</sub> , ZEA, DON, NIV, T-2

Tomado de: Tapia y col., 2010.

### 1.4. AFLATOXINAS

De las micotoxinas más frecuentes que contaminan los alimentos para humanos y animales son las aflatoxinas (AF). Las AF son compuestos tóxicos producto del metabolismo secundario de los hongos *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, siendo *A. flavus* la principal cepa productora (Klich, 2007; Shephard, 2009). La Figura No. 1 muestra micrografías de los hongos.

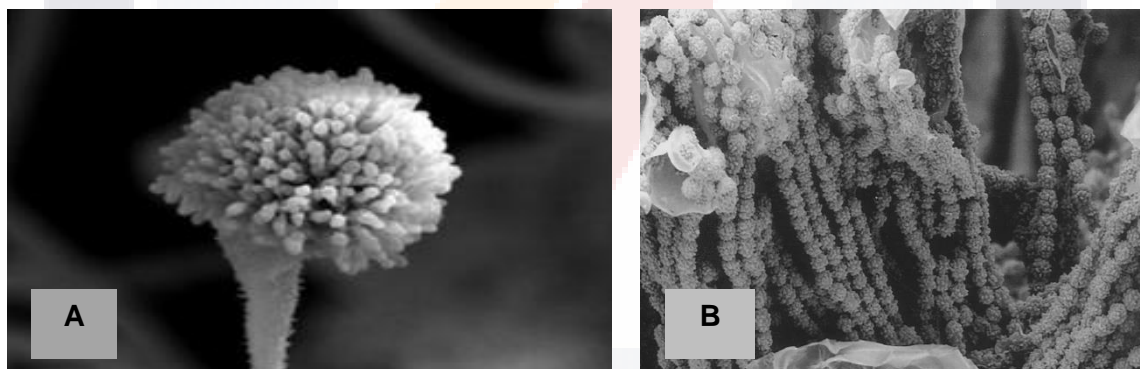


Figura No. 1. Microscopía electrónica de barrido de *Aspergillus flavus* (A) y *Aspergillus parasiticus* (B); tomado de Greene-McDowelle y col., 1999; Maso y col., 2013.

Durante los períodos de estrés por sequía, *A. flavus* puede convertirse en una especie dominante en el suelo, debido a su capacidad para crecer a altas temperaturas y con poca cantidad de agua (Sultana y Hanif, 2009); bajo condiciones de almacenamiento inapropiadas, es capaz de crecer y formar AF en casi cualquier semilla de la cosecha; también es patógeno de animales e insectos (Hamsa y Ayres, 1975; Klich, 2007).

El *Aspergillus* spp. crece y puede producir AF de una forma óptima a 25 °C con una actividad de agua (aw) de 0.95; la temperatura mínima necesaria es de 10-12 °C y la actividad de agua a partir de 0.75 (Payne,1987).

### 1.4.1. Tipos de aflatoxinas

Se han identificado 18 tipos de aflatoxinas. Las aflatoxinas producidas por *Aspergillus flavus* son AFB<sub>1</sub> y aflatoxina B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>), mientras que *Aspergillus parasiticus* produce AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, aflatoxina G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>) y aflatoxina G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>) (Paterson y Lima, 2010; Forouharmeh y col., 2013). La denominación B y G, es debido por el color de la fluorescencia que emiten bajo la luz UV: azul (Blue) y verde (Green), respectivamente. La numeración 1 y 2 dentro de cada grupo hace referencia a su movilidad cromatográfica relativa (Juan y col., 2007).

### 1.4.2. Características fisicoquímicas de las aflatoxinas

Químicamente pertenecen a un grupo de metabolitos de las difuro-cumaro-ciclo-pentanonas (AFB<sub>1</sub> y AFB<sub>2</sub>) y difuro-cumaro-lactonas (AFG<sub>1</sub> y AFG<sub>2</sub>) cuya estructura consiste en un anillo bifurano unido a un núcleo de cumarina con un anillo pentanona o un anillo de lactona (Urrego y Díaz, 2006), como se muestra en la Figura No. 2.

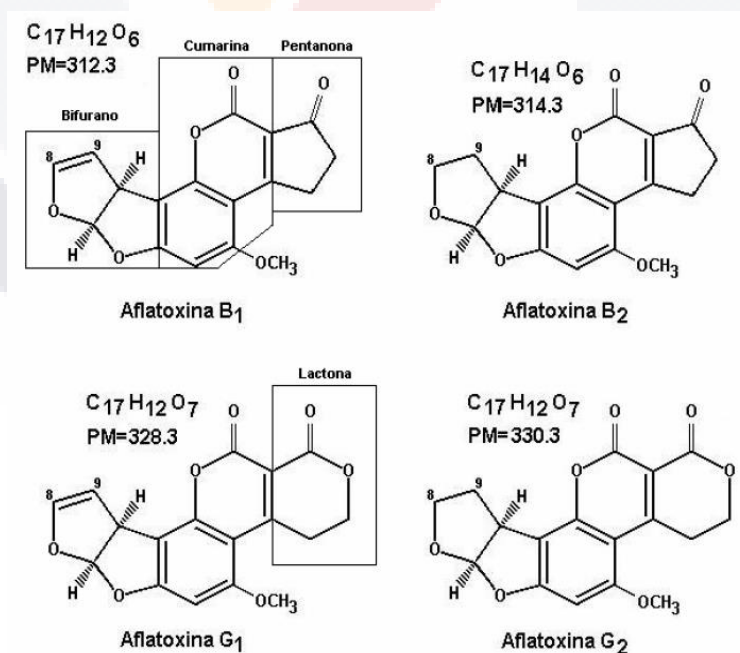


Figura No. 2. Estructura química de las cuatro aflatoxinas producidas de forma natural. Tomado de Williams y col., 2004.

Las aflatoxinas poseen una apariencia cristalina, que les da la cualidad de ser bastante termorresistentes (Juan y col., 2007). La mayoría son poco solubles en agua, pudiéndose extraer con disolventes orgánicos moderadamente polares, tales como cloroformo o el metanol (Urrego y Díaz, 2006). Tienen un peso molecular bajo, los cuales oscilan entre 312 y 350 g/mol y un punto de fusión entre 230 y 290°C (Juan y col., 2007; Valdivia y col., 2012).

### 1.5. AFLATOXINA B<sub>1</sub>

Es considerada la más importante dentro del grupo de las aflatoxinas producidas de forma natural (Forouharmeh y col., 2013), debido a que aparece con mayor frecuencia y en mayor concentración a nivel mundial (Awasthi y col., 2012) en cereales (especialmente el maíz), semilla de algodón, cacahuate, pistachos, frutos secos (FAO, 2007), así como las especias (Yu, 2012). En el Cuadro No. 13, se presenta la incidencia de las AFB<sub>1</sub> en alimentos para humanos y animales.

**Cuadro No. 13. Incidencia de AFB<sub>1</sub> en alimentos para humanos y animales**

Alimento	País	Incidencia (%)	Aflatoxina	Concentración (µg/Kg)
<b>Arroz</b>	China	13	B <sub>1</sub>	5-50
	India	100	B <sub>1</sub>	20
<b>Maíz</b>	EE UU	90	B/G	10-700
	México	89	B/G	2.5-30
	Bangladesh	67	B <sub>1</sub>	33
	Costa Rica	80	B <sub>1</sub>	>20
	India	26	B <sub>1</sub>	>30
	Uganda	29	B <sub>1</sub>	1-100
	Brasil	38.3	B <sub>1</sub>	0.2-129
	China	76	B <sub>1</sub>	>20
	Corea	12	B <sub>1</sub>	26
	Nigeria	25	B <sub>1</sub>	19
<b>Cacahuate</b>	Nigeria	45	B <sub>1</sub>	25-770
	Brasil	90	B/G	30-5000
	EE UU	90	B/G	24
	Brasil	67	B <sub>1</sub>	43-1099
	Egipto	82	B <sub>1</sub>	Positiva
	Ghana	12-32.7	B <sub>1</sub>	Positiva
	Uganda	12	B <sub>1</sub>	>100
	Filipinas	57	B/G	3-2888
<b>Productos de panadería</b>	España	2	B/G	46-67
<b>Girasol</b>	España	100	B <sub>1</sub>	20
<b>Pistacho</b>	Qatar	33	B <sub>1</sub>	>20

Tomado de Juan y col., 2007.

### 1.5.1. Importancia de AFB<sub>1</sub>

La Organización Mundial de la Salud y la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (WHO-IARC, por sus siglas en inglés), han determinado una alta peligrosidad en cuanto a su toxicidad, ya que no solo está clasificada dentro del grupo 1, que quiere decir, cancerígenas para humanos (IARC, 1993, 2002), sino también, es considerada el carcinógeno natural más potente que existe (Roze y col., 2013).

### 1.5.2. Trastornos de salud producidos por AFB<sub>1</sub>

Tiene potentes efectos carcinogénicos, mutagénicos, teratogénicos, hepatotóxicos, nefrotóxicos e inmunosupresores (Köppen y col., 2010), y todas las especies animales son susceptibles. (Kaleibar y Helan, 2012).

De forma general se establece un intervalo en la dosis letal de vida media por vía oral (LD<sub>50</sub>) desde 0.5 a 10 mg/Kg de peso corporal (Robens y Richard, 1992), pero como se muestra en el cuadro No. 14, las diferencias cualitativas y cuantitativas en el metabolismo, modo de acción y toxicidad de AFB<sub>1</sub> son dependientes de la especie y edad (Patterson, 1983). Sisman (2006) coincide con los mismos factores además de considerar también el peso.

**Cuadro No. 14. Dosis letal media oral (LD<sub>50</sub>) para AFB<sub>1</sub>**

Especie	Edad o Peso	LD <sub>50</sub> (mg/Kg PC)	Referencia
Patos	1 día	0.37	Wogan, 1965
Gatos	Nd	0.55	Jones y Jones, 1969
Cerdos	6-7 kg	0.62	Jones y Jones, 1969
Pavos	Nd	0.5-1.0	Wogan, 1966 y 1969
Perros	Cachorros	0.5-1.1	Newberne y Butler, 1969; Butler, 1874
Bovinos	Becerras	0.5-1.2	Wogan, 1966, 1969
Cerdo de Guinea	Nd	1.4-2.0	Newberne y Butler, 1969; Wogan, 1966 y 1969
Conejos	Nd	0.3-0.5	Jones y Jones, 1969; Newberne y Butler, 1969
Caballos	Jóvenes	2.0	Wogan, 1966 y 1969
Ovinos	Jóvenes	2.0	Armbrecht y col., 1970
Changos	Jóvenes	2.2	Rao y Gehring, 1971
Pollos	Jóvenes	6.5-16.5	Smith y Hamilton, 1970
Ratones	Jóvenes	9.0	Jones y Jones, 1969
Hámster	Jóvenes	10.2	Jones y Jones, 1969
Rata macho	21 días	5.5	Butler, 1964
Rata macho	100 g	17.9	Butler, 1964
Rata hembra	Nd	7.4	Butler, 1964

LD50= dosis letal 50; Nd= no disponible. Adaptado de Agag, 2004.

### **1.5.3. Impacto de AFB<sub>1</sub> en la ganadería lechera**

A pesar de su condición de rumiantes, el ganado lechero es muy susceptible a AFB<sub>1</sub>, siendo los animales jóvenes los más susceptibles (Pennington, 1914; Whitlow y col., 2010), así como las vacas en período de transición y de alto rendimiento, debido a la significancia de los cambios metabólicos y hormonales (Kaleibar y Helan, 2012). Un nivel de AFB<sub>1</sub> mayor a 100 mg/kg de alimento se considera ser tóxico para el ganado (Kaleibar y Helan, 2012). El cuadro clínico puede ser agudo, donde el inicio es rápido, los síntomas son claramente definidos y la aflatoxicosis resulta en muerte (Bennett y col., 2007). Sin embargo, como se ha mencionado, lo más común es que la aflatoxicosis sea de tipo crónico, donde los niveles ingeridos de AFB<sub>1</sub> por el ganado son bajos o moderados (Bennett y col., 2007).

El sistema inmune celular y humoral es afectado, interfiriendo con la inmunidad inducida por vacunas, por ejemplo; dando como resultado aumento en la susceptibilidad a las enfermedades infecciosas de los animales expuestos (Gremmels, 2008b) y falta de respuesta a tratamientos antibióticos (Kaleibar y Helan, 2012). En estos casos, no hay signos específicos en los animales, los cuáles son útiles para establecer un diagnóstico (Santacroce y col., 2008).

La disminución de la producción de leche es otro de los muchos efectos que pueden ocurrir en las vacas lecheras después de la ingestión de AFB<sub>1</sub>.

El mecanismo exacto responsable de la disminución de la producción de leche es desconocido, sin embargo, puede en parte ser asociado con la disminución del consumo de alimento (Applebaum y Marth, 1983). Por otra parte, también se altera la función ruminal por disminución de la digestión de celulosa, formación de ácidos grasos volátiles, proteólisis, y la motilidad (Diekman y Green, 1992).

### **1.5.4. Absorción y distribución de AFB<sub>1</sub>**

La ruta oral es el principal medio de ingestión, pero la exposición por inhalación puede ocurrir cuando el hombre o los animales son expuestos al polvo durante la molienda y manejo de los granos. Después de la exposición respiratoria, la AFB<sub>1</sub> puede aparecer en el torrente sanguíneo más rápidamente que la exposición oral (Valdivia y col., 2012).

Después de la ingestión oral, la AFB<sub>1</sub> es eficientemente absorbida en el tracto gastrointestinal, donde el duodeno parece ser el principal sitio de absorción por medio de la difusión pasiva, pues debido a su bajo peso molecular y a su alta liposolubilidad no requiere bombas o transportadores específicos (Eaton y col., 1994). Además de la vía

gastrointestinal, también existe absorción mediante el ciclo enterohepático (Hsieh y Wong, 1994).

Cuando AFB<sub>1</sub> es absorbida a nivel intestinal, en la circulación sanguínea, una porción de ella es unida a proteínas plasmáticas evitándose su difusión, mientras que otro porcentaje queda libre y con la posibilidad de pasar a través de las membranas de los capilares para llegar a los diferentes órganos como riñones, pulmones, masa muscular entre otros, siendo el hígado el principal órgano o sitio para su metabolización (Im y col., 1996; Murphy y col., 2006; Valencia y col., 2012).

#### **1.5.5. Metabolismo de AFB<sub>1</sub>**

La AFB<sub>1</sub> es inocua en el ambiente, sin embargo al ingresar al organismo, el proceso de metabolismo, produce su bioactivación, que paradójicamente es el primer paso para facilitar su remoción del organismo (Do y col., 2007).

Como se muestra en la Figura No. 3, es en este proceso donde ocurre una transformación química que da lugar a la formación de un radical libre muy tóxico (bioactivación), el cual le confiere la toxicidad y el desarrollo de un potencial para manifestar el efecto carcinogénico (Valdivia y col., 2012; Roze y col., 2013).



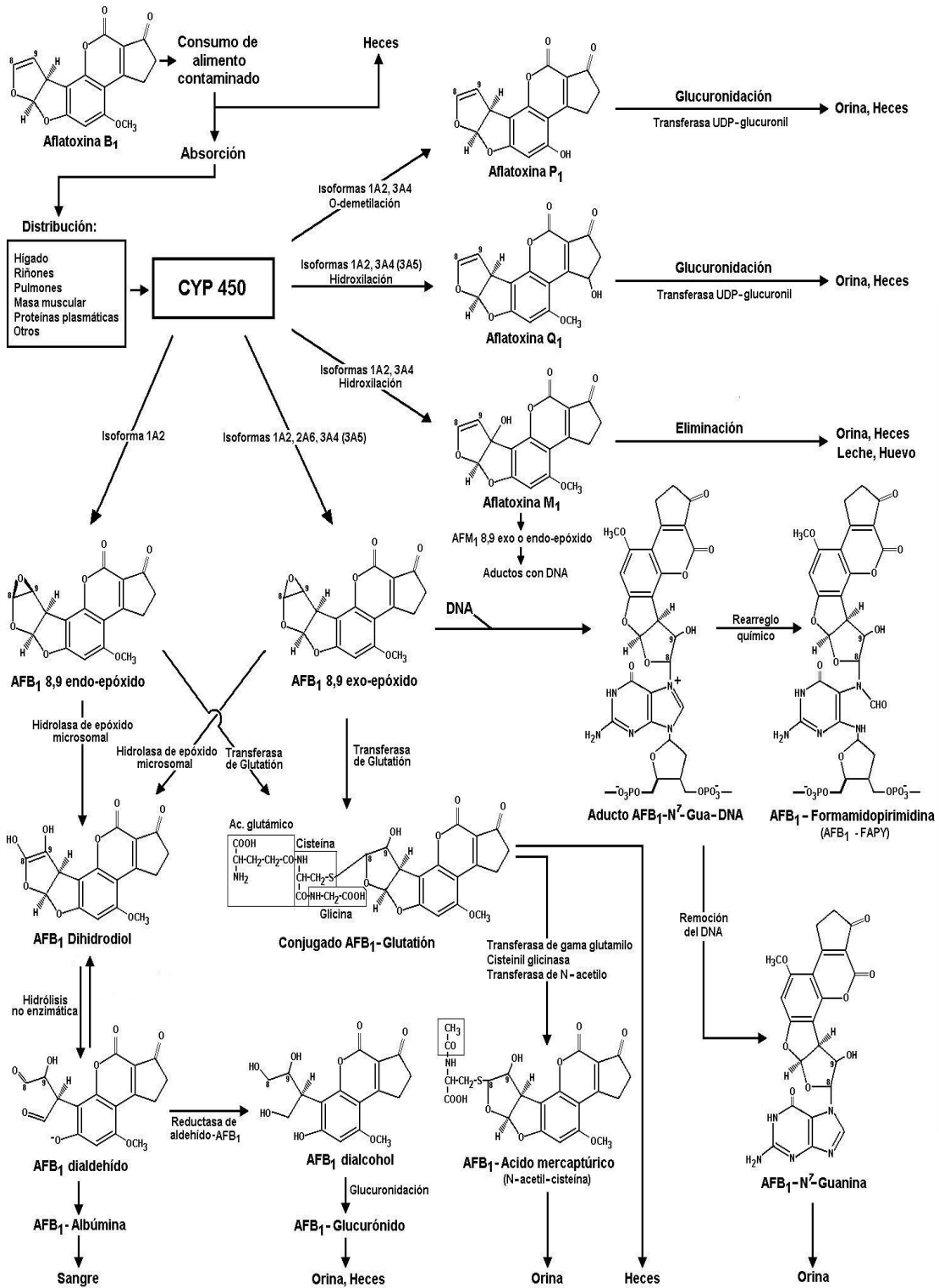


Figura No. 3. Esquema del metabolismo completo de AFB<sub>1</sub> en humanos; Valdivia y col., 2012.



**1.5.5.1. Fase I: Bioactivación.** Es realizada por las isoformas del citocromo P450 (CYP450) (Guzmán, 2007), el cual puede hidroxilar, hidratar, O-demetilar y epoxidar la molécula (Steinmeyer y Eaton, 2012), siendo las isoformas CYP<sub>1A2</sub>, CYP<sub>2A6</sub>, CYP<sub>3A4</sub> y CYP<sub>3A5</sub> las involucradas (Aoyama y col., 1990), principalmente CYP<sub>1A2</sub> y CYP<sub>3A4</sub> (Van Vleet y col., 2002).

La AFB<sub>1</sub> puede estar sujeta a un metabolismo oxidativo, formándose un epóxido entre los carbonos 8 y 9 en el anillo furano terminal, denominado entonces epóxido 8,9-AFB<sub>1</sub>, presentando dos formas estereoméricas: el *exo* y el *endo*-epóxido (Valdivia y col., 2012).

Es la forma *exo* quien posee aproximadamente 500 veces más poder mutagénico (Urrego y Díaz, 2006), el cual reacciona con DNA formando un aducto en la posición N<sup>7</sup> de la guanina, con unión covalente en el carbono ocho del epóxido de AFB<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua-DNA) *trans*- 8,9-dihidro -8- (N<sup>7</sup>-guanil)- 9- hydroxy- AFB<sub>1</sub> (Valdivia y col., 2012).

La presencia del aducto crea una carga positiva en el anillo imidazol de la guanina, lo que da lugar a cualquiera de las dos reacciones siguientes: por ser relativamente inestable dentro de la estructura del DNA, la mayoría de los aductos (AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua) se separan del DNA y se excretan en orina (Valdivia y col., 2012), o bien, ocurre un cambio químico en el cual el anillo imidazol se abre para formar la estructura de AFB<sub>1</sub>-formamidopirimidina (AFB<sub>1</sub>-FAPY) que es biológico y químicamente más estable (Guzmán, 2007).

Si estos aductos de DNA o los sitiosapurínicos que permanecen desde la separación espontánea del aducto AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua no son separados, pueden finalmente conducir a eventos mutacionales, ya que da lugar a una mutación de G-T en la tercera base del codón 249 del gen p53 (Guzmán, 2007).

Otra de las rutas del metabolismo de los epóxidos de AFB<sub>1</sub> es la de ser transformados, en presencia de moléculas de agua, por la hidrolasa de epóxido microsomal en AFB<sub>1</sub>-dihidrodiol, para posteriormente, por hidrólisis no enzimática, realizarse la apertura del anillo furano terminal y formarse la AFB<sub>1</sub>-dialdehído, el cual tiene la capacidad de reaccionar fuertemente con grupos amino de proteínas, específicamente con lisina, y tener efectos citotóxicos, o puede ser parcialmente reducido a monoalcoholes o completamente reducido a dialcohol por la reductasa de aldehído-AFB<sub>1</sub>, donde por medio de glucuronidación llega a ser AFB<sub>1</sub> glucurónido y es eliminada por orina y heces (McIellan y col., 1994; Murcia, 2010).

En este proceso metabólico de fase I también se originan dos metabolitos hidroxilados: la aflatoxina Q<sub>1</sub> (AFQ<sub>1</sub>) y la aflatoxina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>), y un metabolito producto de la O-demetilación llamado aflatoxina P<sub>1</sub> (AFP<sub>1</sub>), los cuales tienen menor toxicidad y carcinogenicidad y su formación está considerada como una vía de detoxificación (Urrego y Díaz, 2006; Steinmeyer y Eaton, 2012).

Una parte de la AFM<sub>1</sub> es eliminada sin modificaciones por heces, orina, leche o puede continuar una activación más a fondo y formar un AFM<sub>1,8,9</sub>-epóxido que forma aductos con el DNA y posteriormente ser excretado en la orina en forma de AFM<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Guanina (Valdivia y col., 2012).

**1.5.5.2. Fase II: Conjugación.** Esta fase involucra a las enzimas transferasas de glutatión (GST), transferasa UDP-glucuronil o transferasa de sulfato que producen los conjugados AFB<sub>1</sub>-glutatión, AFB<sub>1</sub>-glucurónido y AFB<sub>1</sub>-sulfato, respectivamente. En varios mamíferos, es la principal ruta de detoxificación de la AFB<sub>1</sub> activada y es esencial para la reducción y prevención de la carcinogenicidad producida por la AFB<sub>1</sub> (Rodríguez, 2011, Valdivia y col., 2012).

Ha sido aceptado que la actividad de la GST es inversamente correlacionada con la susceptibilidad de las especies animales a la AFB<sub>1</sub> (Valdivia y col., 2012).

La desintoxicación de AFB<sub>1</sub>, también se logra mediante la conjugación de los metabolitos AFQ<sub>1</sub> y AFP<sub>1</sub> con ácido glucurónico, reacción enzimática efectuada por la transferasa UDP-glucuronil para formar ésteres solubles del glucurónido que se excretan por la orina y bilis (Deshpande, 2002).

**1.5.5.3. Eliminación de AFB<sub>1</sub>.** Aproximadamente el 50% de la AFB<sub>1</sub> es eliminada por la bilis en su forma conjugada con glutatión, ácido glucurónico o con sulfato y entre el 15 y el 25% es eliminada por la orina de forma inalterada o previamente metabolizada. Su eliminación es lenta ya que sólo el 70-80% se elimina cuatro días después de haber sido ingerida según se ha observado en ratón, mono y rata. En sangre, una elevada proporción de AFB<sub>1</sub> se fija a la albúmina y una pequeña cantidad (1-10%) se une covalentemente a las proteínas hepáticas (Fernández y Ferrer, 2007).

## **1.6. BIOMARCADORES DE AFB<sub>1</sub>**

Para conocer la relación tóxico-organismo, se han identificado sustancias que indican sin lugar a dudas, que el organismo ha estado expuesto a sustancias tóxicas y la magnitud de la respuesta del organismo al contaminante. A estas sustancias se les denomina biomarcadores. El desarrollo de biomarcadores de AFB<sub>1</sub> es utilizarlos como predictores del estado de exposición, midiéndolos comúnmente en fluidos biológicos tales como sangre, orina o leche (Groopman y Wogan, 2011).

Se utilizan de manera importante para evaluar, *in vivo*, la eficacia de las estrategias de desintoxicación (adsorbentes, microorganismos y enzimas de desintoxicación) y quimoprevención de las enfermedades inducidas por la AFB<sub>1</sub> (Groopman y col., 2008; Solfrizzo y col., 2011).

### **1.6.1. Biomarcadores de exposición**

Se refiere a la medición del agente específico de interés, su metabolito (s), o sus productos interactivos específicos en un compartimiento corporal o líquido e indica la presencia y la magnitud de las exposiciones actuales y pasadas (Kensler y col., 2011). La medición de AFM<sub>1</sub> en leche materna, se ha utilizado como un indicador mucho más directo y fiable de la exposición real (Sugiyama y col., 2008; Almedia y col., 2013; Hassan y Kassaify, 2014). La ventaja de la leche materna como un fluido biológico es que se obtiene fácilmente durante la lactancia y permite la evaluación de la exposición a las aflatoxinas (Adejumo y col., 2013).

### **1.6.2. Biomarcadores de dosis interna y dosis biológicamente efectiva**

Son generalmente los metabolitos oxidativos y aductos de ADN y proteínas formados por el epóxido derivado de la aflatoxina. Estos biomarcadores se ilustran en la Figura No. 4.

