



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

Tesis

**EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE UN PROGRAMA DE CONTROL DE LA
CONTAMINACIÓN POR AFLATOXINAS EN DIETAS DE VACAS LECHERAS DEL
ALTIPLANO CENTRAL MEXICANO**

Presenta

ERIKA JANET RANGEL MUÑOZ

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

Tutor

DR. ARTURO GERARDO VALDIVIA FLORES

Comité Tutorial

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

Aguascalientes, Ags., Julio de 2015.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

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

Por medio del presente como Tutor designado del estudiante **ERIKA JANET RANGEL MUÑOZ** con ID 13236 quien realizó la tesis titulada: **EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE UN PROGRAMA DE CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN POR AFLATOXINAS EN DIETAS DE VACAS LECHERAS DEL ALTIPLANO CENTRAL MEXICANO**, 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.

ATENTAMENTE

"Se Lumen Proferre"

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

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

DR. ARTUTO GERARDO VALDIVIA FLORES
Tutor de tesis

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



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

MC. GABRIEL ERNESTO PALLÁS GUZMÁN
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
PRESENTE

Distinguido Maestro Pallás:

Con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, le comunico que he revisado el trabajo de tesis que presenta el MVZ. ERIKA JANET RANGEL MUÑOZ, con ID 13236 intitulado:

“EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE UN PROGRAMA DE CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN POR AFLATOXINAS EN DIETAS DE VACAS LECHERAS DEL ALTIPLANO CENTRAL MEXICANO”

Como requisito parcial para obtener el grado maestría dentro del programa de la Maestría en Ciencias Agrícolas y Veterinarias, a partir de lo cual considero que el trabajo cumple con los requisitos para ser presentado y discutido en el examen de grado correspondiente.

Por lo anteriormente expresado, otorgo mi VOTO APROBATORIO, para la impresión de la tesis, con el propósito de que se pueda continuar con los trámites correspondientes.

Se extiende el presente para los trámites administrativos necesarios para el interesado.

ATENTAMENTE
“Se Lumen Proferre”

Aguascalientes, Ags., a 26 de junio de 2015.

Dr. Teódulo Quezada Tristán
Comité tutorial

c.c.p. interesado
c.c.p. Secretario de Investigación y Posgrado



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

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 Tutoral designado del estudiante **ERIKA JANET RANGEL MUÑOZ** con ID **13236** quien realizó la tesis titulada: **EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE UN PROGRAMA DE CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN POR AFLATOXINAS EN DIETAS DE VACAS LECHERAS DEL ALTIPLANO CENTRAL MEXICANO**, 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.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Profere"
Aguascalientes, Ags., a 25 de junio de 2015


DR. RAÚL ORTIZ MARTÍNEZ
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

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

Por medio del presente me permito comunicarle a usted que la tesis titulada "EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE UN PROGRAMA DE CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN POR AFLATOXINAS EN DIENTAS DE VACAS LECHERAS DEL ALTIPLANO CENTRAL MEXICANO", de la alumna ERIKA JANET RANGEL MUÑOZ, 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

RECONOCIMIENTOS

Por el apoyo financiero para la realización de este trabajo de tesis:

- ▣ Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT):
 - Por la asignación de beca (No. de beca: 0305-437-009832/03-1789-1012) para la realización de mis estudios de posgrado en el programa de Maestría en Ciencias Veterinarias.
 - Por la convocatoria de Investigación Científica Básica 2012 (Proyecto en Red de Ciencia Animal: 178546).
- ▣ Universidad Autónoma de Aguascalientes por su apoyo financiero a través del proyecto institucional denominado "Control de la contaminación por aflatoxinas en dietas de vacas lecheras" con clave PIP/SA 15-1.
- ▣ Programa Integral de Fortalecimiento Institucional (PIFI 2013).

De sobremanera reconozco el apoyo incondicional del Dr. Arturo Gerardo Valdivia Flores (Centro de Ciencias Agropecuarias de la UAA) que como mi tutor me asesoró puntual y satisfactoriamente durante el desarrollo de este trabajo de investigación; compartiendo su experiencia profesional y brindándome siempre su calidez humana y su paciencia.

Por el esfuerzo y la dedicación que mostraron durante mi formación profesional a través del apoyo técnico y teórico durante el desarrollo de este trabajo en sus fases de campo y laboratorio y por la asesoría para la escritura de la tesis; a los miembros de mi comité tutorial dentro del programa de Maestría en Ciencias Veterinarias: Dr. Teódulo Quezada Tristán (Centro de Ciencias Agropecuarias de la UAA) y Dr. Raúl Ortiz Martínez. Centro de Ciencias Agropecuarias de la UAA.

Por brindarnos el acceso y el apoyo para tomar las muestras y facilitarnos la información necesaria para el desarrollo de este trabajo a los propietarios de las Unidades de Producción Lechera: Sergio Armando Jiménez González, Oscar Jaime Quezada Gallardo y Daniel Quezada Gallardo.

AGRADECIMIENTOS

Por su asesoría y apoyo técnico en la obtención, procesamiento y análisis de muestras:

- ✦ Dra. María Carolina de Luna López. Centro de Ciencias Agropecuarias, Laboratorio de Fisiología Veterinaria e Investigación.
- ✦ Biol. Araceli Adabache Ortiz. Centro de Ciencias Básicas, Laboratorio de Microscopia de Alta Resolución.
- ✦ M.C. José Luis Moreno Hernández Duque. Centro de Ciencias Básicas, Laboratorio de Análisis Instrumental.
- ✦ Dr. Marcelo Silva Briones. Centro de Ciencias Básicas, Laboratorio de Ecología.
- ✦ MVZ Claudia Abril Miranda Castañeda, estudiante de Maestría en Ciencias Veterinarias, Centro de Ciencias Agropecuarias de la UAA.
- ✦ Biol. Estefanía Ramírez Delgado, estudiante de Maestría en Ciencias Agronómicas, Centro de Ciencias Agropecuarias.
- ✦ MVZ Humberto Rivera Castillo, estudiante de Maestría en Ciencias Veterinarias, Centro de Ciencias Agropecuarias de la UAA.
- ✦ M.C. Emmanuel Hernández Valdivia. Centro de Ciencias Agropecuarias, Laboratorio de Fisiología Veterinaria e Investigación.
- ✦ MVZ Estrella Hernández García, estudiante de Maestría en Ciencias Veterinarias, Centro de Ciencias Agropecuarias.
- ✦ MVZ Rodrigo Antonio Ordoñez Ortiz, estudiante de Maestría en Ciencias Veterinarias, Centro de Ciencias Agropecuarias.
- ✦ AQB Juan Alberto Martínez Hernández, Centro de Ciencias Agropecuarias, Laboratorio de Fisiología Veterinaria e Investigación.

DEDICATORIA

Con todo mi amor a mis padres

J. Guadalupe y Eva

Porque con su ejemplo de vida me han enseñado el amor a Dios, el respeto al género humano y la confianza plena en mí.

Con un cariño especial y eterno a mis hermanos

***Juan José, Victor Hugo, Gerardo, Maribel, Maria Guadalupe,
Alberto, Ernesto y Diana Laura***

Porque juntos hemos logrado ser la familia sólida y el primer apoyo para cada uno de nosotros.

A mis sobrinos

***Juan Fernando, Katia, Nestor, Judith Alejandra, Victor Hugo,
Ximena, Marianne, Brisa y Roberto***

Porque son la alegría fresca y perenne de la familia.

ÍNDICE GENERAL

No.	Contenido	Pág.
	ÍNDICE GENERAL	1
	ÍNDICE DE TABLAS	4
	ÍNDICE DE FIGURAS	5
	ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS	7
	RESUMEN	10
	ABSTRACT	11
	INTRODUCCIÓN	12
1.	ANTECEDENTES	14
1.1.	LA GANADERIA LECHERA	14
1.1.1.	La actividad lechera en el contexto mundial	14
1.1.2.	La ganadería lechera en México	15
1.1.3.	La ganadería lechera en Aguascalientes	17
1.2.	ALIMENTACIÓN DEL GANADO LECHERO	17
1.2.1.	Alimentación de rumiantes	17
1.2.2.	Componentes de la dieta para bovinos	17
1.2.3.	Producción de alimento	19
1.3.	PRINCIPALES HONGOS AFLATOXICOGÉNICOS	22
1.3.1.	Características del género <i>Aspergillus</i>	22
1.3.2.	<i>Aspergillus</i> sección <i>flavi</i>	25
1.3.3.	<i>Aspergillus flavus</i>	27
1.3.4.	<i>Aspergillus parasiticus</i>	29
1.3.5.	Condiciones para el crecimiento de hongos <i>Aspergillus</i>	30
1.3.6.	Proliferación de hongos aflatoxicogénicos	33
1.4.	PRODUCCIÓN DE AFLATOXINAS	34
1.4.1.	Importancia de las aflatoxinas en el ámbito agropecuario	35
1.4.2.	Presencia de aflatoxinas en el alimento de uso pecuario	35
1.4.3.	Características fisicoquímicas de las aflatoxinas	37
1.4.4.	Biosíntesis de aflatoxinas	38
1.4.5.	Características de la AFB ₁	39
1.4.6.	Metabolismo de las aflatoxinas	39
1.4.7.	Mecanismos de acción de la AFB ₁	41
1.5.	MICOTOXICOSIS	43
1.5.1.	Tipos de micotoxicosis	44
1.5.2.	Efectos de las aflatoxinas	44
1.6.	MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN PARA AFLATOXINAS EN ALIMENTO	45
1.6.1.	Cromatografía	45
1.6.2.	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)	46
1.7.	NIVELES MÁXIMOS PERMISIBLES DE AFLATOXINAS EN ALIMENTO	46
1.7.1.	Legislación de la Unión Europea (UE)	47
1.7.2.	Administración de Drogas y Alimentos de los EE.UU. (FDA)	48

No.	Contenido	Pág.
1.7.3.	Norma Oficial Mexicana (NOM-188-SSA1-2002)	48
1.7.4.	Comisión del Codex <i>Alimentarius</i>	49
1.8.	MÉTODOS DE DESTOXIFICACIÓN PARA AFLATOXINAS	49
1.8.1.	Métodos químicos	50
1.8.2.	Métodos físicos	51
1.8.3.	Métodos biológicos	51
1.8.4.	Inhibición de la absorción de aflatoxinas en el tracto gastrointestinal	53
2.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	57
2.1.	HIPÓTESIS	57
2.2.	OBJETIVO GENERAL	57
2.2.1.	Objetivos específicos	57
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	58
3.1.	DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	58
3.2.	UBICACIÓN GEOGRÁFICA DEL LUGAR DE ESTUDIO	59
3.3.	CARACTERÍSTICAS DE LAS UNIDADES DE PRODUCCIÓN LECHERA	60
3.3.1.	Unidad de producción lechera "A" (UPL-A)	60
3.3.2.	Unidad de producción lechera "B" (UPL-B)	62
3.4.	OBTENCIÓN DE MUESTRAS	63
3.4.1.	Muestreo del ensilaje de maíz	63
3.4.2.	Muestreo del alimento concentrado	64
3.4.3.	Muestreo de la ración total mezclada (RTM)	64
3.4.4.	Muestreo de leche cruda	65
3.4.5.	Manejo de muestras	65
3.5.	CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS	66
3.5.1.	Cuantificación de aflatoxinas totales por ELISA	66
3.5.2.	Cuantificación de AFB ₁ por HPLC	66
3.5.3.	Cuantificación de AFM ₁ por ELISA	66
3.5.4.	Extracción e identificación de aflatoxinas por TLC en aislados de <i>Aspergillus spp.</i>	67
3.6.	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS DEL GÉNERO ASPERGILLUS	67
3.6.1.	Técnica de vaciado en placa por dilución	67
3.6.2.	Tinción con azul de lactofenol	67
3.6.3.	Técnica de microscopia electrónica de barrido	67
3.7.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	68
3.7.1.	Análisis de Varianza	68
3.7.2.	Modelo Lineal Generalizado con efecto anidado	68
3.7.3.	Correlación	68
4.	RESULTADOS	69
4.1.	CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS	69
4.1.1.	Aflatoxinas detectadas en los ingredientes de la dieta	69
4.1.2.	Aflatoxinas detectadas en la ración total mezclada	71
4.1.3.	Aflatoxinas detectadas en leche cruda	72
4.1.4.	Exposición por lotes productivos a dietas contaminadas con aflatoxinas	74

No.	Contenido	Pág.
4.1.5.	Influencia de las condiciones climáticas sobre la concentración de AF en ingredientes alimenticios y RTM	75
4.2.	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS DEL GÉNERO <i>ASPERGILLUS</i>	77
4.2.1.	Frecuencia de hongos	77
4.2.2.	Características morfológicas de aislados del género <i>Aspergillus</i>	78
4.2.3.	Capacidad toxicogénica de hongos <i>Aspergillus</i>	87
4.2.4.	Asociación de la presencia de hongos <i>Aspergillus</i> spp. con la presencia de aflatoxinas detectadas en las dietas de las vacas lecheras	88
5.	DISCUSIÓN	90
5.1.	PRESENCIA DE AFLATOXINAS	90
5.1.1.	Aflatoxinas en los ingredientes de la dieta y en la ración total mezclada	90
5.1.2.	Aflatoxinas en la ración total mezclada adicionada con secuestrante	91
5.1.3.	Influencia de las condiciones climáticas sobre la presencia de AF	93
5.2.	PRESENCIA DE HONGOS <i>ASPERGILLUS</i>	94
6.	CONCLUSIONES	96
7.	GLOSARIO	97
8.	REFERENCIAS	102
	ANEXOS	119

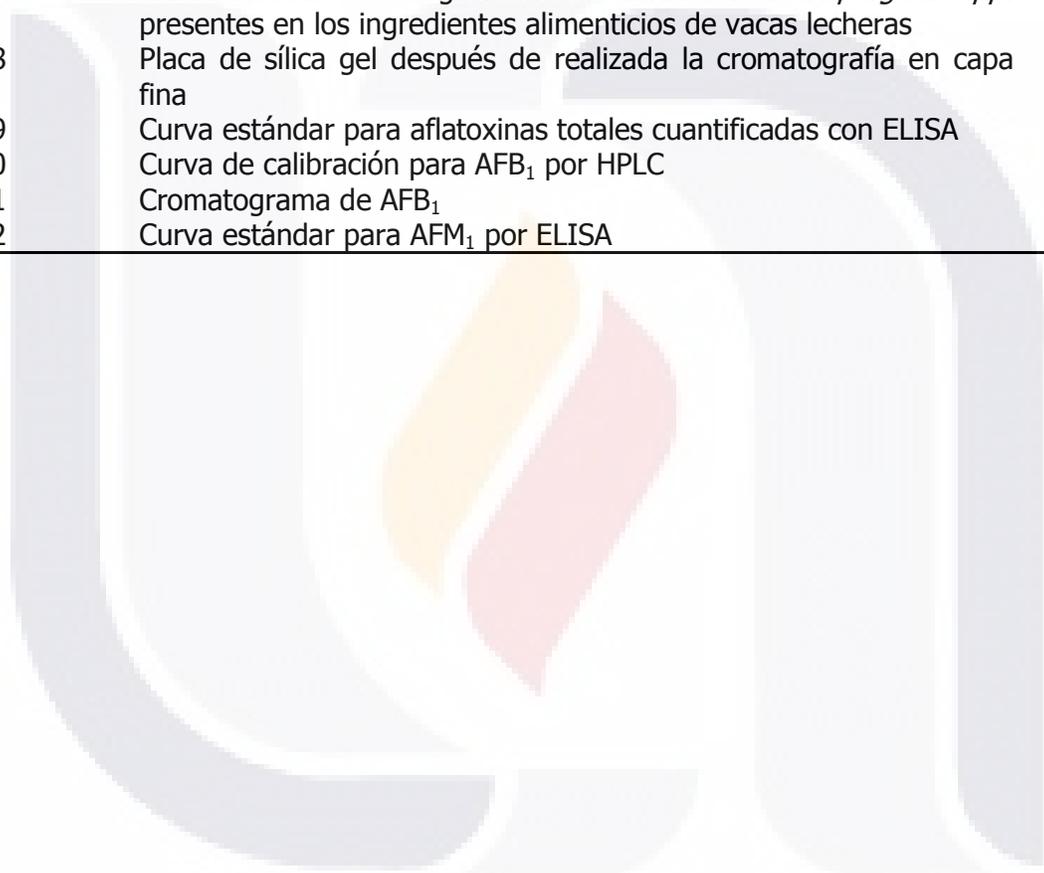
ÍNDICE DE TABLAS

Tabla No.	Nombre	Pág.
1	Producción Anual de leche en México (L ³)	16
2	Producción forrajera en México, 2011	19
3	Aporte nutricional de las materias primas empleadas para la elaboración de alimento concentrado	21
4	Principales hongos Micotoxicogénicos	22
5	Especies de hongos <i>Aspergillus</i> productoras de aflatoxinas	26
6	Necesidades óptimas para el crecimiento de especies del género <i>Aspergillus</i>	32
7	Micotoxinas presentes en alimento de uso pecuario	36
8	Estructura química de las aflatoxinas	37
9	Niveles permitidos para aflatoxinas totales (µg/kg) en alimentos y piensos, establecidos por la FDA	48
10	Límites máximos permitidos en alimento para consumo de rumientes por la Norma Oficial Mexicana	48
11	Productos comerciales empleados como adsorbentes para micotoxinas	56
12	Composición de la dieta para las vacas lecheras del Sitio A-2	61
13	Población animal y producción láctea en la unidad de producción lechera A	61
14	Formulación de las dietas proporcionadas a las vaquillas en el sitio de producción A-1.	62
15	Formulación de la dieta alimenticia para las vacas lecheras en los sitios B-1 y B-2	63
16	Población animal y producción láctea de los sitios B-1 Y B-2	64
17	Exposición promedio de las vacas lecheras a la contaminación por aflatoxinas en la ración total mezclada por lote productivo	74
18	Promedio de AFM ₁ presente en leche cruda de los lotes productivos en las UPL participantes en el estudio	75
19	Características macroscópicas y capacidad de producción de aflatoxinas (AF) en los aislados de <i>Aspergillus spp</i> obtenidas de los ingredientes alimenticios de las unidades de producción lechera participantes en el estudio	78
20	Características microscópicas identificadas en los aislados de <i>Aspergillus spp.</i> obtenidas de los ingredientes alimenticios de las unidades de producción lechera participantes en el estudio	80
21	Ausencia de asociación de la presencia de hongos <i>Aspergillus</i> con la contaminación por aflatoxinas en los ingredientes alimenticios de las unidades de producción lechera participantes en el estudio	89
22	Frecuencia de aislamiento de hongos <i>Aspergillus</i> productores de aflatoxinas (AF ⁺) de las dietas de vacas lecheras en las unidades de producción lechera (UPL)	89

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No.	Contenido	Pág.
1	Proyección del incremento en la producción de leche. Fuente	15
2	Morfología de <i>Aspergillus spp.</i>	24
3	Micrografía del conidióforo de dos miembros del género <i>Aspergillus</i> .	25
4	Micrografía de especies del género <i>Aspergillus</i> sección <i>flavi</i>	27
5	Conidióforos de <i>Aspergillus flavus</i>	28
6	Conidióforo de <i>A. parasiticus</i>	30
7	Estructura química de las principales aflatoxinas	38
8	Estructura de las formas activas de AFB ₁	40
9	Formación de aductos DNA con aflatoxina	42
10	Altiplano Central Mexicano	59
11	Organización de las Unidades de Producción Lechera (UPL)	60
12	Técnica de "M" para muestreo de alimento	64
13	Concentración de AF en el ensilaje de maíz y el alimento concentrado en las unidades de producción lechera participantes en el estudio	69
14	Evolución de la contaminación por AF en ensilaje de maíz y concentrado en las unidades de producción lechera participantes en el estudio	70
15	Concentración promedio de AF en los ingredientes y la ración total mezclada de la dieta de las vacas lecheras de las unidades de producción lechera (UPL) participantes	71
16	Concentración de AF ($\bar{X} \pm EE$) en los ingredientes y en la ración total mezclada (RTM) en las dos unidades de producción	72
17	Evolución de la contaminación por AF totales y AFM ₁ en el último año de observación del estudio	73
18	Concentración promedio de aflatoxinas totales (AF) en ingredientes alimenticios de vacas lecheras y comparación de la precipitación pluvial, temperatura ambiente, humedad relativa y horas frío en la zona de ubicación de las unidades de producción lechera	76
19	Géneros de hongos identificados por sus características morfológicas	77
20	Micrografía electrónica de barrido de las características morfológicas típicas de los hongos del género <i>Aspergillus</i>	79
21	Micrografía electrónica de barrido de las características morfológicas en los diferentes estadios de crecimiento del aislado de <i>Aspergillus</i> tipo A	81
22	Características morfológicas de los aislados tipo A de <i>Aspergillus spp.</i>	82

Figura No.	Contenido	Pág.
23	Características morfológicas de los aislados B de <i>Aspergillus spp.</i> presentes en los ingredientes alimenticios de vacas lecheras	83
24	Características morfológicas de los aislados C de <i>Aspergillus spp.</i> presentes en los ingredientes alimenticios de vacas lecheras	84
25	Características morfológicas de los aislados D de <i>Aspergillus spp.</i> presentes en los ingredientes alimenticios de vacas lecheras	85
26	Características morfológicas de los aislados E de <i>Aspergillus spp.</i> presentes en los ingredientes alimenticios de vacas lecheras	86
27	Características morfológicas de los aislados F de <i>Aspergillus spp.</i> presentes en los ingredientes alimenticios de vacas lecheras	87
28	Placa de sílica gel después de realizada la cromatografía en capa fina	88
29	Curva estándar para aflatoxinas totales cuantificadas con ELISA	
30	Curva de calibración para AFB ₁ por HPLC	
31	Cromatograma de AFB ₁	
32	Curva estándar para AFM ₁ por ELISA	



ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

Abs	Absorbancia	INEGI	Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática
ADN	Ácido desoxirribonucleico	INIFAP	Instituto Nacional de Investigación Forestal, Agrícola y Pecuaria
AFB₁-N⁷-Gua	Aducto trans-8,9-dihidro-8-(N ⁷ -guanil)-9-hidroxi-AFB ₁	kg	Kilogramo
AFB₂	Aflatoxina B ₂	L	Litro
AFB_{2α}	Derivatizada de AFB ₁	LD₅₀	Dosis letal media
AFBO	8,9-epóxido-AFB ₁	M	Molar
AFG₁	Aflatoxina G ₁	mg	Miligramo
AFG₂	Aflatoxina G ₂	min	Minuto
AFM₁	Aflatoxina M ₁	mL	Mililitro
AFM₂	Aflatoxina M ₂	mm	Milímetro
AFP₁	Aflatoxina P ₁	MPA	Acido Micofenólico
AFQ₁	Aflatoxina Q ₁	mV	Milivolt
AF	Aflatoxinas	ng	Nanogramo
Ag-Ac	Complejo antígeno-anticuerpo	nm	Nanómetro
ANDEVA	Análisis de varianza	NOM	Norma Oficial Mexicana
AOAC	Asociación Oficial de Químicos Analistas	°C	Grados Celsius
a_w	Actividad de agua	OTA	Ocratoxina A

AFFCO	Asociación Americana de Oficiales Controladores de la Alimentación	PAT	Patulina
ARN	Ácido ribonucleico	PDA	Agar papa y dextrosa
CCA	Comisión del CODEX Alimentario	p/v	Peso sobre volumen
CCFAC	Aditivos Alimentarios y Contaminantes de los Alimentos	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
cm	Centímetro	pH	Potencial de Hidrógeno
CPA	Ácido ciclopiazónico	psig	Libras por pulgada cuadrada
CYP₄₅₀	Citocromo P ₄₅₀	ppb	Partes por billón
d	Días	rpm	Revoluciones por minuto
DAS	Diacetoxiscirpenol	RF	Factor de Resolución
DON	Deoxilivalenol	ROC	Roquefortina C
dL	Decilitro	s	Segundo
E.E.	Error estándar	SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural Pesca y Alimentación
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas	SE	Secretaria de Economía
FAO	Food and Agriculture Organization	SIAP	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
g	Gramos	USDA	United States Department of Agriculture
GLM	Modelo linear general	UE	Unión Europea
h	Hora	UPL	Unidad de Producción Lechera
HPLC	Cromatografía líquida de	UV	Ultravioleta

	alta presión		
HR	Humedad relativa	V/s	Volts por segundo
HSCAS	Aluminosilicato hidratado de calcio sódico	y col.,	Y colaboradores
IARC	International Agency for Research on Cancer	ZEN	Zearalenona



RESUMEN

EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE UN PROGRAMA DE CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN POR AFLATOXINAS EN DIETAS DE VACAS LECHERAS DEL ALTIPLANO CENTRAL MEXICANO

Rangel Muñoz, E. J., Valdivia Flores, G. A., Quezada Tristán, T., Ortiz Martínez, R., Cruz Vázquez, C., Ortega Mora, L. M.