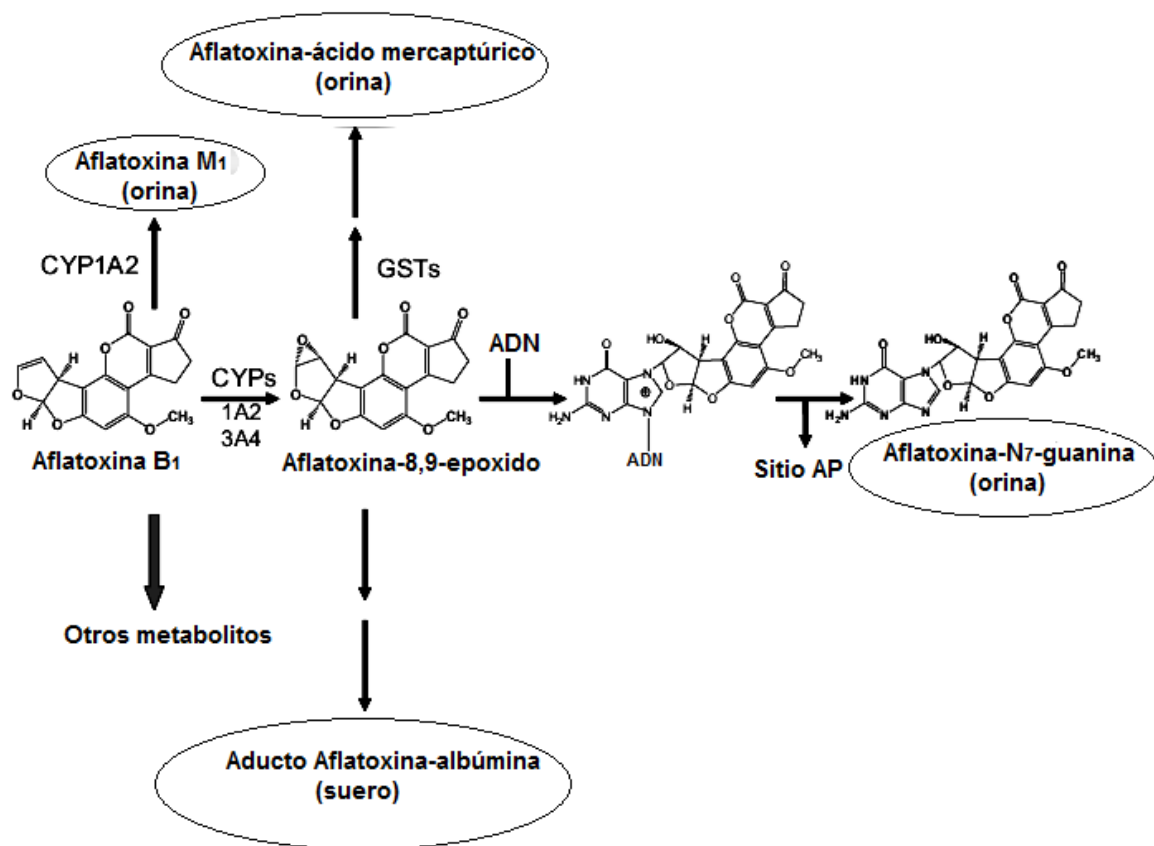


Figura No. 4. Biomarcadores de dosis interna (AFM<sub>1</sub>, ácido mercaptúrico y aducto aflatoxina-albúmina) y de dosis biológicamente efectiva (aflatoxina-N7-guanina). (Adaptado de Groopman y col., 2008)

Para medir este tipo de biomarcadores, la orina se ha utilizado como fluido biológico detectando la presencia de AFM<sub>1</sub> (Cassia y col., 2010).

### 1.7. AFLATOXINA M<sub>1</sub>

La AFM<sub>1</sub> es el derivado metabólico más importante de AFB<sub>1</sub>, el cual se excreta en la leche de animales que consumieron alimento contaminado con AFB<sub>1</sub>. Razón por la que se le designó su nombre de aflatoxina M (Milk Aflatoxin) (Battacone y col., 2005; Fernández y Ferrer, 2007; El-Tras y col., 2011).

Después de 12 a 24 horas de la primera ingestión, la toxina puede ser detectada en leche. Cuando la ingesta de alimento contaminado por AFB<sub>1</sub> es suspendida, la concentración de AFM<sub>1</sub> en la leche disminuye rápidamente, después de 72 horas (Van-Egmond, 1989; Masoero y col., 2009).

La concentración de AFM<sub>1</sub> en la leche variará según la especie animal, la cantidad de AFB<sub>1</sub> ingerida, la duración del consumo de alimento contaminado, el estado de salud

del animal y la eficacia de las medidas preventivas y de detoxificación (Rahimi y col., 2010; Corassin y col., 2013; Hassan y Kassaify, 2014).

Al mismo tiempo, debido al sistema metabólico de los animales poligástricos, las concentraciones de AFM<sub>1</sub> en la leche varían entre animales, de un día a otro, y de una producción de leche a la siguiente. El 0.4% de la AFM<sub>1</sub> pasa a la leche de vaca de tres a dieciocho horas después de ser ingerida la AFB<sub>1</sub> (Fernández y Ferrer, 2007). Stoloff (1980) menciona un rango de 0.4 a 3.0%.

Por otra parte, se sugiere que la presencia de AFM<sub>1</sub> está influenciada por la producción de leche, encontrando mayor eliminación de AFM<sub>1</sub> en vacas altas productoras comparativamente con las de baja producción (Masoreo y col., 2007; Britzi y col., 2013).

#### **1.7.1. Importancia de AFM<sub>1</sub>**

Esta toxina fue inicialmente clasificada por la IARC en el Grupo 2B con posible efecto carcinogénico en humanos (IARC, 1993), pero recientemente fue reclasificada en el Grupo I como agente carcinogénico (IARC, 2002). La AFM<sub>1</sub> también ha sido encontrada en leche materna de humanos (IACR, 2002), por lo que se demuestra que la contaminación de leche por AFM<sub>1</sub> tiene una gran extensión.

#### **1.7.2. Características de AFM<sub>1</sub>**

La distribución en la leche de la AFM<sub>1</sub> no es homogénea y se ha demostrado su alta afinidad a las proteínas, principalmente a la caseína (Galvano y col., 1996).

Brackett y Marth (1982) sugieren que la unión a la caseína se incrementa cuando la toxina en el suero excede 2.0 µg/L, entonces al incrementar la dosis de AFM<sub>1</sub>, la cantidad de toxina recuperada en los análisis disminuye.

La AFM<sub>1</sub> es una molécula de polaridad media, en el desnatado el 10% de la AFM<sub>1</sub> inicial de la leche pasa a la crema y en el batido el 10% de la AFM<sub>1</sub> de la crema pasa a la mantequilla, 60% al suero y 30% al agua de lavado. Esto hace que la contaminación de la AFM<sub>1</sub> en la mantequilla sea muy baja, inferior al 2% (Fernández y Ferrer, 2007).

Además, es estable en leche cruda y en productos lácteos procesados y no es afectada por pasteurización o procesos como los que se necesitan para fabricar queso o yogurt, (Stoloff, 1980; Rubio y col., 2011; Moosavy y col., 2013).

### 1.7.3. Métodos para disminuir la concentración de AFM<sub>1</sub> en la leche

En la actualidad no existe un método físico simple para descontaminar la leche de AFM<sub>1</sub>, sólo la acción combinada del calor y un pH bajo (como se utiliza en la producción de queso ricota) fue capaz de desnaturalizar las proteínas del suero a un punto en el que perdieron la capacidad de unión con AFM<sub>1</sub> (Barbiroli y col., 2007).

Al utilizar enzimas proteolíticas y otros tratamientos como ultrafiltración y acidez en leche de cabra y oveja, se demuestra que la interacción de la toxina con caseína o proteínas del suero no se ve influenciada (Brackett y Marth, 1982; Barbiroli y col., 2007).

Se han obtenido resultados alentadores haciendo uso de diferentes cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) y de *S. cerevisiae*, donde se ha visto su capacidad de unión a AFM<sub>1</sub> y podrían ser usadas como un agente biológico seguro para su reducción en leche (El Khoury y col., 2011; Corassin y col., 2013). Sin embargo, varios factores influyen sobre la formación y estabilidad del complejo AFM<sub>1</sub>-*S. cerevisiae* y/o BAL, tales como tipo de cepa, viabilidad de las células, tiempo de contacto, concentración de los microorganismos en leche, niveles de AFM<sub>1</sub>, pH y temperatura de incubación (Bovo y col., 2012; Corassin y col., 2013).

### 1.7.4. Metabolismo de AFM<sub>1</sub>

Aún no es del todo claro su metabolismo, activación y mecanismos de detoxificación en humanos, pero se sabe que la AFM<sub>1</sub> induce cáncer de hígado en roedores por un mecanismo similar a la AFB<sub>1</sub>, ya que es oxidada por las oxigenasas de la función mixta del CYP450 del hígado, oxidación que da lugar a un reactivo 8,9- epóxido que ataca los residuos de guanina de la doble hélice de ADN (Fernández y Ferrer, 2007).

Sin embargo, según Neal y col. (1998), la formación de epóxidos en hepatocitos humanos es menor que en células de rata y el mecanismo de detoxificación mediante la conjugación con la glutatión-S-transferasa es más rápida en ratones que en humanos. En dichos estudios, a diferencia de la AFB<sub>1</sub>, la AFM<sub>1</sub> parece tener un efecto citotóxico directo en células humanas que no precisa de activación metabólica previa.

## 1.8. LÍMITES MÁXIMOS PERMITIDOS DE AFB<sub>1</sub> POR LA COMUNIDAD EUROPEA

En el Cuadro No. 15, se muestran los límites máximos permitidos, por la Comunidad Europea (EC) expresados en partes por billón (ppb) en alimentos con una humedad del 12%.

**Cuadro No. 15. Límites máximos permitidos de AFB<sub>1</sub> por la Comunidad Europea**

Tipo de alimento	Límite máximo (ppb)
Materias primas para alimentación animal	20
Alimentos completos para cerdos, aves de corral, bovinos, ovinos y caprinos (excepto animales de producción lechera y animales jóvenes)	20
Alimentos completos para ganado lechero	5
Alimentos completos para terneros y borregos	10
Alimentos complementarios para cerdos, aves de corral, bovinos, ovinos y caprinos (excepto alimentos complementarios para ganado lechero, terneros, borregos y otros animales jóvenes)	20
Otros alimentos complementarios	5

Tomado de: Regulation EC, 2003.

### 1.8.1. LÍMITES MÁXIMOS PERMITIDOS DE AFM<sub>1</sub> POR LA COMUNIDAD EUROPEA

Para leche cruda, leche destinada a la fabricación de productos a base de leche y leche de consumo tratada térmicamente, la concentración máxima permitida de AFM<sub>1</sub> es de 0.05 µg/L o Kg (European Community, 2006).

Mientras que en el caso de preparados para lactantes, preparados de continuación (incluidas la leche para lactantes y la leche de continuación) y alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales dirigidos específicamente a los lactantes, la concentración máxima permitida es de: 0.025 microgramos/kg (Regulation EC, 2003).

## 1.9. LÍMITES MÁXIMOS PERMITIDOS DE AFLATOXINAS POR LA FDA

La Food and Drug Administration (FDA), dentro de otras categorías de productos, es el organismo que regula los límites máximos de aflatoxinas en los Estados Unidos de América. En el Cuadro No. 16, se muestran los límites máximos para aflatoxinas totales (µg/kg) en alimentos e ingredientes.



**Cuadro No. 16. Límites máximos permitidos de aflatoxinas por la FDA**

<b>Tipo de alimento</b>	<b>Límite máximo (µg/Kg)</b>
Maíz para animales jóvenes y ganado lechero	20
Productos de maíz y cacahuete para crías de ganado de engorda, cerdos y aves de corral maduras	100
Productos de maíz y cacahuete para finalización de cerdos	200
Productos de maíz y cacahuete para finalización de ganado de engorda	300
Harina de semilla de algodón (como ingrediente de alimento)	300
Todos los otros alimentos	20

Tomado de: FDA, 1977

**1.9.1. LÍMITES MÁXIMOS PERMITIDOS DE AFM<sub>1</sub> POR LA FDA**

Se estableció un límite máximo de 0.5 µg/L en contaminación de los productos lácteos líquidos con AFM<sub>1</sub> (FDA, 1977). Este valor es 10 veces más alto de lo que establece la EC. Esta evidente disparidad de criterios, en cuanto a la cantidad que puede representar un riesgo para la salud animal en primera instancia, y para la salud humana en consecuencia.

**1.10. LÍMITES MÁXIMOS PERMITIDOS DE AFM<sub>1</sub> POR MÉXICO**

La NORMA Oficial Mexicana *NOM-243-SSA1-2010*, Productos y servicios, leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos, disposiciones y especificaciones sanitarias, métodos de prueba, señala que la presencia de AFM<sub>1</sub> no debe rebasar el límite máximo de 0.5 µg/L. El límite es coincidente con el establecido por la FDA.

**1.11. MÉTODOS ANALITICOS PARA DETERMINAR AFM<sub>1</sub> EN LECHE**

Existen diferentes métodos analíticos que pueden ser utilizados, sin embargo, la selección siempre se debe basar en que el método a utilizar sea confiable, aplicable y práctico; deben ser lo suficientemente sensibles como para detectar por debajo de los límites legalmente impuestos (Horwitz, 1982; Kralj y Prosen, 2009).



### **1.11.1. Método analítico HPLC-FD**

El análisis de cromatografía líquida de alta resolución con detección fluorométrica (HPLC-FD) por sus siglas en inglés, acoplado a un tratamiento de extracción y limpieza por columnas de inmutofafinidad, es el método oficial (Método 2000.08) aprobado por la AOAC Internacional para determinación de AFM<sub>1</sub> en leche líquida (aplicable a la determinación de AFM<sub>1</sub> en la leche cruda líquida a > 0.02 ng/mL) (AOAC, 2001).

Este método presenta la mayor eficacia en la detección, sin embargo, tiene el inconveniente de que es largo y laborioso y requiere de equipo costoso y personal altamente capacitado (Rosi y col., 2007).

**1.11.1.1. Principio.** La muestra de ensayo se extrae y se limpia al pasar a través de una columna de inmutofafinidad que contiene anticuerpos específicos unidos a un soporte sólido. Los anticuerpos se unen selectivamente a cualquier aflatoxina M<sub>1</sub> (antígeno) contenida en el extracto, para dar un complejo antígeno-anticuerpo. Otros componentes de la matriz son lavados de la columna con agua. La AFM<sub>1</sub> de la columna se eluye con acetonitrilo. Después de que el eluato se concentra, la cantidad de AFM<sub>1</sub> se determina por Cromatografía Líquida con detección fluorimétrica (AOAC, 2001).

### **1.11.2. Método analítico ELISA**

El ensayo inmutofafinante ligado a enzima (ELISA) por sus siglas en inglés, es un método establecido como un ensayo confiable, con requerimientos de volumen de muestra bajos, varias muestras en corto tiempo y frecuentemente tiene menos requerimientos en cuanto a la limpieza de la muestra comparada con métodos convencionales como HPLC, y su estandarización para la aplicación de análisis de muestra de leche ha sido reportada en la Organización Internacional para pruebas estandarizadas (ISO, 2002).

Aunque en los ensayos inmutofafinmicos pueden sufrir el llamado efecto de matriz o interferencia matriz, debido a la interacción no específica de anticuerpos con sustancias diferentes en el analito y dar una subestimación o sobreestimación en los resultados; se ha comprobado que solo existe una ligera sobreestimación del contenido de aflatoxina al comprobarse una buena correlación entre esta técnica y HPLC, además de que el propósito del ensayo es revelar bajos niveles de contaminación (Rosi y col., 2007). Por lo tanto, se consideró utilizar el método de ELISA ya que es reconocido

ampliamente por su precisión y sensibilidad analítica (Aydemir y col., 2010; El Khoury y col., 2011; Mahdiyeh, 2013; Hassan y Kassaify, 2014).

**1.11.2.1. Principio.** El sustrato para la enzima es usualmente una sustancia cromogénica. El ensayo es frecuentemente realizado en 96 pocillos, pudiendo procesar un análisis simultáneo de 48 muestras por duplicado. Los tiempos de incubación son de 0.5-2 horas y el desarrollo de color es usualmente medido espectrofotométricamente, siendo la forma más simple, y provee resultados semicuantitativos o una respuesta si/no en cierto nivel de concentración o rango de concentración (Kralj y Prosen, 2009).

**1.12. PRODUCCIÓN DE LECHE A NIVEL MUNDIAL**

A nivel global, la producción de leche está creciendo con mayor rapidez que la de los otros sectores de productos clave, con excepción de la producción de carne de aves.

Para el 2019, se pronostica un incremento de producción, en comparación con el nivel promedio de 2007-2009, como se muestra en la Figura No. 5.

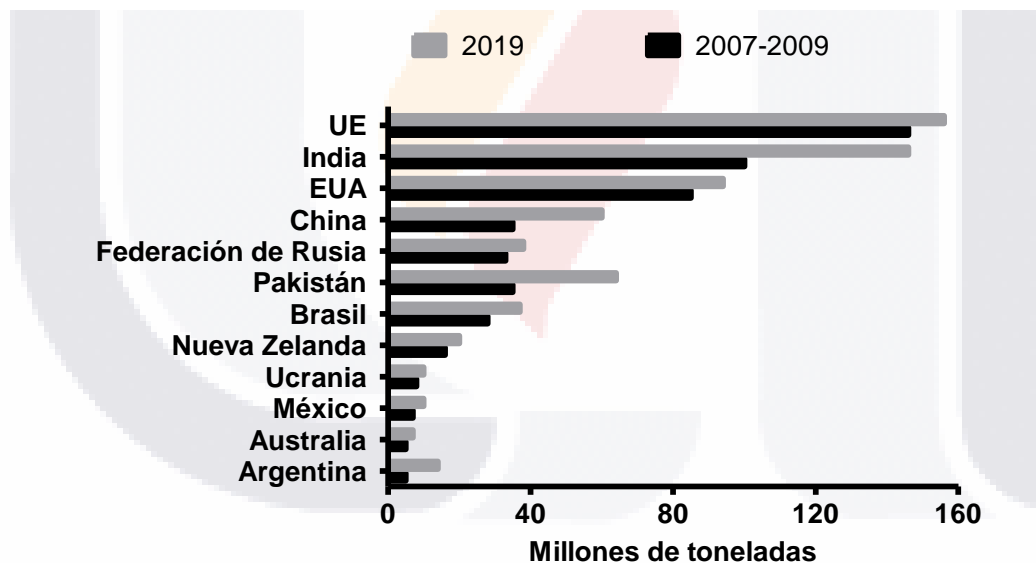


Figura No. 5. Incremento pronosticado para el 2019 en la producción de leche a nivel mundial (OCDE-FAO, 2010).

**1.12.1. Producción de Leche en México**

En México la producción de leche de bovino es muy heterogénea desde el punto de vista tecnológico, agroecológico y socioeconómico, incluyendo la gran variedad de climas regionales y características de tradiciones y costumbres de las poblaciones. Sin embargo,

la industria de productos lácteos es la tercera actividad más importante dentro de la rama de la industria de alimentos en México, y depende de la disponibilidad de la leche nacional su crecimiento (Secretaría de Economía, 2012).

**1.12.2. Producción de leche en el Estado de Aguascalientes**

De acuerdo con el INEGI (2013), Aguascalientes es considerado como una de las principales cuencas lecheras del país; del total de existencias de ganado bovino, el 70.7% corresponde a los vientres para producción de leche. Cuenta con una producción media diaria de leche de 1 millón 265 mil litros, la que lo coloca en el noveno lugar en el país con una aportación del 3.7 por ciento. Al interior del estado, los municipios que destacan como principales productores de leche son: Aguascalientes, Pabellón de Arteaga, Jesús María y San Francisco de los Romo, que en conjunto aportan el 78.8 por ciento de la producción media diaria de leche en el estado de Aguascalientes, ver la Figura No. 6.

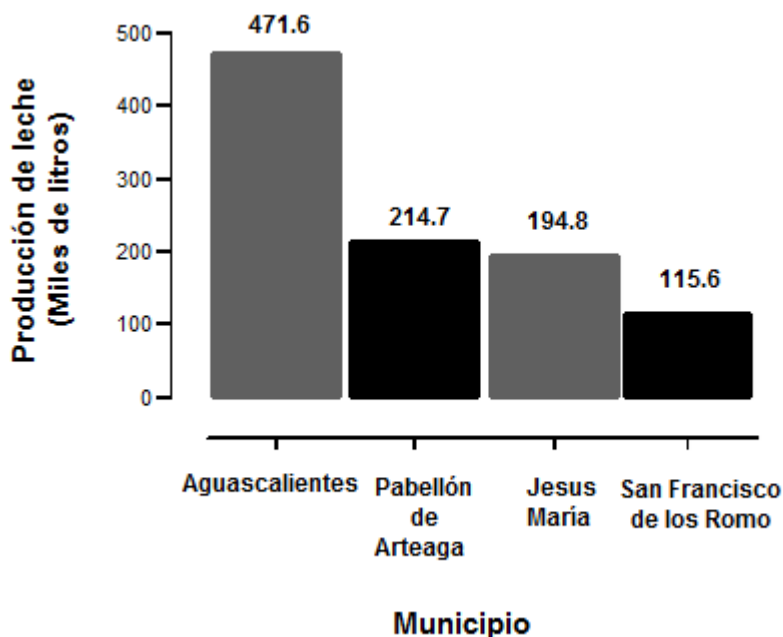


Figura No. 6. Producción media diaria de leche por principales municipios de Aguascalientes (INEGI, 2013).

**1.13. CONSUMO DE LECHE A NIVEL MUNDIAL**

Actualmente la mayor parte del consumo mundial de leche y sus derivados está concentrado en los países industrializados, incrementándose principalmente en los países en desarrollo como consecuencia de su mayor poder adquisitivo y de su mayor consumo per cápita, el mayor ritmo de crecimiento de la población en los países en desarrollo ha

contribuido a que la participación de estos últimos se haya incrementado en las últimas décadas. Se estima que la población mundial consume anualmente cerca de 500 millones de toneladas en equivalente leche en diversas presentaciones para alimento humano (OCDE- FAO, 2010).

#### **1.13.1. Consumo de leche en México**

Adicionalmente y de acuerdo con el INEGI, la leche es el tercer producto alimenticio más consumido en los hogares (uno de cada diez pesos del gasto de los hogares corresponde a dicho producto). Sin embargo, México no logra cubrir sus requerimientos de consumo ya que de acuerdo con datos de FAO (2012), México registró los mayores volúmenes de importación de productos lácteos en el 2011 en comparación con 19 países de América Latina y el Caribe. Se menciona que México junto con Venezuela, tienen déficits estructurales importantes en su balance comercial de lácteos. Por lo que es necesario optimizar la producción y calidad de la leche producida en nuestro país.

En resumen podemos decir que debido al poder carcinogénico de  $AFB_1$  y  $AFM_1$ , a la inminente contaminación de los alimentos para ganado con esas toxinas, a la importancia de Aguascalientes como uno de los estados productores de leche, a la importancia de la producción y consumo de productos lácteos inocuos, y a la posibilidad de evaluar el uso de productos adsorbentes de micotoxinas como alternativa para controlar los efectos nocivos en el ganado y la contaminación de la leche, se propuso desarrollar este estudio formulando las hipótesis y objetivos descritas a continuación.



## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1 HIPÓTESIS

La adición de un agente secuestrante de aflatoxinas a una dosis menor a la indicada por el fabricante y la mala calidad del almacenamiento del alimento en Unidades de Producción de Leche, son factores de riesgo que incrementan el nivel de AFM<sub>1</sub> en la leche.

### 2.2. OBJETIVOS

#### 2.2.1. Objetivo general

Determinar factores de riesgo asociados a los niveles de AFM<sub>1</sub> en Unidades de Producción de Leche.

#### 2.2.2. Objetivos específicos

2.2.2.1. Medir la concentración de AFM<sub>1</sub> en leche de vacas que consumen alimento adicionado o no, con productos secuestrantes de aflatoxinas.

2.2.2.2. Correlacionar los niveles de AFM<sub>1</sub> con factores de riesgo tales como la calidad en el almacenamiento del alimento y con el uso de diferentes dosis y sustancias activas de productos secuestrantes.

2.2.2.3. Correlacionar los niveles de la AFM<sub>1</sub> con la cantidad de alimento consumido por las vacas lecheras de acuerdo a su producción láctea.

2.2.2.4. Correlacionar los niveles de AFM<sub>1</sub> en leche de vacas con la época del año.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. TIPO DE ESTUDIO

El estudio realizado fue exploratorio, descriptivo, prospectivo y correlacional.

#### 3.2. LUGAR DE ESTUDIO

El presente estudio se realizó en tres Unidades Productoras de Leche (UPL) ubicadas en la región de El Llano, localizada al sudeste de la Ciudad de Aguascalientes, entre las coordenadas métricas 792249 zona 13 y 197969 zona 14 Oeste, y 2401296 y 2446481 zona 13 Norte. Tiene una superficie de 78,076.19 ha, de las cuales 67.82% corresponden al estado de Aguascalientes y 32.18% al de Jalisco (Figura No. 7).

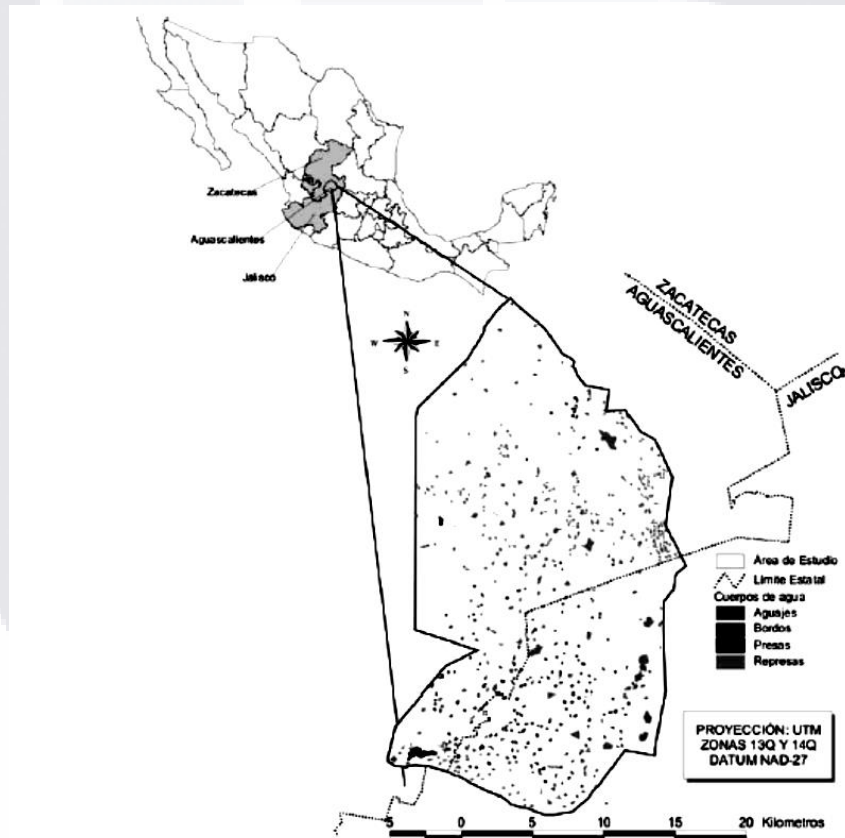


Figura No. 7. Localización de la región de El Llano (Medina Torres y col., 2007)

La Fisiografía de El Llano es una planicie que se extiende del sudeste de Aguascalientes hacia el noreste de Jalisco, en un gradiente altitudinal que varía de 2,000 a 2,050 m y forma parte de la Provincia de la Mesa Central y de la Sub-provincia de los Llanos de Ojuelos (INEGI 1993). Esta área tiene llanuras extensas de piso consolidado que forman una cuenca de origen volcánico rellena por intercalaciones de material clástico

continental de tipo fluvial como conglomerado, arcilla y arena. La vegetación nativa de El Llano ha sido desplazada por el sobre-pastoreo y la agricultura, pero aún persisten algunos remanentes de vegetación original, típica del Desierto Chihuahuense, como los agaves (*Agave spp.*), las nopaleras (*Opuntia spp.*), los mesquites (*Prosopis spp.*), los huizaches (*Acacia pp.*), y pastizal.

Los suelos, en su mayor parte, son someros y con un bajo contenido de materia orgánica. Los tipos que predominan en la zona son Planosol eutricto, Xerosol háplico, Planosol mólico, Xerosol lúvico, Feozem háplico y Fluvisol eutricto (INEGI 1981). El uso de la tierra es agrícola (temporal y riego) con algunas áreas de agostaderos. El clima en El Llano es semiseco-fresco con una temperatura media anual de 18 ° C y precipitación promedio de 500 mm.

### **3.2.1. Selección de las unidades de producción de leche**

Se realizó un muestreo no probabilístico; las tres UPL fueron seleccionadas por el método de conveniencia, en base a la disponibilidad de los propietarios para proporcionar el acceso a las instalaciones y a la información (Thrusfield, 1995). Las UPL fueron identificadas como UPL 1, UPL 2 y UPL 3.

La UPL 1 se localiza en el municipio de El Llano, Ags. y la UPL 2 y 3, en el Bajío de San José, Encarnación de Díaz, Jalisco.

Las tres UPL cuentan con características productivas y nivel de tecnificación similares:

- El 70% de la producción del ensilaje de maíz se produce en la unidad productiva correspondiente; el ensilaje de maíz corresponde al menos el 50% de la dieta.
- El ganado se distribuye en lotes de acuerdo a su nivel productivo (altas, medias y bajas).
- Las tres UPL adicionan diferentes tipos de secuestrante en la ración integral destinada al consumo de las vacas.

### **3.3. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE LECHE**

Se recolectaron 25 mL de leche cada 15 días, durante 12 meses durante la realización de la rutina de ordeño de las vacas de alta, media y baja producción.

Se utilizaron frascos limpios de plástico previamente identificados los cuales fueron transportados en condiciones de refrigeración y almacenados en congelación (-20°C) hasta su análisis.

### **3.4. RECOLECCIÓN DE DATOS**

Para la obtención de la información se elaboraron formatos para aplicar encuestas que incluyeron datos como: las condiciones de almacenamiento del alimento categorizándolas de acuerdo a tres niveles de calidad: mala, regular y buena; el uso de agentes secuestrantes y la producción en litros de leche de acuerdo al nivel productivo de las vacas (altas, medias y bajas).

Durante el estudio, los alimentos para el ganado de las UPL, se analizaron para conocer el nivel de AF en el concentrado, el ensilaje y en la ración integral. Los datos se recuperaron para nuestro estudio.

#### **3.4.1. Categorización de las condiciones de almacenamiento del alimento**

Por cada visita realizada a las UPL, se aplicaba una encuesta para comparar las condiciones de las ULP con lo indicado en *Codex Alimentarius* como factores detonantes para la producción de aflatoxinas. El formato diseñado para llevar a cabo esta actividad (Anexo A), consta de 17 condiciones o prácticas que estaban sujetas a la verificación de su cumplimiento o incumplimiento, colocando un **1** cuando se cumplía con la práctica y un **0** cuando no, obteniendo al final de la encuesta una puntuación total que serviría para categorizar las condiciones de almacenamiento del alimento como se indica a continuación:

La realización de las 17 condiciones o prácticas daban lugar a 17 puntos, los que corresponden al 100% del cumplimiento. Así, en cada una de las visitas se obtenía una puntuación por cada UPL y el porcentaje de cumplimiento, el que finalmente se utilizaba para categorizar a la calidad del almacenamiento en **Mala, Regular** o **Buena**, de acuerdo a una escala de porcentajes que también se encuentra en el formato utilizado.

Por último, se codificaron los tres niveles de la categoría calidad (Mala, Regular y Buena), de forma numérica y en orden ascendente (1, 2 y 3) para ser incluidos de esta forma en la base de datos elaborada en una hoja de cálculo (*Excel, Microsoft®*) y ser sometidos a un análisis estadístico.



### **3.4.2. Uso de agentes secuestrantes**

Del mismo modo, en cada visita a las UPL, se aplicaba una encuesta para recabar información sobre el secuestrante utilizado, haciendo uso de un formato diseñado para llevar a cabo esta actividad (Anexo B). Se recopilaba la información sobre el nombre comercial del agente secuestrante, la sustancia activa y la dosis aplicada a la ración integral, diferenciando entre los lotes de alta, media y baja producción del ganado. Los datos obtenidos en cada visita se integraban en la base de datos antes mencionada. Así mismo, se recopilaron las fichas técnicas de los productos secuestrantes utilizados (Anexo C). En las fichas técnicas, se consultaba la dosis (g/vaca/día) que indicaba el fabricante para su aplicación a la ración integral y posteriormente se ingresaba esta información a la base de datos.

### **3.5. CUANTIFICACIÓN DE AFM<sub>1</sub> EN MUESTRAS DE LECHE**

Se realizaron 432 análisis correspondientes a 216 muestras de leche cruda para determinar el nivel de AFM<sub>1</sub> mediante ELISA competitivo utilizando un kit comercial (*Ridascreen<sup>®</sup> Aflatoxin M<sub>1</sub> r-biopharm*).

El rango de detección fue 5 a 80 ppt. Con los valores de lectura de los estándares (0, 5, 10, 20, 40 y 80 ppt), se elaboró una curva estándar para cuantificar el nivel de AFM<sub>1</sub> en las muestras. El protocolo se realizó de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Anexo D).

Los valores de las concentraciones de AFM<sub>1</sub> detectadas en la leche, se capturaron en una base de datos para ser considerados como variable dependiente o de respuesta.

### **3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS**

Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de estadístico mediante Chi-cuadrada, Razón de Momios (OD), ANOVA y la Prueba de Rangos Múltiples de Bonferroni. Las deferencias encontradas se consideraron estadísticamente significativas cuando  $P \leq 0.05$ . Para todos los análisis estadísticos, se utilizó el Software *Statgraphics Centurion*, *Statpoint Technologies, Inc*, versión 15.2.05.

#### **3.6.1. Análisis estadístico para determinar el grado de asociación entre las variables.**

Se construyó una tabla bidireccional que muestra la ocurrencia de todos los pares únicos de valores en las dos columnas. Las frecuencias se presentan en forma tabular.

Como ya se estableció, los factores de riesgo considerados fueron: Uso del secuestrante, la dosis indicada del secuestrante y la calidad de las condiciones de almacenamiento. Estas tres variables fueron categorizadas de forma numérica de acuerdo a sus atributos.

Así mismo, se realizó el procedimiento de tabulación cruzada con los niveles de AFM<sub>1</sub>, con valores que superaron el Límite Máximo Permissible (>LMP) considerado por la UE en la leche.

Se realizó la prueba de Chi-cuadrada para determinar si hay independencia estadísticamente significativa entre los niveles de AFM<sub>1</sub> y los factores de riesgo. En este caso, la independencia implica si los factores de riesgo tienen o no relación causal, con el LMP de AFM<sub>1</sub> en la leche. Se consideró un nivel de probabilidad de  $P < 0.05$ .

La comparación de las frecuencias esperadas y observadas se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$X^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

Dónde:

$X^2$  = Símbolo griego que es pronunciado “Chi-cuadrada”

O= Frecuencia del valor observado

E= Frecuencia del valor esperado

Entonces:

Chi-cuadrada es igual a =

$$\frac{( \text{Frecuencia de los valores observados} - \text{Frecuencia de los valores esperados} )^2}{\text{Frecuencia de los valores esperados}}$$

**Ejemplo:**

Tabla de valores observados

50	25
40	45

Tabla de valores esperados

42.1875	32.8125
47.8125	37.1875

$$X^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

$$X^2 = \frac{(50 - 42.1875)^2}{42.1875} + \frac{(25 - 32.8125)^2}{32.8125} + \frac{(40 - 47.8125)^2}{47.8125} + \frac{(45 - 37.1875)^2}{37.1875}$$

$$X^2 = 1.4468 + 1.8601 + 1.2766 + 1.6413 = 6.2248$$

**3.6.2. Análisis estadístico para determinar el grado o probabilidad de ocurrencia de AFM<sub>1</sub> en la leche.**

Se realizó la razón de momios (OR) para determinar el grado o probabilidad de ocurrencia de superar el LMP de AFM<sub>1</sub> en las muestras analizadas a causa del uso del secuestrante, la dosis indicada del secuestrante y las condiciones de almacenamiento.

La razón de momios se obtuvo de la siguiente fórmula:

$$\text{Odds ratio o razón de odds (OR)} = (a/b) / (c/d) = OR = \frac{a.d}{b.c}$$

Para mostrar la definición de la razón de momios, se puede hacer referencia a la tabla estándar de 2x2.

	Casos	Controles
Expuestos	a	b
No expuestos	c	d

Dónde:

a= casos expuestos

b= controles expuestos

c= casos no expuestos

d= controles no expuestos

OR= casos expuestos

$$OR = \frac{\text{"odds" expuestos}}{\text{"odds" no expuestos}} = \frac{\text{casos expuestos} / \text{casos no expuestos}}{\text{controles expuestos} / \text{controles no expuestos}} = \frac{\text{casos expuestos} * \text{controles no expuestos}}{\text{casos no expuestos} * \text{controles expuestos}}$$

Entonces: Los momios de un evento (OR) son iguales a la probabilidad de un evento dividida por la probabilidad de que el evento no ocurra.

**3.6.3. Análisis estadístico para comparar el nivel de AFM<sub>1</sub> entre las UPL y estaciones del año.**

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95 %, para comparar los valores de la concentración media de AFM<sub>1</sub> entre las tres diferentes UPL.

Este análisis también se utilizó para comparar los niveles de AFM<sub>1</sub> y de AF con relación a las estaciones del año. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, se utilizó la prueba de rangos múltiples de Bonferroni.

#### **3.6.4. Análisis estadístico para comparar el nivel de AFM<sub>1</sub> entre los lotes productivos y entre los diferentes agentes secuestrantes.**

Se realizó un ANOVA con un nivel de confianza del 95 %, para comparar la concentración media de AFM<sub>1</sub> entre los diferentes lotes productivos.

Así mismo, el análisis se realizó para comparar la concentración media de AFM<sub>1</sub> entre los diferentes agentes secuestrantes. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, se utilizó la prueba de rangos múltiples de Bonferroni.



## 4. RESULTADOS

### 4.1. PRESENCIA DE AFM<sub>1</sub> EN LAS MUESTRAS DE LECHE

54.16% de las muestras de leche analizadas tuvieron niveles detectables de AFM<sub>1</sub>, donde 34.18% corresponde a las UPL 1 y 3, mientras que el 31.62% corresponde a la UPL 2.

Ninguna de estas muestras superó el LMP establecido por la Norma Oficial Mexicana (0.5 µg/L); sin embargo, 47% superó el LMP establecido por la UE (0.05 µg/L). La presencia detectada de AFM<sub>1</sub> en la región denominada el Llano, México; indicó que la falta de inocuidad de la leche es una problemática que está vigente en la región denominada el Llano, México.

### 4.2. PRESENCIA DE AF EN EL CONCENTRADO, EL ENSILAJE DE MAÍZ Y LA RACIÓN INTEGRAL.

El 100% de las muestras analizadas de concentrado, del ensilaje de maíz y de la ración integral tuvieron niveles detectables de AF, donde el 99% superó el LMP de AF (20 µg/Kg) por la UE y la FDA. 49.9% corresponde al concentrado, el 33.2% al ensilaje de maíz y el 16% a la ración integral. La presencia detectada de las AF con niveles superiores al LMP, indicó también la falta de inocuidad en los alimentos para el ganado lechero está vigente en la zona.

### 4.3. GRADO DE ASOCIACIÓN ENTRE LAS VARIABLES CONSIDERADAS COMO FACTORES DE RIESGO Y LOS NIVELES DE AFM<sub>1</sub>

De acuerdo al análisis de Chi-cuadrada se observó una dependencia altamente significativa ( $P < 0.01$ ; Cuadro No. 17) entre cumplir o no cumplir con las indicaciones de dosis del agente secuestrante y el efecto de superar o no el nivel del LMP de AFM<sub>1</sub>. Este mismo efecto se observó con la calidad de almacenamiento ( $P < 0.01$ ). Es decir, se estableció una asociación causal entre el nivel de AFM<sub>1</sub> y estos factores de riesgo.

En contraste, no se observó dependencia significativa ( $P > 0.05$ ) entre usar o no un agente secuestrante, por lo que el nivel de AFM<sub>1</sub>, pudiera ser atribuible al azar, en este caso.

De acuerdo al análisis de momios se observó que el efecto de superar el LMP de AFM<sub>1</sub> en la leche, es 2.2 veces más probable cuando no se cumple con las indicaciones

del fabricante con respecto a la dosis del agente secuestrante, en contraparte del cumplimiento de la indicación. Un efecto similar se observó con la calidad de almacenamiento del alimento, en donde se observó que el efecto de superar el LMP de AFM<sub>1</sub> en la leche, es casi dos veces más probable, con una mala calidad de almacenamiento que cuando las condiciones de almacenamiento son buenas.

Es decir, la probabilidad o posibilidad de superar el LMP de AFM<sub>1</sub> en la leche, es significativamente más alta cuando no se cumple con la indicación del fabricante con respecto a la dosis utilizada de secuestrante y cuando las condiciones de calidad de almacenamiento de alimento son malas.

**Cuadro No. 17. Grado de asociación entre las variables consideradas como factores de riesgo y los niveles que superan el LMP de AFM<sub>1</sub>**

Factor de riesgo	Muestras (n)	>LMP (%)	Chi-Cuadrada	OR	Valor de P
Indicación del fabricante (dosis)					
• No Cumple	116	33.62	12.322	2.20124	0.0004
• Cumple	100	19.00			
Uso del secuestrante					
• No	47	28.72	0.164	1.11045	0.6858
• Si	169	26.62			
Calidad de almacenamiento					
• Mala	72	36.1	8.932	1.97826	0.0115
• Regular	72	22.9			
• Buena	72	22.2			

(P <0.05) Estadísticamente significativo.

En concordancia a lo observado en la prueba de independencia Chi-cuadrada, con relación al uso de secuestrante, la razón de momios = 1, significa que la probabilidad de superar el LMP de AFM<sub>1</sub> aparecerá independientemente si el agente secuestrante se adiciona o no, porque destaca más el efecto de cumplir o no cumplir con la dosis de secuestrante indicada por el fabricante.

#### 4.4. COMPARACIÓN DEL NIVEL DE AFM<sub>1</sub> ENTRE LAS UPL

De acuerdo al ANOVA, existe una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) de la concentración media de AFM<sub>1</sub>, entre las tres UPL.

La concentración media de AFM<sub>1</sub> detectada en la leche de la UPL 1, fue superior a la detectada en las UPL 2 y 3, obteniendo una diferencia estadísticamente significativa (Cuadro No. 18).

**Cuadro No. 18. Diferencia de la concentración media de AFM<sub>1</sub> entre las tres UPL**

UPL	Media (µg/L)	EE	Límite inferior	Límite superior
1	0.032 <sup>a</sup>	0.0027	0.027	0.037
2	0.023 <sup>b</sup>	0.0027	0.018	0.028
3	0.022 <sup>b</sup>	0.0027	0.017	0.026

\*Intervalos de confianza basados en el procedimiento de comparación de rango de amplitud múltiple de Bonferroni. Literales (<sup>a-b</sup>) diferentes indican diferencia en la concentración media de AFM<sub>1</sub> entre las UPL ( $P < 0.05$ ). EE: error estándar.

Dado que la UPL1 presentó de una forma significativa el mayor nivel de AFM<sub>1</sub> en la leche, podemos inferir que su mala calidad del almacenamiento del alimento, que estuvo presente durante todo el estudio, fue uno de los factores de riesgo asociados a este resultado.

#### 4.5. COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE AFM<sub>1</sub> Y AF CON RELACIÓN A LAS ESTACIONES DEL AÑO

De acuerdo con el ANOVA, se encontró una diferencia altamente significativa entre la concentración media de AF y AFM<sub>1</sub> ( $P < 0.01$ ) con respecto a las estaciones del año. Esto parece confirmar que existe un efecto de estacionalidad con respecto a la concentración de AF en el alimento y AFM<sub>1</sub> en la leche.

Conforme con la prueba de rangos múltiples de Bonferroni, a través de las estaciones del año se observaron tres grupos significativamente diferentes entre su concentración media de AFM<sub>1</sub> (Cuadro No. 19); mientras que para AF en la ración integral se observaron solo dos grupos significativamente diferentes.

**Cuadro No.19. Diferencia de la concentración media de AF y AFM<sub>1</sub> entre las estaciones del año**

Estación del año	Media AF (µg/L)	EE	Media AFM <sub>1</sub> (µg/Kg)	EE
Primavera (1 Marzo – 31 Mayo)	7.208 <sup>b</sup>	1.0205	0.001 <sup>c</sup>	0.0026
Verano (1 Junio – 31 Agosto)	8.174 <sup>b</sup>	1.0205	0.020 <sup>b</sup>	0.0026
Otoño (1 Septiembre – 30 Noviembre)	19.459 <sup>a</sup>	1.0301	0.057 <sup>a</sup>	0.0026
Invierno (1 Diciembre – 28 Febrero)	9.875 <sup>b</sup>	1.0112	0.025 <sup>b</sup>	0.0026

\*Intervalos de confianza basados en el procedimiento de comparación de rango de amplitud múltiple de Bonferroni. Literales (<sup>a-b</sup>) diferentes indican diferencia en la concentración media de AF y AFM<sub>1</sub> entre las estaciones del año ( $P<0.01$ ). EE: error estándar.

Tanto las AF como la AFM<sub>1</sub> se encontraron en niveles superiores en otoño, en comparación con las otras estaciones del año, lo cual pudiera confirmar un efecto de estacionalidad en la contaminación por aflatoxinas.

#### **4.6. COMPARACIÓN DEL NIVEL DE AFM<sub>1</sub> ENTRE LOS LOTES PRODUCTIVOS**

En contraste a lo esperado, de acuerdo al ANOVA no se observó una diferencia estadísticamente significativa ( $P>0.05$ ) entre la concentración media de AFM<sub>1</sub> de los diferentes lotes productivos, es decir de acuerdo al consumo de alimento.

Los resultados son atribuidos posiblemente a que en nuestro estudio no se controló el nivel de exposición del ganado a la AFB<sub>1</sub>, aspecto que es muy importante para determinar la tasa de eliminación de AFM<sub>1</sub>.

#### **4.7. COMPARACIÓN DEL NIVEL DE AF Y AFM<sub>1</sub> CON RELACIÓN AL USO DE DIFERENTES AGENTES SECUESTRANTES**

El ANOVA mostró una diferencia altamente significativa ( $P<0.01$ ) en la concentración media de AF y AFM<sub>1</sub>, al utilizar diferentes agentes secuestrantes (Cuadro No. 20).

Además, nuevamente se confirma que los niveles detectados de AFM<sub>1</sub> en la leche son atribuidos a la dosis de AF en el alimento, además de los agentes secuestrantes.



**Cuadro No. 20. Diferencia observada en la concentración media de AF y AFM<sub>1</sub> al utilizar diferentes agentes secuestrantes**

Agente secuestrante	Media AFM <sub>1</sub> (µg/L)	EE	Media AF (µg/Kg)	EE
Arcilla organofílica	0.024 <sup>c</sup>	0.0039	7.661 <sup>d</sup>	1.2999
HSCAS + paredes celulares	0.019 <sup>c</sup>	0.0028	8.918 <sup>cd</sup>	0.955
NA	0.025 <sup>c</sup>	0.0033	9.480 <sup>cd</sup>	1.1056
Organoaluminosilicato	0.026 <sup>c</sup>	0.0029	14.011 <sup>b</sup>	0.9785
Bentonita	0.046 <sup>b</sup>	0.0093	14.900 <sup>bc</sup>	3.0945
Montmorillonita	0.080 <sup>a</sup>	0.0131	34.540 <sup>a</sup>	4.3763
HSCAS activado	0.080 <sup>a</sup>	0.0131	34.540 <sup>a</sup>	4.3763

\*Intervalos de confianza basados en el procedimiento de comparación de rango de amplitud múltiple de Bonferroni. Literales (<sup>a-b-c</sup>) diferentes indican diferencia en la concentración media de AF y AFM<sub>1</sub> al utilizar diferentes agentes secuestrantes ( $P < 0.01$ ). NA: No aplica, HSCAS: Aluminosilicatos hidratados de calcio y sodio. EE: error estándar.

La concentración media de AFM<sub>1</sub> fue la más baja, al adicionar alguno de los agentes secuestrantes del grupo C. Mientras que la media de AFM<sub>1</sub> al aplicar alguno de los agentes secuestrantes de los grupos A y B fue superior. Esto pudiera interpretarse como una pobre eficacia de los agentes secuestrantes que integran estos dos grupos.

Sin embargo, esa aparente ineficiencia de los agentes secuestrantes de los grupos A y B, pudiera estar influenciada en primera instancia por la subdosificación de los agentes secuestrantes, ya que durante la aplicación de encuestas con respecto al uso de los agentes secuestrantes de estos grupos, se informó que hubo ocasiones donde no se agregó la dosis indicada por el fabricante. Lo cual fortalece nuestra hipótesis de que la adición de un agente secuestrante de aflatoxinas a una dosis menor a la indicada por el fabricante, es un factor de riesgo que incrementa el nivel de AFM<sub>1</sub> en la leche.

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. PRESENCIA DE AFM<sub>1</sub> EN LA LECHE CRUDA DE VACA

En diferentes estudios realizados en México, se ha reportado una alta incidencia de AFM<sub>1</sub> en la leche cruda de vaca. Pérez y col. (2008), obtuvieron niveles detectables de AFM<sub>1</sub> en el 80% de las muestras analizadas, mientras que Reyes y col. (2009), reportan el 50%. Sin embargo en un estudio más reciente, Landeros y col. (2012), obtuvieron una incidencia del 100%.

En nuestro estudio se obtuvieron niveles detectables de AFM<sub>1</sub> en el 54.16% de las muestras de leche analizadas, confirmando la alta incidencia de AFM<sub>1</sub> que ya se ha reportado en nuestro país.

Desde hace tiempo a la fecha, los niveles de AFM<sub>1</sub> detectados en otros países muestran amplias diferencias, demostrándose la relación causal de los sistemas de alimentación, factores propios de los animales y las condiciones ambientales (Galvano y col., 1996; Hassan y Kassaify, 2014; Tomasevic y col., 2015), así como por los procedimientos analíticos utilizados (Horwitz, 1982; Kralj y Prosen, 2009).

En Brasil, encontraron alta incidencia de AFM<sub>1</sub> (95.2 % y 67 %,) (Shundo y col., 2009; Iha y col., 2011 respectivamente). En contraste otro estudio, Rodríguez y col. (2003) reportaron una incidencia de AFM<sub>1</sub> del 3.3 % en muestras de leche obtenida de establos de la provincia de León, España. La ocurrencia de AFM<sub>1</sub> en niveles bajos en los países europeos puede sugerir una regulación estricta de AFB<sub>1</sub> en los alimentos complementarios para ganado lechero (Rahimi y col., 2010).

### 5.2. FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS AL NIVEL DE AFM<sub>1</sub>

#### 5.2.1. Uso de agentes secuestrantes

En nuestro estudio fue evidente que la inclusión del secuestrante, a la dosis indicada por el fabricante tuvo una relación causal altamente significativa ( $P < 0.01$ ) con el nivel de AFM<sub>1</sub> detectado en las muestras de leche.

Con respecto a los agentes secuestrantes, nuestros resultados coinciden con otros autores, ya que desde hace tiempo se reporta que la capacidad de los agentes secuestrantes para unirse y adsorber a la AFB<sub>1</sub> depende en gran parte de la dosis empleada (Galvano y col., 2001). Sabater-Vilar y col., (2007), al probar la capacidad de unión de varios agentes secuestrantes, obtuvieron que el mejor producto exhibió una

capacidad de unión >97%, indicando que los productos fueron utilizados solo en una inclusión de 2.5 mg/mL, la cual correspondía a la concentración recomendada por las compañías de distribución comercial. Así mismo, se ha reportado con anterioridad que la mayoría de los agentes secuestrantes han sido reconocidos como adsorbentes eficientes para aflatoxinas, cuando se adicionan a la RTM (ración totalmente mezclada) a una concentración de 10 g/vaca/día, en un rango de 5 a 20 g/vaca/día (Smith y col., 1994; Pierre, 2007), lo cual corresponde con las concentraciones indicadas como preventivas por la mayoría de los agentes secuestrantes en su presentación comercial.

Por otra parte, en nuestro estudio se observó que la probabilidad de superar el LMP de AFM<sub>1</sub> aparecerá independientemente si el agente secuestrante se adiciona o no, porque destaca más el efecto de cumplir o no cumplir con la dosis de secuestrante indicada por el fabricante. Sin embargo, además de la importancia de utilizar un secuestrante a la dosis indicada por el fabricante, Battacone y col., (2003), reportaron que la concentración de AFM<sub>1</sub> en la leche fue significativamente influenciada por la dosis de AFB<sub>1</sub> en el alimento. De acuerdo con Huwig y col., (2001), también es necesario tomar en cuenta las características fisicoquímicas del secuestrante y de la micotoxina, ya que son factores que influyen para que se lleve a cabo el fenómeno de adsorción.

Por lo tanto, no existe hasta el momento un adsorbente con la capacidad de aglutinar varias micotoxinas, justificando así, que en la actualidad exista una amplia gama de productos secuestrantes de micotoxinas de forma comercial (Tapia y col., 2010) y que los productores de leche utilicen varios productos comerciales, tal es el caso de las UPL que colaboraron en nuestro estudio.

De los agentes secuestrantes utilizados por las UPL durante nuestro estudio, el que mostró ser más eficaz, en base a la prueba de rangos múltiples, fue la mezcla de HSCAS con pared celular de levadura, con la concentración media de AFM<sub>1</sub> más baja en la leche (0.019 µg/L). Mientras que cuando se utilizaba el HSCAS activado solo, se observó una pobre eficacia en la adsorción, de acuerdo con la estimación promedio de AFM<sub>1</sub> detectada en la leche (0.080 µg/L).

Nuestros resultados difieren con lo reportado por varios autores, quienes encontraron una mayor capacidad de unión del HSCAS activado a la AFB<sub>1</sub>, que la presentada por los productos a base de pared celular de levadura o a base de la combinación de HSCAS con pared celular de levadura ( $P < 0.001$ ) (Vekiru y col., 2007; Moschini y col., 2008; Juan-juan y col., 2010; Fruhauf y col., 2011).

El contraste con nuestros resultados se debe posiblemente a que la dosis administrada del HSCAS activado por las UPL, no fue la indicada por el fabricante en la mayoría de las ocasiones en que se adicionó al alimento, considerando la dependencia que esta variable mostró con el nivel de AFM<sub>1</sub> en la leche.