Las aflatoxinas (AF) son metabolitos secundarios tóxicos y carcinogénicos producidos por hongos micotoxicogénicos del género *Aspergillus*, principalmente *A. flavus* y *A. parasiticus*, contaminan naturalmente los productos agrícolas destinados a la alimentación humana y animal alterando su aspecto físico y deteriorando su valor nutritivo. El uso de secuestrantes para AF ha sido una buena estrategia para disminuir su disponibilidad durante la cuantificación instrumental, reducir el riesgo para la salud animal y disminuir la exposición a productos de origen animal contaminados con AF. El objetivo de este trabajo fue evaluar la eficacia de un programa para el control de la contaminación por aflatoxinas en la dieta de vacas lecheras de establos del Altiplano Central Mexicano.; Se realizó un estudio longitudinal, descriptivo, no experimental; se seleccionaron dos Unidades de Producción Lechera (UPL) y se realizaron muestreos mensuales (29 meses, 2012-2014) de ensilaje de maíz, alimento concentrado y ración total mezclada en el pesebre. Se cuantificaron AF y se aislaron hongos *Aspergillus spp.* en los ingredientes alimenticios y la ración total mezclada; se caracterizó la capacidad aflatoxicogénica de los aislados de *Aspergillus spp* con TLC. Se cuantificaron AF con ELISA y HPLC. Se aislaron hongos *Aspergillus spp.* en agar papa dextrosa (PDA), se identificaron con la tinción de azul de lactofenol y microscopía electrónica de barrido. El 99 % de las muestras presentó contaminación por AF y el 21 % contaminación con *Aspergillus spp.* en su mayoría no aflatoxicogénicos (83 %). El ensilaje de maíz presentó niveles mayores de contaminación (UPL-A: 18.3 ± 4.6 . UPL-B: 20.6 ± 2.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$) con respecto al concentrado (UPL-A: 18.1 ± 3.5 . UPL-B: 10.4 ± 1.82 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Los secuestrantes empleados en las UPL mostraron una buena eficiencia para reducir las concentraciones de AF en la RTM (UPL-A: 65.4%. UPL-B: 43.3 %) y la concentración detectable de AF en la RTM, ya que del 1-6% esperado disminuyó hasta 0.22 ± 0.25 % (4.5 a 27.3 veces). Lo anterior sugiere que es importante diseñar, establecer y ejecutar estrategias de control para reducir el riesgo de exposición a este metabolito carcinogénico para la salud humana y animal.

Palabras Clave: *Aspergillus*; secuestrante; aflatoxina M1; aflatoxinas totales; comparación de técnicas de ELISA, HPLC y TLC.

ABSTRACT

**EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS OF A PROGRAM OF POLLUTION CONTROL
DIETS AFLATOXIN DAIRY OF HIGHLANDS MEXICAN CENTRAL**

Rangel Muñoz, E. J., Valdivia Flores, G. A., Quezada Tristán, T., Ortiz Martínez, R., Cruz Vázquez, C., Ortega Mora, L. M.

Micotoxigenic aflatoxin (AF) are produced by fungi of the genus *Aspergillus*, mainly *A. flavus* and *A. parasiticus* toxic and carcinogenic secondary metabolites; naturally contaminated agricultural products intended for human and animal consumption altering its appearance and nutritional value deteriorates. The use of scavengers for AF has been a good strategy to reduce its availability during the instrumental quantification, reduce the risk to animal health and minimize exposure to animal products contaminated with AF. The aim of this study was to evaluate the effectiveness of a program to control aflatoxin contamination in the diet of dairy cows stables Highlands Central Mexican; A longitudinal, descriptive, non-experimental study was conducted; Two units of Milk Production (UPL) were selected and monthly sampling (29 months, from 2012 to 2014) of corn silage, concentrate feed and total mixed ration were performed in the manger. AF were quantified and *Aspergillus* spp were isolated. food and ingredients in the TMR; the ability aflatoxicogénica isolates of *Aspergillus* spp with TLC characterized. AF were quantified by ELISA and HPLC. *Aspergillus* spp fungi were isolated. potato dextrose agar (PDA), identified with blue staining Lactophenol and scanning electron microscopy. 99% of the samples were contaminated by AF and 21% contamination with *Aspergillus* spp. mostly non aflatoxicogénicos (83%). Corn silage showed higher levels of contamination (UPL-A: 18.3 ± 4.6 UPL-B. 20.6 ± 2.7 mg / kg) to the concentrate (UPL-A: 18.1 ± 3.5 UPL-B. 10.4 ± 1.82 mg / kg). Sequestering agents employed in UPL showed good efficiency to reduce concentrations of FA in the RTM (UPL-A: 65.4% UPL-B. 43.3%) and the AF detectable concentration in the RTM as 1-6 % expected decreased to $0.22 \pm 0.25\%$ (4.5 to 27.3 times). This suggests that it is important to design, establish and implement control strategies to reduce the risk of exposure to the carcinogenic metabolite to human and animal health.

Keywords: *Aspergillus*; sequestering; aflatoxin M1; total aflatoxins; comparison of ELISA, HPLC and TLC.

INTRODUCCIÓN

La presencia de hongos micotoxicogénicos y de aflatoxinas deterioran la calidad y el valor nutritivo de los ingredientes que integran la dieta de vacas lecheras, ocasionan cuantiosas pérdidas económicas y deterioran la salud y el rendimiento de los animales; además, constituyen un riesgo para la salud pública. Las condiciones de manejo, transporte y almacenamiento de los productos agrícolas influyen en la ocurrencia de la proliferación fúngica y la presencia de aflatoxinas (AF) en el alimento.

La FAO (2003) ha estimado que más del 25% de la producción agrícola producida a nivel mundial se encuentra contaminado con alguna micotoxina. Se han identificado alrededor de 400 micotoxinas (Chi y Broomhead, 2009), las que presentan mayor importancia para el sector agropecuario y el área de salud pública son las AF; por ejemplo la AFB₁ es considerada como el carcinógeno natural más potente (IARC, 2002, Roze y col., 2013). Las vacas lecheras están expuestas a ingerir productos agrícolas contaminados con AFB₁ y sus mecanismos de eliminación para este xenobiótico se encaminan a su bioactivación (AFB₁ 8,9 exo-epóxido) y a la formación de AFM₁, un metabolito que se elimina en leche y considerado como agente carcinogénico para los humanos (IARC, 2002, Rahimi y col., 2010). Por tal razón, se han estado diseñando estrategias para prevenir y disminuir la presencia y biodisponibilidad de AF en el tracto gastrointestinal de los animales que consumen estos alimentos contaminados.

Las AF no se distribuyen de forma homogénea sobre la materia orgánica, lo que dificulta su cuantificación y una vez instaladas en el alimento no pueden ser eliminadas. Debido a la severidad del problema de contaminación con AF y a las pérdidas económicas que esto ocasiona al sector pecuario, se han diseñado varias estrategias para reducir su biodisponibilidad, el uso de agentes secuestrantes ha sido bien aceptado por la mayoría de los productores pecuarios en nuestro país; estos productos son añadidos a la ración total mezclada con la que se alimenta a las vacas lecheras, actúan uniéndose a las AF formando un complejo que suele ser eliminado en las heces u orina .

Se han utilizado los cultivos de levaduras de *Saccharomyces cerevisiae*, cuya pared celular tiene propiedades que contribuyen secuestrando la aflatoxina, además son

precusores para la formación de vitaminas del complejo B, minerales y proteínas incrementando así la producción láctea del ganado lechero (Arrieta y col., 2006, Armando y col., 2012).

Otros agentes adsorbentes son los aluminosilicatos, que poseen una amplia superficie de unión donde las AF y otras micotoxinas son secuestradas mediante la formación de enlaces iónicos o covalentes, varios estudios *in vitro* han demostrado la gran capacidad de adsorción de estos compuestos (Díaz, 2003).

Se han diseñado también estrategias de control biológico (Patterson, 2011. Ehrlich, 2014.), que consisten en la inoculación de cepas de *A. flavus* no aflatoxicogénica antes de la siembra en suelos donde se producen los principales productos agrícolas; estas cepas crecen más rápido que las cepas aflatoxicogénicas por lo que reducen las cantidades de carbohidratos disponibles para la proliferación de cepas toxicogénicas, reduciendo así la producción de AF y disminuyendo el grado de contaminación de los productos agrícolas.

Todas estas estrategias reducen el riesgo de exposición para los humanos, a productos agrícolas y de origen animal contaminados con AF. Por lo tanto es importante conocer y determinar el grado de contaminación por hongos aflatoxicogénicos y AF en el alimento que están consumiendo las vacas lecheras de las Unidades de Producción Lechera de nuestra región y evaluar la eficacia del secuestrante, que ha sido la estrategia empleada para reducir el riesgo de exposición a AF y disminuir los riesgos para la salud de las personas y los animales.

1. ANTECEDENTES

1.1. LA GANADERÍA LECHERA

1.1.1. La actividad lechera en el contexto mundial

La leche es considerada uno de los principales productos de la canasta básica (López y col., 1996) para la alimentación humana. El consumo y el comercio mundial de lácteos están incrementando con mayor rapidez en comparación a otros productos del sector agropecuario; en las últimas décadas, la producción mundial de leche se ha ido incrementando principalmente en los países en desarrollo (Figura No. 1; OCDE- FAO, 2010). El incremento de la producción de leche se ve influenciado por un conjunto de factores macroeconómicos como la evolución de la población mundial y su localización, políticas de apoyo a la producción y comercialización en los distintos países y por las negociaciones internacionales mediadas por tratados comerciales (FAO, 2012). Según la FAO (2012) se estima que la población mundial consume anualmente cerca de 500 millones de toneladas en equivalente leche en diversas presentaciones para alimento humano. El 85% corresponde a leche de vaca y el resto a otras especies (búfala 11%, cabra 2% y otras 2%).

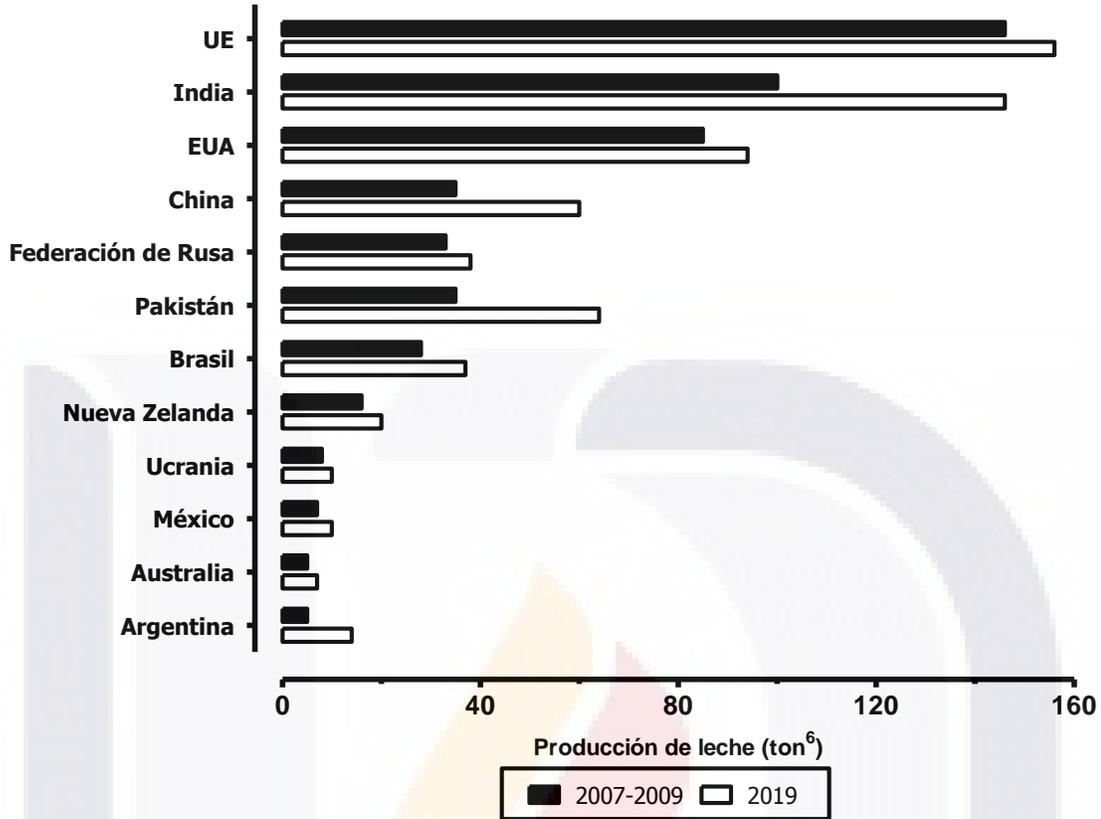


Figura No. 1. Proyección del incremento en la producción de leche. Fuente: OCDE- FAO, 2010.

1.1.2. La actividad lechera en México

En México, los esquemas productivos y comerciales que provocan un crecimiento importante de la ganadería lechera son básicamente las grandes extensiones de explotaciones ganaderas que se establecen con el fin de proporcionar el suministro de alimento a la población. Esta ganadería se desarrolla como unidades productivas agropecuarias, con posesión privada de la tierra y trabajadores permanentes, con una producción dirigida principalmente a satisfacer el mercado interno (SIAP, 2013).

La introducción de nuevas técnicas para la crianza del ganado y la transformación industrial generan un mercado interno dinámico que consolida a la ganadería bovina mexicana. Actualmente se reconocen cuatro sistemas productivos: especializado, semi-especializado, doble propósito y familiar o de traspatio (FAO, 2012. SIAP, 2013).

La producción nacional de leche de bovino ha tenido una tendencia ascendente (Tabla No. 1). La consolidación y expansión de las empresas lecheras y de organizaciones

de productores integrados, han incrementado su participación en el mercado de productos terminados presentando mejores ingresos para sus asociados, al participar del valor agregado generado en el proceso de transformación (SIAP, 2013). Para el primer trimestre del 2014, la producción de leche de bovino alcanzó una taza de 2 mil 595 millones de litros (SIAP, 2014).

Tabla No. 1. Producción Anual de leche en México (L³)

Especie	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	PROMEDIO ANUAL
Bovino	10,589,418	10,549,038	10,676,691	10,724,289	10,946,015	10,965,632	11,129,921	10,797,286
Caprino	165,197	164,756	161,796	161,712	155,255	161,743	162,463	161,846
Total	10,754,615	10,713,834	10,838,487	10,886,001	11,101,240	11,127,375	11,292,384	10,959,134
Bovino		-0.38	1.21	0.45	2.07	0.18	1.50	-2.99
Caprino		-0.27	-1.80	-0.05	-3.99	4.18	0.45	-0.38
Total		-0.38	1.16	0.44	1.98	0.24	1.48	-2.95

Fuente: SIAP, 2014.

En nuestro país el sistema de producción lechero es heterogéneo desde el punto de vista tecnológico, las unidades de producción lechera cuentan con infraestructura tecnológica según sus posibilidades de crecimiento, por lo que se ve influenciado el número de animales que puedan explotar, las técnicas y procedimientos empleados para su manejo y la calidad de los insumos destinados a la alimentación del ganado (SIAP, 2013).

Sin embargo, una de las actividades económicas más importantes para el país dentro de la rama de productos alimenticios es la industria de productos lácteos y su crecimiento depende de la cantidad y la calidad de leche producida en el país y destinada a la industrialización (SE, 2012).

La globalización mundial ha repercutido en todos los ámbitos del país, el sector agropecuario ha sido uno de los más afectados, por esto la actividad lechera deriva hacia la producción ganadera de tipo intensivo destinada a satisfacer la demanda interna, que en los últimos años se ha visto afectada por la oferta de leche procedente de otros países. (SIAP, 2013).

1.1.3. La ganadería lechera en Aguascalientes

En Aguascalientes existen ocho mil 364 unidades de producción, con un total de 239 mil 222 cabezas de bovinos. El 70.7 % corresponde a los vientres para producción de leche, 18.8 % destinados a producción (Censo Agropecuario, 2007). Aguascalientes es considerado como una de las principales cuencas lecheras del país, los resultados del VIII Censo Agrícola, Ganadero y Forestal 2007 nos muestran una producción diaria media de leche de un millón 265 mil litros, colocándose así en el noveno lugar del país con una aportación del 3.7 % (Censo Agropecuario, 2007).

1.2. ALIMENTACIÓN DEL GANADO LECHERO

1.2.1. Alimentación de rumiantes

Los bovinos son animales rumiantes, su fisiología digestiva se caracteriza por una fermentación pre-sistémica y la digestión de los componentes de plantas como celulosa por la flora ruminal, requieren regímenes de alimentación que incluyan suficiente cantidad de fibra para mantener el funcionamiento óptimo de la flora ruminal (Fink, 2008).

Actualmente se han generado nuevas formas de alimentación en las que se incluye el uso masivo de alimentos concentrados, con el objetivo de aumentar la producción láctea y cubrir las necesidades de demanda.

Modificar la alimentación del ganado trae consigo beneficios productivos para el ganadero, pero a la vez se generan algunos problemas para el ganado que es sometido a límites metabólicos y esto deriva en enfermedades que inciden en la producción. En nuestra región y en la mayoría de las explotaciones lecheras del país, los componentes principales de las dietas alimenticias del ganado bovino son los ensilaje de maíz, forrajes y concentrados. Una consecuencia directa de la composición compleja de la dieta de los rumiantes es el riesgo a la exposición de alguna micotoxina (Fink, 2008).

1.2.2. Componentes de la dieta para bovinos

1.2.2.1. Forrajes. Los forrajes son la parte vegetativa de las gramíneas y leguminosas, además de ser un buen alimento para el ganado bovino por su rico contenido de carbohidratos, deben de ser la base de su alimentación (Agrios, 2007).

Según el estado en el que se encuentren al momento de ser consumidos por los animales, los forrajes pueden ser clasificados como:

- **Forrajes verdes.**- Forrajes de consumo inmediato al punto de cosecha o directamente en la pradera. Los principales son los pastos (naturales y artificiales), alfalfa, maíz, cebada, trigo, avena y sorgo.
- **Forrajes secos.**- Forrajes que se cortan y se dejan secar antes de ser proporcionados a los animales, se les conoce como henos. También entran dentro de este grupo los residuos de cosecha como el tamo de leguminosas o cereales.

Desde el punto de vista nutricional los forrajes pueden variar, desde ser alimentos muy buenos (pastos jóvenes y succulentos, leguminosas en su estado vegetativo) a muy pobres (pajas). Algunos forrajes deben de ser suplementados con alimento concentrado, para cubrir la mayoría de los requerimientos nutricionales del animal (FAO, 2009).

1.2.2.2. Ensilaje de maíz. Para la FAO el ensilaje de maíz es el resultado de una forma de conservación o almacenamiento húmedo de los forrajes en un lugar llamado silo. En el proceso, las bacterias del ácido láctico fermentan los hidratos de carbono solubles en agua, produciendo ácido acético y ácido láctico esto provoca la disminución del pH y por lo tanto los microorganismos causantes del deterioro se inhiben (Reyes y col., 2008), la calidad del ensilaje de maíz depende de la forma en que se llevó a cabo la fermentación del forraje.

Un buen ensilaje de maíz debe reunir los siguientes requisitos: bien picado en trozos de dos a cuatro cm, pH ácido, alta proporción de grano, sin hongos o enmohecimientos, olor agradable, color café olivo, entre 60 y 70% de humedad y un buen sabor (dulce, no agrio) para que el ganado lo consuma (Chaverra, 2000).

1.2.2.3. Concentrados. Según la FAO (2000) el 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 (AAFCO, 2000).

Los concentrados pueden ser mezclas de granos y residuos de algunas industrias que tienen en su composición los principales nutrientes que requieren los animales y

poseen alto contenido de energía, los granos de cereales como el trigo, avena, cavada, maíz y sorgo son los más importantes (SAGARPA, 2013).

Deben de estar balanceados de acuerdo con la edad, la producción y otras características propias de los animales que los van a recibir y ser suministrados de acuerdo a un plan de alimentación previsto. Pueden ser elaborados en la misma explotación o conseguirse externamente en el mercado (Flores y col., 2006).

1.2.3. Producción de alimento

1.2.3.1. Producción agrícola. Los productos agrícolas de mayor importancia en la alimentación del ganado lechero son los forrajes (Rodrigues y col., 2011). En nuestro país se cultivan gran variedad de forrajes (Tabla No. 2) y una parte considerable de la producción total se destina a la alimentación del ganado.