### **5.2.2. Calidad del almacenamiento del alimento**

En nuestro estudio, una buena calidad del almacenamiento del alimento, también resultó tener relación causal significativa ( $P < 0.05$ ) con el nivel de AFM<sub>1</sub> detectado en las muestras de leche.

Diversos estudios indican que la contaminación por AF no está restringida a ningún componente de la ración integral para el ganado lechero, pero el nivel de contaminación varía, dentro de otras cosas, por las condiciones de almacenamiento. Bajo condiciones de almacenamiento inapropiadas, las aflatoxinas se pueden formar en casi cualquier semilla de la cosecha (Wicklow, 1995; *Códex Alimentarius*, 2012; Alonso y col., 2013).

Se sabe que en la ganadería lechera es necesario que los insumos que integran la ración integral para el consumo del ganado, se almacenen para contar con ellos durante el año. El ensilaje, es uno de los métodos que con mayor frecuencia se utiliza para el almacenamiento y la preservación de forrajes (Bucio-Villalobos y col., 2001; Richard y col., 2007; Richard y col., 2009; Hutnik y Kobiela; 2012). En nuestro estudio, las UPL incluían al ensilaje de maíz en casi el 50% de la ración integral proporcionada al ganado.

Cuando no se llevan a cabo buenas prácticas en la fabricación y almacenamiento del ensilaje de maíz, las aflatoxinas son de las micotoxinas que con mayor frecuencia se han encontrado, las cuales permanecen en el ensilaje aún después de haber desaparecido el hongo (Roigé y col., 2009; Li y Nishino, 2011). De acuerdo con nuestros resultados, de las tres UPL, la UPL<sub>1</sub> fue la que obtuvo el mayor porcentaje de muestras de ensilaje con niveles de AF superiores al LMP, estipulado por la FDA y por la UE (20 µg/Kg). Cabe señalar, que la UPL<sub>1</sub>, se categorizó durante todo el periodo de estudio con una mala calidad de almacenamiento de alimento.

La semilla de algodón es uno de los insumos que con mayor frecuencia conforma la ración integral del ganado lechero. Thota y col. (1977), mencionan que las semillas de algodón pueden estar contaminadas internamente durante el almacenamiento, tras el desmotado, si las esporas de *A. flavus* están presentes en la superficie de la semilla en el momento del almacenamiento y de acuerdo con Alonso y col. (2010), pueden representar

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

un alto riesgo cuando son aplicadas en la ración integral del ganado lechero ya que es de los productos agrícolas que son frecuentemente contaminados con AF (Zheng y col., 2006).

Al inicio del estudio, a dos de las UPL, las pasteurizadoras les estaban reportando niveles de AFM<sub>1</sub> en la leche, por lo que decidieron realizar una prueba empírica de retiro de la semilla de algodón, obteniendo resultados satisfactorios ya que el problema se controló.

### **5.3. CONCENTRACIÓN DE AFM<sub>1</sub> EN LA LECHE ASOCIADA AL NIVEL PRODUCTIVO DEL GANADO.**

La etapa temprana de lactación y la etapa de alta producción del ganado lechero han sido identificadas como de los principales factores que contribuyen a incrementar el porcentaje de eliminación de AFM<sub>1</sub> (Munksgaard y col., 1987; Masoreo y col., 2007; Britzi y col., 2013).

En nuestro estudio no se encontró diferencia estadísticamente significativa ( $P>0.05$ ) entre los tres niveles de producción, con relación a la concentración de AFM<sub>1</sub> en la leche. Sin embargo, debido a que este estudio fue de tipo no experimental, no tuvimos control sobre el nivel de ingesta de AFB<sub>1</sub> en el ganado lechero. Esto contrasta con los estudios experimentales, en los cuales todas las vacas recibieron AFB<sub>1</sub>, considerando el mismo nivel de exposición, para predecir la relación entre la tasa de eliminación (%) y la producción de leche (kg), en los que encontraron que la producción de leche es el principal factor que afecta la excreción total de AFM<sub>1</sub> (Masoreo y col., 2007).

### **5.4. CONCENTRACIÓN DE AFM<sub>1</sub> EN LA LECHE ASOCIADA A LAS ESTACIONES DEL AÑO.**

Las concentraciones más altas de AFM<sub>1</sub> en la leche fueron detectadas en otoño, coincidiendo con los niveles más altos de AF en el alimento. Estudios diversos realizados en México, han reportado que la contaminación de leche por AFM<sub>1</sub> está influenciada por los factores climáticos estacionales, principalmente en época otoño-invierno (Córdova y col., 2007; Pérez y col., 2008; Landeros y col., 2012). La estación de otoño comprende los meses de septiembre, octubre y noviembre; caracterizándose por ser de un clima seco.

Sultana y Hanif (2009), mencionan que durante los períodos de estrés por sequía, *A. flavus* puede convertirse en una especie dominante en el suelo, debido a su capacidad para crecer a altas temperaturas y con poca cantidad de agua. Por lo tanto, de acuerdo a

nuestros resultados y a lo reportado, la estacionalidad influye de manera significativa en la presencia de AF y de AFM<sub>1</sub> en la leche.



## 6. CONCLUSIONES

1. La presencia de AFM<sub>1</sub> en el 54.16% de las muestras de leche analizadas, indica que la problemática con la falta de inocuidad de la leche, está vigente en la región denominada el Llano, México, lo que muestra que la población consumidora de leche y productos lácteos está expuesta a la AFM<sub>1</sub>.
3. El uso del secuestrante, la dosis indicada del secuestrante y la calidad de las condiciones de almacenamiento del alimento, son factores de riesgo asociados al nivel de AFM<sub>1</sub> en la leche.
4. Los agentes secuestrantes de aflatoxinas adicionados en una dosis inferior a la indicada por el fabricante, fueron asociados con niveles que superaron el LMP de AFM<sub>1</sub> en la leche.
5. La mala calidad en las condiciones de almacenamiento del alimento, fue asociada con niveles mayores al LMP de AFM<sub>1</sub> en la leche.
6. La presencia de AF y las concentraciones de AFM<sub>1</sub> en las unidades de producción de leche, tuvieron una influencia estacional.
7. La presencia de AFM<sub>1</sub> es un biomarcador confiable para predecir la exposición del ganado a las AF.
8. Es necesario continuar y profundizar con estudios que permitan definir los mejores secuestrantes, de acuerdo al tipo de aflatoxinas y/o micotoxinas presentes en el alimento y sus ingredientes.
9. El impacto de la aplicación de las medidas anteriores, será benéfico tanto para la salud animal como para la salud pública.

## 7. GLOSARIO

**Absorción:** Proceso por el cual los tóxicos cruzan las membranas celulares y entran en la circulación sanguínea o sistema linfático.

**Adsorción:** Proceso por el cual átomos, iones o moléculas son atrapados o retenidos en la superficie de algún material en contra posición de la absorción que es un fenómeno de volumen.

**Aflatoxicosis:** Intoxicación producida por el consumo de sustancias o alimentos contaminados con aflatoxinas.

**Alimento concentrado:** Es todo aquel alimento combinado con otro para mejorar el balance nutritivo del producto y que será posteriormente diluido o mezclado para producir un suplemento o un alimento completo.

**Aluminosilicatos:** Es un material que contiene óxido de aluminio y sílice.

**Asociación causal:** Es aquella en la cual un cambio en la frecuencia o calidad de una exposición o característica resulta en un cambio correspondiente en la frecuencia de la enfermedad o evento de interés.

**Buenas Prácticas Agrícolas:** Se refieren a todas aquellas actividades desarrolladas en la producción agrícola para evitar o reducir daños ambientales, procurar una adecuada productividad y obtener productos inocuos para las personas y animales que los consumen, libre de contaminantes de cualquier tipo.

**Carcinogénico:** Habilidad de una sustancia para causar cáncer.

**Códex Alimentarius:** Del latín, legislación alimentaria o código alimentario. Reúne una serie de normas alimentarias internacionalmente adoptadas.

**Detoxificación:** Es el acto de retirar la toxina de un producto tóxico o contaminado.

**Dosis Letal Media (LD<sub>50</sub>):** Indica los miligramos de una sustancia necesarios por kilogramo de peso de un animal para matar al 50% de la población.



**ELISA (enzyme-linked immunosorbant assay):** Es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas para la cuantificación de la presencia de un antígeno usando una enzima enlazada a un anticuerpo para el antígeno.

**Ensilaje:** Producto que resulta del proceso de ensilado de varios productos agrícolas y que es destinado a la alimentación del ganado.

**Factores de riesgo:** Son aquellas características y atributos (variables) que se presentan asociados diversamente con la enfermedad o el evento estudiado. Los factores de riesgo no son necesariamente las causas, solo sucede que están asociadas con el evento. Como constituyen una probabilidad medible, tienen valor predictivo y pueden usarse con ventajas tanto en prevención individual como en la comunidad.

**Norma Oficial Mexicana:** Es una serie de normas cuyo objetivo es asegurar, valores, características y cantidades mínimas y máximas en el diseño, producción o servicio de los bienes entre personas morales y/o físicas.

**Ración totalmente mezclada (RTM):** Producto final que contiene todos los requerimientos nutricionales para la alimentación del ganado y puede ser adicionada con minerales, secuestrantes o vitaminas. Se puede elaborar con forrajes, materias primas, granos y suplementos.

**Secuestrante:** Capacidad que tienen algunos agentes de unirse a uno o varios metabolitos por medio de algún tipo de enlace químico.

**Sistema de HACCP:** Sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control adoptados por la Comisión del *Codex Alimentarius* (CCA). Tiene fundamentos científicos y carácter sistemático, permite identificar peligros específicos y medidas para su control con el fin de garantizar la inocuidad de los alimentos.

**Unidad de producción de leche:** Rancho, finca, hacienda, granja, establo u otra similar.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Abbes, S., Salah-Abbes, J. B., Hetta, M. M., Ibrahim, M., Abdel-Wahhab, M. A., Bacha, H. y Oueslati, R., 2008. Efficacy of Tunisian montmorillonite for in vitro aflatoxin binding and in vivo amelioration of physiological alterations. *Applied Clay Science*, 42: 151-157.
- Abrunhosa, L., Paterson, R. R. M. y Venancio, A., 2010. Biodegradation of Ochratoxin A for Food and Feed Decontamination. *Toxins*, 2: 1078-1099.
- Adejumo, O., Atanda, O., Raiola, A., Somorin, Y., Bandyopadhyay, R. y Ritieni, A., 2013. Correlation between aflatoxin M<sub>1</sub> content of breast milk, dietary exposure to aflatoxin B<sub>1</sub> and socioeconomic status of lactating mothers in Ogun State, Nigeria. *Food and Chemical Toxicology*, 56: 171-177.
- Agag, Bi., 2004. Micotoxins in food and feeds, 1-aflatoxins. *Bulletin For Environmental Researches*, 7:173-205.
- Almeida, L.C., Oliveira, M.M., Azevedo, E., Quintao, A.M., Maia, I. y Bordignon-Luiz, M.T., 2013. Influence of climate conditions on aflatoxin M<sub>1</sub> contamination in raw milk from Minas Gerais State, Brazil. *Food Control* 31: 419-424.
- Almeida, P. L. C., Oliveira, P. C. y Azevedo, V. A., Quintão, L., Maia, T. I. y Bordignon-Luiz, M. T., 2013. Influence of climate conditions on aflatoxin M1 contamination in raw milk from Minas Gerais State, Brazil. *Food Control*, 31: 419-424.
- Alonso, V. A., González, M. L., Armando, M. R., Dogi, C. A., Dalcero, A. M., Rosa, C. A., Chiacchiera, S. M y Cavaglieri, L. R., 2011. Aflatoxins- Detection, Measurement and Control. Ed. Dr Irineo Torres-Pacheco: In Tech, p. 364.
- Alonso, V. A., Monge, M. P., Larriestra, A., Dalcero, A. M., Cavaglieri, L.R. y Chiacchiera, S. M., 2010. Naturally occurring aflatoxin M1 in raw bulk milk from farm cooling tanks in Argentina. *Food Additives and Contaminants*, 27: 373-379.
- Alonso, V. A., Pereyra, C. M., Keller, L. A. M., Dalcero, A. M., Rosa, C. A. R., Chiacchiera, S. M y Cavaglieri, L. R., 2013. Fungi and mycotoxins in silage: an overview. *Journal of Applied Microbiology*, ISSN 1364-5072.
- Alonso, V.A., Pereyra, C.M., Keller, L.A.M., Dalcero, A.M., Rosa, C.A.R. y Chiacchiera, S.M., 2013. Fungi and mycotoxins in silage: an overview. *Journal of Applied Microbiology*, 1-7.

- Aly, S. E., Abdel-Galil, M. M. y Abdel-Wahhab, M. A., 2004. Application of adsorbent agents technology in the removal of aflatoxin B<sub>1</sub> and fumonisin B<sub>1</sub> from malt extract. *Food and Chemical Toxicology*, 42: 1825-1831.
- Anguiano, R. G. A., Verver, A., Vargas, C. y Guzmán, De P. D., 2005. Inactivación de aflatoxina B<sub>1</sub> y aflatoxicol por nixtamalización tradicional del maíz y su regeneración por acidificación de la masa. *Salud Pública de México*, 47(5): 369-375.
- AOAC, 2001. Aflatoxina M<sub>1</sub> en leche líquida. Columna de inmunoafinidad por Cromatografía Líquida. Método Oficial 2000.08. *Journal AOAC*, 84: 437.
- Aoyama, T., Yamano, S., Guxelian, P. S., Gelboin, H. V. y Gonzalez, F. J., 1990. Five of 12 forms of vaccinia virus-expressed human hepatic cytochrome P450 metabolically activate aflatoxin B<sub>1</sub>. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 4790-4793.
- Applebaum, R. S. y Marth, E. H., 1983. Responses of Dairy Cows to Dietary Aflatoxin: Concentration of Blood Serum Constituents and Hormones Associated with Liver-Kidney Dysfunction and Maintenance of Lactation. *Journal Applied Microbiol Biotechnology*, 18: 381-386.
- Asher, R., 2008. Mycotoxicoses in dairy cattle – a case history review. *Mikologia Lekarska*, 15 (3): 180-185.
- Avantaggiato, G., Havenaar, R. y Visconti, A., 2004. Evaluation of the intestinal absorption of deoxynivalenol and nivalenol by an in vitro gastrointestinal model, and the binding efficacy of activated carbón and other adsorbent materials. *Food and Chemical Toxicology*, 42: 817-824.
- Awasthi, V., Bahman, S., Thakur, L. K., Singh, S. K., Dua, A. y Ganguly, S., 2012. Contaminants in Milk and Impac of Heating: An Assessment Study. *Indian Journal of Public Health*, 56: 96-99.
- Aydemir, M.A., Adiguzel, G., Atasever, M., Ozlu, H. y Ozturan, K., 2010. Ocurrance of Aflatoxin M<sub>1</sub> in UHT Milk in Erzurum-Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 16 (Suppl A): S119-S122.
- Barbiroli, A., Bonomi, F., Benedetti, S., Mannino, S., Monti, L., Cattaneo, T. y lametti, L., 2007. Binding of Aflatoxin M<sub>1</sub> to Different Protein Fractions in Ovine and Caprine Milk. *Journal of Dairy Science.*, 90: 532–540.

- Battacone, G., Nudda, A., Palomba, M., Pascale, M., Nicolussi, P. y Pulina, G., 2005. Transfer of Aflatoxin B1 from Feed to Milk and from Milk to Curd and Whey in Dairy Sheep Fed Artificially Contaminated Concentrates. *Journal of Dairy Science.*, 88:3063-3069.
- Bennett, G. A. y Richard, J. L., 1996. Influence of Processing on *Fusarium* Mycotoxins in Contaminated Grains. *Food Technology*, Suministrado por el Departamento de Agricultura de EE.UU. Centro Nacional de Desarrollo Agrícola Investigación de Utilización, Peoria, Illinois.
- Bennett, J.W., Kale, S. y Yu, J., 2007. *Foodborne Diseases, Aflatoxins: Background, Toxicology, and Molecular Biology*. Ed. Humana Press Inc: pp 355-373.
- Bhat, R., Rai, R. y Karim, A., 2010. Mycotoxins in Food and Feed: Present status and future concerns. *Reviews in Food Science and Food Safety*, Institute of Food Technologists, 9:57-75.
- Bilandzic, N., Varenina, I. y Solomun, B., 2010. Aflatoxin M1 in raw milk in Croatia. *Food Control*, 21, 1279-1281.
- Bogantes, P., Bogantes, D. y Bogantes, S., 2004. Aflatoxinas. *Acta Médica Costarricense*, 46:174-178.
- Bonna, R. J., Aulerich, R. J., Bursian, S. J., Poppenga, R. H., Braselton, W. E. y Watson, G. L., 1991. Efficacy of Hydrated Sodium Calcium Aluminosilicate and Activated and Activated Charcoal in Reducing the Toxicity of Dietary Aflatoxin to Mink. *Arch. Environ. Contain. Toxicol*, 20: 441-447.
- Borchers, A., Teuber, S. S., Keen, C. L. y Gershwin, M. E., 2010. Food safety. *Clinic Rev Allerg Immunol*, 39:95-141
- Bovo, F. Corassin, C.H., Rosim, R.E. y Oliveira, C.A.F., 2012. Efficiency of lactic acid bacteria strains for dcontamination of aflatoxin M<sub>1</sub> in phosphate buffer saline solution and in skim milk. *Food Bioprocess Technology*, 5: 1-5.
- Bozoglu, F., 2011. Inactivation Mechanisms of Different Mycotoxins. En Hefnawy, M., *Advances in Food Protection*. Ed. Springer Netherlands, pp. 197-204.
- Brackett, R. E. y Marth, E. H., 1982. Association of Aflatoxin M1 with Casein. *Z Lebensm Unters Forsch*, 174:439-441.
- Breck, D.W., 1974. *Zeolite molecular sieves: Structure, chemistry and use*. Wiley, New York.

- Britzi, M., Friedman, S., Miron, J., Solomon, R., Cuneah, O., Shimshoni, J.A., Soback, S., Ashkenazi, R., Armer, S. y Sholosberg, A., 2013. Carry-Over of Aflatoxin B<sub>1</sub> to Aflatoxin M<sub>1</sub> in High Yielding Israeli Cows in Mid- and Late- Lactation. *Toxins*, 5: 173-183.
- Bucio-Villalobos, C.M., Guzmán-de-Peña, D. y Peña-Cabriales, J.J., 2001. Aflatoxin synthesis in corn fields, *Rev Iberoam Micol*, 18: 83-87.
- Buldu, H. M., Koc, A. N. y Uraz, G., 2011 Aflatoxin M1 contamination in cow's milk in kayseri (Central Turkey). *Turk. Journal Veterinary of Animal Science.*, 35(2): 87-91.
- Caloni, F., Stamatii, A. L., Raimondi, F. y De Angelis, I., 2005. In vitro Study With Caco-2 Cells on Fumonisin B1: Aminopentol Intestinal Passage and Role of P-Glycoprotein. *Veterinary Research Communications*, 29(Suppl. 2): 285–287.
- Carvajal, M., Rojo, F., Méndez, I. y Bolaños, A. 2003. Aflatoxin B1 and its interconverting metabolite aflatoxicol in milk: the situation in Mexico. *Food Additives and Contaminants*, 20: 1077-1086.
- Cassia, R. A., Baroni, F. T. R., Dos Santos, D. C. T., Calori, D. M. A. y Micotti, DG. E., 2010. Occurrence of AFM<sub>1</sub> in urine samples of a Brazilian population and association with food consumption. *Food Control*, 21: 554- 558.
- CAST, 2003. Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems. Report 139. Ames, IA: Counc. Agriculture Science Technology.
- Chi, F. y Broomhead, J., 2009. Mycotoxins a Dairy Cattle. *A Review for Dairy Producers*, 1-5.
- Codex Alimentarius*, 193-1995, 2010. CODEX GENERAL STANDARD For Contaminants and Toxins, Codex Standard.
- Códex Alimentarius*, 2010. Código de prácticas para reducir la AFB<sub>1</sub> presente en las materias primas y los piensos suplementarios para animales productores de leche. En FAO-OMS, *Producción de Alimentos de Origen Animal*. Segunda Edición, Roma: pp. 267-270.
- Codex Alimentarius*, 2012. Prevention and Reduction of Food and Feed contamination. World Health Organization Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

- Colak, H., Hampikyan, H., Ulusoy, B. y Ergun, O., 2006. Comparison of a competitive ELISA with an HPLC method for the determination of aflatoxin M1 in Turkish White, Kasar and Tulum cheeses. *European Food Research and Technology*, 223: 719–723.
- Corassin, C.H., Bovo, F., Rosim, R.E. y Oliveira, C.A.F., 2013. Efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria strains to bind aflatoxin M<sub>1</sub> in UHT skim milk. *Food Control*, 31:80-83.
- Córdova, I. A., Ramírez S. R., Peña, B., Córdova, J., Córdova, J. y Muñoz, M., 2007. Zearalenona (*Fusarium* Spp.) En la alimentación de Cerdos con Problemas Reproductivos. *Archivos de Zootecnia*, 56: 55-58.
- D'Mello, J. P., 2004. Assessing quality and safety of animal feeds. FAO Animal Production Add Health: Rome, pp. 107-128.
- D'Mello, J.P.F. y MacDonald, A.M.C., 1997. Mycotoxins. *Animal Feed and Science Technology*, 69: 155–166.
- Dakovic', A., Tomasevic-Canovic, M., Dondur, V., Rottinghaus, G. E., Medakovi'c, V. y Zari'c, S., 2005. Adsorption of mycotoxins by organozeolites. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 46: 20-25.
- de Luna López, M. C., Valdivia Flores, A. G., Reyes Velázquez, W. P. y Bucio Villalobos, C. M., 2010. Efecto Protector de Etoxiquina, *Saccharomyces cerevisiae* y N-acetilcisteína Contra la Intoxicación Alimentaria Crónica por Aflatoxinas en Gallinas de Postura. Trabajo de Tesis. Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- Deshpande, S. S., 2002. *Handbook of Food Toxicology. Fungal Toxins*. Ed. Marcel Dekker, Inc.:New York, Basel, p.p 387-456.
- Di Natale, F., Gallo, M. y Nigro, R., 2009. Adsorbents selection for aflatoxins removal in bovine milks. *Journal of Food Engineering* 95: 186–191.
- Diaz, G. J. y Murcia, H. W., 2011. Biotransformation of Aflatoxin B<sub>1</sub> and its Relationship with the Differential Toxicological Response to Aflatoxin in Commercial Poultry Species 3. En Guevara, G. R. G, *Aflatoxins –Biochemistry and Molecular Biology*. Ed. InTech, Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia, pp. 1-20.
- Diekman, M. A. y Green, M. L., 1992. Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. *Journal of Animal Science*, 70: 1615-1627.
- Do, J. H. y Choi, D. K., 2007. Aflatoxins: Detection, Toxicity, and Biosynthesis. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 12: 585-593.

- Driehuis, F., Spanjer M. C., Scholten, J. M. y Giffel, M. C., 2008. Occurrence of Mycotoxins in Feedstuffs of Dairy Cows and Estimation of Total Dietary Intakes. *Journal of Dairy Science.*, 91:4261–427.
- Eaton, D.L., Ramsdell, H.S. y Neal, G.E., 1994. Biotransformation of aflatoxins. Toxicology of aflatoxins: Human Health, Veterinary, and Agricultural significance. Academic Press, Inc. San Diego, 45-71.
- EFSA, 2009. Review of mycotoxin-detoxifying agents used as feed additives: mode of action, efficacy and feed/food safety. *Reference number of the call for proposal: CFP/EFSA/FEEDAP/2009/01 In accordance with Article 36 of Regulation (EC) No. 178/2002.* European Food Safety Authority, pp.1-192.
- El Khoury, A., Atoui, A. y Yaghi, J., 2011. Analysis of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and yogurt and AFM<sub>1</sub> reduction by lactic acid bacteria used in Lebanese industry. *Food Control*, 22: 1695-1699.
- El-Tras, W. F., El-Kady, N. N. y Tayel, A. A., 2011. Infants exposure to aflatoxin M<sub>1</sub> as a novel foodborne zoonosis. *Food and Chemical Toxicology*, 49: 2816-2819.
- European Community, 2006. 2006/1881/EC. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs (text with EEA relevance). Official Journal of the European Union L 364, 5–24.
- FAO-OMS, 1999. Estudio monográfico, Tercera conferencia internacional mixta. Prevención y descontaminación de micotoxinas. Túnez, Túnez, 3-6 de marzo de 1999.
- Farré, M. y Barceló, D., 2012. Emerging organic contaminants and human health. *Hdb Environment Chemistry*, 20:1–46.
- FDA, 1977. Inspections, Compliance, Enforcement, and Criminal Investigations. U.S Food and Drug Administration.
- Fernández, M. y Ferrer, E., 2007. Aflatoxina M<sub>1</sub>. En Soriano, C. J. M., *Micotoxinas en alimentos*. Ed. Díaz de Santos, pp. 185-199.
- Flores, O. C. M., Hernández, P. L. B. y Vázquez, M. J., 2006. Contaminación con micotoxinas en alimento balanceado y granos de uso pecuario en México en el año 2003. *Técnica Pecuaria de México*, 44 (2): 247- 256.
- Food and Agriculture Organization, 2001. Manual sobre la aplicación del sistema de análisis de peligros y de puntos críticos en la prevención y control de las micotoxinas. *Estudio FAO Alimentación y Nutrición 73*, Organización de las



- Naciones Unidas Para la Agricultura y la Alimentación, Roma, Italia.
- Food and Agriculture Organization, 2004. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. *FAO Food and Nutrition Paper 81*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy
- Food and Agriculture Organization, 2007. Animal Feed Impact on Food Safety. *Report of the FAO/WHO Expert Meeting*, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Headquarters, Rome, 2008.
- Forbisch, R. A., Bradley, B. D., Wagner, D. D., Long-Bradley, P. E. y Harriston, H., 1986. Aflatoxin residues in milk of dairy cows after ingestion of naturally contaminated grain. *Journal of Food Protection*, 49: 781-785.
- Forouharmeh, A., Harkinezhad, T. y Qasemi-Panahi, B., 2013. Effect of Aflatoxin B1 on Growth of Bovine Mammary Epithelial Cells. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 3:143-146.
- Fruhauf, S., Schwartz, H., Ottnerb, F., Krska, R. y Vekiru, E., 2011. Yeast cell based feed additives: Studies on aflatoxin B1 and zearalenone. *Food Additives and Contaminants*, 1: 1-28.
- Galvano, F., Galofaro, V. y Galvano, G., 1996. Occurrence and Stability of Aflatoxin M1 in Milk and Milk Products: A Worldwide Review. *Journal of Food Protection*, 59: 1079-1090.
- Galvano, F., Piva, A., Ritieni, A., Galvano, G., 2001. Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins: a review. *Journal Food Protection*. 64:120-131.
- Garrido, N. S., Iha, M. H., Santos, O. M. R. y Duarte, F. R. M., 2003. Occurrence of aflatoxins M1 and M2 and milk commercialized in Riberao Preto-SP, Brazil. *Food additives and Contaminants*, 20: 70-73.
- Giddey, C., 1977. Mecanismos de detoxificación de las micotoxinas y procedimientos industriales para tratamiento de los alimentos para animales. *XV Symposium Científico de la Asociación Española Mundial de Avicultura Científica*.
- Gimeno, A. y Martins, M. L., 2006. *Mycotoxins and Mycotoxicosis and Animals and Humans*. Ed. Special, Nutrients, INC, p. 96.
- Gimeno, A. y Martins, M. L., 2011. *Micotoxinas y Micotoxicosis en animales y humanos*. Tercera edición, Special Nutrients, INC: USA, p. 86.