Tabla No. 2. Producción forrajera en México, 2011

Cultivo	Superficie sembrada (Ha)	Superficie cosechada (Ha)	Producción (Ton)	Rendimiento (Ton/Ha)	Valor producción (Miles de Pesos)
ALFALFA VERDE	387,799	376,422	28,247,520	75.0	13,055,454
MAÍZ GRANO	7,750,301	6,069,092	17,635,417	2.9	71,913,855
MAÍZ FORRAJERO	489,152	311,225	9,605,148	30.8	4,402,710
SORGO GRANO	1,972,059	1,728,228	6,429,311	3.7	22,185,072
AVENA FORRAJERA	942,82	633,761	6,265,530	9.9	3,012,451
SORGO FORRAJERO VERDE	235,787	183,398	3,937,931	21.4	1,961,937
TRIGO GRANO	714,864	662,221	3,627,511	5.5	13,043,285
CEBADA GRANO	334,065	218,344	487,448	2.2	1,750,885
CEBADA FORRAJERA EN VERDE	34,61	27,714	376,586	13.6	161,363
TRITICALE FORRAJERO EN VERDE	5,300	5,259	146,429	27.8	61,182
TRIGO FORRAJERO VERDE	2,378	2,369	63,762	26.9	29,186
AVENA GRANO	61,702	51,655	50,582	0.98	207,379
GARBANZO FORRAJERO	19,812	18,668	38,112	2.0	97,201
MAÍZ GRANO SEMILLA	3,397	3,397	24,722	7.3	73,248
REMOLACHA AZUCARERA	30	30	750	25	600
TRITICALE GRANO	245	245	472	1.93	1,604

Fuente: Adaptado de SIAP, 2012.

El maíz es el producto agrícola de mayor importancia para la ganadería y la agricultura, siendo este cultivo el que ocupa mayor superficie de siembra y en el que se

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

basa la mayoría de las dietas alimenticias para ganado bovino productos de leche. Otros productos como la avena y el sorgo son usados con frecuencia como ingredientes primordiales para la alimentación del ganado (SIAP, 2012).

Estos productos agrícolas tienen mayor susceptibilidad de ser contaminados por hongos micotóxicos y AF (Zheng y col., 2006), que al ser ingeridos por las vacas lecheras éstas presentan un trastorno en la salud conocido como aflatoxicosis. Los bovinos lecheros resisten intoxicaciones agudas, pero las intoxicaciones crónicas son la causa de pérdidas económicas considerables.

1.2.3.4. Producción de alimento concentrado. México ocupa el sexto lugar del continente en producción de alimento balanceado o concentrado, para el año 2012 se produjeron 28.7 millones de toneladas de las cuales 4,606 se destinaron a la ganadería lechera (SIAP, 2013).

Las Unidades de Producción Lechera se han visto en la necesidad de suplementar la alimentación del ganado con alimento balanceado o concentrado debido a la introducción de ganado especializado en la producción de leche genéticamente mejorado (SAGARPA, 2013), lo que genera la elevación de costos de producción. La composición tan compleja de la dieta y la manipulación de los productos agrícolas aumentan la susceptibilidad de que los insumos se contaminen con alguna micotoxina (Gremmels, 2008a).

Para la producción de alimentos concentrados se usan diferentes insumos de origen agrícola (Tabla No. 3), su porcentaje en el producto final depende del ganado que lo consume, las necesidades nutritivas según el estado fisiológico, los nutrientes legalmente declarables según la legislación vigente y las preferencias del animal y su propietario en cuanto a las características organolépticas y las cualidades nutricionales de los ingredientes (SAGARPA, 2013).

Tabla No. 3. Aporte nutricional de las materias primas empleadas para la elaboración de alimento concentrado

Materia prima	Aporte
Forrajes	Obligados para rumiantes. Correcto funcionamiento del aparato digestivo.
Cereales	Para todas las especies. Fuentes de energía.
Subproductos de cereales y otros productos y subproductos fibrosos	Alto contenido de fibra.
Semillas leguminosas	Complemento de cereales.
Semillas oleaginosas	Fuentes de energía en forma de grasa. Niveles medios de proteína.
Harinas de extracción de semillas oleaginosas	En todas las especies. Fuente de proteína vegetal.
Melazas	Mejorar la palatabilidad.
Aceites vegetales y grasas animales	Solo cuando no es posible aumentar la energía con cereales. Aportación de ácidos grasos esenciales.
Sales de ácidos grasos	En rumiantes. Incremento de aportes de grasas.
Productos lácteos	En las primeras edades de rumiantes. Aporte de nutrientes fácilmente digestibles.
Aminoácidos sintéticos	Corregir deficiencias de aminoácidos.
Productos minerales	Corregir deficiencias de calcio, fósforo, magnesio o sodio.
Premezclas de vitaminas y minerales	Aporte mínimo de vitaminas.
Aditivos	Son incluidos con fines particulares.

Fuente: Adaptado de SAGARPA (2013)

1.3. PRINCIPALES HONGOS AFLATOXICOGÉNICOS

Los hongos micotoxigénicos presentan un interés particular en el ámbito agropecuario por ser agentes contaminantes en alguna o todas las etapas de la cadena agroalimentaria, en particular aquellos capaces de producir metabolitos secundarios tóxicos denominados aflatoxinas; como es el caso de algunas especies del género *Aspergillus*, especialmente *A. flavus* y *A. parasíticus* (Canafoglia y col., 2007).

Se han identificado alrededor de 400 micotoxinas, la mayoría de importancia agrícola y pecuaria. Según la FAO (2007) (Tabla No. 4) los principales hongos productores de micotoxinas y de importancia económica son: *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, ya que han sido la causa de cuantiosas pérdidas económicas en el sector agropecuario (Chi y Broomhead, 2009. Keller y col., 2013).

Tabla No. 4. Principales hongos Micotoxicogénicos

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

Fuente: FAO (2007)

Estos hongos se distribuyen a nivel mundial y contaminan gran cantidad de los alimentos y productos agrícolas destinados a la elaboración de dietas para el ganado bovino productor de leche. *A. flavus* puede contaminar los productos agrícolas y producir aflatoxinas en el campo, durante la cosecha o el almacenamiento de los productos agrícolas (Theumer y col., 2012. Cotty, 2014).

1.3.1. Características del género *Aspergillus*

Pier Antonio Micheli en 1729, presentó por primera vez la descripción del género *Aspergillus*; lo nombró así por la similitud estructural de su conidióforo al hisopo litúrgico

utilizado para esparcir agua bendita. Después, Link en 1809 describe la especie de *Aspergillus flavus*, que ha sido conocida como una especie asexual que sólo produce esporas o conidios asexuales y cuerpos fructíferos asexuales de hibernación denominados esclerocios. Recientemente se han identificado conidióforos capaces de reproducirse sexualmente que se han clasificado como *Petromyces flavus* (Amaike y Keller, 2011; Patterson, 2011).

En 1926, se presentó oficialmente la primera clasificación del género, con 69 especies en 11 grupos, el término "grupo" se ha sustituido por "sección". Con la ayuda de técnicas moleculares modernas el número de especies del género *Aspergillus* ha aumentado a más de 250, clasificadas en siete subgéneros y múltiples secciones (Petterson, 2011). Los miembros de este género presentan los conidióforos en posición vertical, sencilla, terminan en una hinchazón claviforme, tienen fiálides en el ápice o irradiando desde el vértice o toda la superficie (Figura No.2); con un conidio unicelular, globoso, a menudo de varios colores en la masa (Barnett y Hunter, 2000).

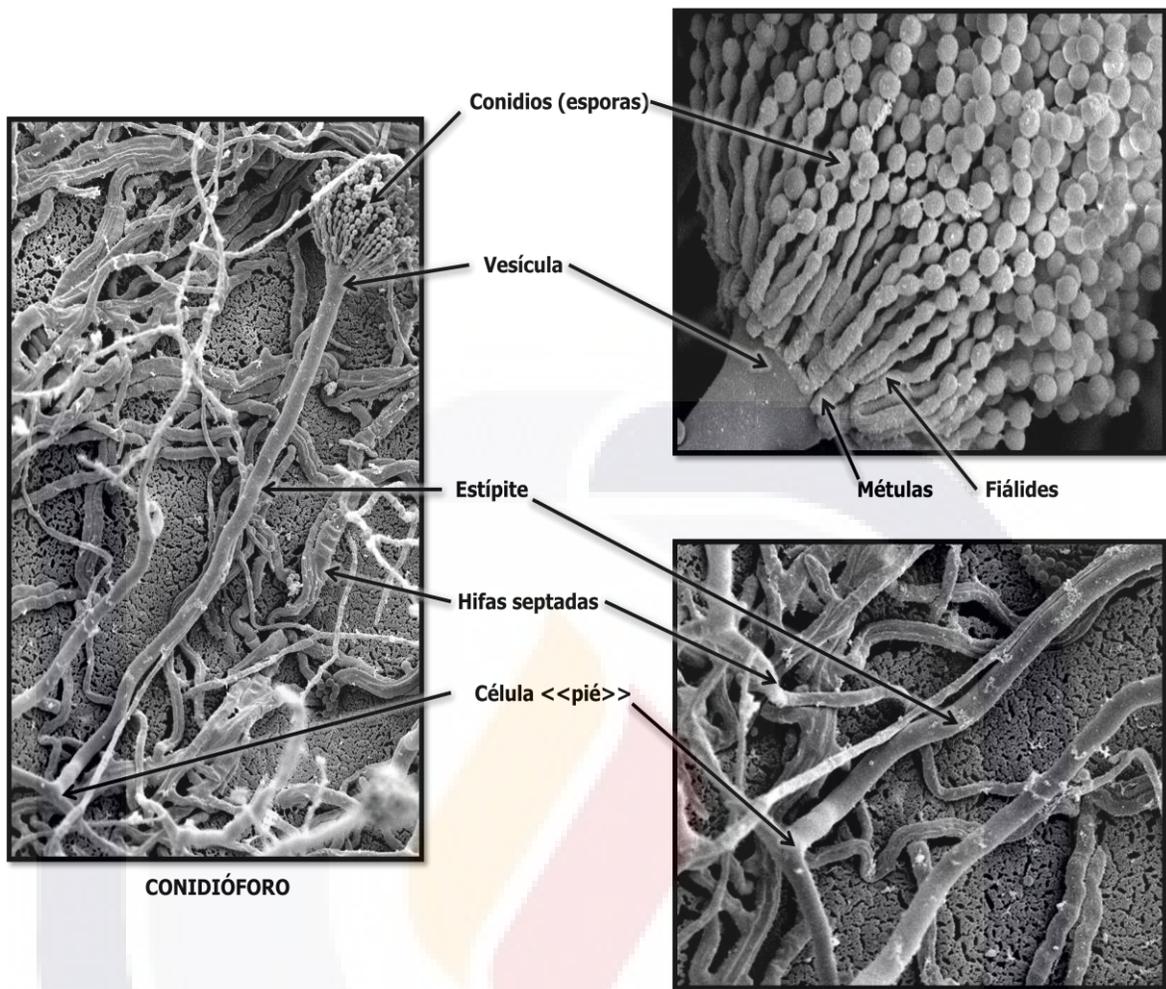


Figura No. 2. Morfología de *Aspergillus spp.* (Elaboración propia)

La taxonomía de *Aspergillus* ha sido ampliamente revisada y reclasificada en los últimos años, basándose sobre todo en estudios moleculares como la secuenciación del ribosoma, de genes beta-tubulina o calmodulina. Estos estudios han permitido una identificación más precisa de las especies pero sin duda seguirán dándose modificaciones en la nomenclatura de *Aspergillus* (Patterson, 2011; Ehrlich, 2014). La mayoría de las especies del género *Aspergillus* se reproducen asexualmente, a excepción de sus teleomorfos (formas de reproducción sexual) y el nombre genérico de *Aspergillus* se aplica generalmente a todas las especies, independientemente de sus teleomorfos (Patterson, 2011). *Aspergillus* es considerado un hongo anamórfico o imperfecto por su forma de reproducción asexual, que pertenece a la familia *Trichocomaceae* de la clase *Hyphomycetes* en el filo Deuteromycota. Los teleomorfos de especies de *Aspergillus* se

clasifican en siete géneros en el orden de los *Eurotiales* dentro del filo *Ascomycota* (Amaike y Keller, 2011; Patterson, 2011). La identificación de hongos del género *Aspergillus* suele ser fácil la identificación a nivel de especie es más complicada (Figura No. 3), especialmente para los aislamientos atípicos (Samson, 2014).



Figura No.3. Micrografía del conidióforo de dos miembros del género *Aspergillus*. Panel A: *A. solanii*. Panel B: *A. ocraceus* (Samson, 2014)

1.3.2. *Aspergillus* sección *flavi*

Aspergillus sección *flavi* incluye 22 especies que se han agrupado en siete subtipos. Dentro de esta sección se clasifican especies productoras de AF como *A. flavus* y *A. parasiticus* (Tabla No. 5), que crecen casi en cualquier cultivo agrícola, también se encuentran incluidas especies que son utilizadas en la fermentación de alimentos sobre todo en el oriente como *A. oryzae*, *A. sojae* y *A. tamarii*, estas especies son consideradas domésticas (Varga y col., 2011).

Tabla No. 5. Especies de hongos *Aspergillus* productoras de aflatoxinas

Especie	Distribución	Metabolito producido
<i>A. flavus</i>	Mundial	AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ , AFG ₂ , Ac. Aspergílico, Ac. Ciclopiazónico, Ac. Kójico, Paspalininas, Ac. Nitropropiónico.
<i>A. nomius</i>	Brasil, India, Japón, Tailandia y EUA	AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ , AFG ₂ , Ac. Aspergílico, Ac. Kójico, Paspalininas, Ac. Tenuazónico.
<i>A. parasiticus</i>	Australia, India, Japón, América del Sur, Uganda, EUA	AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ , AFG ₂ , Ac. Aspergílico, Ac. Kójico.
<i>A. arachidicola</i>	Argentina	AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ , AFG ₂ , Ac. Aspergílico, Ac. Kójico, Quinazolina.
<i>A. bombycis</i>	Indonesia y Japón	AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ , AFG ₂ , Ac. Aspergílico, Ac. Kójico.
<i>A. minisclerotigenes</i>	Argentina, Australia, Nigeria y EUA	AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ , AFG ₂ , Aflavinas, Aflavinas, Ac. Aspergílico, Ac. Ciclopiazónico, Paspalininas.
<i>A. parvisclerotigenus</i>	Nigeria	AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ , AFG ₂ , Ac. Ciclopiazónico, Ac. Kójico, Paspalininas
<i>A. pseudocaelatus</i>	Argentina	AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ , AFG ₂ , Ac. Ciclopiazónico, Ac. Kójico.
<i>A. pseudonomius</i>	EUA	AFB ₁ , Ac. Kójico.
<i>A. pseudotamarii</i>	Argentina, Japón	AFB ₁ , AFB ₂ , Ac. ciclopiazónico, Ac Kójico
<i>A. togoensis</i>	África	AFB ₁ , Esterigmatocistina.

FUENTE: Adaptado de Vargas y col. (2011)

Los miembros de esta sección *flavi* presentan cabezas conidiales en tonos amarillo verdoso y esclerosis de color marrón oscuro, y varias especies han sido descritas dentro de esta sección basándose solamente en los aspectos morfológicos (Figura No. 4) como: diámetro, color y textura de la colonia, tamaño y textura de conidios y conidióforos; sin embargo la clasificación por especie a resultado difícil por la gran similitud en sus características morfológicas debido a una alta variabilidad genética (Klich, 2002).

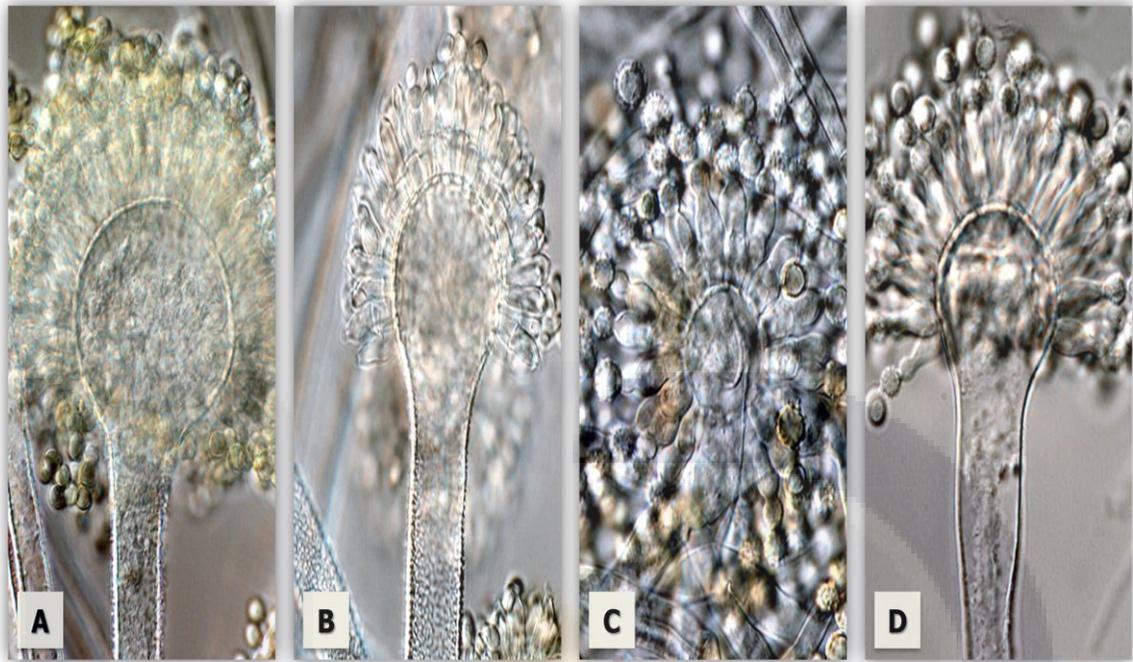


FIGURA No.4. Micrografía de especies del género *Aspergillus* sección *flavi*. Panel A: *A. oryzae*. Panel B: *A. togoensis*. Panel C: *A. pseudocaelatus*. Panel D: *A. pseudonomius*. (Klich, 2002)

Pese a las múltiples investigaciones, la taxonomía de este grupo es aún muy compleja y varios trabajos realizados, entre ellos los de Frisvad y col. (2005) y Pildain y col. (2008) afirman que varias especies asignadas a esta sección no pueden distinguirse basándose solamente en las características morfológicas, es importante la identificación a nivel molecular debido a que existe una gran variabilidad genética entre los miembros de este género.

Godet y Munaut (2010) diseñaron una estrategia molecular, que consiste en una PCR en tiempo real, identificando nueve especies para la sección *flavi*, y Varga y col (2011) lograron identificar dos especies más para esta sección: *A. pseudocaelatus* sp nov. y *A. pseudonomius* sp nov.

1.3.3. *Aspergillus flavus*

Crecen de especial forma en los granos como el maíz; es un microorganismo saprófito se encuentra en el suelo, oportunista que coloniza fácilmente cuando hay una rica fuente de carbono y nitrógeno, su principal mecanismo de reproducción es por esporulación asexual

pero, bajo condiciones ambientales extremas forman esclerocios capaces de sobrevivir por muchos años (Patterson, 2011.).

La temperatura óptima de crecimiento es de 25 a 37 °C; las colonias de aspecto rugoso o en ocasiones lisas, suelen ser de color amarillo a verde lima brillante y crecen a un ritmo rápido. Típicamente presenta conidióforos uniseriados o biseriados (Figura No. 5), con conidios de forma y tamaño variables, de pared delgada y finamente rugosos; las vesículas son grandes de hasta 50 mm de diámetro y suele tener mótulas a diferencia de *A. parasiticus*. (Pitt y Hocking, 2009).

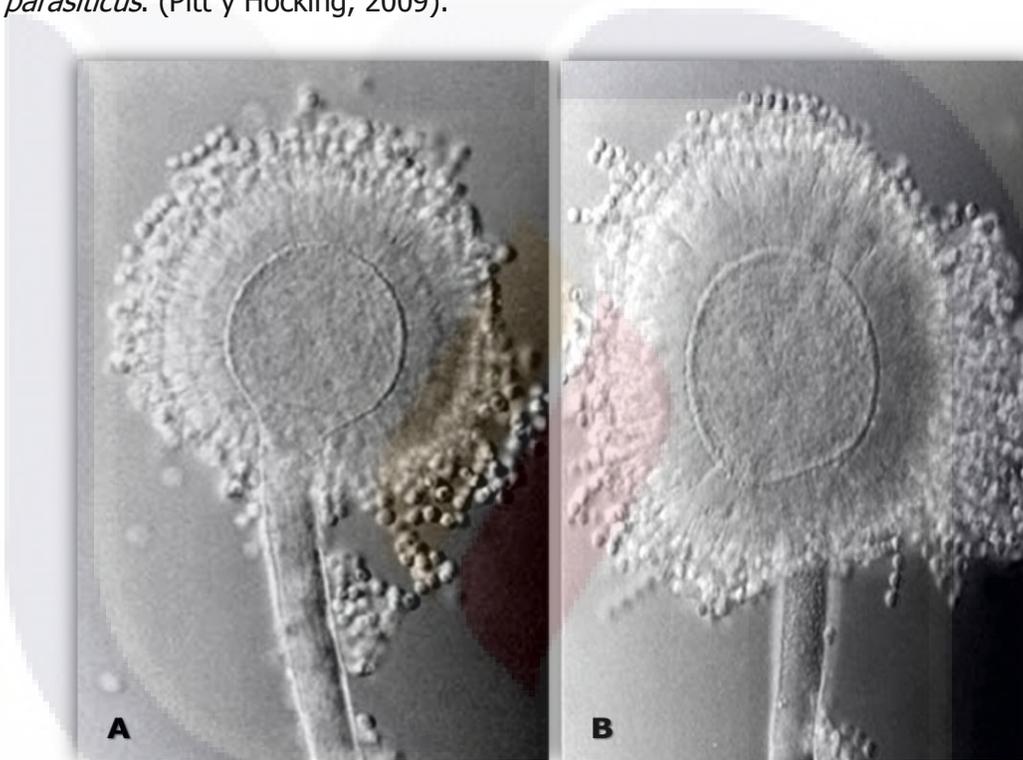


Figura No. 5. Conidióforos de *Aspergillus flavus*. Panel A: Uniseriado. Panel B: Biseriado. (Pitt y Hocking, 2009)

La presencia de AF en los conidios de *A. flavus* es de suma importancia, individualmente los conidios o esporas pueden contener altas concentraciones de AF, que al ser ingeridas por el organismo animal producen una serie de trastornos en la salud, reflejándose en la baja productividad que a la larga trae pérdidas económicas en las explotaciones lecheras, las AF también pueden ser absorbidas a través de la piel, por lo que el manejo de cepas aflatoxicogénicas debe realizarse con las mayores medidas de seguridad (Pitt y Hocking, 2009).