- Gomaa, M. N. E., Ayesh, A.M., Abdel, G. M. M. y Naguib, K., 1997. Effect of high pressure ammoniation procedure on the detoxification of aflatoxins. *Mycotoxin Research*, 13: 23-34.
- Gowda, N. K. S., Suganthi, R. U., Malathi, V. y Raghavendra, A., 2007. Utilization of dietary minerals and blood biochemical values in lambs fed hydrated sodium calcium alumino silicate sorbent material at supplementary level. *Small Ruminant Research*, 69: 17-22.
- Greene-McDowelle, D. M., Ingber, B., Wright, M. S., Zeringue, H. J., Bhatnagar, D. y Cleveland, T. E., 1999. The effects of selected cotton-leaf volatiles on growth, development and aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus*. *Toxicon*, 37: 883-893.
- Gremmels, F. J., 2008a. Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: A review. *Food Additives and Contaminants*, 25 (2): 172-180.
- Gremmels, F. J., 2008b. The role of mycotoxins in the health and performance of dairy cows. *The Veterinary Journal*, 176: 84-92.
- Groopman, J. D. y Wogan, G. N., 2011. Aflatoxin and Hepatocellular Carcinoma. En Penning, T. M., *Chemical Carcinogenesis*. Ed. Humana Press, pp. 113-133.
- Groopman, J. D., Kensler, T. W. y Wild, C. P., 2008. Protective Interventions to Prevent Aflatoxin-Induced Carcinogenesis in Developing countries. *Annual Review of Public Health*, 29: 187-203.
- Groopman, J.D., 1993. Molecular dosimetry methods for assessing human aflatoxin exposures. En Eaton, D.L. y Groopman, J.D., *The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary and Agricultural Significance*, New York, Academic Press, pp. 259–279.
- Guzmán, de P., D., 2007. La exposición a la aflatoxina B1 en animales de laboratorio y su significado en la salud pública. *Salud Pública de México*, 49(3): 227-235.
- Halady, P.S. y Jespersen, L., 2006. *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. *Food Science & Technology*, 17:48-55.
- Hamsa, T.A.P. y Ayres, J.C., 1975. Factors Affecting Aflatoxin Contamination of Cottonseed. I. Contamination of Cottonseed with *Aspergillus flavus* at Harvest and during Storage. *Food Science*, 219-224.

- Hassan, H.F. y Kassaify, Z., 2014. The risks associated with aflatoxins M<sub>1</sub> occurrence in Levaneese dairy products. *Food Control*, 37: 68-72.
- Hernández-Mendoza, A., Garcia, H.S y Steele, J. L., 2009. Screening of Lactobacillus casei strains for their ability to bind aflatoxin B<sub>1</sub>. *Food and Chemical Toxicology*, 47:1064-1068.
- Horwitz, W., 1982. "Evaluation of Analytical Methods Used for Regulation of Foods and Drugs". *Analytical Chemistry* 54, 67A.
- Hsieh, D. y Wong. J. J., 1994. Pharmacokinetics and Excretion of Aflatoxins. The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary and Agricultural Significance. Eaton DL, Groopman J. New York, Academic Press.
- Husing, N. y Hartmann, S., 2009. Inorganic-Organic Hybrid porous Materials. En Merhari, L., *Hybrid Nanocomposites for Nanotechnology*. Springer Science+Business Media, LLC, pp 131-171.
- Hussain, I. y Anwar, J., 2008. A study on contamination of aflatoxin M<sub>1</sub> in raw milk in the Punjab province of Pakistan. *Food Control*, 19: 393–395.
- Hutnik, E. y Kobiela, S. 2012. Density of silage stored in horizontal silos. *Acta Agrophys*, 19:539–549.
- Huwig, A., Freimund, S., Kappeli, O. y Dutler, H., 2001. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicology Letters*, 122: 179-188.
- IARC, International Agency for Research on Cancer, 1987. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol. 36. Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans II, Press Lyon France.
- IARC, International Agency for Research on Cancer, 1993. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol 56. Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans II, Press Lyon France.
- IARC, International Agency for Research on Cancer, 2002. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol. 82. Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans II, Press Lyon France.
- Iha, M. H., Barbosa, C. B., Okada, I. A. y Trucksess, M. W., 2011. Occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in dairy products in Brazil. *Food Control*, 22: 1971-1974.
- Im, S. H., Bolt, M. W., Stewart, R. K. y Massey, T. E., 1996. Modulation of aflatoxin B<sub>1</sub> Biotransformation by b-naphthoflavone in Isolated Rabbit Lung Cells. *Archive Toxicology, Springer-Verlag*, 71: 72-79.

- Ismail, B., Reuhs, B. L. y Nielsen, S. S., 2010. Analysis of Food Contaminants, Residues, and Chemical Constituents of Concern. Nielsen, S. S., Food Analysis. *Food Science Texts Series*, pp. 326-328.
- ISO, 2002. Milk and milk products. Guidelines for a standardized description of competitive enzyme immunoassays-determination of AFM1 content. Standard 14675. Geneva, Switzerland: International Standards Organisation.
- Jemmali, M., 1983. Decontamination of mycotoxins. *International Symposium on Mycotoxins. Barcelona*, España, 29 de Noviembre a 1 de diciembre, 1977. pp 53-67 (Libro del Symposium).
- Jian, F., Jayas, D. S. y White, N. D. G., 2013. Can Ozone be a New Control Strategy for Pests of Stored Grain. *Agriculture Research*, 2(1): 1-8.
- Jonsyn, F. E., Maxwell, S. M. y Hendrickse, R. G., 1995. Ochratoxin A and aflatoxins in breast milk samples from Sierra Leone. *Mycopathologia*, 131: 121-126.
- Juan, C., Soriano, J. m. y Burdaspal, P., 2007. Aflatoxinas del grupo B y G. En Soriano, C. J. M., *Micotoxinas en alimentos*. Ed. Díaz de Santos, pp. 167-184.
- Juan-juan, L., De-cheng, S. y Xiao-ou, S., 2010. Binding Capacity for Aflatoxin B<sub>1</sub> by Different Adsorbents. *Agricultural Sciences in China*, 9(3): 449-456.
- Kabak, B., 2010. Prevention and Management of Mycotoxins in Food and Feed. En Rai, M. y Varma, A., *Mycotoxins in Food, Feed and Bioweapons*. Ed. Springer Berlin Heidelberg, pp. 201-227.
- Kaleibar, M. T. y Helan, J. A., 2012. A field outbreak of aflatoxicosis with high fatality rate in feedlot calves in Iran. *Springer-Verlag London Limited, Comp Clin Pathol*, DOI 10.1007/s00580-012-1543-1.
- Kaleibar, M. T. y Helan, J. A., 2012. A field outbreak of aflatoxicosis with high fatality rate in feedlot calves in Iran. *Comparative Clinical Pathology*, DOI 10.1007/s00580-012-1543-1.
- Kensler, T. W., Roebuck, B. D., Wogan, G. N. y Groopman, J. D., 2011. Aflatoxin: A 50-Year Odyssey of Mechanistic and Translational Toxicology. *Toxicological Sciences*, 120(S1), S28-S48.
- Khlangwiset, P. y Wu, F., 2010. Costs and efficacy of public health interventions to reduce aflatoxin-induced human disease. *Food Additives and Contaminants*, 27:998-1014.

- Klich, M.A., 2007. *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. *Molecular Plant Pathology*, 8(6): 713-722.
- Köppen, R., Koch, M., Siegel, D., Merkel, S., Maul, R. y Nehls, I., 2010. Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations. *Applied Microbiology Biotechnology*, 86:1595–1612.
- Kralj, I.C. y Prosen, H., 2009. An Overview of Conventional and Emerging Analytical Methods for the Determination of Mycotoxins. *International Journal of Molecular Sciences*, 10, 62-115.
- Kvesitadze, G., Khatishashvili, G., Sadunishvili, T. y Ramsden, J. J., 2006. Contaminants in the environment. En Kvesitadze, G., Khatishashvili, G., Sadunishvili, T. y Ramsden, J. J., *Biochemical mechanisms of detoxification in higher plants*. Ed. Springer-Verlag: Springer Berlin Heidelberg, p.p 1-53.
- Landeros, P., Noa, M., López, Y., González, D. G., Noa, E., Real, M., Juárez, C. y Medina, M. S., 2012. Niveles de Aflatoxina M<sub>1</sub> en leche cruda y pasteurizada comercializada en la zona Metropolitana de Guadalajara, México. *Revista en Salud Animal Vol. 34 No. 1*:40-45.
- Lazo, R. F. y Sierra, G., 2008. Investigación del Efecto de las Micotoxinas en el ser Humano. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25: 7-11.
- Li, Y., McCrory, D. F., Powell, J. M., Saam, H. y Jackson-Smith, D., 2005. A survey of selected heavy metal concentrations in Wisconsin dairy feeds. *Journal of Dairy Science*, 88:2911–2922.
- Li, Y., Nishino, N., 2011. Bacterial and fungal communities of wilted Italian ryegrass silage inoculated with and without *Lactobacillus rhamnosus* or *Lactobacillus buchneri*. *Let. Applied Microbiology*, 52: 314–321.
- Loste, A., Sáez, T., Ramos, J. J. y Fernández, A., 2002. Principales micotoxicosis en el ganado ovino. *Pequeños rumiantes, Zaragoza*, 3 (3): 8-13.
- Lych, G. P., 1967. Mycotoxins in Feedstuffs and Their Effect on Dairy Cattle. *Journal Of Dairy Science*, Animal Science Research Division, USDA, Beltsville, Maryland 20705, 55:1243-1255.
- Magnoli, C. E., Cavaglieri, L. R., Rocha, C. A y Dalcerro, A. M., 2010. *Mycotoxigenic Fungi and Mycotoxins in animal Feed in South american countries*. Ed. M. Rai and A. Varma: Berlin, p. 230.

- Mahdiyeh, L. R., 2013. Determination of Aflatoxin M<sub>1</sub> Levels in Raw Milk Samples in Gilan, Iran. *Advanced Studies in biology*, 5: 151-156.
- Manso, S., Cacho-Nerin, F., Becerril, R. y Nerín, C., 2013. Combined analytical and microbiological tools to study the effect on *Aspergillus flavus* of cinnamon essential oil contained in food packaging. *Food Control*, 30: 370-378.
- Martins, H. M., Mendes, G. M. M y d'Almeida, B. F. M., 2007. Occurrence of aflatoxin B<sub>1</sub> in dairy cow's feed over 10 years in Portugal (1995-2004). *Revista Iberoamericana de Micología*, 24: 69-71.
- Masoero, F., Gallo, A., Diaz, D., Piva, G. y Moschini, M., 2009. Effects of the procedure of inclusión of a sequestering agent in the total mixed ratio non proportional aflatoxin M<sub>1</sub> excretion into milk of lacting dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, 150: 34-45.
- Masoreo, F., Galloa, A., Moschinia, M., Pivaa, G. y Diaza, D., 2007. Carryover of aflatoxin from feed to milk in dairy cows with low or high somatic cell counts. *Animal*, (1):1344-1350.
- McCormick, S.P., 2013. Microbial Detoxification of Mycotoxins. *Journal of Chemistry Ecology*, 39:907-918.
- Mclellan, L. I., Judah, D. J., Neal, G. E. y Hayes, J. D., 1994. Regulation of aflatoxin Bi-metabolizing aldehyde reductase and glutathione S- transferase by chemoprotectors. *Biochemistry Journal.*, 300: 117-124.
- Medina, T., S., Márquez O. M., García, G. M. 2007. Uso y Selección de Embalses por el pato mexicano (*Anas Diazí*) en la región del Llano, Aguascalientes-Jalisco, México. *Acta Zoológica Mexicana.*, 23(2): 163-181.
- Milićević, D. R., Škrinjar, M. y Baltić, T., 2010. Real and Perceived Risks for Mycotoxin Contamination in Foods and Feeds: Challenges for Food Safety Control. *Toxins*, 2: 572-592.
- Moosavy, M.H., Roostae, N., Katirae, F., Habibi-Asl B, Mostafavi, H. y Dehghan, P., 2013. Aflatoxin M<sub>1</sub> occurrence in pasteurized milk from various dairy factories in Iran. *International Food Research Journal*, 20(6): 3351-3355.
- Morales, H., Marín, S., Rovira, A., Ramos, A. J. y Sanchis, V., 2006. Patulin Accumulation in Apples by *Penicillium Expansum* During Postharvest Stages *Journal compilation, The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology*, 44: 30–35.

- 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 the sequestered toxin. *Animal Feed Science and Technology*, 147: 292-309.
- Munksgaard, L., Larsen, J., Werner, H., Andersen, P.E., Viuf, B.T., 1987. Carry over of aflatoxin from cows' feed to milk and milk products. *Milchwissenschaft*, 42: 165–167.
- Murata, H., Yamaguchi, D., Nagai, A. y Shimada, N., 2011. Reduction of Deoxynivalenol contaminating Corn Silage by Short-Term Ultraviolet Irradiation: A Pilot Study. *J. Veterinary Medicine Science*, 73(8): 1059-1060.
- Murcia, R., H., W., 2010. Micotoxinas y Aflatoxina B<sub>1</sub>, un problema en salud animal. *Teoría y Práxis investigativa*, 5 (2): 72-78.
- Murphy, P. A., Hendrich, S., Landgren, C. y Bryant, C. M., 2006. Food Mycotoxins: An Update, *Journal of Food Science*, 71:51-65.
- Neal, G. E., Eaton, D. L., Judah, D. J., Verma, A., 1998. Metabolism and toxicity of Aflatoxins M<sub>1</sub> and B<sub>1</sub> in human-herived *in vitro* systems. *Toxicology Applied Pharmacy.*, 151(1):152-8.
- NOM-243-SSA1-2010. Norma Oficial Mexicana, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado. Especificaciones sanitarias. Diario Oficial de la Federación, 1 de agosto de 2002.
- OCDE-FAO, 2010. Perspectivas Agrícolas 2010-2019, Cap. 9. OCDE/FAO 2010, ISBN: 978-92-64-08779-8.
- Okeke, K. S., Abdullahi, I. O., Makun, H. A. y Mailafiya, S. C., 2012. A preliminary survey of aflatoxin M<sub>1</sub> in dairy cattle products in Bida, Niger State, Nigeria. *African Journal of Food Science and Technology*, 3: 273-276.
- Paterson, R. R. M. y Lima, N., 2010. Toxicology of mycotoxins. Molecular, Clinical and Environmental Toxicology, *Clinical Toxicology*, 2:31-63.
- Patterson, D. S., 1983. Aflatoxicosis in Farm Animals. *Veterinary Research Communications*, 7:135-140.
- Payne, G.A., 1987. *Aspergillus flavus* infection of maize: silks and kernels. In: Zuber MS, Lillehoj EB, Renfro BL (Eds.) Aflatoxin in Maize: Proceedings of the Workshop. CIMMYT, Mexico, 119-129.
- Pennington, J. A., 1914. Aflatoxin M<sub>1</sub> in Milk. *University Of Arkansas Division Of agriculture*, FSA4018:1-4.



- Pérez, J., Gutiérrez, R., Vega, S., Díaz, G., Urbán, G., Coronado, M., y Escobar, A., 2008. Ocurrencia de Aflatoxina M<sub>1</sub> en leches cruda, Ultrapasteurizada y Orgánica producidas y comercializadas en el altiplano Mexicano. *Revista de Salud animal.*, 30:103-109.
- Pierre, J. J., 2007. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 137: 342-362.
- Pimenta, R. S., Morais, P. B., Rosa, C. A. y Correa, A., 2009. Utilization of Yeasts in biological Control. En Satyanarayana, T. y Kunze, G., *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*. Ed. Springer Netherlands, pp. 199-214.
- Pongratz, I., Petterson, K. y Faulds, M. H., 2011. *Chemical contaminants in food. Safe or not safe*, Ed. Springer Science+Business Media, LLC: Springer New York, p.p 79-100.
- Quang, T. N., Ogle, B. y Pettersson, H., 2008. Efficacy of bentonite clay in ameliorating aflatoxicosis in piglets fed aflatoxin contaminated diets. *Tropical Animal Health Production*, 40: 649-656.
- Rahimi, E., Bonyadian, M., Rafei, M. y Kazemeini, H. R., 2010. Ocurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in raw milk of five dairy species in Ahvaz, Iran. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 129-131.
- Rai, M. K., Bonde, S. R., Ingle, A. P. y Gade, A. K., 2012. Mycotoxin: Rapid Detection, Differentiation and Safety. *Journal Pharmacy Educ Research.*, 3: 22-30.
- Ramos, A. J. y Hernández, E., 1997. Prevention of aflatoxicosis in farm animals by means of hydrated sodium calcium aluminosilicate addition to feedstuffs: a review. *Animal Feed Science Technology*, 65: 197-206.
- Regulation EC, 2003. No. 2174/2003 of 12 December 2003, amending regulation (EC) No. 466/2001 as regards aflatoxins. *Official Journal of European Communities*, L326, 12-15.
- Rehačková, M., Uvanova, S. C., Dzivač, M., Rimač, J. y Gaval'ova', Z., 2004. Agricultural and agrochemical uses of natural zeolite of the clinoptilolite type. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 8: 397-404.
- Rempe, I., Kersten, S., Valenta, H. y Danicke, S., 2013. Hydrothermal treatment of naturally contaminated maize in the presence of sodium metabisulfite, methylamine and calcium hydroxide; effects on the concentration of zearalenone and deoxynivalenol. *Mycotoxin Research*, DOI 10.1007/s12550-013-0166.

- Reyes, V. W., Martínez, S. P., Espinosa, V. H., Nathal, M. A., De Lucas, E. P. y Rojo, F., 2009. Aflatoxinas totales en raciones de bovinos y AFM1 en leche cruda obtenida en establos del estado de Jalisco, México. *Técnica Pecuaria de México*, 47: 223-230.
- Reyes, V.W., Martínez, A. P., Isaías, V. H. E., Nathal, M. A. V., De Lucas, P. e. y Rojo, F., 2009. Aflatoxinas totales en raciones de bovinos y AFM1 en leche cruda obtenida en establos del estado de Jalisco, México. *Técnica Pecuaria de México*, 47 (2): 223-230.
- Richard, E., Heutte, N., Bouchart, V., Garon, D., 2009. Evaluation of fungal contamination and mycotoxin production in maize silage. *Animal Feed Science and Technology*, 148: 309-320.
- Richard, E., Heutte, N., Sage, L., Pottier, D., Bouchart, V., Lebailly, P., Garon, D., 2007. Toxigenic fungi and mycotoxins in mature corn silage. *Food Chemical Toxicology*, 45: 2420-2425.
- Robens, J. F. y Richard, J. L., 1992. Aflatoxins In Animal and Human Health. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 27:69-85. Roder, J. D., 2002. *Manual de Toxicología Veterinaria*. Ed. Multimédica, Barcelona, España, p. 29.
- Rodríguez, S. P., 2011. Importance of Aflatoxins and Fumonisin in some domestic Animals. *Conexión Agropecuaria JDC*, 1(1): 37 - 44.
- Rodríguez, V., Delso, C. y Ordoñez, E. D., 2003. ELISA and HPLC determination of the occurrence of aflatoxin M1 in raw cow's milk. *Food Additive Contaminant*, 20: 276-280.
- Roigé, M.B., Aranguren, S.M., Riccio, M.B., Pereyra, S., Soraci, A.L., Tapia, M.O., 2009. Mycobiota and mycotoxins in fermented feed, wheat grains and corn grains in Southeastern Buenos Aires Province, Argentina. *Research Iberoamerican Micology*, 26: 233-237.
- Rosi, P., Borsari, A., Lasi, G., Lodi, S., Galanti, A., Fava, A., Girotti, S. y Ferri, E., 2007. Aflatoxin M1 in milk: Reliability of the immunoenzymatic assay. *International Dairy Journal*, 17: 429-435.
- Roussi, V., Govaris, A., Varagoul, A. y Botsoglous, N. A., 2002. Occurrence of aflatoxin M1 in raw and market milk commercialized in Greece. *Food additives and Contaminants*, 19: 863-868.



- Roze, L. V., Hong, S. Y. y Linz, J. E., 2013. Aflatoxin Biosynthesis: Current Frontiers. *Annual Review Food Science Technology*, 4: 293-311.
- Rubio, R., Moya, V.J., Berruga, M.I., Molina, M.P. y Molina, A., 2011. Aflatoxin M<sub>1</sub> in the intermediate dairy products from Manchego cheese production: distribution and stability. *Mljekarstvo*, 61(4): 283-290.
- Sabater-Vilar, M., Malekinejad, H., Selman, M.H.J., van der Doelen, M.A.M. y Fink-Gremmels, J., 2007. In vitro assessment of adsorbents aiming to prevent deoxynivalenol and zearalenone mycotoxinoses. *Mycopathologia*, 163:81–90.
- SAGARPA, 2013. Sistema de producción de leche en granjas bovinas familiares. *Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural Pesca y Alimentación*. Subsecretaría de Desarrollo Rural, Dirección General de Apoyos para el Desarrollo Rural. Tomado de la red mundial el 14-05-13. <http://www.sagarpa.gob.mx/desarrolloRural/Documents/fichasaapt/Sistema%20de%20producci%C3%B3n%20de%20leche%20en%20granjas%20bovinas%20familiares.pdf> 2013.
- Santacroce, M. P., Conversano, M. C., Casalino, C., Lai, O., Zizzadoro, C., Centoducati, G. y Crescenzo, G., 2008. Aflatoxins in aquatic species: metabolism, toxicity and perspectives. *Review Fish Biology Fisheries*, 18:99–130.
- SECRETARÍA DE ECONOMÍA, 2012. Dirección General de Industrias Básicas. Análisis del Sector Lácteo en México 2012. Tomado de la red mundial el 12-03-13: [www.economia.gob.mx/files/comunidad.../analisis\\_sector\\_lacteo.pdf](http://www.economia.gob.mx/files/comunidad.../analisis_sector_lacteo.pdf), 07/03/13.
- Shephard, G. S., 2009. Aflatoxin Analysis at the Beginning of the Twenty-first Century *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395:1215–1224.
- Shundo, L., Navas, S. A., Lamardo, C. L. A., Ruvieri, V. y Sabino, M., 2009. Estimate of aflatoxin M<sub>1</sub> exposure in milk and occurrence in Brazil. *Food Control*, 20: 655–657.
- SIAP/SAGARPA, Tomado de [www.lechemexico.org.mx/lactodata/leche/index.php](http://www.lechemexico.org.mx/lactodata/leche/index.php), 07/03/13.
- Sisman, T., 2006. The Protective Effect of Hydrated Sodium Calcium Aluminosilicate Against the Adverse Effects of Aflatoxin B1 on *D. Melanogaster*. *Toxicology and Industrial Health*, 22: 173-179.
- Smith, E.E., Phillips, T.D., Ellis, J.A., Harvey, R.B., Kubena, L.F., Thomson, J., Newton, G., 1994. Dietary hydrated sodium calcium aluminosilicate reduction of aflatoxin M1 residue in dairy goat milk and effects on milk production and components. *Journal*

*of Animal Science*, 72, 677–682.

- Solfrizzo, M., Gambacorta, L., Lattanzio, V. M. T., Powers, S. y Visconti, A., 2011. Simultaneous LC-MS/MS determination of aflatoxin M<sub>1</sub>, ochratoxin A, deoxynivalenol, de-epoxydeoxynivalenol,  $\alpha$  and  $\beta$ -zearalenols and fumonisin B<sub>1</sub> in urine as a multi-biomarker method to assess exposure to mycotoxins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401: 2831-2841.
- Steinmeyer, K. G. y Eaton, D. L., 2012. Dietary modulation of the biotransformation and genotoxicity of aflatoxin B<sub>1</sub>. *Toxicology*, 299: 69-79.
- Stoloff, L., 1980. Aflatoxin M<sub>1</sub> in Perspective. *Journal of food Protection*, 43: 226-230.
- Styriak, I., Conkova, E., Kmec, V., Bohm, J. y Razzazi, E., 2001. The use of yeast for microbial degradation of some selected mycotoxins. *Mycotoxin Research*, 17(1):24-27.
- Sugiyama, K., Hiraoka, H. y Sugita-Konishi, Y., 2008. Aflatoxin M<sub>1</sub> Contamination in Raw Bulk Milk and the Presence of Aflatoxin B<sub>1</sub> in Corn Supplied to Dairy Cattle in Japan. *Journal of Food Hygiene Society Japan.*, 49:352-355.
- Sultana, N. y Hanif, N. Q., 2009. Mycotoxin Contamination In Cattle Feed and Feed Ingredients. *Pakistan Veterinary Journal.*, 29(4): 211-213.
- Tapia, S. M., García, P. O. D., Nieto, L. M., Ricque, M. D., Villarreal, C. D. y Cruz, S. L. E., 2010. Uso de secuestrantes para disminuir la toxicidad de micotoxinas en alimentos para acuicultura. *Avances en Nutrición Acuicola X-Memorias del Décimo Simposio Internacional de Nutrición Acuicola*. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, 8-10 de Noviembre; p 514-546.
- Thimm, N., Schwaighofer, B., Ottner, F., Froschl, H., Greifenender, S. y Binder, E., 2001. Adsorption of mycotoxins. *Mycotoxin Research*, 17 Suppl 2: 219-223.
- Thota, A.P., Hamsa y Ayres, J. C., 1977. Factors Affecting Aflatoxin Contamination of Cottonseed. I. Contamination of Cottonseed with *Aspergillus flavus* at Harvest and during Storage. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 54: 219-224.
- Thrusfield, M., 1995. *Veterinary Epidemiology*. 2th edition. London. UKD. Blackwell Sciences. p. 185.
- Tiwari, R. M. y Sinha, M., 2010. *Veterinary Toxicology*. Ed. Oxford Book Company: Jaipur, India, p. 39.
- Tomasevic, I., Petrovic, J., Jovetic, M., Raicevic, S., Milojevic, M. y Miocinovic, J., 2015. Two year survey on the occurrence and seasonal variation of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk

- and milk products in Serbia. *Food Control*, 56: 64-70.
- Trucksess, M. W. y Pohland, A. E., 2002. Methods and Method Evaluation for Mycotoxins. *Molecular Biotechnology*: 22: 287-292.
- Tulpule, P. G., 1981. Aflatoxins - Experimental Studies. *Journal of Cancer Research Clinical Oncology*, 99:137-142.
- Turner, N. W., Subrahmanyam, S. y Piletsky, S. A., 2009. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica Acta*. 632:168–180.
- Upadhaya, S. D., Park, M. A. y Ha, J. K., 2010. Mycotoxins and Their Biotransformation in the Rumen: A Review *Asian-Aust. Journal of Animal Science*, 23: No. 9: 1250 – 1260.
- Urrego, J. R. y Díaz, G. J., 2006. Aflatoxinas: Mecanismos de Toxicidad en la Etiología del Cáncer Hepático Celular. *Revista de la Facultad de Medicina en la Universidad Nacional de Colombia*, 54:108-116.
- Valdivia, F. A., Quezada, T. T., Ortiz, M. R. y Martínez, A. A., 2012. Contaminantes ambientales y estrés oxidativo-micotoxinas. En Jaramillo, J. F., Rincón, A. R. S. y Martínez, S. M. C., *Estrés oxidativo y su impacto en la salud*. Ed. Universidad Autónoma de Aguascalientes, pp. 133-151.
- Valencia, Q. R., Sánchez, A. J., Tenorio, M. G., Deng, Y., Marian, W. S. y Valera, M. A., 2012. Preventive Strategies Aimed at Reducing the Health Risks. *Toxicology Environmental Health of Science*, 4(2): 71-79.
- Van Vleet, T. R., Macé, K. y Coulombe, R. A., 2002. Comparative Aflatoxin B1 Activation and Citotoxicity in Human Bronchial Cells Expressing Cytochromes P450 1A2 and 3A4. *Cancer Research*, 62: 105–112.
- Varga, J., Kocsubé, S., Péteri, Z., Vagvolgyi, C. y Toth, B., 2010. Chemical, Physical and Biological Approaches to Prevent Ochratoxin Induced yoxicoses in humans and Animals. *Toxins*, 2:1718-1750.
- Vekiru, E., Fruhauf, S., Sahin, M., Ottner, F., Schatzmayr, G. y Krska, R., 2007. Investigation of various adsorbents for their ability to bind Aflatoxin B1. *Mycotoxin Research*, 23: 27-33.
- Whitlow, L. W., W.M. Hagler, W. M. y Díaz, D. E., 2010. *Mycotoxins. Mycotoxins in feeds*. Ed. Feed Quality Mycotoxins, pp. 1-11.
- Wicklow, D.T., 1995. The mycology of stored grain: an ecological perspective. En: *Jayas, D.S., White, N.D.G., Muir, W.E.* (Eds.), *Stored-Grain Ecosystems*. Marcel Dekker,

Inc, New York, pp. 197–249.

Williams, J. H., Philips, T. D., Jolly, P. E, Stiles, J. K., Jolly c. M., Aggarwal, D., 2004. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *American Journal of clinical Nutrition*, 80: 1106-1122.

World Health Organization International Agency for Research on Cancer, 1987. *Overall Evaluations of Carcinogenicity. An Updating of IARC Monographs volumes 1 to 42*. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans supplement, 7:1-440.

World Health Organization International Agency for Research on Cancer, 1993. *Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. International Agency for Research on Cancer by the Secretariat of the World Health Organization, Reino Unido, 56:5-609.

Yu, J., 2012. Current Understanding on Aflatoxin Biosynthesis and Future Perspective in Reducing Aflatoxin Contamination. *Toxins*, 4:1024-1057. Zaki, M. M., Shaheen, H. M. y Rizzi, L., 2012. Mycotoxins in animals: Occurrence, Effects, Prevention and Management. *Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences*, 4: pp. 13-28.

Zain, M.E., 2011. Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society* 15, 129–144.



Zheng, M. Z., Richard, J. L. y Binder J., 2006. A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. *Mycopathologia*, 161: 261-273.

### 9. ANEXOS

#### Anexo A. Formato para la categorización de las condiciones de almacenamiento del alimento.

		<b>CALIDAD DE ALMACENAMIENTO DEL ALIMENTO:</b>		
<b>UPL:</b>		MALA	REGULAR	BUENA
<b>FECHA:</b>				
			<b>REALIZÓ:</b>	
<b>FORMATO PARA LA CATEGORIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO DEL ALIMENTO, DE ACUERDO A TRES NIVELES DE CALIDAD (MALA, REGULAR Y BUENA)</b>				
<p>Observar cada una de las condiciones o prácticas que el <i>Codex Alimentarius</i> considera como detonantes para la producción de aflatoxinas. Colocar un "1" si la condición se cumple y un "0" si la condición no se cumple.</p>				
<b>CONDICIÓN O PRÁCTICA</b>		<b>CUMPLE</b>	<b>NO CUMPLE</b>	
1. Cobertura adecuada de forrajes henificados				
2. Cobertura adecuada de granos de cereales y/o subproductos				
3. Cobertura adecuada de producto ensilado				
4. Forrajes henificados sin rastros de humedad, detectada a simple vista				
5. Granos de cereales y/o subproductos sin rastros de humedad, detectada a simple vista				
6. Ventilación en bodegas				
7. Ausencia de hongos en producto ensilado				
8. Ausencia de hongos en forrajes henificados				
9. Ausencia de hongos en granos de cereales y/o subproductos				
10. Control de encharcamientos en bodegas				
11. Declive en bodegas				
12. Ausencia de hongos en paredes de bodegas				
13. Iluminación de bodega				
14. Limpieza de carro mezclador				
15. Limpieza de tolvas				
16. Sacos aislados del piso				
17. Control de Plaga (roedores, insectos, pájaros)				
<b>Puntuación total</b>				
<b>Porcentaje de cumplimiento</b>				
<b>Porcentaje de cumplimiento</b>	<b>Nivel de calidad de almacenamiento</b>			
85-100	Buena			
70-84	Regular			
85-100	Mala			

**Anexo B. Uso de agentes secuestrantes**

 UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE AGUASCALIENTES	<b>MONITOREO</b>	 SE LUMEN PROFERRE		
RESPONSABLE: <input style="width: 95%;" type="text"/>	FECHA: <input style="width: 95%;" type="text"/>			
<b>I. ALIMENTO</b> INDICACIÓN: DONDE HAYA CAMBIOS ANOTE EL NUEVO VALOR. <b>JUDIO</b>				
Ingrediente	Cantidad kg/vaca			Cambio en la dieta (si)
	Altas	Frescas	Bajas	
Silo de Maíz				
Silo de Alfalfa				
Silo de Triticali				
Alfalfa Henificada				
Triticali Heno				
Maíz Rolado				
Grano Seco de Maíz				
Grano Seco Destilería				
Semilla de algodón				
Px Ordeña				
Soya Plus				
Pasta de soya				
Secuestrante (Mycoad ZT)				
Secuestrante (Mycoad ZT) (kg/ton)				
Total				

<b>TEPETATILLO</b>				
Ingrediente	Cantidad (kg/lote)			Cambio en la dieta (si)
	Altas (200 vacas)	Frescas (25 vacas)	Bajas (60 vacas)	
Silo de Maíz				
Silo de Triticali				
Silo de Alfalfa				
Alfalfa Henificada				
Maíz Rolado				
Concentrado				
Canola				
Soya				
Minerales				
Semilla de Algodón				
Grano de Maíz Seco Dest.				
Secuestrante (Capture)				
Secuestrante (Capture)(kg/ton)				
TOTAL				

MEDIA LUNA					
Ingrediente	Cantidad (kg/vaca)				Cambio en la dieta (sí)
	Super Altas	Altas	Medias	Bajas	
Silo de Alfalfa					
Avena Henificada					
Alfalfa Henificada					
Salvado de Maíz					
Ensilaje de Maíz					
Semilla de Algodón					
Maíz Rolado					
Núcleo (Previtep)					
Concentrado					
Pasta de soya					
Bicarbonato					
Lactomil					
Procreatin					
Galleta					
Glucomiel					
Secuestrante (Calibrin a) (kg/vaca)					
Secuestrante (Calibrin a) (kg/ton)					
TOTAL					

**II. PRODUCCIÓN**

**INDICACIÓN:** PROMEDIO DE PRODUCCIÓN POR VACA DE ACUERDO A SU ESTADO PRODUCTIVO

JUDIO				
	Altas	Frescas	Bajas	
N° de Vacas				
Producción diaria (L)				
Promedio (L/vaca día)				
PRODUCCIÓN PROMEDIO DEL HATO: 30 litros/vaca/día				
TEPETATILLO				
	Altas	Frescas	Bajas	
N° de Vacas				
Producción diaria (L)				
Promedio (L/vaca día)				
PRODUCCIÓN PROMEDIO DEL HATO: 28 litros/vaca/día				
MEDIA LUNA				
	Super Altas	Altas	Medias	Bajas
N° de Vacas				
Producción diaria (L)				
Promedio (L/vaca día)				
PRODUCCIÓN PROMEDIO DEL HATO: 28 litros/vaca/día				

## Anexo C. Fichas técnicas de los productos comerciales de agentes secuestrantes

### ASTRA BEN 20 (AB 20 A)

REG. SAGARPA Q-0259-025

- **Nombre Comercial:** Astra Ben 20 (AB20A).
- **Análisis garantizado:** Cada 100gr del producto contiene: Oxido de silicio 59.00 %, Oxido de aluminio 14.00 %, Oxido de Sodio 0.9%, Oxido de calcio 0.4%, Humedad 5%, pH 9.2.
- **Ingredientes:** Bentionita, silica y cristales de cuarzo.
- **Indicaciones:** Astra Ben 20A (AB 20A) es un poderoso secuestrante de micotoxinas elaborado a base de bentionitas que se emplea en las materias primas y alimentos balanceados para animales a fin de evitar los efectos nocivos en los parámetros productivos y reproductivos, así como los daños hepáticos que las micotoxinas ocasionan en los animales domésticos. Adicionalmente Astra Ben 20A (AB 20A) reduce el apelmazamiento y proporciona fluidez a los alimentos balanceados y premezclas para alimentos terminados.
- **Dosis:** Administrar de 1 a 2 kg por tonelada de producto a tratar (0.1 a 0.2%), para el caso de productos muy contaminados administrar 5 kg por tonelada (0.5%).
- **Vía de administración:** Oral, mezclado en las materias primas, granos y alimentos balanceados.
- **Advertencias:** Evite la inhalación y el contacto del producto por periodos prolongados. Evítese el contacto con los ojos. Lavarse las manos después del contacto con el producto.
- **Almacenamiento:** Consérvese el producto en un lugar limpio y seco. Protéjalo de la humedad excesiva.

### Calibrin A

- **Nombre comercial:** Calibrin A.
- **Laboratorio:** Amlan International.
- **Composición:** Mineral absorbente de montmorillonita altamente refinado.
- **Dosis:** Agregar de 0.5 a 2 kg por tonelada de alimento.
- **Análisis garantizado:** Oxido de silicio 78.00 % máximo, Oxido de aluminio 15.00 % máximo, Humedad 13.00 % máximo.



- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- **Características:** Calibrin-A ha sido cuidadosamente seleccionado y procesado para aprovechar al máximo su capacidad de atraer y aislar las moléculas de aflatoxina para que se trasladen por las heces del animal sin ocasionarle daños. Esto reduce la biodisponibilidad de la aflatoxina y de otras toxinas para el animal y disminuye los efectos adversos en su rendimiento. Calibrin-A se somete a un procesamiento exhaustivo para aprovechar al máximo la cantidad de partículas de ingrediente activo por dosis. Esto reduce de manera muy efectiva la interacción del adsorbente con las moléculas de micotoxina en el tracto gastrointestinal, lo cual resulta en un mayor aislamiento de las toxinas.

#### **Celtic® Zeta**

- **Nombre comercial:** Celtic® Zeta.
- **Laboratorio:** Holland.
- **Composición Química:** Calcio (Ca) 1.50-2.50%, Potasio (K) 0.25-0.50%, Sodio (Na) 0.50-1.00%, Aluminio (Al) 1.50-2.50%, Sílice (Si) 30.00-35.00%.
- **Características:** Detoxificante de micotoxinas de 3<sup>ra</sup> generación, elaborado a base de glucomananos, enzimas y silicas precipitadas obtenidas por síntesis bioquímica.
- **Espectro de acción indicadas por el fabricante:** Fusarium: Zearalenona (ZEN) y en general: Aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), Ocratoxina (OTA), Deoxinivalenol (DON, vomitoxina), Toxina T-2 (T-2), Fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>).
- **Dosis recomendada por el fabricante:** De 10 a 20 g/vaca/día
- **Vía de administración:** Oral mezclado en el alimento terminado.

#### **MYCOSORB<sup>MR</sup>**

- **Nombre comercial:** MYCOSORB<sup>MR</sup>.
- **Laboratorio:** ALLTECH INC.
- **Composición Química:** Proteína cruda 28.00% (min), Grasa cruda 1.40% (min), Fibra cruda 13.00% (min), Proteína de glucomanano 25.00% (min).
- **Características:** Levadura seca irradiada como fuente de manano oligosacáridos. Glucomananos esterificados (EGM), extraídos de la pared celular de la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), cepa 1026.

- **Espectro de acción indicadas por el fabricante:** Adsorbente de micotoxinas para alimentos de bovinos, equinos, porcinos, ovinos, caprinos, caninos, felinos y aves.
- **Dosis recomendada por el fabricante:** 2kg / tonelada de alimento balanceado.
- **Vía de administración:** Oral, mézclase con el alimento balanceado.

#### **Capture®**

- **Nombre comercial:** Capture®
- **Laboratorio:** Nuba Comercial, RB Nutrition.
- **Composición:** Aluminosilicatos de última generación adicionado de paredes celulares.
- **Dosis recomendado por el fabricante:** 30gr/vaca/día.

#### **mycoad® ZT.**

REG. SAGARPA A-0250-001

- **Nombre comercial:** mycoad® ZT.
- **Laboratorio:** AVIMEX®.
- **Descripción:** Detoxificante de micotoxinas purificado, especialmente formulado para adsorber y retener las principales micotoxinas que afectan a los animales, y en especial las Fusariotoxinas.
- **Composición:** Arcilla organofílica purificada 100%.

**Indicaciones:** Detoxificante inocuo de uso continuo en los alimentos balanceados del pollo de engorda, gallinas de postura y reproductoras,

- cerdos, bovinos y otras especies, para la eliminación de micotoxinas que los contaminan como: T2 toxina, Diacetoxiscirpenol (DAS), Deoxinilvalenol (DON), Fumonisinás, Zearalenona, Citrinina, Ocratoxina A, Afs, Acido Ciclopiazónico, Ergotamina y Ergovalina. mycoad® ZT presenta alta especificidad, afinidad y potencia para la adsorción y neutralización de las micotoxinas presentes en los alimentos pecuarios, y es seguro para los nutrientes, vitaminas, minerales, pigmentos, probióticos, promotores de crecimiento, farmacéuticos y otros elementos contenidos en la ración, por lo que su uso es seguro para los animales.
- **Dosis y vía de administración:** Oral, mezclado en el alimento a razón de: AVES: 0.5 a 1.0 kg / ton de alimento, uso continuo. CERDOS: 0.5 a 1.0 kg / ton de

alimento, uso continuo. BOVINOS: 10 a 20 g/ cabeza/ día en programa continuo mezclado en el alimento concentrado o en la ración integral de becerras, vaquillas, vacas secas o en producción, dependiendo de la severidad del desafío. En exposiciones extremas se recomienda el uso de hasta 30 g/ cabeza/ día hasta agotar la fuente de exposición.

- **Precauciones:** Consérvese fuera del alcance de los niños y los animales. Almacene en un lugar fresco y seco. Evite la exposición directa a la luz del sol.
- **Advertencias:** Se recomienda que los operarios utilicen equipo de protección industrial como goggles y mascarilla para polvos finos.

**myco ad.**

REG. SAGARPA Q-0258-021

- **Nombre comercial:** myco-ad®
- **Laboratorio:** AVIMEX®
- **Descripción:** Aluminosilicato de calcio y sodio hidratado activado de amplio espectro y potencia, especialmente formulado para adsorber y retener las principales micotoxinas que afectan a los animales.
- **Fórmula:** Cada 100 g de myco-ad® contienen: Aluminosilicato hidratado de calcio y sodio, activado.....100.0 g.
- **Indicaciones:** myco-ad® está indicado como auxiliar en la prevención y control de los daños ocasionados por la micotoxinas en los animales domésticos, como las Afs (B1, B2, G1 y G2), Fusariotoxinas (Zearalenona, Fumonisinias y Tricotecenos como T2, Scirpenoles, Ácido Ciclopiazónico, Vomitoxina o DON), Ocratoxinas y Citrinina.
- **Dosis y vía de administración:** Administre myco-ad® en el alimento de los animales, en forma continua. AVES: Administre 2.5 kg de producto por tonelada de alimento. En micotoxicosis severas, se puede incrementar la dosis a 3.5 Kg/ ton de alimento, hasta que los niveles de exposición disminuyan. CERDOS: Administre 2.5 kg de producto por tonelada de alimento y hasta 3.5 kg / ton en altos desafíos. BOVINOS: Administre de 60 a 100 g de producto por cabeza /día en el alimento concentrado.

- **Precauciones:** Consérvese fuera del alcance de los niños y los animales. Almacene en un lugar fresco y seco. Evite la exposición directa a la luz del sol.
- **Advertencias:** Se recomienda que los operarios utilicen equipo de protección industrial como goggles y mascarilla para polvos finos.

**Duotek®** es un aluminosilicato cuya superficie tiene una incorporación parcial y selectiva de un compuesto orgánico (ORGANOALUMINOSILICATO) que le confiere un excelente balance en su afinidad por micotoxinas poco polares (como la Zearalenona) y de alta polaridad (como las Aflatoxinas), de ahí su cualidad de ANFOTERICO, tiene además una buena capacidad para adsorber tricotecenos.

**Indicaciones:** **Duotek®** es un aditivo eficiente en la eliminación de Zearalenona, Ocratoxina A, Fumonisina B1, Toxina T-2 y otros tricotecenos, así como de Aflatoxinas, presentes en los alimentos para animales monogástricos y rumiantes.

**Vía de Administración:** Oral, mezclado en el alimento.

**Dosis y direcciones de uso:** Se recomienda utilizar de 1 a 3 kg por tonelada de alimento, dependiendo del nivel de contaminación presente.

Debido a su bajo nivel de inclusión, es necesaria su incorporación en la premezcla para asegurar una dispersión adecuada en el alimento terminado.

**Precauciones:** Consérvese en un lugar fresco y seco.

**Presentación:** Sacos con 20 kg.

**Control de calidad:** Antes de salir a la venta, cada lote de producto es analizado en el laboratorio utilizando la técnica de cromatografía líquida de alta resolución, lo que permite garantizar un nivel de adsorción en una solución de pepsina de: 95% de Zearalenona, 90% de Ocratoxina A, 98% de Fumonisina B1, 39% de Toxina T-2 y 90% de Aflatoxinas.

#### **Anexo D. Procedimiento para la realización del método de ELISA de acuerdo a las especificaciones del fabricante.**

El Material necesario se enlista a continuación:

- Placas de 96 pozos recubiertos con anticuerpos anti- aflatoxina M1.
- Estándares de aflatoxina M1 con las siguientes concentraciones: 0.0 (estándar cero), 5.0, 10.0, 20.0, 40.0 y 80.0 ng/L.
- Conjugado enzimático (peroxidasa) con aflatoxina M1.
- Substrato/cromógeno, contiene tetrametilbencidina.
- Solución stop, contiene ácido sulfúrico 1.0 N.
- Buffer de dilución de la muestra.
- Buffer de dilución del conjugado.

#### **Procedimiento:**

1. Homogenizar manualmente las muestras de leche y tomar 1 ml en tubo eppendorf.
2. Centrifugar (10min/ 3500 g/ 10°C)
3. Retirar grasa (parte superior)
4. Agregar 100  $\mu$ L de anticuerpo diluido e incubar 15 min.
5. Eliminar los líquidos de la placa y lavarla con 250  $\mu$ L de solución de lavado dos veces. Al final secar la placa con papel absorbente.
6. Agregar 100  $\mu$ L de cada estándar por duplicado en la placa.
7. Agregar 100  $\mu$ L de cada muestra por duplicado en la placa.
8. Incubar durante 30 min a temperatura ambiente (20–25° C) en oscuridad.
9. Eliminar los líquidos de la placa y lavarla con 250  $\mu$ L de solución de lavado dos veces. Al final secar la placa con papel absorbente.
10. Agregar 100  $\mu$ L de conjugado de enzima diluida a cada uno de los pozos. Agitar la placa e incubar durante 15 min a temperatura ambiente en oscuridad.
11. Eliminar los líquidos de la placa y lavarla con 250  $\mu$ L de solución de lavado dos veces. Al final secar la placa con papel absorbente.
12. Agregar 100  $\mu$ L de substrato/cromógeno a cada pozo. Agitar la placa e incubar durante 15 min a temperatura ambiente en oscuridad.
13. Agregar 100  $\mu$ L de solución stop a cada pozo. Agitar la placa y medir la absorbancia a 450 nm en un lector de microplacas de ELISA (BioTek Instruments, Inc., USA). Leer la placa dentro de los 15 min después de agregar la solución de stop.

Para la interpretación de resultados se realizó una curva de calibración con los estándares y/o se utilizará la siguiente fórmula:

$$\left( \frac{\text{Abs est o muestra}}{\text{Abs est cero}} \right) 100 = \% \text{ Abs}$$

Dónde:

- Abs est o muestra = absorbancia del estándar o de la muestra
- Abs est cero = absorbancia del estándar cero
- % Abs= absorbancia de la muestra expresada en porcentaje
- 

El estándar cero es lo que hace igual a 100% y los valores de absorbancia se representan en porcentajes. Los valores calculados de los estándares se introducen en un sistema de coordenadas semi-logarítmico en función de la concentración de aflatoxina M<sub>1</sub> [ng/L]. La Figura No. 8 muestra la curva estándar usada para calcular la concentración de AFM<sub>1</sub> en las muestras lácteas.

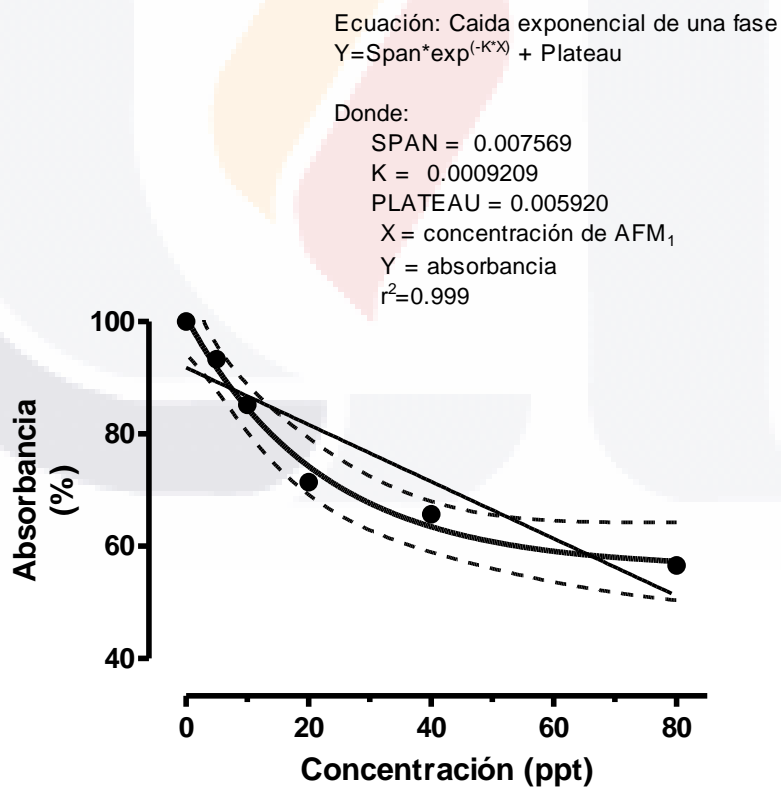


Figura 8. Curva patrón para la concentración aflatoxina M<sub>1</sub> en leche de bovino.

**Anexo E. Manuscrito de propuesta de artículo**

**Factores de riesgo asociados con la presencia de la Aflatoxina M<sub>1</sub> en la leche  
cruda de vaca en establos de la región El Llano, México**

Claudia Abril Miranda Castañeda <sup>a</sup>, Raúl Ortiz Martínez <sup>a</sup>, Teódulo Quezada  
Tristán <sup>a</sup>, Arturo Gerardo Valdivia Flores <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Cuerpo Académico de Micotoxinas. Centro de Ciencias Agropecuarias,  
Universidad Autónoma de Aguascalientes, México  
Raúl Ortiz Martínez. raormar2000@gmail.com



## RESUMEN

La aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) es un potente carcinógeno. Si el ganado la consume en el alimento, se produce un metabolito que excreta en la leche, la aflatoxina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>), también con potencial carcinogénico. A nivel internacional se han establecido límites máximos permisibles (LMP) de AFM<sub>1</sub> en la leche. El objetivo del estudio fue evaluar factores de riesgo asociados tales como el uso de secuestrantes y la calidad de almacenamiento del alimento, con el nivel de AFM<sub>1</sub> en la leche. De tres establos de la región El Llano, México, se recolectaron 216 muestras de leche. Se recabó información sobre el uso de secuestrantes, las condiciones de almacenamiento de alimentos, la cantidad de leche de acuerdo a los lotes productivos y el nivel de aflatoxinas totales (AF) en los alimentos. El nivel de AFM<sub>1</sub> fue analizado por el método de ELISA competitiva. 54.16% de las muestras tuvieron niveles detectables de AFM<sub>1</sub>. Ninguna muestra superó el LMP por la Norma Oficial Mexicana (0.5 µg/L); sin embargo 27.31% superó el LMP por la Unión Europea (UE). Se encontró una asociación estadísticamente significativa entre los niveles de AFM<sub>1</sub>, con la calidad de almacenamiento del alimento (P<0.05) y con la adición de la dosis del secuestrante indicada por el fabricante; se observó también una influencia estacional en la ocurrencia de AFM<sub>1</sub> (P<0.05). Los resultados muestran que la dosis adecuada del secuestrante y la buena calidad del almacenamiento del alimento, debe ser considerado como factores determinantes para disminuir la presencia de AFM<sub>1</sub> en la leche.

PALABRAS CLAVE: aflatoxina M<sub>1</sub>, biomarcador, secuestrantes, aflatoxina B<sub>1</sub>



## Introducción

Las aflatoxinas (AF) son metabolitos tóxicos por hongos del género *A. flavus* que afectan la inocuidad de productos agrícolas utilizados para consumo humano y animal <sup>(1)</sup>. La aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) está considerada como el carcinógeno natural más potente que existe <sup>(2)</sup> y junto con su derivado metabólico, la AFM<sub>1</sub>, han sido clasificadas por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) dentro del grupo 1, como cancerígenas para humanos <sup>(3)</sup>. La AFM<sub>1</sub> es excretada en la leche de mamíferos que consumieron AFB<sub>1</sub> en el alimento <sup>(4)</sup> y en la actualidad, no existe un método físico simple para eliminarla de la leche ya que no es afectada por la pasteurización o procesos como los que se necesitan para fabricar queso o yogurt <sup>(5)</sup>.