Algunos autores (Mauro y col., 2013. Ehrlich, 2014) han propuesto incluir dos variantes de *Aspergillus flavus* que incluyen aislamientos aflatoxicogénicas y no aflatoxicogénicas de cepas presentes en el suelo, las cuales se pueden ubicar en alguna de las siguientes dos variantes: *A. flavus* cepa S (Grupo IA, esclerocio < 400 micras) y *A. flavus* cepa L (Grupo IB, esclerocio > 400 micras).

Las técnicas moleculares desarrolladas actualmente han permitido conocer la forma de reproducción sexual, la mayoría de los conidios que presenta *A. flavus* son homocarióticos, se ha identificado la capacidad de recombinación de un pequeño porcentaje de conidios que se convierten en heterocarióticos, lo que permite la forma sexual de reproducción (Ehrlich, 2014).

Aparte de la producción de las AF más conocidas (B_1 , B_2 , G_1 y G_2), *A. flavus* produce también otros metabolitos secundarios como el ácido cliclopiazónico (CPA), indol-diterpenos, aflatrem, paxillenes, paspalicines, aflavinines y p-seurotin, P-neurotransmisor, estos metabolitos podrían tener efectos neurotóxicos y nefrotóxicos en animales (Ehrlich, 2014).

1.3.4. *Aspergillus parasiticus*

Las colonias miden entre 50-70 μm de diámetro, el micelio es blanco poco visible, las cabezas conidiales forman una capa densa uniforme de color verde amarillento oscuro, ocasionalmente produce esclerosis, con un conidióforo que emerge desde el subsuelo o por encima de las hifas, la vesícula es esférica con conidias rugosas y esféricas que miden aproximadamente 5 μm , que por lo general tienden a crecer irradiando sobre la cabeza (Figura No. 6).



Figura No. 6. Conidióforo de *A. parasiticus*. (Pitt y Hocking, 2009)

A diferencia de *A. flavus*, en *A. parasiticus* es raro encontrar cepas atoxicogénicas, también produce AF B y G, además se ha identificado la producción de ácido kójico un metabolito de baja toxicidad, empleado en la industria cosmética y en medicina (Pitt y Hocking, 2009).

1.3.5. Condiciones para el crecimiento de hongos *Aspergillus*

Los principales factores que influyen en el crecimiento de los hongos y la producción de metabolitos secundarios son: actividad de agua, pH, temperatura, concentraciones de O_2/CO_2 y fuentes de carbohidratos.

2.3.5.1. Actividad de agua (a_w). La a_w hace referencia a la porción de agua disponible en el sustrato que puede ser aprovechada por el hongo. La disponibilidad de agua es esencial para el crecimiento de *Aspergillus spp.* que crece adecuadamente en medios donde la a_w se encuentra entre 0.70 y 0.98 (Klich, 2006. Pitt and Hocking, 2009).

2.3.5.2. Concentración de iones hidrógeno (pH). Otros microorganismos compiten con los hongos para el aprovechamiento de los niveles de agua, para que los hongos sean favorecidos el pH es el factor decisivo. El pH indica la concentración de iones hidrógeno (H^+) en el sustrato, cuya mayor o menor concentración se expresa numéricamente dando como resultado medios ácidos (pH menor a 7) y medios alcalinos (pH mayor a 7). El desarrollo de hongos *Aspergillus* se ve favorecido por los medios ácidos, aunque algunas especies tienden a crecer bien en medios alcalinos (*A. tamarii*, *A. restrictus*) (Klich, 2006. Pitt and Hocking, 2009).

2.3.5.3. Temperatura (T°). Para los hongos del género *Aspergillus* la temperatura juega un papel importante, más que para su desarrollo, para la formación de esporas y esclerocios, o para la formación de metabolitos secundarios como AF. La mayoría de las especies de *Aspergillus* son termoestables, pueden crecer lentamente a temperaturas bajas (2-5°C) o resistir temperaturas extremas para el ser humano (42-45°C), sus formas vegetativas son más resistentes, las esporas pueden sobrevivir las temperaturas de pasteurización. La mayoría de los hongos *Aspergillus* crecen bien a temperaturas de entre 25 y 35°C (Klich, 2006. Pitt and Hocking, 2009).

2.3.5.4. Disponibilidad de oxígeno y bióxido de carbono (O₂/CO₂). La concentración de O₂ en el sustrato tiene mayor influencia para el crecimiento de los hongos *Aspergillus*, que la concentración de O₂ en la atmósfera. Muchas especies son eficientes para eliminar el O₂ disponible, por lo tanto la concentración de O₂ en el sustrato influye en mayor medida para el desarrollo de los hongos, más que el encontrado en la atmósfera y crecen bien en atmósferas con hasta un 15% de CO₂ (Pitt and Hocking, 2009).

2.3.5.5. Disponibilidad de nutrientes. La mayoría de las especies de *Aspergillus*, son capaces de asimilar ricas fuentes de carbono y nitrógeno, estos nutrientes juegan un papel importante en el desarrollo de los hongos y la producción de metabolitos secundarios. (Klich, 2006. Pitt and Hocking, 2009).

La tabla 6 muestra las condiciones específicas de crecimiento para especies del género *Aspergillus*.

Tabla No. 6. Necesidades óptimas para el crecimiento de especies del género *Aspergillus*

Especie	Temperatura (T °C)	Actividad de agua (a_w)	Acidez (pH)	Sustrato
<i>A. nidulellus</i>	35-37	0.82-0.90	ND	Trigo, cebada, arroz, maíz y sorgo
<i>A. vitis</i>	33-35	0.70-0.75	5.5-7.0	Trigo, harina de arroz, cebada maíz, uva y pasas
<i>A. chevalieri</i>	30-35	0.71-0.74	4-6.5	Ciruela pasa, queso, garbanzos, habas, trigo, arroz y nueces
<i>A. aculeatus</i>	20-30	0.87-0.82	2-10	Tomate, uva, cacahuate y soya
<i>A. candidus</i>	Termoestable hasta 50°	0.75-0.98	5.0-6.0	Trigo, salvado, maíz, arroz, cacahuate, avellana y nueces
<i>A. carbonarius</i>	30-41	0.96-0.98	2-10	Uva, higo, maní y maíz
<i>A. clavatus</i>	25-40	0.87-0.89	ND	Cebada, trigo, arroz, maíz, frijol y soya
<i>A. flavipes</i>	26-28	0.80-0.85	ND	Frutas tropicales, yuca y trigo
<i>A. flavus</i>	27-33 Tolera hasta 48°	0.78-0.84	3.4-10	Frutos secos, semillas oleaginosas, maíz, cacahuate, arroz, sorgo, soya, nuez, pistache y avellana
<i>A. oryzae</i>	25-27	ND	ND	Productos fermentados
<i>A. nomius</i>	25-30	0.81-0.83	ND	Maíz, cacahuate y soya
<i>A. fumigatus</i>	40-42	0.82-0.90	ND	Cacao, semillas oleaginosas almacenadas, huevos almacenados
<i>A. niger</i>	35-37	0.77	4.0-6.5	Frutos secos, frutos frescos como manzana, pera, durazno, uva, higo fresa mango y melón
<i>A. niveus</i>	36-42	ND	ND	Cacahuate, soya y arroz
<i>A. ochraceus</i>	37-40	0.79-0.81	3-10	Café, soya, pimienta, fruta seca, cacahuate y nuez
<i>A. parasiticus</i>	12-42 Óptima 32	0.81-0.85	3.5-8.5	Suelos, arroz, cacahuate, avellana, nuez y maíz
<i>A. penicillioides</i>	30	0.89	5.5	Raro en alimentos
<i>A. restrictus</i>	30	0.75	ND	Trigo, arroz, maíz, frijol y nuez
<i>A. tamarrii</i>	33	0.78	ND	Trigo, cebada y sorgo
<i>A. terreus</i>	37	0.78	6-7	Pistache y nuez
<i>A. versicolor</i>	27-37	0.87-0.98	3.1-7.4	Trigo, cebada, arroz, avena, semilla de girasol y semilla de amaranto

ND= Dato no disponible. Elaboración propia con datos de Pitt and Hocking (2009).

1.3.6. Proliferación de hongos aflatoxicogénicos

Los hongos aflatoxicogénicos pueden colonizar los productos agrícolas y producir aflatoxinas antes, durante o después de la cosecha; en el almacenamiento, transporte o procesamiento (Agrios, 2006; Bhat y col., 2010).

Para que los hongos proliferen sobre un sustrato es necesario que se reúnan una serie de factores; las condiciones climáticas, los sistemas de cultivo, las prácticas culturales y de manejo post-cosecha de granos, forrajes y alimentos para el ganado, determinan el impacto que puedan tener la presencia de cepas toxicogénicas y la producción de aflatoxinas (Reyneri, 2006; Agrios, 2006, Cotty, 2014).

Las partes aéreas de las plantas quedan expuestas a la invasión por microorganismos que acarrea el viento, entre ellos los hongos filamentosos saprobios y patógenos, como es el caso de *A. flavus*. El hongo se desarrolla durante la cosecha y continua su crecimiento aún en los productos frescos después de ésta, lesionando la estructura física del material vegetal y deteriorando su valor nutritivo (Agrios, 2006. Cotty, 2014).

Los granos se encuentran entre los productos agrícolas más susceptibles a la contaminación con AF, Reyneri (2006) y Soares (2013) coinciden en que el maíz es uno de los productos agrícolas que presenta mayor incidencia de contaminación por hongos y AF en muchos de los países del mundo; de Luna y col. (2013) evaluaron la resistencia que presentan varios genotipos de maíz a la infección por hongos aflatoxicogénicos y a la contaminación por AF; encontrando una asociación entre el genotipo de maíz y el nivel de colonización.

El desarrollo de *A. flavus* se ve favorecido después de la cosecha, ya que se reúnen las condiciones adecuadas para su crecimiento: nutrientes, contenido de humedad, actividad de agua, temperatura y pH (Agrios, 2006. Driehuis y col., 2008).

En alimentos húmedos, como ensilaje de maíz el crecimiento de hongos depende del pH y de la cantidad de oxígeno disponible. La gran mayoría de los hongos son aerobios obligados y las condiciones de anaerobiosis propias de un silo, favorecidas por la alta humedad y bajo pH, limitan el desarrollo de hongos (Agrios, 2006; Driehuis y col., 2008).

1.4. PRODUCCIÓN DE AFLATOXINAS

La Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO 1991) define a las micotoxinas como productos químicos del metabolismo secundario de hongos filamentosos que provocan cambios patológicos en seres humanos y animales. Los metabolitos fúngicos primarios son aquellas moléculas sintetizadas por el hongo para la formación de biomasa. El término micotoxina se deriva de las palabras griegas "mykes" (hongos) y "toksicons" veneno (Céspedes, 1997), las más importantes y las que presentan mayor interés para su estudio son la aflatoxinas.

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios altamente tóxicos y carcinogénicos producidos por diferentes hongos del género *Aspergillus*, causan trastornos en la salud y en la producción animal, la más importante es la AFB₁ y representan un serio peligro para los seres humanos y para los animales porque son contaminantes ambientales naturales en la mayoría de los productos alimentarios (FAO, 1991; Deshpande, 2002; Duarte y Villamil, 2006; Dogi y col 2011).

Cuando el crecimiento del hongo termina o es interrumpido por la escases de algún nutriente esencial, el proceso de metabolismo se encaminan hacia la producción de aflatoxinas, las cuales se producen en gran cantidad durante la fase estacionaria y al final de la fase exponencial del ciclo de vida del hongo (Agrios, 2006; de Luna y col. 2013).

La biosíntesis de aflatoxinas es influenciada por varios factores bióticos (propios del hongo) y abióticos (propios del medio ambiente), entre los cuales están: fase de desarrollo del hongo, factores nutricionales, como fuentes de carbono o nitrógeno; factores ambientales, como la actividad de agua (aw), las sequías y la temperatura; condiciones fisiológicas como pH y la presencia de agentes bio-reactivos como productos químicos ambientales propias de la planta. Los pH ácidos favorecen la producción de aflatoxinas en *A. flavus*, mientras que los pH alcalinos la inhiben (Jiujiang y col., 2010).

Los factores mencionados anteriormente son factores no genéticos que influyen en la fisiología de los hongos aflatoxicogénicos y pueden cambiar la expresión del gen regulador de aflatoxinas (afl-R) alterando el proceso de transcripción (Jiujiang y col., 2010). La esporulación y la formación de esclerocios también resultan del metabolismo secundario de los hongos.

Las aflatoxinas son compuestos ubicuos, policetónicos resultantes de las reacciones de condensación que tienen lugar cuando bajo determinadas condiciones ambientales,

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

fisiológicas o genéticas se interrumpe la reducción de los grupos cetónicos en la biosíntesis de los ácidos grasos realizada por los hongos aflatoxicogénicos. (Díaz, 1995. Céspedes, 1997).

1.4.1. Importancia de las aflatoxinas en el ámbito agropecuario

Las AF en el alimento se consideran como un problema de salud pública (Marina, 2007), por tal razón los alimentos se han convertido en un área importante de investigación. La contaminación de los alimentos con AF o alguna otra micotoxina representa importantes pérdidas económicas (Dorokhin, 2011; Cotty, 2014), tanto en la producción animal por los efectos que tienen sobre su salud, como por el deterioro de las materias primas y consumibles, que interfieren en la barrera comercial entre los países (Bucio y col, 2001; Fink, 2008).

La importancia de las AF se debe a la capacidad carcinogénica, mutagénica, teratogénica e inmunosupresora que presentan, pero también hay otras micotoxinas que se pueden encontrar de manera natural como la Ocratoxina A (OTA), Zearalenona (ZEA), Tricotecenos (DON, Toxina T-2, DAS) y Fumonisinás que también producen daños severos en la salud de los animales (FAO, 2003; IARC, 2002).

El consumo de alimentos contaminados con AF por bovinos lecheros presenta un riesgo potencial a la salud pública, particularmente en la población infantil, debido a la eliminación de aflatoxina M₁ (AFM₁) en leche, que ya es considerada por la IARC (2002) como agente carcinogénico para humanos.

1.4.2. Presencia de aflatoxinas en alimento de uso pecuario

La contaminación de alimento por micotoxinas, destinado al consumo humano y animal se ha convertido en una de las mayores problemáticas de salud pública a nivel mundial (Tabla No. 7), lo que ha originado el interés de realizar investigaciones para conocer las concentraciones de micotoxinas y específicamente de AF que pueden estar presentes en los componentes de las dietas destinadas al consumo animal (Alonso y col., 2013).

Tabla No. 7. Micotoxinas presentes en alimento de uso pecuario

País	Tipo de ensilaje	Micotoxina encontrada	Referencia
Argentina	Maíz y sorgo	AF, DON	Amigot y col., 2006
Argentina	Maíz	AF	Alonso y col., 2009
Argentina	Maíz	AFB ₁ , ZEA, DON, FBs, patulina	Gonzalez Pereyra y col., 2008, 2011
Brasil	Maíz y Sorgo	AFB ₁	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	AF, T2	El-Shanawany y col., 2005
Francia	Maíz	AFB ₁ , ZEA, DON, CIT	Garon y col., 2006
Francia	Maíz	GLY, DON, CIT	Richard y col., 2007
Francia	Maíz	AFB ₁ , DON, CIT	Richard y col., 2008
Alemania	Maíz	Tricotecenos, ZEA	Schollenberger y col., 2006
Italia	Maíz	AFB ₁	Decastelli y col., 2007
México	Maíz	AFB ₁ , 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	AF, DON, FBs, T2, ZEA, OTA	Bíro y col., 2009
USA	Maíz	FBs	Kim y col., 2004

Fuente: Alonso y col. (2013)

1.4.3. Características físico químicas de las aflatoxinas

Las AF son un grupo de alrededor de 15 a 20 compuestos químicos estrechamente relacionados, son inodoras, insípidas e incoloras. Químicamente son estables en los alimentos y resistentes a la degradación bajo procedimientos de cocción normales. Es difícil eliminarlas una vez que se producen. Pertenecen a la familia de las difurano-cumarinas (Tabla No. 8), se clasifican en dos grandes grupos de acuerdo a su estructura química (Urrego y Díaz, 2006).

Tabla No. 8. Estructura química de las aflatoxinas

Grupo	Tipo de Aflatoxina	Fórmula estructural	Peso molecular (g/mol)
Serie 1	B1	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312
	B2	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314
	M1	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328
	M2	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330
Serie 2	G1	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	328
	G2	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330

Fuente: Urrego y Díaz (2006)

Las dos principales especies de *Aspergillus* que producen AF son *A. flavus* que produce AFB₁ y AFB₂, y *A. parasiticus* que puede producir AFB y AFG. Sin embargo las más importantes son AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂. Las aflatoxinas M₁ y M₂ son productos hidroxilados del metabolismo oxidativo de las AFB₁ y AFB₂ respectivamente, estos metabolitos pueden eliminarse en leche. Las aflatoxinas B₂, G₁ y G₂ son menos frecuentes y casi nulas en ausencia de AFB₁ (Figura No. 7) (Juan y col., 2007; Paterson y Lima, 2010; Forouharmeh y col., 2013).

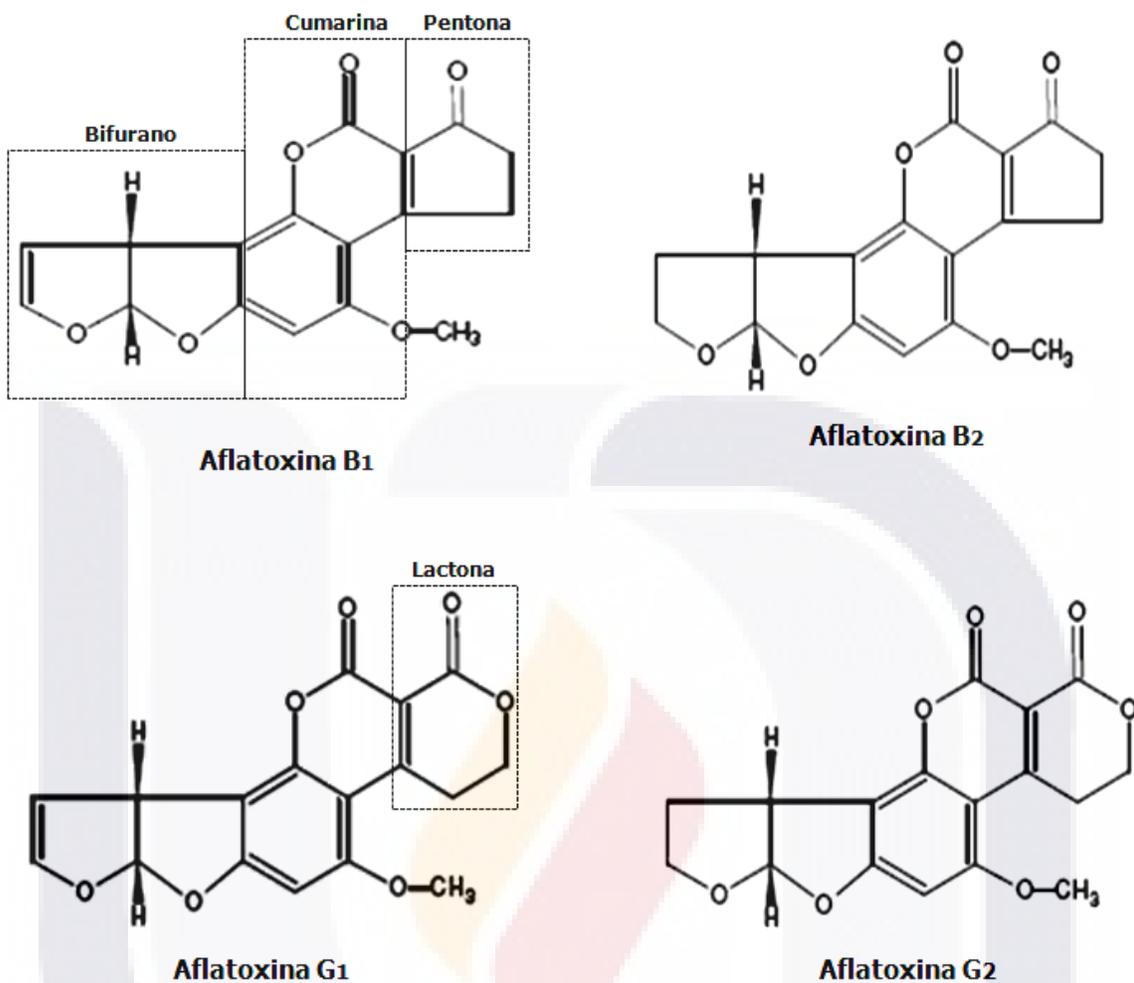


Figura No. 7. Estructura química de las principales aflatoxinas. (Adaptado de William y col. 2004)

1.4.4. Biosíntesis de aflatoxinas

Se estima que al menos 23 reacciones enzimáticas están involucradas en la ruta de biosíntesis para la formación de aflatoxinas y han sido identificados alrededor de 15 productos químicos intermediarios (Juijiang y col., 2010. Kabak, 2010).

Las AF son polipéptidos derivados de difurano-cumarinas que se sintetizan a partir de malonil CoA, primero con la formación de CoA hexanoílo y seguido de la formación de una antraquinona decaketide. Hay dos sintetasa de ácidos grasos (FAS-1 y FAS-2) y un policétido sintetasa (PKS) que participan en la síntesis del policétido de acetyl CoA (Juijiang y col., 2010. Roze y col. 2013).

El ácido norsolorínico (NOR) es el primer intermediario estable de la aflatoxina, después de la formación de este compuesto se presentan una serie de reacciones de oxido-reducción (Kabak, 2010. Roze y col. 2013). Las enzimas oxido-reductasa, monooxigenasa, deshidrogenasa, dinucleótido flavina adenina mono oxigenasa, esterasa y sintetasa actúan en secuencia para producir versicolorin B. Este intermedio es un precursor común de ramas divergentes biosintéticas que producen aflatoxina B₁ y aflatoxina B₂. A raíz de la rama de la aflatoxina B₁, versicolorin B desaturasa produce versicolorin A (VA), que contiene el 2,3 doble enlace en el anillo dihidrodifurano (Kabak, 2010; Roze y col. 2013).

Este doble enlace puede ser oxidado en el organismo huésped y formar un epóxido altamente reactivo que media la mutagenicidad, carcinogenicidad, y la citotoxicidad de la AFB₁. Varias reacciones enzimáticas están implicadas en la conversión de VA a dimetil-esterigmatocistina y luego a O-metil-esterigmatocistina, el citocromo P-450 monooxigenasa OrdA cataliza la reacción final para generar la aflatoxina B₁ de O-metil-esterigmatocistina (Kabak, 2010. Roze y col. 2013).

Los últimos estudios realizados sobre la identificación de la ruta de biosíntesis para aflatoxinas han descubierto la participación de 29 genes o marcos de lectura abierta (ORFs). Entre los que se encuentran dos grandes grupos: afl-B (Fas-1) y afl-A (FAS-2) (Juijiang y col., 2010).

1.4.5. Características de la AFB₁

La AFB₁ es un componente altamente tóxico (LD₅₀, 1-50 mg/kg peso corporal) para una gran variedad de especies animales (Klein y col., 2003), es la más común y tóxica, por si sola es una molécula inocua, pero al ser ingerida por un organismo y en su afán de eliminarla, se biotransforma a su forma tóxica, una vez activada forma aductos con proteínas y con ADN al realizarse un ataque nucleofílico que inactiva la función biológica de la estructura dañada (Wang y col., 2000; Guengerich y col., 2002; Kamdem y col., 2006).

1.4.6 Metabolismo de las aflatoxinas

En general, existe una considerable variabilidad de especie-específica, relevante al metabolismo de la AFB₁. Los factores que pueden influir en su metabolismo no están

relacionados con la especie, sino con el sexo, la edad, la dieta y el estado sanitario del animal (Fink, 1999).

Un requisito fundamental para evaluar la toxicidad y la carcinogenicidad de AFB₁, es su conversión a uno o más metabolitos (Figura No. 8), en diversos tejidos animales y secundariamente, serían las reacciones de menor importancia (Guzman, 2007).

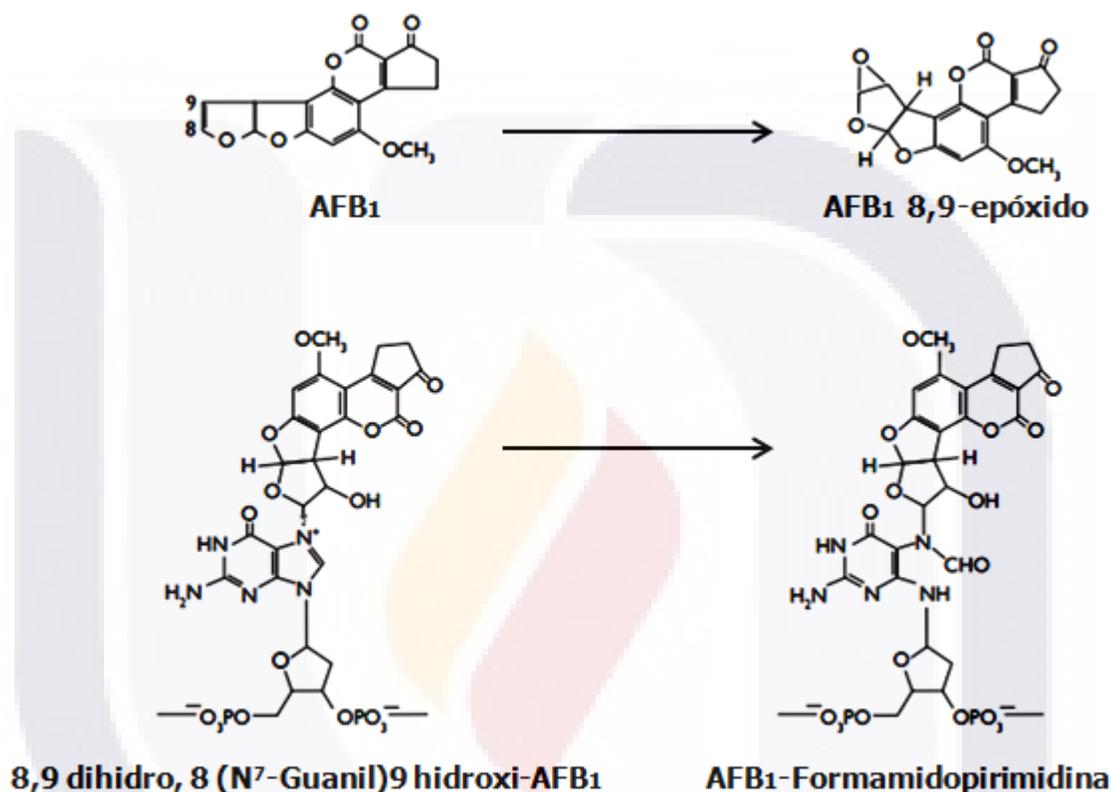


Figura No 8. Estructura de las formas activas de AFB₁. (Guzman, 2007)

La forma pura de AFB₁ no es mutagénica. La primera fase de biotransformación, en el tejido, sucede en el hígado de todos los mamíferos (Valdivia y col., 2012) y se lleva a cabo mediante la acción del complejo enzimático citocromo P-450. El punto clave de la biotransformación de AFB₁ es la bioactivación a epóxido. La AFB₁ 8,9-epóxido es altamente tóxica, mutagénica y carcinogénica. La detoxificación de la AFB₁ epóxido puede ocurrir a través de la conjugación de la glutatión reductasa, reacción catalizada por las Transferasas de Glutatión. En los seres humanos la detoxificación vía GSH-GST, es inferior a la encontrada en otras especies como en la rata, ratón o conejo (Guzmán, 2007. Groos, 2012).

El epóxido viene hidrolizado a AFB₁ 8,9-dihidróxido. Después de la formación de AFB₁ epóxido, pueden formarse dihidrodioles (8,9-dihidro-8,9-dihidroxi, aflatoxina B₁), metabolitos de la AFB₁ que se unen a proteínas celulares mediante la formación de bases de Schiff, induciendo daño celular y eventualmente muerte celular. AFB₁-epóxido puede formar aductos con los residuos de lisina de la albúmina y otras proteínas celulares (Bogantes y col., 2004; Groos, 2012).

Los metabolitos formados por el citocromo P-450: Aflatoxina Q₁, Aflatoxina P₁, Aflatoxina B_{2a}; han mostrado una menor toxicidad y representan los productos de detoxificación. La AFM₁, metabolito hidroxilado de la AFB₁, presenta una toxicidad aguda confrontable con la AFB₁, y crónica a partir del 2-10%; estos metabolitos se distribuyen sistemáticamente y de esta forma, se pueden encontrar en la leche, los huevos y los tejidos del animal intoxicado (Rodríguez, 2007; Groos, 2012).

La AFB₁ es la de mayor preocupación, es la más tóxica y está asociada con el cáncer de hígado, además se presenta hígado graso, pálido, inflamado y friable; la afección de este órgano ocasiona una disminución en la síntesis de enzimas digestivas, por lo que produce un síndrome de mala absorción, que ocasiona una disminución de la ganancia de peso (Groos, 2012).

También se afectan los procesos de coagulación de la sangre y los mecanismos en el transporte de lípidos, por lo que en el examen bioquímico, se puede evidenciar una disminución del valor de la glucosa y un aumento de los lípidos totales, especialmente del colesterol (Rodríguez, 2011).

1.4.7. Mecanismo de acción de la AFB₁

Por su alta liposolubilidad la AFB₁ se absorbe en el tracto gastrointestinal y se biotransforma en el hígado por la acción de enzimas microsomales de la familia del citocromo P-450, las dos enzimas más importantes son representadas por la CYP 3A4 que intervienen en la formación de la forma exo-epóxido y el metabolito AFQ₁ y la CYP 1A2 que forma en su mayoría el endopóxido y la AFM₁ (Guzman de Peña, 2007; Valdivia y col., 2012; Groos, 2012).

La AFB₁ requiere una activación para producir mutaciones, la ruta de activación es la conversión de AFB₁ en el metabolito electrofílico AFB₁-8,9-epóxido. La formación del epóxido requiere la presencia de un doble enlace entre los carbonos C8-C9, por esta razón

las aflatoxinas B₂ y G₂ son prácticamente atóxicas en comparación con las aflatoxinas B₁ y G₁ (Groos, 2012).

La AFM₁, aunque presenta en doble enlace entre los carbonos C8 y C9, es dos órdenes de magnitud menos tóxica que la AFB₁ en cuanto a carcinogenicidad se refiere (Deshpande, 2002; Groos, 2012).

La AFB₁-epóxido presenta dos conformaciones: una endo y una exo. La forma endo posee aproximadamente 500 veces más poder mutagénico que la forma exo. El fenómeno de mutagenicidad (Figura No. 9) puede explicarse mediante la formación de un compuesto estable por la unión covalente en el nitrógeno N-7 de los residuos guanil del DNA (o RNA) mediante la inducción de depurinación y escisión de la hebra lo que puede inducir mutación en células somáticas (Urrego, 2006; Valdivia y col., 2012; Groos, 2012).

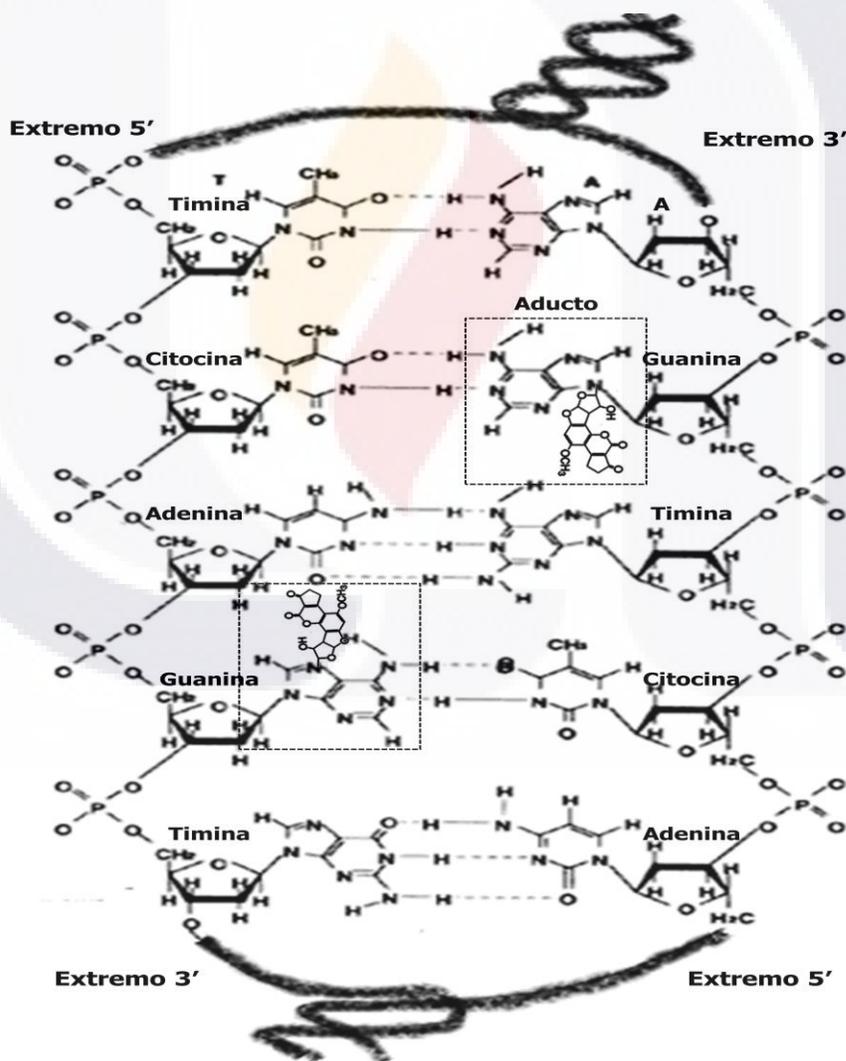


Figura No. 9. Formación de aductos DNA con aflatoxina. (Adaptado de Urrego, 2006)

Estas formaciones de aductos persistentes se llevan a cabo en regiones del DNA, el complejo formado se intercala causando mutación: la guanina sufre transversión a timina; esto ocurre en el codón 249 del gen *p53* (este gen está implicado como punto de chequeo durante la síntesis y reparación del DNA. Si el daño no se repara, esta misma proteína induce apoptosis. La ocurrencia de este tipo de alteración se ha determinado como carcinoma hepatocelular (Urrego, 2006; Groos, 2012).

Después de la formación de AFB₁-epóxido pueden formarse dihidrodioles (8,9-dihidro-8,9-dihidroxi-aflatoxina B₁) metabolitos de la AFB₁ que se unen a proteínas celulares; AFB₁- epóxido también puede formar aductos con los residuos de lisina de la albúmina y otras proteínas celulares. Cerca del 5% de la dosis de AFB₁ se une a la albúmina. (Steyn y Stander, 1999. Groos, 2012).

La AFB₁-epóxido puede también reaccionar con glutatión mediante un mecanismo medido por una glutatión-S-transferasa; esta conjugación de tipo competitivo representa el paso de detoxificación más importante con respecto a otros tipos de biotransformación en la obtención de metabolitos menos tóxicos de AFB₁, incluyendo entre ellos aflatoxicol y otros derivados como la M₁, P₁ y Q (Ross y col, 1992. Groos, 2012).

1.5. MICOTOXICOSIS

El cuadro clínico patológico ocasionado por la intoxicación aguda o crónica que se origina por la exposición a alimentos o piensos contaminados con micotoxinas producidas por hongos toxicogénicos se conoce como micotoxicosis (Agrios, 2006; Valdivia y col., 2012).

Las micotoxicosis pueden presentarse tanto en países industrializados como en países en desarrollo, cuando el medio ambiente social y económico se combina con condiciones meteorológicas (humedad, temperatura) a favor del crecimiento de los hongos (Urreglo y Díaz, 2006; Rai y col., 2012; Cotty, 2014).

Los primeros casos de micotoxicosis conocidos se debieron al centeno contaminado con *Claviceps purpurea* en la edad media. En 1912, en Argentina, se descubrió la acción de un metabolito tóxico de un *Aspergillus* del maíz sobre varias especies animales, lo que constituye la primera observación científica de las micotoxicosis en Sudamérica.

El estudio documentado de las aflatoxinas y la enfermedad causada por estas, comienza en los sesenta cuando se reportó de una epidemia, llamada "X", de pavos y otros animales de corral, matando a más de diez mil animales, la causa de la muerte fue

la presencia de maní brasileño contaminado por aflatoxinas, llamadas así porque son producidas por especies del grupo *Aspergillus flavus* (Carrillo, 2003).

La detección de esporas fúngicas no es suficiente para el diagnóstico, las esporas e incluso el hongo pueden aparecer sin la formación de aflatoxinas. La severidad de los efectos de las micotoxinas depende del tipo de micotoxina, la intensidad de la exposición, la edad, el sexo y de posibles efectos de sinergia con otras sustancias o patologías propias del individuo (Agrios, 2006; Espíndola, 2006; Urrego y Díaz, 2006).

1.5.1. Tipos de Micotoxicosis

1.5.1.1. Micotoxicosis agudas: Se producen cuando se consumen concentraciones de altas a moderadas de micotoxinas y causan manifestaciones específicas tales como síndrome de enfermedad aguda o muerte (Lazo y Sierra, 2008; Upadhaya, 2010; Zaki y col., 2012). **Micotoxicosis crónicas:** Derivadas de la ingesta de niveles de micotoxinas bajos a moderados y son causantes de enfermedades crónicas específicas (Lazo y Sierra, 2008; Upadhaya, 2010; Zaki y col., 2012).

1.5.1.2. Micotoxicosis crónicas: Producidas por la ingesta de concentraciones de micotoxinas muy bajas y suelen causar un aumento de la susceptibilidad a otras enfermedades e infecciones (Placinta y col. 1999; Upadhaya, 2010).

1.5.2. Efectos de las aflatoxinas

La habilidad de las aflatoxinas para inducir la presentación de varios tipos de cáncer en animales domésticos y de experimentación, constituye una preocupación para la salud pública, porque algunas micotoxinas presentan mayor interés por ciertos órganos tales como hígado y riñón así como por el sistema inmune y nervioso (Valdivia y col., 2012).

La Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (International Agency for Research on Cancer, IARC, 2002) clasificó a las aflatoxinas en el grupo 1, como compuestos carcinógenos para humanos y Aflatoxina M₁ en el 2, como compuestos posiblemente carcinogénicos para humanos.

Además de los efectos carcinogénicos, son conocidos los efectos adversos en la salud y en la producción de los animales domésticos (Valdivia y col., 2012), presentándose reducción en la ganancia de peso, efectos adversos en la reproducción, daño al sistema

inmunológico, síntomas severos de intoxicación incluso muerte cuando los niveles tóxicos son demasiado altos (Díaz, 1995; Valdivia y col., 2012).

La Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO), ha estimado que el 25% de la producción mundial de cultivos es afectada por las micotoxinas. Adicional a los efectos adversos de las micotoxinas sobre la salud y la producción de animales, y sobre la salud humana, la contaminación con AF genera pérdidas económicas al productor, distribuidor, procesador y consumidor de alimentos, y ocasiona problemas de comercio internacional de granos y cereales (FAO, 2003).

1.6. MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN PARA AFLATOXINAS EN ALIMENTO

Debido a la gran problemática de la contaminación por AF en ingredientes alimenticios para el ganado lechero, se han desarrollado varios métodos analíticos y entre los que tienen mayor precisión para la identificación de AF en alimentos es la cromatografía en capa fina (TLC), herramienta que puede ser cualitativa o semicuantitativa, estableciéndose como método oficial por parte de la *Association of Analytical Chemistry* (AOAC), entre los métodos más modernos que se han desarrollado esta la cromatografía líquida de alta precisión (HPLC), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), además de las columnas de inmunoafinidad y el ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas) (Requena y col., 2005).

Para la elección de cualquier método analítico se debe tener en cuenta la precisión y la confiabilidad para identificar partículas mínimas del metabolito de interés y la practicidad para su desarrollo (Kralj y Prosen, 2009).

1.6.1. Cromatografía

La cromatografía es un método que permite la separación de compuestos de una mezcla por efectos de retención y desplazamiento, con ayuda de una fase móvil una fase estacionaria; como consecuencia de la distinta movilidad los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas discretas que pueden analizarse cualitativa y/o cuantitativamente (Varga, 2012; Ismail y col., 2010; Rai y col., 2012).

1.6.1.1. Cromatografía en Capa Fina (TLC). Es una técnica relativamente económica con el inconveniente de que no es una técnica muy precisa; por ser una técnica mas cualitativa que cuantitativa se emplea para identificar la presencia de AF en los alimentos con ayuda del RF (factor de resolución), con el inconveniente de que no determina la concentración de AF presente (Rai y col., 2012).

1.6.1.2. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). HPLC es una técnica con especificidad y sensibilidad muy altas para la cuantificación de AF, las muestras que se analizan mediante esta técnica requieren de una purificación exhaustiva y deben ser analizadas una a una (Varga y col. 2012). Este método es el más recomendado para la cuantificación de AF en raciones alimenticias para ganado y esta oficialmente aprobado por la AOAC; tiene el inconveniente de ser un método largo y laborioso por lo que se requiere personal especializado para su desarrollo (Rai y col., 2012).

1.6.2. Ensayo Inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

Actualmente se han desarrollado protocolos para inmunoensayos enzimáticos competitivos, mediante los cuales la detección y cuantificación de micotoxinas ha llegado a los límites de especificidad y sensibilidad deseados. Además la sencillez de manipulación y la posibilidad de trabajar al mismo tiempo un gran número de muestras mediante las microplacas (Jiang y col, 2012).

El fundamento de las técnicas de ELISA aplicadas a la detección de AF se basa en la competencia de las moléculas que eventualmente puede haber en las muestras con las que se añaden de forma controlada y que están marcadas convenientemente, para su unión al anticuerpo: ya que ambas presentan la misma afinidad, cuanto más contaminada está la muestra, mas moléculas "sin marcar" se unirán al anticuerpo (Dorokhin y col. 2011; Jiang y col., 2012).

1.7. NIVELES MÁXIMOS PERMISIBLES DE AFLATOXINAS EN ALIMENTO

La necesidad de establecer una legislación para fijar límites en la concentración de aflatoxinas en alimentos para humanos y animales esta generalmente reconocida en varios países del mundo (FAO, 2003).

Los dos primeros factores proporcionan, respectivamente, la información necesaria para la evaluación de riesgos y para la evaluación de la exposición, ingredientes principales para una evaluación de riesgos. La evaluación de riesgos es la evaluación científica de la probabilidad de que tengan lugar efectos conocidos o potenciales adversos a la salud resultantes de la exposición de los seres humanos a peligros transmitidos por los alimentos y es la base científica primaria para los reglamentos (FAO, 2003).

1.7.1. Legislación de la Unión Europea (UE)

1.7.1.1 Alimentos para animales

- Aflatoxina B₁: Los límites máximos en µg/kg (ppb) se refieren a alimentos con una humedad de 12%.

Todas las materias primas para alimentación animal:	20
Alimento completo para bovinos:	20
Alimento completo para becerro:	10
Alimentos completos para ganado lechero:	5
Otros alimentos complementarios:	5

1.7.1.2. Aflatoxina M₁

- Para leche cruda, leche destinada, leche destinada a la fabricación de productos a base de leche y leche de consumo tratada térmicamente, la concentración máxima permitida de AFM₁ es de: 0.05 µg/Lt o kg (0.05 ppb).
- En el caso de preparados para lactantes, preparados de continuación y alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales dirigidos específicamente a los lactantes, la concentración máxima permitida de AFM₁ es de: 0.025 µg/Lt o kg (0.025 ppb).

1.7.2. Administración de Drogas y Alimentos de los EE.UU. (FDA)

Tabla No. 9. Niveles permitidos para aflatoxinas totales ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en alimentos y piensos, establecidos por la FDA

Micotoxina	Tipo de alimento	Límite máximo ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Aflatoxinas totales	Maíz destinado para engorda de ganado vacuno	300
	Harina de semilla de algodón para el ganado vacuno	300
	Maíz para la cría de ganado vacuno	100
	Maíz y otros ingredientes para el ganado (salvo la harina de semilla de algodón) destinados a animales inmaduros	20
AFM ₁	Maíz, harina de semilla de algodón y otros alimentos para animales productores de leche	20
	Productos lácteos líquidos	0.5

Fuente: US-FDA, 1994.

1.7.3. Norma Oficial Mexicana (NOM-188-SSA1-2002)

La Norma Oficial Mexicana (NOM-188-SSA1-2002) para el control de aflatoxinas en cereales establece un límite máximo permisible de aflatoxinas en los cereales destinados para el consumo humano y animal, así como los lineamientos y requisitos sanitarios para el transporte y almacenamiento de los granos. Esta Norma Oficial Mexicana es de observancia obligatoria en el Territorio Nacional para las personas físicas o morales que se dedican a su proceso o importación.

1.7.3.1. Límites permitidos para consumo animal. Los cereales con una concentración mayor de $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ de aflatoxinas y que se destinen para consumo directo o como parte de alimentos procesados, deberán ajustarse a lo dispuesto en la siguiente tabla (Tabla No.10).