Se sabe que el nivel de AFM<sub>1</sub> en la leche está asociado con factores como las condiciones climáticas <sup>(10)</sup>, con la etapa de producción de leche, detectándose mayor eliminación de AFM<sub>1</sub> en etapas de alta producción comparativamente con las de baja <sup>(11)</sup>, con las estrategias de desintoxicación (secuestrantes, microorganismo y enzimas) <sup>(12)</sup>, y de acuerdo con el *Codex Alimentarius* 2012 <sup>(1)</sup>, con las buenas prácticas agrícolas (BPA) y buenas prácticas de fabricación (BPF).

El nivel de AFM<sub>1</sub> en la leche y productos lácteos es regulado en varios países. El límite de la UE de 0.05 µg/L sigue siendo el más bajo del mundo <sup>(6)</sup>. En México, la NOM-243-SSA1-2010 especifica que el máximo nivel permitido es de 0.5 µg/L.

En México, se ha reportado una elevada ocurrencia de AFM<sub>1</sub> en leche cruda de vaca. En el Altiplano Mexicano, se detectó a la AFM<sub>1</sub> en el 50% de las muestras analizadas, en un rango de 0.05 a >50 µg/L <sup>(7)</sup>. En el estado de Jalisco, se encontró una presencia del 80%, con rangos de 0.006 a 0.065 µg/L <sup>(8)</sup> y un estudio más reciente, realizado en la zona Metropolitana de Guadalajara, reveló una contaminación del 100% de las muestras, con rango de <0.005 a 0.100 µg/L <sup>(9)</sup>.

Una alternativa para una evaluación más precisa de la exposición a AFB<sub>1</sub> en el alimento, es medir la AFM<sub>1</sub> en la leche, ya que es considerada un biomarcador de exposición <sup>(13)</sup>.

En nuestro estudio fueron evaluados factores de riesgo asociados con el nivel de  $AFM_1$  en unidades de producción de leche (UPL), considerando la calidad del almacenamiento del alimento, el uso de secuestrantes, las estaciones del año y el nivel productivo del ganado.



## **Materiales y Métodos**

### *Lugar de estudio*

El estudio se realizó en tres Unidades de Producción de Leche (UPL) ubicadas en la región de El Llano, México; las tres UPL fueron seleccionadas por el método de conveniencia, en base a la disponibilidad de los propietarios para proporcionar el acceso a las instalaciones y a la información <sup>(14)</sup>. Las UPL fueron identificadas como UPL 1, UPL 2 y UPL 3.

### *Recolección de muestras de leche*

Se recolectaron 25 mL de leche cada 15 días, durante 12 meses durante la realización de la rutina de ordeño de las vacas. El muestreo se realizó por lotes clasificados de acuerdo al nivel de producción establecido por los propietarios (alta, media y baja).

Se utilizaron frascos limpios de plástico previamente identificados los cuales fueron transportados en condiciones de refrigeración y almacenados en congelación (-20°C) hasta su análisis.

### *Recolección de datos*

Para la obtención de la información se elaboraron formatos para aplicar encuestas que incluyeron datos como: las condiciones de almacenamiento del alimento categorizándolas de acuerdo a tres niveles de calidad: mala, regular y buena; el uso de agentes secuestrantes y la producción de leche. Durante el estudio, los alimentos para el ganado de las UPL, se analizaron para conocer el nivel de AF en el concentrado, el ensilaje y en la ración integral.

### *Categorización de las Condiciones de almacenamiento del alimento*

En cada muestreo, se aplicó una encuesta basada en las prácticas que el *Codex Alimentarius* considera como detonantes para la producción de AF. El formato, constó de 17 condiciones de las cuales se verificaba su cumplimiento o no; al final de la encuesta la puntuación total ubicó a las UPL en una condición determinada:

85-100%= Buena, 74-84%= Regular y  $\leq 70\%$ = Mala. Se codificaron los tres categorías en una base de datos electrónica (*Excel, Microsoft®*).

#### *Uso de agentes secuestrantes*

De igual manera, en cada muestra, se aplicó una encuesta para recabar la información acerca de secuestrante (sustancia activa y la dosis aplicada) en la ración integral, diferenciando igualmente los lotes de alta, media y baja producción. Los datos obtenidos en la base de datos antes mencionada. Asimismo, se recopilaron las fichas técnicas de los productos utilizados para comparar el cumplimiento de las indicaciones del fabricante.

#### *Cuantificación de AFM<sub>1</sub> en las muestras de leche*

Las muestras de leche obtenidas se analizaron para medir la concentración de AFM<sub>1</sub> mediante una reacción inmunoenzimática de tipo competitivo usando un kit comercial (*Ridascreen® Aflatoxin M<sub>1</sub> r-biopharm; Germany*). El protocolo se realizó de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de microplacas de ELISA (BioTek Instruments, Inc., USA). Para obtener la concentración de las muestras de leche con AFM<sub>1</sub>, se utilizó la curva de calibración realizada previamente con los valores de los estándares. Los valores de la concentración de AFM<sub>1</sub> en las muestras de leche, fueron registrados en la base de datos.

#### *Análisis estadístico*

Los datos obtenidos se sometieron a un análisis estadístico mediante Chi-cuadrada, Razón de Momios (OD), ANOVA y la Prueba de Rangos Múltiples de Bonferroni. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software STATGRAPHICS Centurion XVI.II (*Statgraphics.Net, España*). Las diferencias encontradas se consideraron estadísticamente significativas cuando  $P \leq 0.05$ .

## Resultados

### *Presencia de AFM<sub>1</sub> en las muestras de leche*

El 54.16% de las muestras de leche analizadas tuvieron niveles detectables de AFM<sub>1</sub>, donde 34.18% corresponde a las UPL 1 y 3, mientras que el 31.62% corresponde a la UPL 2. Ninguna de estas muestras superó el LMP establecido por la Norma Oficial Mexicana (0.5 µg/L); sin embargo, 47% superó el LMP establecido por la UE (0.05 µg/L).

### *Presencia de AF en el concentrado, el ensilaje de maíz y la ración integral*

El 100% de las muestras analizadas de concentrado, del ensilaje de maíz y de la ración integral tuvieron niveles detectables de AF, donde el 99% superó el LMP de AF (20 µg/Kg) por la UE y la FDA. El 49.9% corresponde al concentrado, el 33.2% al ensilaje de maíz y el 16% a la ración integral. Los resultados tanto de AFM<sub>1</sub> como de AF indican una falta de inocuidad tanto en la leche, como en los alimentos para los animales, representan una problemática vigente en las UPL de la región estudiada.

### *Grado de asociación entre las variables consideradas como factores de riesgo y los niveles de AFM<sub>1</sub>*

En el Cuadro 1, se muestra el grado de asociación entre los factores de riesgo con el efecto de superar o no el LMP de AFM<sub>1</sub>; así como el grado de probabilidad de que ocurra este efecto. Los resultados muestran una dependencia altamente significativa ( $P < 0.01$ ) entre usar la dosis de secuestrante indicada por el fabricante y tener una buena calidad del almacenamiento del alimento para disminuir la AFM<sub>1</sub>. En contraste, no se observó dependencia significativa ( $P > 0.05$ ) entre usar o no un agente secuestrante, por lo que el nivel de AFM<sub>1</sub>, pudiera ser atribuible al azar, en este caso. Esto parece indicar que el cumplimiento de las indicaciones del fabricante del uso del secuestrante cumpliría, de mejor manera, el objetivo de disminuir la biodisponibilidad de la AF. De acuerdo con OR, se mostró que la probabilidad de superar el LMP de AFM<sub>1</sub> en la leche, es 2.2 veces más cuando no se utiliza la dosis del secuestrante indicada por el fabricante. Un efecto similar

se observó con la calidad de almacenamiento del alimento, en donde se observó que la probabilidad de superar el LMP de AFM<sub>1</sub> en la leche, es casi dos veces más, con una mala calidad de almacenamiento que cuando las condiciones de almacenamiento son buenas. En relación al uso o no de secuestrantes, los resultados de Chi- cuadrada y OR, son concordantes ya que sugieren que la probabilidad de superar el LMP de AFM<sub>1</sub> aparecerá independientemente de la adición de secuestrantes.

#### *Comparación del nivel de AFM<sub>1</sub> entre las UPL*

En el Cuadro 2 se muestra una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) de la concentración media de AFM<sub>1</sub> entre las UPL, donde la concentración media de AFM<sub>1</sub> detectada en la leche de la UPL 1, fue superior a la detectada en las UPL 2 y 3. Podemos inferir que debido a la Mala Calidad del almacenamiento durante todo el estudio en la UPL 1, influyó en este resultado.

#### *Comparación de los niveles de AFM<sub>1</sub> y AF con relación a las estaciones del año*

Se encontró una diferencia altamente significativa entre la concentración media de AF y AFM<sub>1</sub> ( $P < 0.01$ ) con respecto a las estaciones del año. Tanto las AF como la AFM<sub>1</sub> se encontraron en niveles superiores en otoño, en comparación con las demás estaciones del año, como se observa en el Cuadro 3; lo cual pudiera confirmar un efecto de estacionalidad en la producción de AF.

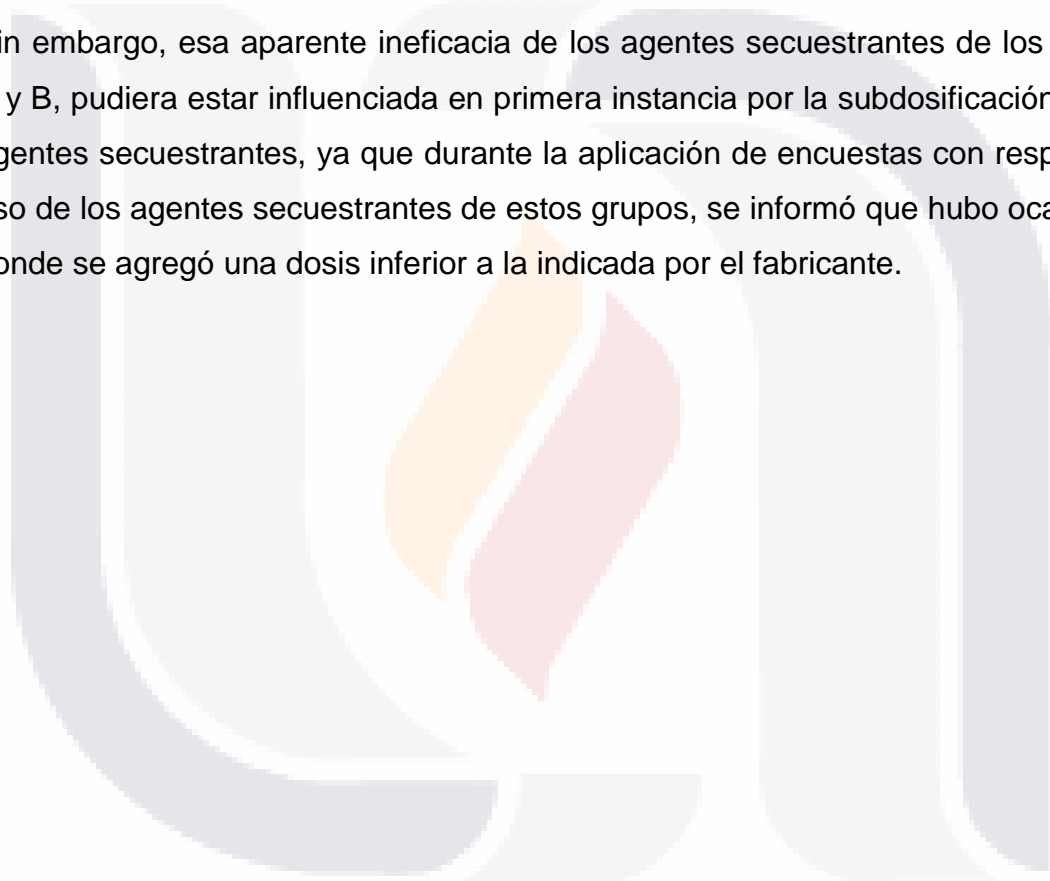
#### *Comparación del nivel de AFM<sub>1</sub> entre los lotes productivos*

No se observó una diferencia estadísticamente significativa ( $P > 0.05$ ) entre la concentración media de AFM<sub>1</sub> de los diferentes lotes productivos, es decir el nivel de AFM<sub>1</sub> no se relacionó con un mayor consumo de alimento del ganado de acuerdo al nivel de producción. Los resultados son atribuidos posiblemente a que no se controló el nivel de exposición del ganado a la AF, aspecto que es muy importante para determinar la tasa de eliminación de AFM<sub>1</sub>.

#### *Comparación del nivel de AF y AFM<sub>1</sub> con relación al uso de diferentes agentes secuestrantes*

Como se muestra en el Cuadro 4, se encontró una diferencia altamente significativa ( $P < 0.01$ ) en la concentración media de AF y AFM<sub>1</sub>, al utilizar diferentes agentes secuestrantes. La concentración media de AFM<sub>1</sub> fue la más baja, al adicionar alguno de los agentes secuestrantes del grupo C. Mientras que la media de AFM<sub>1</sub> al aplicar alguno de los agentes secuestrantes de los grupos A y B fue superior. Esto pudiera interpretarse como una pobre eficacia de los agentes secuestrantes que integran estos dos grupos.

Sin embargo, esa aparente ineficacia de los agentes secuestrantes de los grupos A y B, pudiera estar influenciada en primera instancia por la subdosificación de los agentes secuestrantes, ya que durante la aplicación de encuestas con respecto al uso de los agentes secuestrantes de estos grupos, se informó que hubo ocasiones donde se agregó una dosis inferior a la indicada por el fabricante.



## Discusión

En nuestro estudio se obtuvieron niveles detectables de AFM<sub>1</sub> en el 54.16% de las muestras de leche analizadas, confirmando y coincidiendo con la alta incidencia de AFM<sub>1</sub> que ya se ha reportado en nuestro país. Como se mencionó, en el Altiplano Mexicano, se detectó a la AFM<sub>1</sub> en el 50% de las muestras analizadas, en un rango de 0.05 a >50 µg/L <sup>(7)</sup>, en el estado de Jalisco, encontraron una incidencia del 80%, fluctuando la concentración de AFM<sub>1</sub> de 0.006 a 0.065 µg/L <sup>(8)</sup> y en la zona Metropolitana de Guadalajara, se reveló una contaminación del 100% de las muestras, con niveles en el rango de <0.005 a 0.100 µg/L <sup>(9)</sup>. Adicionalmente, los niveles de AFM<sub>1</sub> detectados en otros países muestran amplias diferencias, demostrándose la relación causal de los sistemas de alimentación, factores propios de los animales y las condiciones ambientales <sup>(12,15,16)</sup>, así como por los procedimientos analíticos utilizados <sup>(17,18)</sup>. En Brasil, encontraron alta incidencia de AFM<sub>1</sub> (95.2 % y 67 %, ) <sup>(19,20)</sup>. En contraste otro estudio, Rodríguez y col. <sup>(21)</sup>, reportaron una incidencia de AFM<sub>1</sub> del 3.3 % en muestras de leche obtenida de establos de la provincia de León, España. La ocurrencia de AFM<sub>1</sub> en niveles bajos en los países europeos puede sugerir una regulación estricta de AFB<sub>1</sub> en los alimentos complementarios para ganado lechero <sup>(4)</sup>.

Con respecto al uso de secuestrante, en nuestro estudio fue evidente que su inclusión a la dosis indicada por el fabricante, tuvo una relación causal altamente significativa ( $P < 0.01$ ) con el nivel de AFM<sub>1</sub> detectado en las muestras de leche. Nuestros resultados coinciden con autores, ya que desde hace tiempo se reporta que la capacidad de los agentes secuestrantes para unirse y adsorber a la AFB<sub>1</sub> depende en gran parte de la dosis empleada <sup>(22)</sup>. Por ejemplo, Sabater-Vilar y col. <sup>(23)</sup>, al probar la capacidad de unión de varios agentes secuestrantes, obtuvieron que el mejor producto exhibió una capacidad de unión >97%, indicando que los productos fueron utilizados solo en una inclusión de 2.5 mg/mL, la cual correspondía a la concentración recomendada por las compañías de distribución comercial. Así mismo, se ha reportado con anterioridad que la mayoría de los agentes secuestrantes han sido reconocidos como adsorbentes eficientes para



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

aflatoxinas, cuando se adicionan en el alimento a una concentración de 10 g/kg (en un rango de 5 a 20 g/kg) <sup>(24,25)</sup>, lo cual corresponde con las concentraciones indicadas como preventivas por la mayoría de los agentes secuestrantes en su presentación comercial. Por otra parte, nuestros resultados mostraron que la probabilidad de superar el LMP de AFM<sub>1</sub> aparecerá independientemente si el agente secuestrante se adiciona o no; en contraste, destaca más el efecto de incluir la dosis indicada para disminuir esa probabilidad. Sin embargo, además de la importancia de utilizar un secuestrante a la dosis indicada por el fabricante, Battacone y col.<sup>(26)</sup>, reportaron que la concentración de AFM<sub>1</sub> en la leche fue significativamente influenciada por la dosis de AFB<sub>1</sub> en el alimento. También es necesario tomar en cuenta las características fisicoquímicas del secuestrante y de la micotoxina, ya que son factores que influyen para que se lleve a cabo el fenómeno de adsorción <sup>(27)</sup>. Por lo tanto, no existe hasta el momento un adsorbente con la capacidad de aglutinar varias micotoxinas, justificando así, que en la actualidad exista una amplia gama de productos secuestrantes de micotoxinas de forma comercial <sup>(28)</sup> y que los productores de leche utilicen varios productos comerciales, tal es el caso de las UPL que colaboraron en nuestro estudio. De los secuestrantes utilizados, el más eficaz fue la mezcla de HSCAS con pared celular de levadura, con la concentración media de AFM<sub>1</sub> más baja en la leche (0.019 µg/L). Mientras que cuando se utilizaba el HSCAS activado únicamente, se obtuvo una menor eficacia, considerando el promedio de AFM<sub>1</sub> detectada en la leche (0.080 µg/L) utilizando ese producto. Nuestros resultados difieren con lo reportado por varios autores, quienes encontraron una mayor capacidad de unión del HSCAS activado a la AFB<sub>1</sub>, que la presentada por los productos a base de pared celular de levadura o a base de la combinación de HSCAS con pared celular de levadura (P<0.001) <sup>(29,30,31,32)</sup>. El contraste con nuestros resultados se debe posiblemente a que la dosis administrada del HSCAS activado por las UPL, no fue la indicada por el fabricante en la mayoría de las ocasiones en que se adicionó al alimento, considerando la dependencia que esta variable mostró con el nivel de AFM<sub>1</sub> en la leche.

En relación a la calidad del almacenamiento del alimento, el mantener una buena calidad, resultó tener relación causal significativa ( $P < 0.05$ ) con el nivel de AFM<sub>1</sub> en las muestras de leche. Diversos estudios indican que la contaminación por AF no está restringida a ningún componente de la ración integral para el ganado lechero, pero el nivel de contaminación varía, dentro de otras cosas, por las condiciones de almacenamiento, ya que bajo condiciones de almacenamiento inapropiadas, las aflatoxinas se pueden formar en casi cualquier semilla de la cosecha <sup>(1,33,34)</sup>. Se sabe que en la ganadería lechera es necesario que los insumos que integran la ración integral para el consumo del ganado, se almacenen para contar con ellos durante el año. El ensilaje, es uno de los métodos que con mayor frecuencia se utiliza para el almacenamiento y la preservación de forrajes <sup>(35,36,37,38)</sup>. En nuestro estudio, las UPL incluían al ensilaje de maíz en casi el 50% de la ración integral proporcionada al ganado. Cuando no se mantiene una buena calidad en la fabricación y almacenamiento del ensilaje de maíz, las AF son de las micotoxinas que con mayor frecuencia se han encontrado, las cuales permanecen en el ensilaje aún después de haber desaparecido el hongo <sup>(39,40)</sup>. De acuerdo con nuestros resultados, de las tres UPL, la UPL<sub>1</sub>, obtuvo el mayor porcentaje de muestras de ensilaje con niveles de AF superiores al LMP, estipulado por la FDA y por la UE (20 µg/Kg). Cabe señalar, que la UPL<sub>1</sub>, se categorizó durante todo el periodo de estudio con una Mala Calidad de almacenamiento de alimento.

Entre los insumos o ingredientes utilizados con mayor frecuencia, está la semilla de algodón para elaborar la dieta integral del ganado lechero. Thota y col. <sup>(41)</sup>, mencionan que las semillas de algodón pueden estar contaminadas internamente durante el almacenamiento, tras el desmotado, si las esporas de *A. flavus* están presentes en la superficie de la semilla en el momento del almacenamiento y de acuerdo con Alonso y col. <sup>(42)</sup>, pueden representar un alto riesgo cuando son aplicadas en la ración integral del ganado lechero ya que es de los productos agrícolas que son frecuentemente contaminados con AF <sup>(43)</sup>. Al inicio del estudio, los niveles de AFM<sub>1</sub> en dos de las UPL, superaban el LMP, por lo que decidieron

realizar una prueba empírica y suspendieron el uso de semilla de algodón, obteniendo resultados satisfactorios ya que el problema se controló.

Con respecto a la etapa temprana de lactación y de alta producción del ganado lechero, han sido identificadas como de los principales factores que contribuyen a incrementar el porcentaje de eliminación de AFM<sub>1</sub> <sup>(11,44,45)</sup>. Nuestros resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $P>0.05$ ) entre los tres niveles de producción, con relación a la concentración de AFM<sub>1</sub> en la leche. Sin embargo, como ya se estableció anteriormente, no se controló el nivel de ingesta de AF del ganado lechero. Esto contrasta con los estudios experimentales, en los cuales todas las vacas recibieron AFB<sub>1</sub>, considerando el mismo nivel de exposición, para predecir la relación entre la tasa de eliminación (%) y la producción de leche (kg), en los que encontraron que la producción de leche es el principal factor que afecta la excreción total de AFM<sub>1</sub> <sup>(45)</sup>.

Por último, las concentraciones más altas de AFM<sub>1</sub> en la leche fueron detectadas en otoño, coincidiendo con los niveles más altos de AF en el alimento. Estudios diversos realizados en México, han reportado que la contaminación de leche por AFM<sub>1</sub> está influenciada por los factores climáticos estacionales, principalmente en época otoño-invierno <sup>(7,9,46)</sup>. La estación de otoño comprende los meses de septiembre, octubre y noviembre; caracterizándose por ser de un clima seco. Sultana y Hanif <sup>(47)</sup>, mencionan que durante los períodos de estrés por sequía, *A. flavus* puede convertirse en una especie dominante en el suelo, debido a su capacidad para crecer a altas temperaturas y con poca cantidad de agua. Por lo tanto, de acuerdo a nuestros resultados y a lo reportado, la estacionalidad influye de manera significativa en la presencia de AF y de AFM<sub>1</sub> en la leche.

## **Conclusiones e implicaciones**

La presencia de AFM<sub>1</sub> en el 54.16% de las muestras de leche analizadas, indica que la problemática con la falta de inocuidad de la leche, está vigente en la región denominada el Llano, México, lo que sugiere que la población consumidora de leche y productos lácteos está expuesta a la AFM<sub>1</sub>.

Los agentes secuestrantes de aflatoxinas adicionados en una dosis inferior a la indicada por el fabricante y la mala calidad en las condiciones de almacenamiento del alimento, fueron asociados con niveles superiores al LMP de AFM<sub>1</sub> en la leche. Por lo tanto, el uso del secuestrante, la dosis indicada del secuestrante y la calidad de las condiciones de almacenamiento del alimento, son factores de riesgo asociados al nivel de AFM<sub>1</sub> en la leche.

Se confirmó que la presencia de AF y de AFM<sub>1</sub> en las unidades de producción de leche, tiene una influencia estacional.

Es necesario continuar y profundizar con estudios que permitan definir los mejores secuestrantes, de acuerdo al tipo de AF y/o micotoxinas presentes en el alimento y sus ingredientes. El impacto de la aplicación de las medidas anteriores, será benéfico tanto para la salud animal como para la salud pública.

**Agradecimientos**

Este trabajo fue financiado con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y por la Universidad Autónoma de Aguascalientes a través de Proyecto PIPSA 12-02.



## Literatura citada

1. *Codex Alimentarius*. Prevention and Reduction of Food and Feed contamination. World Health Organization Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome 2012.
2. Roze LV, Hong SY y Linz JE. Aflatoxin Biosynthesis: Current Frontiers. *Annu Rev Food Sci Techn* 2013; (4): 293-311.
3. IARC. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol. 82. Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans II, Press Lyon France 2002.
4. Rahimi E, Bonyadian, M, Rafei M y Kazemeini HR. Occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in raw milk of five dairy species in Ahvaz, Iran. *Food Chem Toxicol* 2010; (48): 129-131.
5. Moosavy MH, Roostaei N, Katiraei F, Habibi-Asl B, Mostafavi H, Dehghan P. Aflatoxin M<sub>1</sub> occurrence in pasteurized milk from various dairy factories in Iran. *J Int Food Res* 2013; 20(6): 3351-3355.
6. European Community. 2006/1881/EC. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs (text with EEA relevance). *Official Journal of the European Union L* 2006; (364): 5–24.
7. Pérez J, Gutiérrez R, Vega S, Díaz G, Urbán G, Coronado M, Escobar A. Ocurrencia de Aflatoxina M<sub>1</sub> en leches cruda, Ultrapasteurizada y Orgánica producidas y comercializadas en el altiplano Mexicano. *Rev Salud anim* 2008; (30):103-109.
8. Reyes VW, Martínez AP, Isaías VHE, Nathal MAV, De-Lucas P, Rojo F. Aflatoxinas totales en raciones de bovinos y AFM<sub>1</sub> en leche cruda obtenida en establos del estado de Jalisco, México. *Tec Pecu Méx* 2009; 47 (2): 223-230.
9. Landeros P, Noa M, López Y, González DG, Noa E, Real M, Juárez C y Medina MS. Niveles de Aflatoxina M<sub>1</sub> en leche cruda y pasteurizada

- comercializada en la zona Metropolitana de Guadalajara, México. *Rev Salud anim* 2012; 34(1):40-45.
10. Polychronaki N, West RM, Turner PC, Amra H, Abdel-Wahhab M, Mykka"nen H, El-Nezami H. A longitudinal assessment of aflatoxin M<sub>1</sub> excretion in breast milk of selected Egyptian mothers. *Food Chem Toxicol* 2007; (45): 1210–1215.
  11. Britzi M, Friedman S, Miron J, Solomon R, Cuneah O, Shimshoni JA, Soback S, Ashkenazi R, Armer S, Sholosberg A. Carry-Over of Aflatoxin B<sub>1</sub> to Aflatoxin M<sub>1</sub> in High Yielding Israeli Cows in Mid- and Late- Lactation. *Toxins* 2013; (5): 173-183.
  12. Hassan HF y Kassaify Z. The risks associated with aflatoxins M<sub>1</sub> occurrence in Levanese dairy products. *Food Control* 2014; (37): 68-72.
  13. Adejumo O, Atanda O, Raiola A, Somorin Y, Bandyopadhyay R, Ritieni A. Correlation between aflatoxin M<sub>1</sub> content of breast milk, dietary exposure to aflatoxin B<sub>1</sub> and socioeconomic status of lactating mothers in Ogun State, Nigeria. *Food Chem Toxicol* 2013; (56): 171–177.
  14. Thrusfield M. *Veterinary Epidemiology*. 2th edition. London. UKD. Blackwell Sciences 1995; p. 185.
  15. Galvano F, Galofaro V y Galvano G. Ocurrence and Stability of Aflatoxin M<sub>1</sub> in Milk and Milk Products: A Worldwide Review. *J Food Protec* 1996; (59): 1079-1090.
  16. Tomasevic I, Petrovic J, Jovetic M, Raicevic S, Milojevic M y Miocinovic J. Two year survey on the occurrence and seasonal variation of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and milk products in Serbia. *Food Control* 2015; (56): 64-70.
  17. Horwitz W. "Evaluation of Analytical Methods Used for Regulation of Foods and Drugs". *Anal Chem* 1982; (54):67A.
  18. Kralj IC y Prosen H. An Overview of Conventional and Emerging Analytical Methods for the Determination of Mycotoxins. *Int J Mol Sci* 2009; (10):62-115.