Tabla No. 10. Límites máximos permitidos de AF en alimento para consumo de rumiantes animal por la Norma Oficial Mexicana

Etapas de producción	Límite máximo $\mu\text{g}/\text{kg}$
De engorda en etapa de finalización	300
Maduros destinados a reproducción	100

Fuente: Norma Oficial Mexicana (NOM-188-SSA1-2002)

1.7.4. Comisión del Codex Alimentarius

La Comisión del Codex Alimentarius (CCA), apoyada por la FAO y la OMS, apunta a facilitar el comercio mundial y a proteger la salud de los consumidores mediante el desarrollo de normas internacionales para los alimentos y las raciones. En la actualidad los países miembros del CODEX Alimentario son 168. Dentro de la CCA, el Comité del CODEX para Aditivos Alimentarios y Contaminantes de los Alimentos (CCFAC) establece límites máximos (normas) para los aditivos y los contaminantes en los alimentos los que resultan decisivos en caso de conflictos comerciales. En aflatoxinas totales establece niveles máximos permisibles entre 10 y 15 mg/kg para la mayoría de los ingredientes alimenticios.

El CCFAC desarrolla normas basadas en un procedimiento que sigue, en lo posible, los principios del análisis de riesgos según las reglas y los métodos establecidos en el Manual de Procedimientos del CODEX y en la Norma General del CODEX para Contaminantes y Toxinas en los Alimentos. Los reglamentos vigentes para las AF en los alimentos y las raciones, así como otros en desarrollo, debieran resultar de una intensa cooperación entre las partes interesadas basada en la ciencia, que congregue a los consumidores, a la industria y a los responsables de las políticas. Sólo de esta forma puede alcanzarse una protección realista (FAO, 2003).

1.8. MÉTODOS DE DESTOXIFICACIÓN PARA AFLATOXINAS

Existe un conjunto de tratamientos que se realizan después de la cosecha con el objetivo de eliminar o reducir los efectos tóxicos de las AF en los animales (Charmley y Prelusky, 1999). Estos tratamientos son conocidos como métodos de destoxificación y pueden ser: químicos, físicos y biológicos (Díaz, 2002; Marina y col., 2007).

La eficacia de cada proceso de adsorción se ve influenciada por la estructura química del adsorbente, es decir, la carga total y la distribución de la carga, el tamaño de los poros y la accesibilidad al área de superficie; además de las propiedades de las micotoxinas (Huwig y col., 2001; Kabak, 2010).

Se han establecido muchos métodos para eliminar las aflatoxinas de los alimentos, pero aún no existe un método que haya conseguido una destoxificación completa a gran escala de una forma práctica, económica y que no produzca subproductos peligrosos (Ramos y Hernández, 1997; Queiroz, y col. 2012).

1.8.1. Métodos químicos

Son más que nada productos químicos que se aplican a insumos agrícolas contaminados naturalmente, la mayoría de estos métodos no satisface los criterios de aceptabilidad debido a que disminuyen el valor nutritivo del producto; ejemplos de éstos son los agentes oxidantes, algunos ácidos y álcalis, teniendo como desventaja los costos elevados del producto además de no ser muy eficientes para eliminar micotoxinas. El éxito del proceso de desintoxicación por tratamientos químicos depende del tipo de piensos. (Galvano y col., 2001. Mc Cormick, 2013).

1.8.1.1. Tratamiento con ácidos. Los ácidos son aquellas sustancias que al ser disueltas en agua u otra, producen un incremento en los iones hidrógeno. El tratamiento con ácidos fuertes destruye la actividad biológica de AFB₁ y AFG₁ mediante la conversión a la hemiacetal forma AFB_{2a} y AFG_{2a} respectivamente, con la adición del doble enlace en el anillo difurano por la acción catalizadora del ácido. Tratamiento con HCl (pH 2) han reducido los niveles de AFB₁ por 19,3 % en un plazo de 24 h (Kabak, 2010; Mc Cormick, 2013).

1.8.1.2. Tratamiento con bases. Las bases o álcalis son sustancias que poseen propiedades alcalinas. Entre las bases y otros productos químicos, la amoniación ha demostrado ser un método eficaz para desintoxicar productos agrícolas contaminados con aflatoxinas, destinados a la alimentación del ganado, reduciendo los niveles en más de un 75% (McCormick, 2013).

1.8.1.3. Agentes oxidantes. Son compuestos químicos que ganan electrones de otro compuesto, a este fenómeno de robar electrones se le llama oxidación. Las AF que poseen un doble enlace terminal en el anillo de dihidrofurano (AFB₁, AFG₁ y AFM₁) por lo que son sensibles al ataque de agentes oxidantes como el ozono (McCormick, 2013).

1.8.1.4. Agentes reductores. Son compuestos que seden electrones a un agente oxidante. Se ha demostrado la capacidad del bisulfito de sodio (NaHSO₃) para destruir aflatoxinas, principalmente AFB₁ en el maíz. (Li y Su, 2010).

1.8.1.5. Agentes de cloración. Los agentes clorados son aquellos compuestos químicos orgánicos a los que se le ha sustituido átomos de hidrogeno por átomos de cloro. El cloro a una concentración de gas de 11 mg g⁻¹ logró la degradación de más del 75 % de AFB₁ en harina de productos agrícolas (Li and Su, 2010).

1.8.2. Métodos físicos

Son un conjunto de técnicas y estrategias cuyo objetivo es eliminar la porción contaminada por AF de los insumos agrícolas; sin embargo éstas técnicas resultan ser poco prácticas además de que tienen el inconveniente de disminuir el valor nutritivo de los ingredientes alimenticios. Estas estrategias han sido aplicadas para la inactivación o reducción de las AF en los productos agrícolas que se destinan a la alimentación del ganado lechero (Takayama y col 2005; Kabak, 2010). Entre estas estrategias están los tratamientos térmicos y la irradiación.

1.8.2.1. Tratamiento Térmico. La mayoría de las micotoxinas son resistentes al calor (80 a 121° C), por lo que resulta ser un método poco conveniente; ya que no se observa ninguna reducción en los niveles generales de la toxina. Tiene el gran inconveniente de desnaturalizar las vitaminas y los minerales por que el valor nutritivo de estos productos agrícolas con los que se alimentan las vacas lecheras, se ve disminuido (Sabater y col., 2007; Kabak, 2010).

1.8.2.2. Irradiación. La radiación que implica rayos X, rayos g, haz de electrones, radiación UV y de la energía solar se han aplicado para destruir las AF; ya que se produce una emisión de alta energía capaz de romper la estructura de estas moléculas, aún así los resultados obtenidos por la aplicación de este método no han sido satisfactorios (Gallo y Masoero, 2010. Mc Cormick, 2013).

1.8.3. Métodos biológicos

Un enfoque interesante para la descontaminación de AF en piensos es el uso de alimento funcional que contiene microorganismos benéficos que pueden unirse a las AF en el tracto gastrointestinal (Armando y col., 2012).

La destoxificación se lleva a cabo a través de un microorganismo controlador o la acción de compuestos químicos específicos producidos por el mismo microorganismo, que inhiben el crecimiento del hongo y/o la producción de sus toxinas; como pueden ser bacterias lácticas o levaduras que se utilizan con frecuencia en la fermentación de alimentos (Zinedine, 2007; Mc Cormick, 2013).

La detoxificación de AF por microorganismos ha sido revisada extensivamente y se ha identificado la capacidad que tienen algunas bacterias de degradar esta toxina, tal es el caso de *Flavobacterium aurantiacum* NRRL B -184, según Juan y col. (2010) podría quitar de forma irreversible la AFB₁ a partir de una variedad de productos alimenticios incluyendo leche, aceite, mantequilla de maní, maní y maíz sin dejar subproductos tóxicos, además se ha reportado su capacidad de inhibir la actividad mutagénica de AFB₁ (Kabak, 2010.).

1.8.3.1 *Saccharomyces cerevisiae*. En respuesta a los problemas de micotoxicosis, se ha utilizado el cultivo de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), cuya pared celular tiene propiedades que contribuyen secuestrando la aflatoxina en el alimento (Arrieta y col., 2006). Se ha comprobado que los componentes de la pared celular de la levadura se unen muy fuertemente a diferentes micotoxinas, aunque sus mecanismos aún no se conocen muy bien (Díaz, 2002; Armando y col., 2012).

Según Rojo y col., (2014) Los productos basados en la pared celular de la levadura *S. cerevisiae* proporcionan la síntesis de vitaminas del complejo B, minerales y proteínas; por lo que las cepas de esta levadura son capaces de prevenir las enfermedades infecciosas y mejorar el aprovechamiento de los alimentos.

Algunos de los beneficios asociados con *S. cerevisiae* en el ganado son: incremento de la materia seca, aumento de la producción de leche en el ganado lechero; estos beneficios parecen ser causados por cambios en la fermentación ruminal, en particular por el aumento de la actividad bacteriana, que a su vez lleva a un aumento en la digestibilidad de los forrajes (Díaz, 2002; Dogi y col., 2011. Armando y col., 2012).

S. cerevisiae se ha estado utilizando en la industria de los alimentos de consumo humano y animal, se considera un probiótico (estimula un equilibrio en la microflora intestinal) y adsorbente de micotoxinas, reduce la absorción de las AF a nivel gastrointestinal (Zaghini y col., 2005; Yang y col., 2007; Abousadi y col., 2007; Baurhoo y col., 2009).

La estructura de la pared celular de *S. cerevisiae* contiene varios oligosacáridos, entre los que se encuentran los mananoligosacáridos (MOS), que a su vez están conformados por los mananos y los glucanos, componentes estructurales que representan el 30–40% de la pared celular y determinan las propiedades de la superficie celular (Stanley y col., 2004; Benites y col., 2008; Peralta y col., 2008).

1.8.4. Inhibición de la absorción de aflatoxinas en el tracto gastrointestinal

El enfoque más reciente para la reducción de la exposición a las aflatoxinas ha sido el uso de agentes aglutinantes o secuestrantes, estos son añadidos en la dieta para que secuestran la AF dentro del tracto gastrointestinal de los animales, lo que reduce su biodisponibilidad (Sabater y col., 2007), según Juan-Juan (2010) los complejos formados por la unión AF-secuestrante son inertes e irreversibles, se eliminan por heces y no afectan la salud de los animales.

Esta estrategia ha demostrado reducir la biodisponibilidad de AF y como consecuencia su absorción y el daño a los órganos blanco (hígado y riñón), según Díaz (2002) la adición de agentes secuestrantes en la dieta alimentaria del ganado lechero reduce hasta un 95% los niveles de AF.

Han sido probados diversos adsorbentes entre ellos carbón activado, aluminosilicatos de sodio y calcio hidratado (HSCAS), zeolita, bentonita y ciertas arcillas, que mostraron un buen potencial para su uso en la alimentación animal ayudando a disminuir los casos de micotoxicosis. El mecanismo por el cual estas sustancias actúan es un fenómeno de superficie llamado adsorción, que se ve influenciado por las propiedades de la micotoxina (polaridad, tamaño, forma) y las condiciones de pH del medio (Sabater y col., 2007; Kabak, 2010; Reyes y col. 2014).

Las arcillas son minerales sedimentarios de origen detrítico que poseen una estructura laminar o tubular definida de un tamaño menor a 2 micras, esta arquitectura le confiere características físico-químicas especiales. Éstas son constituyentes esenciales de gran parte de los suelos y sedimentos, debido a que son productos finales de la meteorización de los silicatos; se clasifican según los minerales dominantes de los componentes y su organización dentro de la capa (Sabater y col., 2007; Rojo y col., 2014).

Como consecuencia de esto, las arcillas presentan una gran cantidad de superficie activa con enlaces no saturados por ello pueden interactuar con diversas moléculas, en especial polares. La existencia de cargas en las láminas se compensa con la entrada de cationes débiles en el espacio interlaminar con diferentes grados de hidratación (Sabater y col., 2007; Mc Cormick, 2013).

Los cationes pueden ser intercambiados fácilmente por contacto de la arcilla con una solución saturada de otros cationes, a esta propiedad se le conoce como capacidad de intercambio catiónico y es la base de su capacidad adsorbente.

En la industria de la alimentación animal el uso de arcillas es muy común como agentes adsorbentes de compuestos no deseados, tal es el caso de las AF (Sabater y col., 2007; Li y Su, 2010; Kabak, 2010; Gallo y Masoero, 2010).

El tamaño molecular y las propiedades fisicoquímicas, las propiedades de las AF así como la estructura física del adsorbente incluyendo la distribución de carga total y la carga, el tamaño de los poros, el área de superficie, el pH del medio, el porcentaje de inclusión en la dieta, entre otros factores son importantes para lograr un mayor porcentaje de adsorción (Díaz, 2002; Kabak, 2010; Rojo y col, 2014).

1.8.4.1. Aluminosilicato sódico hidratado de calcio (HSCAS). Son polímeros polares que contienen óxido de aluminio y sílice, son el adsorbente más ampliamente estudiado debido a su alta capacidad de unión de AF. Sin embargo su eficacia contra otras micotoxinas (OTA, toxina T-2, ZEA) es muy baja, además tiene el inconveniente de que se unan a su superficie nutrientes esenciales para el desarrollo y producción animal (Sabater y col., 2007; Rojo y col., 2014).

1.8.4.2. Bentonita. Arcilla cuyas partículas granulosas son muy finas como la montmorillonita, que por su capacidad de intercambio catiónico puede formar geles donde quedan atrapadas las AF. Se ha demostrado la eficacia en la reducción de los efectos tóxicos de la AF mediante la adición de bentonita de sodio en dietas que contienen 0,84 mg kg⁻¹ AFB₁, observándose una mejor ganancia de peso y consumo de alimento diario promedio, pero su concentración de incorporación en la dieta debe ser relativamente alta (alrededor de 10 veces más) que el nivel de AF (Juan-Juan y col., 2010; Rojo y col., 2014).

1.8.4.3. Carbón activado. Es un polvo no soluble resultado de la pirólisis de diferentes tipos de materiales orgánicos, ha demostrado reducir la absorción intestinal de la zearalenona hasta un 32 %, en cuanto a la reducción de la AFB₁ de los piensos y la eliminación de AFM₁ en la leche se ha logrado observar una reducción del 22 hasta el 45% (Gallo y Masoero, 2010). El alto costo y la tendencia a ennegrecer el medio ambiente, los animales y el alimento restringen su uso en los piensos. Además no se sabe si el uso a largo plazo puede conducir a la deficiencia de nutrientes esenciales como vitaminas y minerales en los animales domésticos (Quang y col., 2008).

1.8.4.4. Zeolitas: Del grupo de los tectosilicatos, son arcillas con una estructura tridimensional con características básicas, formadas por tetraedros de óxido de silicio (SiO₄) y de aluminio (AlO₄) entre los cuales se intercalan otros iones como aluminio (Al⁺), calcio (Ca⁻) y sodio (Na⁺) lo que hace que posea una mayor capacidad de adsorción, ya que estos iones producen una expansión de la molécula incrementando los puntos de enlace y el área de contacto (Dakovic y col., 2005). La clinoptilolita (1,5%), ha demostrado reducir efectos adversos de las AF (2,5 mg/kg) sobre el rendimiento de pollos de engorda pero no ha mostrado capacidad para secuestrar micotoxinas producidas por *Fusarium* (Gallo y Masoero, 2010; Kabak, 2010).

Existen en el mercado variedad de productos adsorbentes usados en las explotaciones lecheras para reducir los efectos en la salud y en la productividad animal causados por la ingestión de AF. En la tabla No. 11 se enumeran algunos de los productos comerciales que se usan en el sector agropecuario como adsorbentes para AF.

Tabla No 11. Productos comerciales empleados como adsorbentes para micotoxinas

Nombre comercial	Principio activo	Espectro de acción
Aquacarb™ 207EA	Carbón activado	AFB ₁
Astra Ben 20®	Bentonita de sodio	AFB ₁ , AFM ₁
Atox®	Combinación de esmectita y sepiolita	AFB ₁
Calibrin-A	Montmorillonita altamente refinada	AFB ₁
Championite®	Bentonita de sodio	AFB ₁
Duotek®	Organoaluminosilicato	ZEA, OTA, FUM B ₁ , T-2, AFB ₁
Fixat®	Aluminosilicato	AFB ₁
Flow Guard®	Bentonita de sodio	AFB ₁ , AFM ₁
Mexsil®	Aluminosilicato hidratado de calcio y sodio	AFB ₁
Milbond-TX®	HSCAS	AFB ₁₃
Myco-Ad®	Combinación de dos HSCAS y mezcla de illita y cloritas	AFB ₁ , T-2, OTA
Mycosil®	HSCAS	AFB ₁
Mycifix plus	Levadura de <i>T. mycotoxinivorans</i>	AFB ₁ , ZEA, DON, NIV, DAS, T-2, OTA
Mycosorb™	Glucomannanos esterificados (EGM) extraídos de la levadura <i>S. cerevisiae</i> (cepa 1026).	AFB ₁ , ZEA, DON, NIV, T-2
Nuchar® SA-20	Carbón activado	AFB ₁ , AFM ₁
Red Crown®	Bentonita de calcio	AFB ₁ , AFM ₁
Sintox®	Aluminosilicato de calcio y sodio	AFB ₁ , T-2, DON, ZEA, OTA
Toxinor®	Combinación de montmorillonita, sepolita y diatomita	AFB ₁ , ZEA, OTA, FUM, DON, T-2
Zeolex extra®	Aluminosilicato de calcio y sodio hidratado y activado químicamente	AFB ₁ , OTA, T-2, FUM B ₁ , ZEA
Zeotek®	Organoaluminosilicato	AFB ₁ , ZEA, OTA, VOM, FUM, T-2, CIT

Adaptado de Tapia y col. (2010)

En la producción lechera, la contaminación de los ingredientes de la dieta de las vacas lecheras continúa siendo un problema muy difícil de resolver completamente. Por esa razón los productos secuestrantes han tenido un uso muy amplio; sin embargo, hasta ahora ninguno de estos productos ha demostrado poseer una capacidad de adsorción para todas las micotoxinas, para todos los posibles niveles de contaminación, ni para todas las condiciones productivas; por lo que es necesario implementar estrategias más elaboradas para el control de la contaminación por AF en los productos forrajeros destinados a la alimentación del ganado lechero.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS

La concentración de aflatoxinas en la dieta de vacas lecheras se ve influenciada por la presencia de cepas toxicogénicas de *Aspergillus spp.*, por condiciones ambientales y por la eficacia de un programa de control de la contaminación con aflatoxinas.

2.2. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la eficacia de un programa para el control de la contaminación por aflatoxinas en la dieta de vacas lecheras de establos del Altiplano Central Mexicano.

2.2.1 Objetivos específicos

2.2.1.1. Evaluar la evolución temporal de la contaminación de ingredientes alimenticios con aflatoxinas.

2.2.1.2. Aislar, identificar y caracterizar la capacidad toxicogénica de *Aspergillus spp.*, presentes en los ingredientes de la dieta que consumen vacas lecheras.

2.2.1.3. Evaluar la eficacia de un programa de control de la contaminación con aflatoxinas en dietas de vacas lecheras, teniendo en cuenta el manejo de la dieta y el uso de compuestos con capacidad secuestrante.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Se realizó un estudio descriptivo, longitudinal y no experimental para evaluar la eficacia de un programa de control de aflatoxinas en dos unidades de producción lechera del altiplano central mexicano; las acciones del programa de control se analizaron separadamente como sigue: preparación de ingredientes, almacenamiento de materias primas y adición de compuestos con capacidad secuestrante de aflatoxinas; la eficacia de estas acciones se valoró mediante la cuantificación de la concentración de AF en ensilaje listo para ser consumido, en alimento concentrado (incluyendo todos sus componentes) así como en la ración total mezclada.

Para lo anterior, se llevaron a cabo muestreos mensuales durante 29 meses (mayo 2012-septiembre 2014); las muestras de alimento concentrado se colectaron en el almacén, el ensilaje de maíz se recolectó directamente en la superficie de corte del silo y de la ración total mezclada en el pesebre de cada lote de producción; además, durante los últimos 12 meses se realizaron muestreos quincenales de leche cruda por lote de producción y directamente del tanque enfriador. Se obtuvo un total de 266 muestras de alimento y 216 de leche, las cuales se procesaron en las instalaciones del Centro de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

Se cuantificaron AF totales y AFM₁ mediante el uso de kits comerciales de ELISA. Las muestras de productos agrícolas destinados a la alimentación del ganado bovino productor de leche que excedieron los límites máximos de detección por el kit de ELISA (1.7-45 µg/kg) fueron procesadas con un sistema cromatográfico de HPLC. Los resultados de HPLC fueron considerados definitivos.

Se aislaron hongos del género *Aspergillus* con la técnica de vaciado en placa por diluciones y se identificaron sus características morfológicas preparando tinciones con azul de lactofenol y se detallaron las diferencias morfológicas con la técnica de microscopía electrónica de barrido. La capacidad aflatoxicogénica de los aislados de *Aspergillus* se caracterizó mediante la técnica de TLC.

La información con respecto a las variables climatológicas (temperatura, humedad relativa y precipitación pluvial) se obtuvo apartir de las bases de datos emitidas

por la red de estaciones meteorológicas del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP, <http://clima.inifap.gob.mx>).

3.2. UBICACIÓN GEOGRÁFICA DEL LUGAR DE ESTUDIO

Este trabajo se realizó en dos unidades de producción lechera (UPL) del Altiplano Central Mexicano. El Altiplano Central Mexicano es una región natural de México que se extiende hasta el eje neovolcánico del sur, sus límites oriente y poniente son señalados por la sierra madre oriental y la sierra madre occidental.

Abarca parte o la totalidad del territorio de los estados de Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Durango, Zacatecas, San Luis Potosí, Aguascalientes, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo México, Tlaxcala Puebla, Jalisco, Michoacán, y el Distrito Federal (Figura No. 10) (Rodríguez y Pérez, 2009).