19. Shundo L, Navas SA, Lamardo CLA, Ruvieri V y Sabino M. Estimate of aflatoxin M<sub>1</sub> exposure in milk and occurrence in Brazil. *Food Control* 2009; (20):655–657.
20. Iha MH, Barbosa CB, Okada IA y Trucksess MW. Occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in dairy products in Brazil. *Food Control* 2011; (22): 1971-1974.
21. Rodriguez V, Delso C y Ordoñez ED. ELISA and HPLC determination of the occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in raw cow's milk. *Food Addit Contam* 2003; (20): 276-280.
22. Galvano F, Piva A, Ritieni A, Galvano G. Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins: a review. *J Food Protec* 2001; (64):120-131.
23. Sabater-Vilar M, Malekinejad H, Selman MHJ, van der Doelen MAM y Fink-Gremmels J. In vitro assessment of adsorbents aiming to prevent deoxynivalenol and zearalenone mycotoxicoses. *Mycopathologia* 2007; (163):81–90.
24. Smith EE, Phillips TD, Ellis JA, Harvey RB, Kubena LF, Thomson J, Newton G. Dietary hydrated sodium calcium aluminosilicate reduction of aflatoxin M<sub>1</sub> residue in dairy goat milk and effects on milk production and components. *J Anim Sci* 1994; (72):677–682.
25. Pierre JJ. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. *Anim Feed Sci Techn* 2007; (137): 342-362.
26. Battacone G, Nudda A, Palomba M, Pascale M, Nicolussi P y Pulina G. Transfer of Aflatoxin B<sub>1</sub> from Feed to Milk and from Milk to Curd and Whey in Dairy Sheep Fed Artificially Contaminated Concentrates. *J Dairy Sci* 2005; (88):3063-3069.
27. Huwig A, Freimund S, Kappeli O y Dutler H. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicology Letters* 2001; (122): 179-188.
28. Tapia SM, García POD, Nieto LM, Ricque MD, Villarreal CD y Cruz SLE. Uso de secuestrantes para disminuir la toxicidad de micotoxinas en alimentos para acuicultura. *Avances en Nutrición Acuícola X-Memorias del Décimo Simposio Internacional de Nutrición Acuícola*. Universidad



- Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, 8-10 de Noviembre 2010; p 514-546.
29. Vekiru E, Fruhauf S, Sahin M, Ottner F, Schatzmayr G y Krska R. Investigation of various adsorbents for their ability to bind Aflatoxin B<sub>1</sub>. *Mycotoxin Res* 2007; (23): 27-33.
  30. Moschini M, Gallo A, Piva G, Masoero F. The effects of rumen fluid on the in vitro aflatoxin binding capacity of different sequestering agents and in vivo release of the sequestered toxin. *Anim Feed Sci Techn* 2008; (147): 292-309.
  31. Juan-juan L, De-cheng S y Xiao-ou S. Binding Capacity for Aflatoxin B<sub>1</sub> by Different Adsorbents. *Agricultural Sci China* 2010; 9(3): 449-456.
  32. Fruhauf S, Schwartz H, Ottnerb F, Krska R y Vekiru E. Yeast cell based feed additives: Studies on aflatoxin B<sub>1</sub> and zearalenone. *Food Addit Contam* 2011; (1):1-28.
  33. Wicklow DT. The mycology of stored grain: an ecological perspective. En: Jayas DS, White NDG, Muir WE (Eds.), *Stored-Grain Ecosystems*. Marcel Dekker, Inc, New York 1995; pp. 197–249.
  34. Alonso VA, Pereyra CM, Keller LAM, Dalcero AM, Rosa CAR y Chiacchiera SM. Fungi and mycotoxins in silage: an overview. *J Appl Microbiol* 2013; 1-7.
  35. Bucio-Villalobos CM, Guzmán-de-Peña D y Peña-Cabriales JJ. Aflatoxin synthesis in corn fields, *Rev Iberoam Micol* 2001; (18): 83-87.
  36. Richard E, Heutte N, Sage L, Pottier D, Bouchart V, Lebailly P, Garon D. Toxicogenic fungi and mycotoxins in mature corn silage. *Food Chem Toxicology* 2007; (45): 2420-2425.
  37. Richard E, Heutte N, Bouchart V, Garon D. Evaluation of fungal contamination and mycotoxin production in maize silage. *Anim Feed Sci Techn* 2009; (148): 309-320.
  38. Hutnik E y Kobiela S. Density of silage stored in horizontal silos. *Acta Agrophys* 2012; (19):539–549.

39. Roigé MB, Aranguren SM, Riccio MB, Pereyra S, Soraci AL, Tapia MO. Mycobiota and mycotoxins in fermented feed, wheat grains and corn grains in Southeastern Buenos Aires Province, Argentina. *Rev Iberoam Micol* 2009; (26): 233–237.
40. Li Y, Nishino N. Bacterial and fungal communities of wilted Italian ryegrass silage inoculated with and without *Lactobacillus rhamnosus* or *Lactobacillus buchneri*. *Lett. Appl Microbiol* 2011; (52): 314–321.
41. Thota AP, Hamsa y Ayres JC. Factors Affecting Aflatoxin Contamination of Cottonseed. I. Contamination of Cottonseed with *Aspergillus flavus* at Harvest and during Storage. *J Amer Oil Chem Soc* 1977; (54): 219-224.
42. Alonso VA, Monge MP, Larriestra A, Dalcero AM, Cavaglieri LR y Chiacchiera SM. Naturally occurring aflatoxin M<sub>1</sub> in raw bulk milk from farm cooling tanks in Argentina. *Food Addit Contam* 2010; (27): 373-379.
43. Zheng MZ, Richard JL y Binder J. A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. *Mycopathologia* 2006; (161): 261-273.
44. Munksgaard L, Larsen J, Werner H, Andersen PE, Viuf BT. Carry over of aflatoxin from cows' feed to milk and milk products. *Milchwissenschaft* 1987; (42): 165–167.
45. Masoreo F, Gallo A, Moschinia M, Pivaa G y Diaza D. Carryover of aflatoxin from feed to milk in dairy cows with low or high somatic cell counts. *Anim* 2007; (1):1344-1350.
46. Córdova IA, Ramírez SR, Peña B, Córdova J, Córdova J y Muñoz M. Zearalenona (*Fusarium* Spp.) En la alimentación de Cerdos con Problemas Reproductivos. *Arch Zootec* 2007; (56): 55-58.
47. Sultana N y Hanif NQ. Mycotoxin Contamination In Cattle Feed and Feed Ingredients. *Pakistan Vet J* 2009; 29(4): 211-213.

**Cuadros**

**Cuadro 1. Grado de asociación entre las variables consideradas como factores de riesgo y los niveles de AFM<sub>1</sub>**

<b>Factor de riesgo</b>	<b>Muestras (n)</b>	<b>&gt;LMP (%)</b>	<b>Chi-Cuadrada</b>	<b>Valor de P</b>	<b>OR</b>
<b>Indicación del fabricante (dosis)</b>					
• No Cumple	116	33.62			
• Cumple	100	19.00	12.322	0.0004	2.20124
<b>Uso del secuestrante</b>					
• No	47	28.72			
• Si	169	26.62	0.164	0.6858	1.11045
<b>Calidad de almacenamiento</b>					
• Mala	72	36.1			
• Regular	72	22.9			1.97826
• Buena	72	22.2	8.932	0.0115	1.04054

(P <0.05) Estadísticamente significativo.

**Cuadro 2. Diferencia de la concentración media de AFM<sub>1</sub> entre las tres UPL**

UPL	Media (µg/L)	EE	Límite inferior	Límite superior
1	0.032 <sup>a</sup>	0.0027	0.027	0.037
2	0.023 <sup>b</sup>	0.0027	0.018	0.028
3	0.022 <sup>b</sup>	0.0027	0.017	0.026

\*Intervalos de confianza basados en el procedimiento de comparación de rango de amplitud múltiple de Bonferroni. Literales (<sup>a-b</sup>) diferentes indican diferencia en la concentración media de AFM<sub>1</sub> entre las UPL ( $P < 0.05$ ). EE= error estándar.

**Cuadro 3. Diferencia de la concentración media de AF y AFM<sub>1</sub> entre las estaciones del año**

Estación del año	Media AF (µg/L)	EE	Media AFM <sub>1</sub> (µg/Kg)	EE
Primavera (1 Marzo – 31 Mayo)	7.208 <sup>b</sup>	1.0205	0.001 <sup>c</sup>	0.0026
Verano (1 Junio – 31 Agosto)	8.174 <sup>b</sup>	1.0205	0.020 <sup>b</sup>	0.0026
Otoño (1 Septiembre – 30 Noviembre)	19.459 <sup>a</sup>	1.0301	0.057 <sup>a</sup>	0.0026
Invierno (1 Diciembre – 28 Febrero)	9.875 <sup>b</sup>	1.0112	0.025 <sup>b</sup>	0.0026

\*Intervalos de confianza basados en el procedimiento de comparación de rango de amplitud múltiple de Bonferroni. Literales (<sup>a-b</sup>) diferentes indican diferencia en la concentración media de AF y AFM<sub>1</sub> entre las estaciones del año ( $P < 0.01$ ). EE= error estándar.

**Cuadro 4. Diferencia observada en la concentración media de AF y AFM<sub>1</sub> al utilizar diferentes agentes secuestrantes**

Agente secuestrante	Media		Media	
	AFM <sub>1</sub> (µg/L)	EE	AF (µg/Kg)	EE
Arcilla organofílica	0.024 <sup>c</sup>	0.0039	7.661 <sup>d</sup>	1.2999
HSCAS + paredes celulares	0.019 <sup>c</sup>	0.0028	8.918 <sup>cd</sup>	0.955
NA	0.025 <sup>c</sup>	0.0033	9.480 <sup>cd</sup>	1.1056
Organoaluminosilicato	0.026 <sup>c</sup>	0.0029	14.011 <sup>b</sup>	0.9785
Bentonita	0.046 <sup>b</sup>	0.0093	14.900 <sup>bc</sup>	3.0945
Montmorillonita	0.080 <sup>a</sup>	0.0131	34.540 <sup>a</sup>	4.3763
HSCAS activado	0.080 <sup>a</sup>	0.0131	34.540 <sup>a</sup>	4.3763

\*Intervalos de confianza basados en el procedimiento de comparación de rango de amplitud múltiple de Bonferroni. Literales (<sup>a-b-c</sup>) diferentes indican diferencia en la concentración media de AF y AFM<sub>1</sub> al utilizar diferentes agentes secuestrantes ( $P < 0.01$ ). NA: No aplica, HSCAS: Aluminosilicatos hidratados de calcio y sodio. EE= error estándar.

# NOTAS PARA AUTORES

Actualización: enero, 2013

Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias se edita completa en dos idiomas (español e inglés) y publica tres categorías de trabajos: Artículos científicos, Notas de investigación y Revisiones bibliográficas.

Los autores interesados en publicar en esta revista deberán ajustarse a los lineamientos que más adelante se indican, los cuales en términos generales, están de acuerdo con los elaborados por el Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas (CIERM) Bol. Of. Sanit. Panam. 1989; 107:422-437.

1. Sólo se aceptarán trabajos inéditos. No se admitirán si están basados en pruebas de rutina, ni datos experimentales sin estudio estadístico cuando éste sea indispensable. Tampoco se aceptarán trabajos que previamente hayan sido publicados condensados o in extenso en Memorias o Simposio de Reuniones o Congresos (a excepción de Resúmenes).

2. Todos los trabajos estarán sujetos a revisión de un Comité Científico Editorial, conformado por Pares de la Disciplina en cuestión, quienes desconocerán el nombre e Institución de los autores proponentes. El Editor notificará al autor la fecha de recepción de su trabajo.

3. El manuscrito se enviará por correo electrónico (rodriguez\_oscar@prodigy.net.mx). Para su elaboración se utilizará el procesador de Microsoft Word, con letra Arial a 12 puntos, a doble espacio. Asimismo se deberá remitir una carta de presentación firmada por todos los autores, aceptando el orden de co-autoría, remitiéndola en forma digitalizada o por Fax (999/941.50.30); en ella se indicará el responsable de la correspondencia con la Revista, indicando dirección (no apartado postal), teléfono, fax y dirección electrónica.

4. Por ser una revista con arbitraje, y para facilitar el trabajo de los revisores, todos los renglones de cada página deben estar numerados; asimismo cada página debe estar numerada, inclusive cuadros, ilustraciones y gráficas.

5. Los artículos tendrán una extensión máxima de 20 cuartillas a doble espacio, sin incluir páginas de Título, y cuadros o figuras (los cuales no deberán exceder de ocho). Las Notas de investigación tendrán una extensión máxima de 15 cuartillas y 6 cuadros o figuras. Las Revisiones de literatura una extensión máxima de 30 cuartillas y 5 cuadros.

6. Los manuscritos de las tres categorías de trabajos que se publican en **Téc. Pecu. Méx.** deberán contener los componentes que a continuación se indican, empezando cada uno de ellos en página aparte.

Página del título

Resumen en español

Resumen en inglés

Texto

Agradecimientos

Literatura citada

Cuadros y gráficas

7. **Página del Título.** Debe contener a) el título del trabajo, que debe ser conciso pero informativo; b) nombre(s) y apellidos completos de cada autor, acompañados de su afiliación institucional; c) nombre del departamento o departamentos y la institución o instituciones a los que se debe atribuir el trabajo; d) nombre y dirección del autor a quien deben dirigirse la correspondencia, y f) origen del apoyo recibido en forma de subvenciones, equipo y otros (opcional).

8. **Resumen en español.** En la segunda página se debe incluir un resumen que no pase de 250 palabras. En él se indicarán los propósitos del estudio o investigación; los procedimientos básicos y la metodología empleada; los resultados más importantes encontrados, y de ser posible, su significación estadística y las conclusiones principales. A continuación del resumen, en punto y aparte, agregue debidamente rotuladas, de 3 a 8 palabras o frases cortas clave que ayuden a los indizadores a clasificar el trabajo, las cuales se publicarán junto con el resumen.

9. **Resumen en inglés.** Anotar el título del trabajo en inglés y a continuación redactar el "abstract" con las mismas instrucciones que se señalaron para el resumen en español. Al final en punto y aparte, se deberán escribir las correspondientes palabras clave ("key words").

10. **Texto.** Las tres categorías de trabajos que se publican en **Téc. Pecu. Méx.** consisten en lo siguiente:

a) Artículos científicos. Deben ser informes de trabajos originales derivados de resultados parciales o finales de investigaciones. El texto del Artículo científico se divide en secciones que llevan estos encabezamientos:

## Búsqueda

Si desea encontrar algún artículo o tema en particular, escriba la(s) palabras clave:

## Boletín electrónico

Si desea recibir notificación sobre actualizaciones y próximos números de la revista, escriba su correo electrónico.

Correo

electrónico:

## Introducción

## Materiales y Métodos

## Resultados

## Discusión

## Conclusiones e implicaciones

En los artículos largos puede ser necesario agregar subtítulos dentro de estas divisiones a fin de hacer más claro el contenido, sobre todo en las secciones de Resultados y Discusión, las cuales también pueden presentarse como una sola sección.

b) Notas de investigación. Consisten en modificaciones a técnicas, informes de casos clínicos de interés especial, preliminares de trabajos o investigaciones limitadas, descripción de nuevas variedades de pastos; así como resultados de investigación que a juicio de los editores deban así ser publicados. El texto contendrá la misma información del método experimental señalado en el inciso a), pero su redacción será corrida del principio al final del trabajo; esto no quiere decir que sólo se supriman los subtítulos, sino que se redacte en forma continua y coherente.

c) Revisión bibliográfica. Consisten en el tratamiento y exposición de un tema o tópico de relevante actualidad e importancia; su finalidad es la de resumir, analizar y discutir, así como poner a disposición del lector información ya publicada sobre un tema específico. El texto se divide en: Introducción, y las secciones que correspondan al desarrollo del tema en cuestión.

11. **Agradecimientos.** Siempre que corresponda, se deben especificar las colaboraciones que necesitan ser reconocidas, tales como a) la ayuda técnica recibida; b) el agradecimiento por el apoyo financiero y material, especificando la índole del mismo; c) las relaciones financieras que pudieran suscitar un conflicto de intereses. Las personas que colaboraron pueden ser citadas por su nombre, añadiendo su función o tipo de colaboración; por ejemplo: "asesor científico", "revisión crítica de la propuesta para el estudio", "recolección de datos", etc.

12. **Literatura citada.** Numere las referencias consecutivamente en el orden en que se mencionan por primera vez en el texto. Las referencias en el texto, en los cuadros y en las ilustraciones se deben identificar mediante números arábigos entre paréntesis, sin señalar el año de la referencia. Evite hasta donde sea posible, el tener que mencionar en el texto el nombre de los autores de las referencias. Procure abstenerse de utilizar los resúmenes como referencias; las "observaciones inéditas" y las "comunicaciones personales" no deben usarse como referencias, aunque pueden insertarse en el texto (entre paréntesis).

### Reglas básicas para la Literatura citada.

Nombre de los autores, con mayúsculas sólo las iniciales, empezando por el apellido paterno, luego iniciales del materno y nombre(s). En caso de apellidos compuestos se debe poner un guión entre ambos, ejemplo: Elías-Calles E. Entre las iniciales de un autor no se debe poner ningún signo de puntuación, ni separación; después de cada autor sólo se debe poner una coma, incluso después del penúltimo; después del último autor se debe poner un punto.

El título del trabajo se debe escribir completo (en su idioma original) luego el título abreviado de la revista donde se publicó, sin ningún signo de puntuación; inmediatamente después el año de la publicación, luego el número del volumen, seguido del número (entre paréntesis) de la revista y finalmente el número de páginas (esto en caso de artículo ordinario de revista).

Puede incluir en la lista de referencias, los artículos aceptados aunque todavía no se publiquen; indique la revista y agregue "en prensa" (entre corchetes).

En el caso de libros de un solo autor (o más de uno, pero todos responsables del contenido total del libro), después del o los nombres, se debe indicar el título del libro, el número de la edición, el país, la casa editorial y el año.

Cuando se trate del capítulo de un libro de varios autores, se debe poner el nombre del autor del capítulo, luego el título del capítulo, después el nombre de los editores y el título del libro, seguido del país, la casa editorial, año y las páginas que abarca el capítulo.

En el caso de tesis, se debe indicar el nombre del autor, el título del trabajo, luego entre corchetes el grado (licenciatura, maestría, doctorado), luego el nombre de la ciudad, estado y en su caso país, seguidamente el nombre de la Universidad (no el de la escuela), y finalmente el año.

Emplee el estilo de los ejemplos que aparecen a continuación, los cuales están parcialmente basados en el formato que la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos usa en el *Index Medicus*.

## Revistas

*Artículo ordinario, con volumen y número.* (Incluya el nombre de todos los autores cuando sean seis o menos; si son siete o más, anote sólo el nombre de los seis primeros y agregue "et al. ").

- I. Basurto GR, Garza FJD. Efecto de la inclusión de grasa o proteína de escape ruminal en el comportamiento de toretos Brahman en engorda. *Téc Pecu Méx* 1998;36(1):35-48

### Sólo número sin indicar volumen.

II) Stephano HA, Gay GM, Ramírez TC. Encephalomyelitis, reproductive failure and corneal opacity (blue eye) in pigs associated with a paramyxovirus infection. *Vet Rec* 1988;(122):6-10.

III) Chupin D, Schuh H. Survey of present status of the use of artificial insemination in developing countries. *World Anim Rev*

1993;(74-75):26-35.

*No se indica el autor.*

IV) Cancer in South Africa [editorial]. S Afr Med J 1994;84:15.

*Suplemento de revista.*

V) Hall JB, Staigmiller RB, Short RE, Bellows RA, Bartlett SE. Body composition at puberty in beef heifers as influenced by nutrition and breed [abstract]. J Anim Sci 1998;71(Suppl 1):205.

*Organización, como autor.*

VI) The Cardiac Society of Australia and New Zealand. Clinical exercise stress testing. Safety and performance guidelines. Med J Aust 1996;(164):282-284.

*En proceso de publicación.*

VII) Scifres CJ, Kothmann MM. Differential grazing use of herbicide treated area by cattle. J Range Manage [in press] 2000.

*Libros y otras monografías*

*Autor total.*

VIII) Steel RGD, Torrie JH. Principles and procedures of statistics: A biometrical approach. 2nd ed. New York, USA: McGraw-Hill Book Co.; 1980.

*Autor de capítulo.*

IX) Roberts SJ. Equine abortion. In: Faulkner LLC editor. Abortion diseases of cattle. 1st ed. Springfield, Illinois, USA: Thomas Books; 1968:158-179.

*Memorias de reuniones.*

X) Loeza LR, Angeles MAA, Cisneros GF. Alimentación de cerdos. En: Zúñiga GJL, Cruz BJA editores. Tercera reunión anual del centro de investigaciones forestales y agropecuarias del estado de Veracruz. Veracruz. 1990:51-56.

XI) Olea PR, Cuarón IJA, Ruiz LFJ, Villagómez AE. Concentración de insulina plasmática en cerdas alimentadas con melaza en la dieta durante la inducción de estro lactacional [resumen]. XXXIV Reunión nacional de investigación pecuaria. Querétaro, Qro. 1998:13.

XII) Cunningham EP. Genetic diversity in domestic animals: strategies for conservation and development. In: Miller RH *et al.* editors. Proc XX Beltsville Symposium: Biotechnology's role in genetic improvement of farm animals. USDA. 1996:13.

*Tesis.*

XIII) Alvarez MJA. Inmunidad humoral en la anaplasmosis y babesiosis bovinas en becerros mantenidos en una zona endémica [tesis maestría]. México, DF: Universidad Nacional Autónoma de México; 1989.

XIV) Cairns RB. Infrared spectroscopic studies of solid oxygen [doctoral thesis]. Berkeley, California, USA: University of California; 1965.

*Organización como autor.*

XV) NRC. National Research Council. The nutrient requirements of beef cattle. 6th ed. Washington, DC, USA: National Academy Press; 1984.

XVI) SAGAR. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Curso de actualización técnica para la aprobación de médicos veterinarios zootecnistas responsables de establecimientos destinados al sacrificio de animales. México. 1996.

XVII) AOAC. Official methods of analysis. 15th ed. Arlington, VA, USA: Association of Official Analytical Chemists. 1990.

XVIII) SAS. SAS/STAT User's Guide (Release 6.03). Cary NC, USA: SAS Inst. Inc. 1988.

XIX) SAS. SAS User's Guide: Statistics (version 5 ed.). Cary NC, USA: SAS Inst. Inc. 1985.

*Publicaciones electrónicas*

XX) Jun Y, Ellis M. Effect of group size and feeder type on growth performance and feeding patterns in growing pigs. J Anim Sci



2001;79:803-813. Available: <http://jas.fass.org/cgi/reprint/79/4/803.pdf>. Accessed Jul 30, 2003.

XXI) Villalobos GC, González VE, Ortega SJA. Técnicas para estimar la degradación de proteína y materia orgánica en el rumen y su importancia en rumiantes en pastoreo. *Téc Pecu Méx* 2000;38(2):119-134. Disponible: <http://www.tecnicapecuaria.org/trabajos/200212175725.pdf>. Consultado 30 jul, 2003.

XXII) Sanh MV, Wiktorsson H, Ly LV. Effect of feeding level on milk production, body weight change, feed conversion and postpartum oestrus of crossbred lactating cows in tropical conditions. *Livest Prod Sci* 2002;27(2-3):331-338. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/journal/03016226>. Accessed Sep 12, 2003.

13. **Cuadros, Gráficas e Ilustraciones.** Es preferible que sean pocos, concisos, contando con los datos necesarios para que sean autosuficientes, que se entiendan por sí mismos sin necesidad de leer el texto. Para las notas al pie se deberán utilizar los símbolos convencionales.

14. **Versión final.** Es el documento en el cual los autores ya integraron las correcciones y modificaciones indicadas por el Comité Revisor. Se deberá entregar un solo original en hojas blancas, así como en un diskette. Los trabajos deberán ser elaborados con Word. Las gráficas y figuras se deberán elaborar en Word, Power Point, Corel Draw y enviadas en archivo aparte (nunca insertarlas como imágenes en el texto). Los cuadros no deberán contener ninguna línea vertical, y las horizontales solamente las que delimitan los encabezados de columna, y la línea al final del cuadro.

15. Una vez recibida la versión final, ésta se mandará para su traducción al idioma inglés o español, según corresponda. Si los autores lo consideran conveniente podrán enviar su manuscrito final en ambos idiomas.

16. **Tesis.** Se publicarán como Artículo o Nota de Investigación, siempre y cuando se ajusten a las normas de esta revista.

17. Los trabajos no aceptados para su publicación se regresarán al autor, con un anexo en el que se explicarán los motivos por los que se rechaza o las modificaciones que deberán hacerse para ser reevaluados.

18. **Abreviaturas de uso frecuente:**

cal caloría (s)

cm centímetro (s)

°C grado centígrado (s)

DLS0 dosis letal 50%

g gramo (s)

ha hectárea (s)

h hora (s)

i.m. intramuscular (mente)

i.v. intravenosa (mente)

J joule (s)

kg kilogramo (s)

km kilómetro (s)

L litro (s)

log logaritmo decimal

Mcal megacaloría (s)

MJ megajoule (s)

m metro (s)

msnm metros sobre el nivel del mar

µg microgramo (s)

μl microlitro (s)
μm micrómetro (s)(micra(s))
mg miligramo (s)
ml mililitro (s)
mm milímetro (s)
min minuto (s)
ng nanogramo (s)
<i>P</i> probabilidad (estadística)
p página
PC proteína cruda
PCR reacción en cadena de la polimerasa
pp páginas
ppm partes por millón
% por ciento (con número)
rpm revoluciones por minuto
seg segundo (s)
t tonelada (s)
TND total de nutrientes digestibles
UA unidad animal
UI unidades internacionales
<i>vs versus</i>
xg gravedades
Cualquier otra abreviatura se pondrá entre paréntesis inmediatamente después de la(s) palabra(s) completa(s).
19. Los nombres científicos y otras locuciones latinas se deben escribir en cursivas.