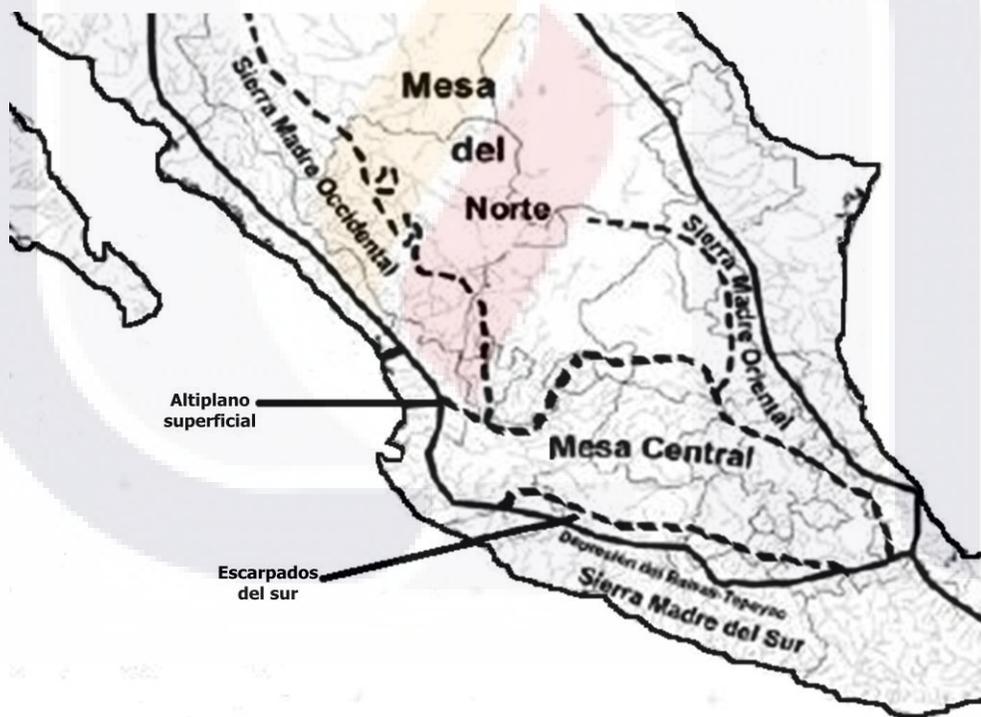


Figura No. 10 Altiplano Central Mexicano (Rodríguez y Pérez. 2009)

La meseta del Altiplano Central Mexicano alcanza su máxima altitud en la parte sur con niveles mayores a 2300msnm, a medida que se avanza hacia el norte la altitud disminuye. Los climas que comparte son: templado seco y semicálido semiseco, con lluvias

en verano, una temperatura promedio de 18.4 °C y una precipitación pluvial anual de 518.4 mm (Rodríguez y Pérez, 2009. INEGI 2006).

3.3. CARACTERÍSTICAS DE LAS UNIDADES DE PRODUCCIÓN LECHERA

Con el método no probabilístico por conveniencia se seleccionaron dos unidades de producción lechera (UPL-A y UPL-B) que se organizan en sitios de producción. Se asignó la letra "A" a la unidad de producción lechera que inicialmente no añadía secuestrante en la ración total mezclada; esta UPL-A inició noviembre 2013 la adición de secuestrante a la RTM como medida de control para reducir la contaminación con AF en ingredientes alimenticios vacas lecheras y la letra "B" a la unidad de producción lechera que desde el inicio del estudio añade secuestrante a la ración total mezclada, (Figura No 11).

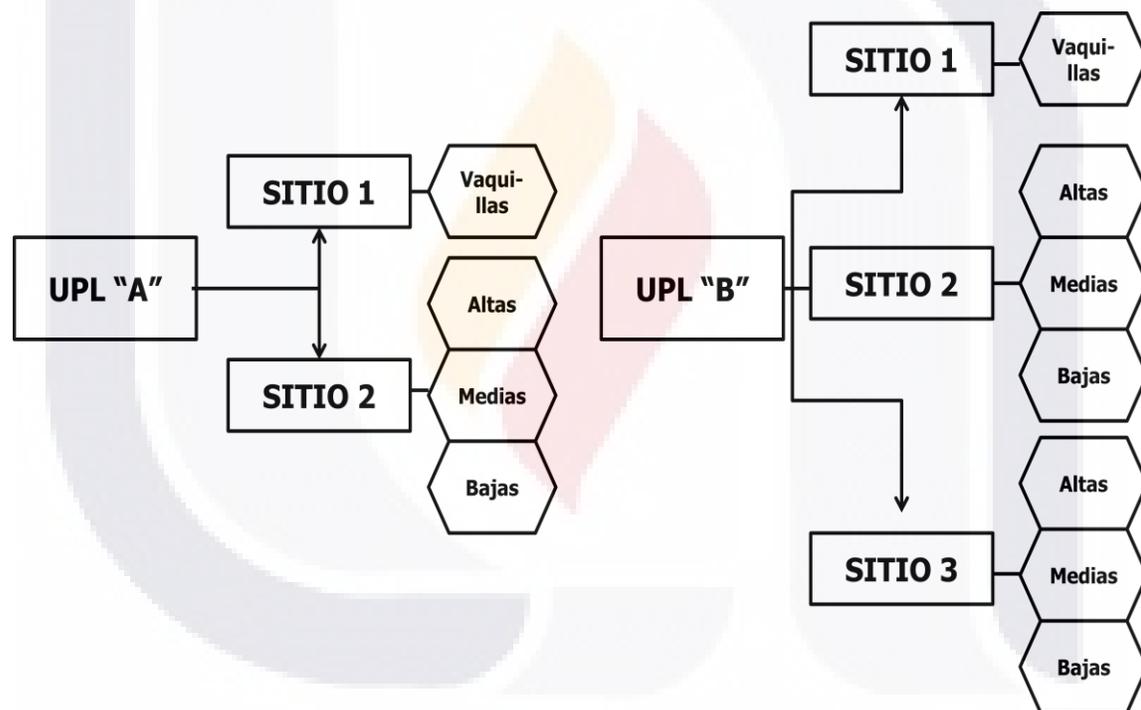


Figura No.11. Organización de las Unidades de Producción Lechera (UPL)

3.3.1. Unidad de producción lechera "A" (UPL-A)

Se organiza en sitios de producción. El sitio A-1 está ubicado en san José del Bajío, perteneciente al municipio de Encarnación de Díaz en Jalisco, a una latitud de 21.6833, una longitud de -102.117 y una altitud de 1960 msnm. Las vaquillas están en este sitio hasta los 5 meses de gestación, la alimentación es a base de forrajes y se mantienen en corrales (estabulación). El sitio A-2 está ubicado en Matamoros, Aguascalientes, a una

altitud de 1990 msnm, donde se tiene una organización por lotes de producción: altas, medias y bajas. Tiene ganado especializado en la producción de leche de la raza Holstein, además de que posee tecnología especializada y predomina el manejo de los animales en corrales (estabulado). Las dietas alimenticias (Tabla No. 12) son elaboradas por el nutriólogo de la UPL. El proceso de ordeña se realiza con equipo automatizado y la sala de ordeña en paralelo tiene capacidad para 40 vacas.

Tabla No 12. Composición de la dieta para las vacas lecheras del Sitio A-2

Ingrediente	Cantidad (kg/vaca/día)			
	Altas	Medias	Bajas	Secas
Ensilaje de Alfalfa	0.0	0.0	12	0.0
Avena Henificada	1.50	1.50	2	1.50
Alfalfa Henificada	4.5	4.5	1	1
Salvado de Maíz	0.0	0.50	0.60	0.0
Ensilaje de Maíz	20	18	0.0	14
Semilla de Algodón	1.5	1	0.0	0.0
Maíz Rolado	4.3	3.5	2.6	0.0
Núcleo (*)	0.400	0.350	0.300	0.0
Pasta de soya	0.900	0.500	0.0	0.0
Bicarbonato	0.100	0.100	0.100	0.0
Procreatin	0.007	0.007	0.007	0.0
Galleta	1.300	1	1.500	0.0
Reto vacas y vaquillas	0.0	0.0	0.0	3.5
Triticale	0.0	0.0	0.0	15
Ración Total	34.587	31.037	20.187	35.02

* Previtep MR

Esta UPL tiene una población promedio de 1508 vacas en producción, una producción promedio de 43 845 litros de leche por día y en promedio cada vaca produce alrededor de 29 litros de leche al día (Tabla No 13). La producción láctea se destina a las principales plantas procesadoras y transformadoras de la región. Los problemas reproductivos son la causa más frecuente de desecho.

Tabla No 13. Población animal y producción láctea en la unidad de producción lechera A

Sitio A-2	Altas	Medias	Bajas	Total
Nº de Vacas	900	550	300	1,750
Producción diaria (L)	32,850	15,730	2,580	51,160
Promedio (L/vaca/día)	36.5	28.6	8.6	29.2

3.3.2. Unidad de producción lechera "B" (UPL-B)

Se organiza en 3 sitios de producción. El sitio B-1 está ubicado en el km 1 de la carretera a Betulia, en el municipio de Lagos de Moreno en Jalisco, a una altitud de 1995 msnm, aquí se tienen a las vaquillas hasta los 5 a 6 meses de gestación, su alimentación es principalmente a base de forrajes con una proporción menor de concentrado (Tabla No 14), los animales se encuentran en estabulación libre (confinados) y cambian de corral conforme avanza su gestación.

Tabla No 14. Formulación de las dietas proporcionadas a las vaquillas en el sitio B-1.

Ingrediente	Cantidad (kg/vaquilla/d)
Ensilaje de maíz	9.2
Triticale	16.5
Avena seca	0.8
Forraje de sorgo	0.4
Secuestrante (*)	0.02
Ración total	26.92

*Mycoad ZT MR.

El sitio 2 de producción se ubica en Lagos de Moreno, Jalisco sobre el km 35 de la carretera Aguascalientes-San Luis Potosí: latitud 21.7887, longitud -102.0048, altitud 1900 msnm; cuenta ganado Holstein especializado en la producción de leche, se organiza en lotes productivos: bajas, medias y altas, según la cantidad de leche que producen al día. La alimentación es proporcional entre ensilaje de maíz y alimento concentrado (Tabla No 15), las dietas son formuladas por el nutriólogo que brinda servicio externo en la UPL. Los problemas reproductivos son los que se presentan con mayor frecuencia, seguidos de problemas con micotoxinas.

Tabla No. 15. Formulación de la dieta alimenticia para las vacas lecheras en los sitios B-2 y B-3

Ingrediente	Cantidad (kg/vaca/día)			
	Altas	Medias	Bajas	Secas
SITIO B-2				
Ensilaje de maíz	23	14	20	20
Ensilaje de alfalfa	6	0.0	8	0.0
Ensilaje de triticale	3	2	8	7
Alfalfa henificada	2	3.6	1.80	0.0
Triticale heno	0.0	0.15	0.0	2
Maíz rolado	6.4	6.3	2.4	0.0
Grano seco de maíz	1.70	1.70	0.0	0.0
Grano de maíz seco destileria	0.0	0.0	1.00	0.0
Semilla de algodón	1.70	1.70	0.0	0.0
Px ordeña	0.33	0.33	0.20	0.0
Soya plus	1	1	0.0	0.0
Pasta de soya	2.6	2.6	3	0.0
Booster secas	0.0	0.0	0.0	2
Ración total	48.156	33.38	44.22	31
SITIO B-3				
Ensilaje de maíz	21	14.04	21	12
Ensilaje de triticale	2.025	0.280	10	20
Ensilaje de alfalfa	6.51	0.0	5	0.0
Alfalfa henificada	0.847	3.6	2	0.0
Ensilaje rye grass	10.43	0.0	0.0	0.0
Maíz rolado	5.7	3	2	0.0
Canola	1.05	1	1.62	0.0
Soya	3.72	3.6	1.656	0.0
Minerales	0.246	0.24	0.175	0.02
Semilla de algodón	0.993	0.96	0.0	0.0
Grano de maíz seco dest.	0.993	0.80	0.0	0.0
Booster	0.0	0.0	0.0	0.600
Avena seca	0.0	0.0	0.0	1.333
Ración total	55.129	27.519	43.451	33.978

Tiene una población de alrededor de 600 vacas en producción, el proceso de ordeña es automatizado y cuenta con una sala de ordeña tipo espina de pescado con capacidad para 16 vacas, la producción promedio es de 30 litros de leche por vaca al día (Tabla No. 16) y es destinada a su procesamiento por una comercializadora local.

Tabla No. 16. Población animal y producción láctea de los sitios B-2 Y B-3

Sitio		Altas	Medias	Bajas	Total
Sitio B2					
	Nº de Vacas	445	30	20	495
	Producción diaria (L)	10,929	614	284	11,827
	Promedio (L/vaca día)	24.56	20.46	14.2	23.89
Sitio B3					
	Nº de Vacas	410	26	68	504
	Producción diaria (L)	12,710	520	1,088	14,318
	Promedio (L/vaca día)	31	20	16	28.4

El sitio B-3 de producción se localiza a 1 km de la comunidad de San Luis Gonzaga, Lagos de Moreno en Jalisco, a una altitud de 2015 msnm. La alimentación de las vacas es proporcional entre ensilaje de maíz y alimento concentrado (Tabla No. 15), adiciona secuestrante a la ración total mezclada. Con una población promedio de 620 vacas en producción, que se encuentran en estabulación libre (confinamiento), cuenta con alta tecnología y un sistema automatizado de ordeño, con un equipo de ordeña de tipo espina de pescado con capacidad para 30 vacas. Mantiene una producción promedio de 28.4 litros (Tabla No. 16) por vaca al día la producción es destinada a una empresa transformadora y comercializadora regional.

3.4. OBTENCIÓN DE MUESTRAS

3.4.1. Muestreo del ensilaje de maíz

Con referencia a la técnica de "M" o zig-zag se tomaron cinco porciones de un kg de ensilaje de maíz, se depositaron en una bolsa de plástico, se homogeneizaron y se obtuvo una muestra compuesta homogénea de cinco kg, de esta muestra compuesta se tomó un kg para la cuantificación de AF totales y la identificación de hongos del género *Aspergillus*. (Figura No.12).

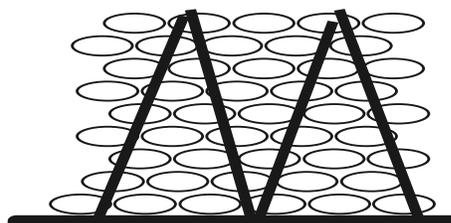


Figura No. 12. Técnica de "M" para muestreo de alimento. (NOM-188-SSA1-2002)

3.4.2. Muestreo del alimento concentrado

Con base a la técnica descrita por la Norma Oficial Mexicana (NOM-188-SSA1-2002, figura No 12) para muestras de alimento, se tomó un kg de los elemento que integran el concentrado en la dieta de las vacas lecheras, se depositaron en una bolsa de plástico y se mezclaron para obtener una muestra representativa y homogénea de cinco kg, de esta muestra se tomó un kg para la determinación de aflatoxinas totales y la identificación de hongos del género *Aspergillus*. (Figura No 17). El ensilaje de otros forrajes incluidos en menor proporción en la dieta, como triticale, rye grass y alfalfa, se tomaron como un ingrediente del concentrado, por lo que la evaluación de la contaminación por AF en estos ingredientes, se reportó dentro de los valores del concentrado.

3.4.3. Muestreo de la ración total mezclada (RTM)

Dibujando imaginariamente una "M" sobre el pesebre como lo describe la Norma Oficial Mexicana (NOM-188-SSA1-2002, figura No 12) se identificaron los cinco puntos de donde se tomó la muestra de un kg, los cinco kg se pusieron en una bolsa de plástico y se mezclaron de tal forma que se obtuvo una muestra representativa y homogénea, se tomó un kg de esta muestra para la cuantificación de AF totales y la identificación de hongos del género *Aspergillus*.

3.4.4. Muestreo de leche cruda

Durante el último año del periodo de observación se llevaron a cabo muestreos quincenales de leche cruda en las dos UPL para la detección de AFM₁. El muestreo se realizó al azar durante la rutina de ordeño recolectando 25 ml de leche por cada lote productivo (altas, medias y bajas) en frascos previamente identificados; se obtuvieron 216 muestras que se transportaron en refrigeración y se conservaron en congelación a -20°C hasta su procesamiento.

3.4.5. Manejo de muestras

Para su análisis las muestras de ensilaje de maíz, alimento concentrado y ración total mezclada se procesaron en las instalaciones del Centro de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

Se secaron en una estufa de alta temperatura con circulación forzada de aire (OF-22G JEOI-TECH, Lab Companion, Corea) a 60°C durante 24 horas y se molieron en un molino universal de funcionamiento continuo (MF series 10 Basic, IKA®-Werke, Alemania) hasta obtener un tamaño de partícula de entre 500 y 800 μ .

Las muestras secas y molidas se almacenaron en refrigeración dentro de bolsas con cierre hermético, se identificaron con la fecha de muestreo, la UPL de donde se obtuvo, el tipo de muestra (ensilaje de maíz, concentrado o ración total mezclada) y un número consecutivo indicando el orden en el que se fueron realizando los muestreos. Los datos se vaciaron en una hoja electrónica de cálculo usando el software Microsoft Excel 2007.

3.5. CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS

3.5.1. Cuantificación de aflatoxinas totales por ELISA

La cuantificación de AF totales en las muestras de alimento se realizó con un kit comercial de ELISA competitivo con un nivel mínimo de detección de 1.7 μ g/kg y un nivel máximo de detección de 45.00 μ g/kg (RIDASCREEN FAST® aflatoxin R-5202, R-Biopharm, Alemania). La extracción de aflatoxinas se hizo con metanol al 70% y cada muestra se depositó por duplicado en los pocillos de la placa y se leyó la absorbancia de las muestras en un lector de microplacas Biotek a 450 nm (ELx800™, Bio Tek, EUA) (Anexo C).

3.5.2. Cuantificación de AFB₁ por HPLC

Las muestras cuantificadas por ELISA que sobrepasaron los límites máximos de detección por el kit aún realizando una dilución seriada (1:1), se cuantificaron con la técnica de HPLC, bajo el método 990.33 establecido por la Association of Official Agricultural Chemistral (AOAC, 1995). Las muestras se purificaron con metanol grado HPLC y se inyectaron en el equipo para HPLC Perkin Elmer Series 2000 (EUA) y los cromatogramas se visualizaron con el software Total chrom Workstation versión 6.2.0.0.1 (Anexo D).

3.5.3. Cuantificación de AFM₁ por ELISA

La cuantificación de AFM₁ en leche cruda se realizó con un kit comercial de ELISA competitivo con un nivel mínimo de detección de 0.005 μ g/L y un nivel máximo de

detección de 0.08 µg/L (RIDASCREEN FAST® aflatoxin M₁ R-1121, R-Biopharm, Alemania). Para su análisis las muestras se homogeneizaron, centrifugaron y desgrasaron; posteriormente se depositaron en la placa y se realizó el procedimiento correspondiente (Anexo E). Se leyó la absorbancia de los estándares y las muestras en un lector de microplacas Biotek a 450 nm (ELx800™, Bio Tek, EUA).

3.5.4. Extracción e identificación de aflatoxinas por TLC en aislados de *Aspergillus spp.*

La extracción de AF se realizó agregando metanol:agua (80:20) a los cultivos previamente triturados y se siguió el procedimiento descrito por la AOAC 972.26, donde se usó como fase estacionaria las placas de sílica gel. Las placas con el estándar (AFB₁) y las muestras se colocaron en una cámara cromatográfica con fase móvil cloroformo:acetona:isopropanol (85:10:5) y se dejó correr la fase móvil durante una hora y media y se visualizó en un transiluminador (Anexo F).

3.6. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS DEL GÉNERO ASPERGILLUS

3.6.1. Técnica de vaciado en placa por dilución

A las muestras molidas se les agregó peptona de caseína estéril al 0.1%, se prepararon cuatro diluciones por cada muestra (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4}), se sembraron en agar papa dextrosa y se incubaron a 27-30°C durante 5 a 7 días (Anexo G).

3.6.2. Tinción con azul de lactofenol

Para la identificación de los hongos *Aspergillus*, se prepararon laminillas con la técnica de tinción con azul de lactofenol, se tomó un trozo de la colonia de interés y se fijó con el lactofenol sobre un portaobjetos estéril. Se observó al microscopio óptico (Carl Zeiss, Axiostar plus, EUA) a diferentes magnificaciones (Anexo H).

3.6.3. Técnica de microscopia electrónica de barrido

Se agruparon los aislados que presentaron similitud en la morfología de la colonia, de cada grupo se eligió un ejemplar para trabajarlo con SEM. Las muestras se fijaron con glutaraldehído al 2% y se deshidrataron con alcoholes graduales, se sometieron a punto

crítico de secado en un aparato Samdri 795, Tousumis Research (Rockville, Meryland) y se montaron en un metalizador DESK II, DENTON VACUUM, EUA y se realizó la digitalización con un microscopio electrónico de barrido (JSM-5900 LV, JOEL, EUA; Anexo I).

3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS

3.7.1. Análisis de Varianza

Se realizó el análisis de varianza para determinar si hubo o no diferencias estadísticas significativas entre las medias de concentración de AF entre las dos UPL participantes (A y B), entre los ingredientes alimenticios de la misma UPL o entre los meses del año; con intervalos de confianza del 95% con un valor P de 0.05 para los ingredientes alimenticios y de 0.01 para la RTM. La prueba protegida de Fisher se realizó cuando se obtuvo significancia en el ANDEVA entonces se aplicó el método de rango de amplitud múltiple de Duncan se realizó para determinar entre que variables existieron diferencias con un nivel de confianza menor o igual a 0.05. Se empleó el software de *Statistical Analysis System* (1999).

3.7.2. Modelo Lineal Generalizado con efecto anidado

Para determinar la posible influencia de las variables climáticas (Temperatura ambiental, humedad relativa y precipitación pluvial) sobre la concentración de AF se realizó el análisis de modelos lineales generalizados con efecto anidado; donde el valor de R^2 determinó el mejor modelo que explica la influencia de las variables sobre la concentración promedio de AF durante el periodo de observación; con intervalos de confianza del 99% y un valor P de 0.01.

3.7.3. Correlación

El procedimiento de correlaciones se efectuó para determinar la posible asociación entre la presencia de hongos *Aspergillus* y la presencia de AF en los ingredientes alimenticios y la RTM de las UPL; se realizó el procedimiento de comparación múltiple de Bonferroni con intervalos de confianza del 95% y un valor P de 0.05; este procedimiento está diseñado para permitir la estimación de cualquier número de contrastes entre los datos seleccionados.

4. RESULTADOS

4.1. CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS

4.1.1. Aflatoxinas detectadas en los ingredientes de la dieta

Durante los 29 meses de duración del estudio, en la UPL-A se detectaron niveles promedio similares de AF en el ensilaje de maíz y el alimento concentrado de (18.3 ± 4.6 y 18.1 ± 3.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente). Sin embargo, en la UPL-B se encontró un comportamiento diferente de la contaminación en los ingredientes de la dieta, especialmente en el ensilaje de maíz se detectaron niveles significativamente mayores (20.6 ± 2.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$) que en el alimento concentrado, el cual mostró una contaminación promedio menor (10.4 ± 1.82 $\mu\text{g}/\text{kg}$; figura 13).

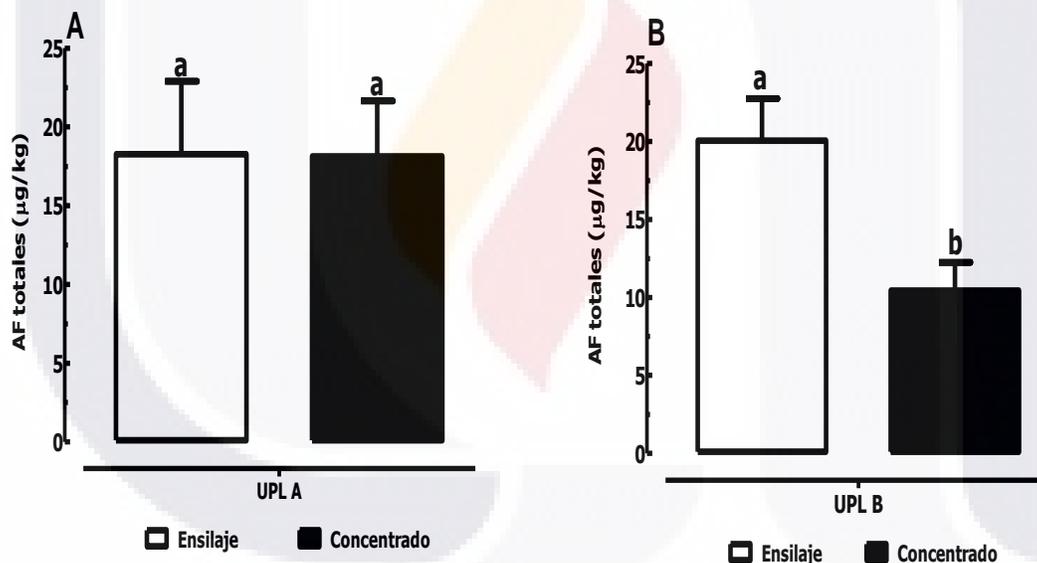


Figura No. 13. Concentración de AF en el ensilaje de maíz y el alimento concentrado en las unidades de producción lechera participantes en el estudio (Panel A: UPL-A y Panel B: UPL-B).^{a-b} Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) entre los promedios de AF en los ingredientes de la dieta

Los problemas de contaminación por AF en los ingredientes fueron más intensos en algunos periodos, especialmente a final del otoño e inicio del invierno (Figura No. 14), lo cual coincidió con las épocas secas del periodo de observación. Con respecto a la contaminación de los ingredientes de la UPL-B, fue evidente un aumento en la

contaminación por AF hacia el verano de 2013, época en la que se observaron las concentraciones más altas.

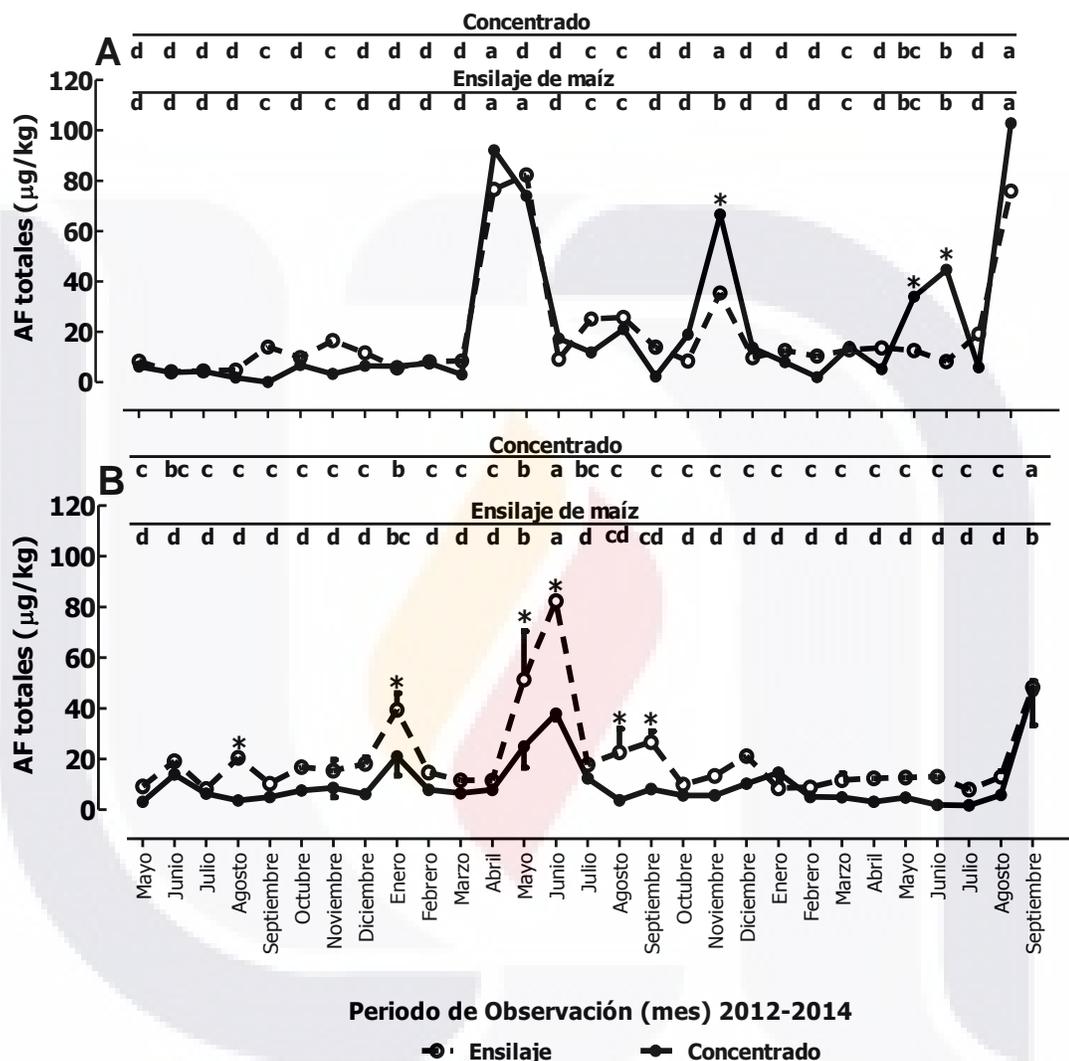


Figura No 14. Evolución de la contaminación por AF en ensilaje de maíz y concentrado en las unidades de producción lechera participantes en el estudio (Panel A: UPL-A y Panel B: UPL-B). Letras diferentes (a-b) indican diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) entre los promedios mensuales de AF dentro de cada uno de los ingredientes de la dieta (prueba de rango de amplitud múltiple de Duncan). Los asteriscos (*) indican diferencias estadísticas significativas entre la concentración promedio de AF entre ensilaje de maíz de maíz y concentrado en el mismo mes de observación

4.1.2. Aflatoxinas detectadas en la ración total mezclada

En la figura No. 15 se muestra la diferencia estadística significativa ($p < 0.01$) entre la concentración de AF detectada en los ingredientes de la dieta de las dos UPL participantes (A: 43.4 ± 5.1 ; B: 30.9 ± 2.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$) y en ración total mezclada (A: 15.0 ± 1.60 ; B: 13.4 ± 1.31 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Se observó una diferencia significativa entre la concentración de AF de la RTM y los ingredientes tanto en la UPL-A como en la UPL-B, indicando una reducción del 65.4 y 43.3 % respectivamente ($p < 0.01$).

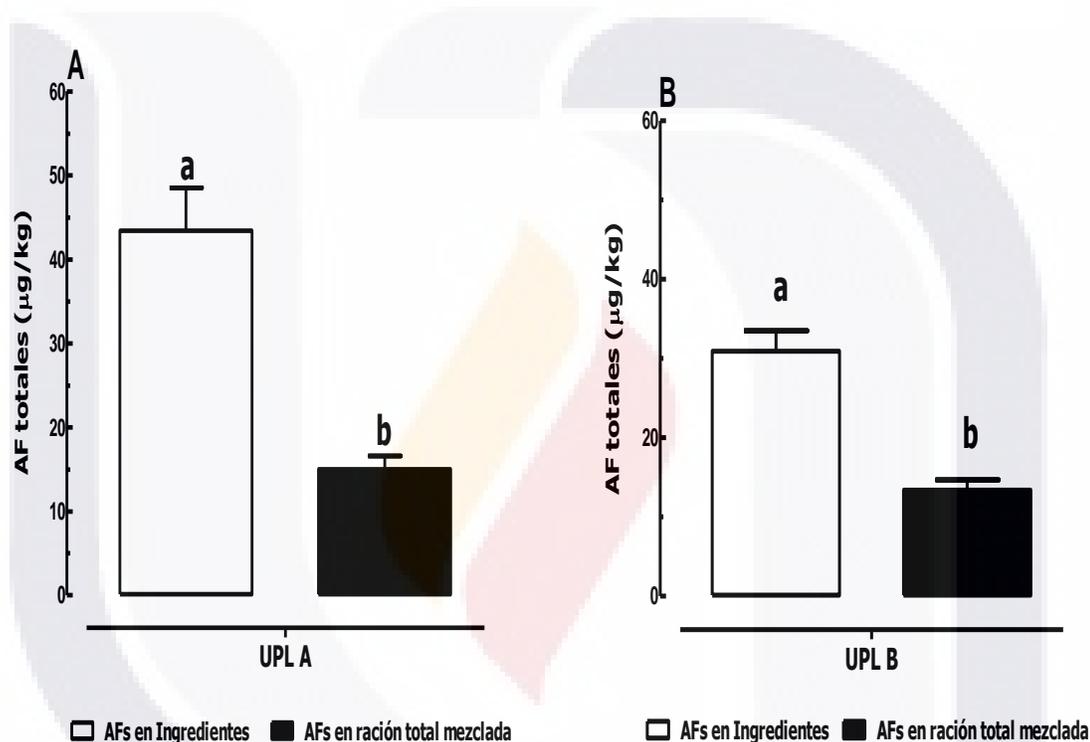


Figura No. 15. Concentración promedio de AF en los ingredientes y la ración total mezclada de la dieta de las vacas lecheras de las unidades de producción lechera (UPL) participantes. Letras diferentes (a-b) indican diferencias estadísticas significativas ($P < 0.01$) en la concentración de AF dentro de la misma UPL

En la UPL B se añadió secuestrante a la RTM durante todo el periodo de observación, mientras que en la UPL-A solamente se agregó el secuestrante a la RTM hasta notar en abril 2013 un incremento de AF en los ingredientes (Figura No. 16, panel A). Los niveles más altos de contaminación por AF en los ingredientes empleados en la UPL-B se detectaron en el verano de 2013; sin embargo, en la RTM no se detectó un incremento significativo durante este periodo.

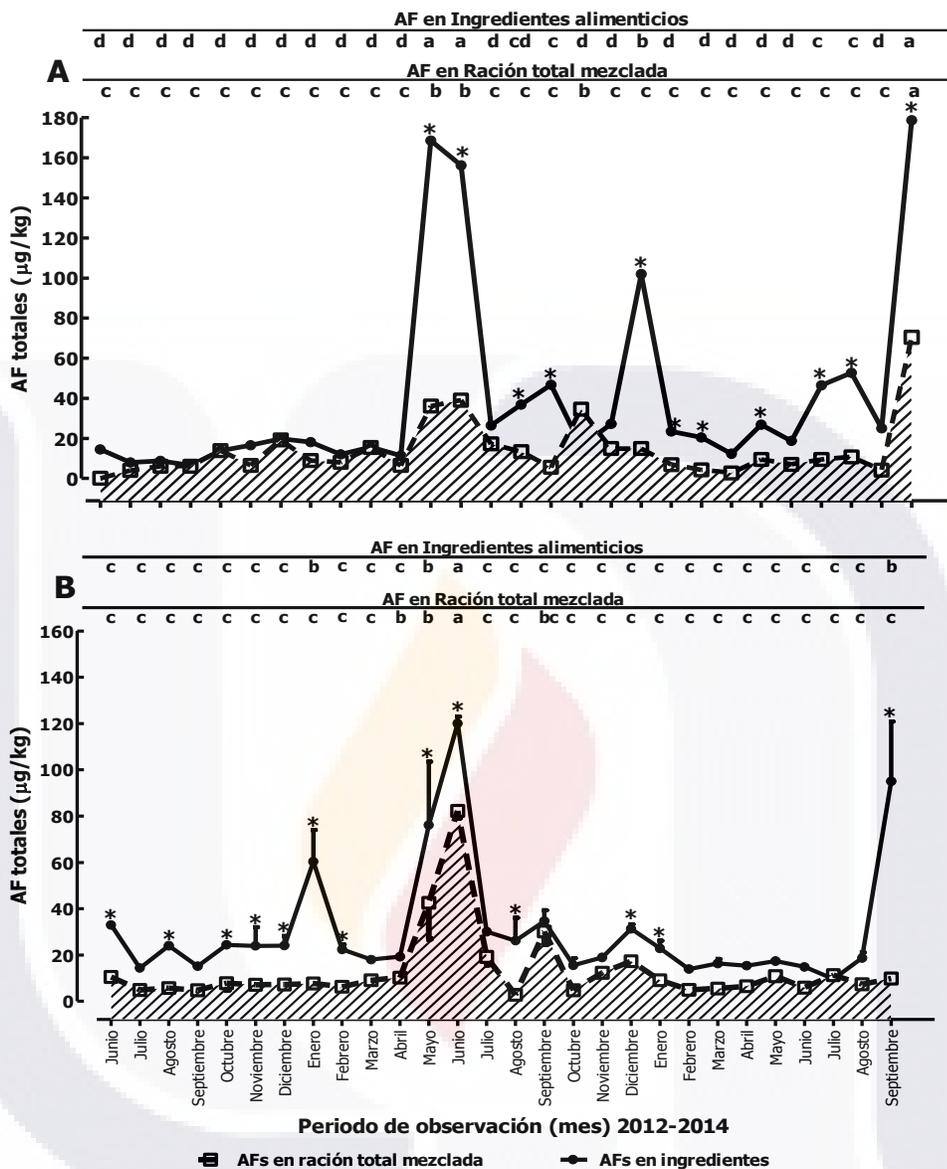


Figura N° 16. Concentración de AF ($\bar{x} \pm EE$) en los ingredientes y en la ración total mezclada (RTM) en las dos unidades de producción (Panel A: UPL-A y Panel B: UPL-B). Letras diferentes (a-b) indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre las concentración promedio de los meses en la misma UPL. Los asteriscos (*) indican diferencias estadísticas significativas entre la concentración promedio de AF entre los ingredientes y la RTM en el mismo mes de observación

4.1.3. Aflatoxinas detectadas en leche cruda

Durante el último año del estudio se cuantificó la concentración de AFM₁ en leche cruda producida en las dos UPL participantes; los datos obtenidos son la evidencia de una contaminación por AFM₁ durante todos los meses observados (Figura No.17 panel B) con incrementos en los meses de septiembre, octubre y noviembre (0.05, 0.07 y 0.05 µg/L);

comportamiento que coincide con el observado en la concentración promedio de AF totales detectada en la RTM durante el mismo periodo (Figura No. 17, panel A).

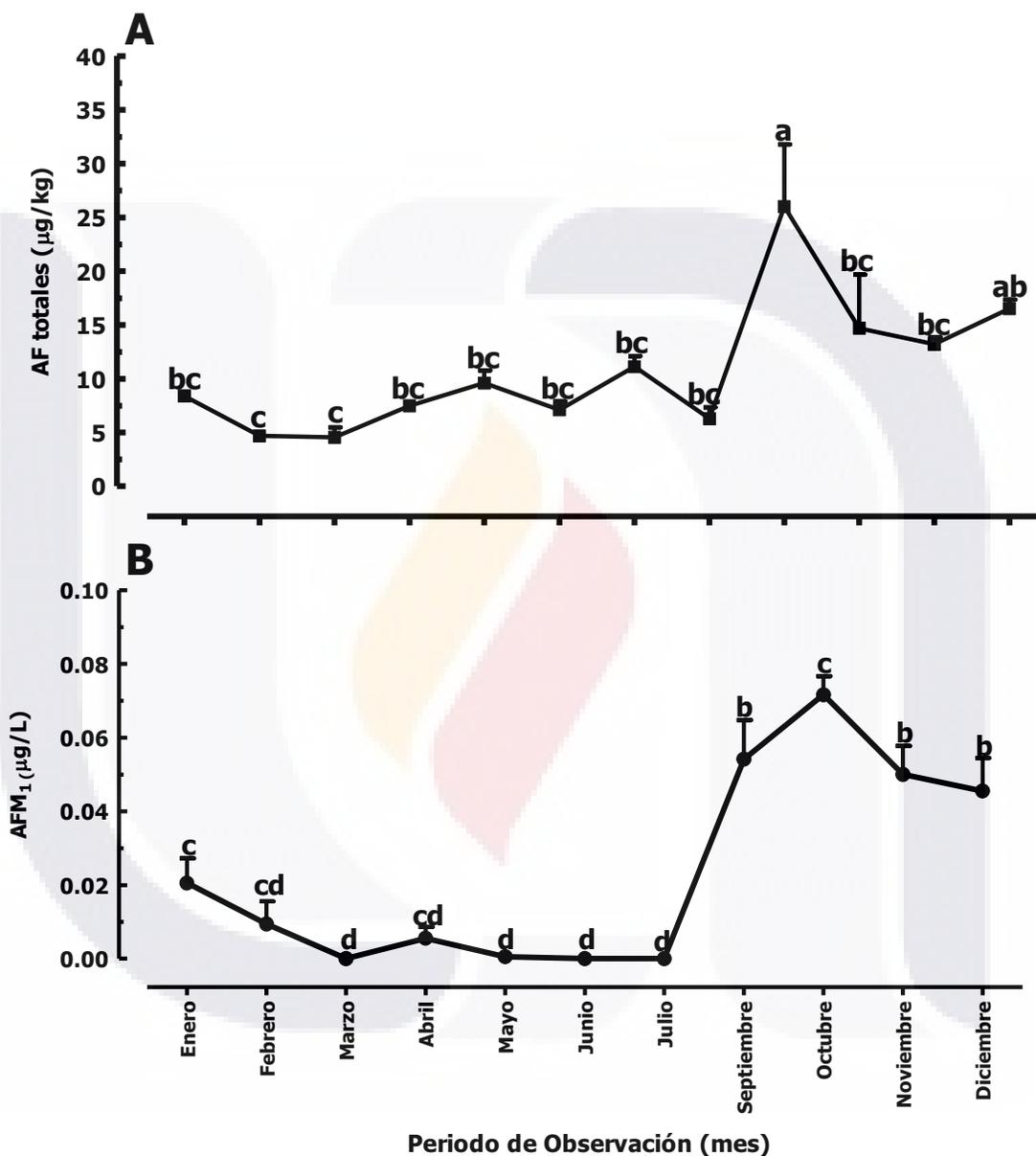


Figura N° 17. Evolución de la contaminación por AF totales y AFM₁ ($\bar{x} \pm EE$) en el último año de observación del estudio. Panel A: Promedio de AF totales en ración total mezclada (RTM) de las UPL participantes. Panel B: Promedio de AFM₁ en leche fresca de los lotes productivos de las UPL. Letras diferentes (a-b) indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre los promedios mensuales.

4.1.4. Exposición por lotes productivos a dietas contaminadas con aflatoxinas

La cantidad de ración total mezclada proporcionada a cada lote productivo presentó variaciones en la cantidad suministrada (kg/animal/día), por lo que los animales de cada lote se expusieron a cantidades diferentes de AF (Tabla No. 17); en general, los lotes productivos de vacas con alta producción se expusieron a la ingestión de mayores cantidades de AF de manera proporcional al tamaño de la dieta consumida; así como a la variación propia de la concentración entre lotes de ingredientes alimenticios.

Tabla No. 17. Exposición promedio de las vacas lecheras a la contaminación por aflatoxinas en la ración total mezclada por lote productivo

Lote	Media ($\mu\text{g}/\text{animal}/\text{día}$)	EE	Límites*	
			Inferior	Superior
UPL-A				
Altas	632 ^a	128	504	760
Medias	497 ^{ab}	101	396	597
Bajas	600 ^{ab}	121	479	721
Secas	538 ^{ab}	178	360	716
Vaquillas	184 ^b	55.7	128	240
UPL-B				
Altas	671 ^a	132	539	802
Medias	571 ^{ab}	115	456	686
Bajas	552 ^{ab}	109	443	661
Secas	352 ^{ab}	57.3	294	409
Vaquillas	211 ^b	37.0	174	248
UPL-A y B				
Altas	658 ^a	97.0	561	755
Medias	546 ^a	83.4	463	630
Bajas	568 ^a	82.7	485	651
Secas	414 ^{ab}	70.6	343	484
Vaquillas	203 ^b	30.8	172	234

*Intervalos de confianza basados en el procedimiento de comparación de rango de amplitud múltiple de Duncan. Literales (^{a-b}) diferentes indican diferencia entre lotes dentro de la misma UPL

Como se observó en la tabla No. 17 los lotes productivos de vacas altas se expusieron a concentraciones mayores de AF (658 $\mu\text{g}/\text{vaca}/\text{día}$) en comparación a los lotes de vacas bajas y medias productoras al ingerir dietas contaminadas naturalmente; evidencia de esto es la presencia de AFM₁ en la leche obtenida de estos lotes (Tabla No. 18), aunque estadísticamente no hay una diferencia ($p>0.05$) entre las concentraciones de

AFM₁ detectada en la leche fresca si se observaron concentraciones mayores de AFM₁ en la leche de los lotes altas y medias (0.026 ± 0.0045 y 0.026 ± 0.0046 µg/L).

Tabla No. 18. Promedio de AFM₁ presente en leche cruda de los lotes productivos en las UPL participantes en el estudio.

Lote	Media (µg/L)	E. E.	*Límite	
			Inferior	Superior
Altas	0.026 ^a	0.0045	0.022	0.031
Medias	0.026 ^a	0.0046	0.021	0.030
Bajas	0.017 ^b	0.0038	0.013	0.020

*Intervalos de confianza basados en el procedimiento de comparación de rango de amplitud múltiple de Duncan. Literales (^{a-b}) diferentes indican diferencia entre lotes

4.1.5. Influencia de las condiciones climáticas sobre la concentración de AF en ingredientes alimenticios y RTM

En este estudio se observó una influencia altamente significativa ($p < 0.01$) de la precipitación pluvial sobre la concentración de AF en los ingredientes alimenticios (figura No. 18); debido a que esta precipitación pluvial tuvo un comportamiento estacional, también la concentración de AF tuvo una presentación de tipo bifásico, con valores promedio significativamente más altos en dos tiempos, el primero en los meses de mayo y junio mientras que el segundo en septiembre del periodo bajo estudio. El análisis de modelos lineales generales mostró que el mejor modelo de predicción ($R^2 = 42.7\%$) para la concentración de AF en ingredientes alimenticios fue el que incluyó solamente los promedios mensuales de la precipitación pluvial pero sin considerar a los promedios mensuales de temperatura ambiental, humedad relativa, evapotranspiración potencial e irradiancia solar.

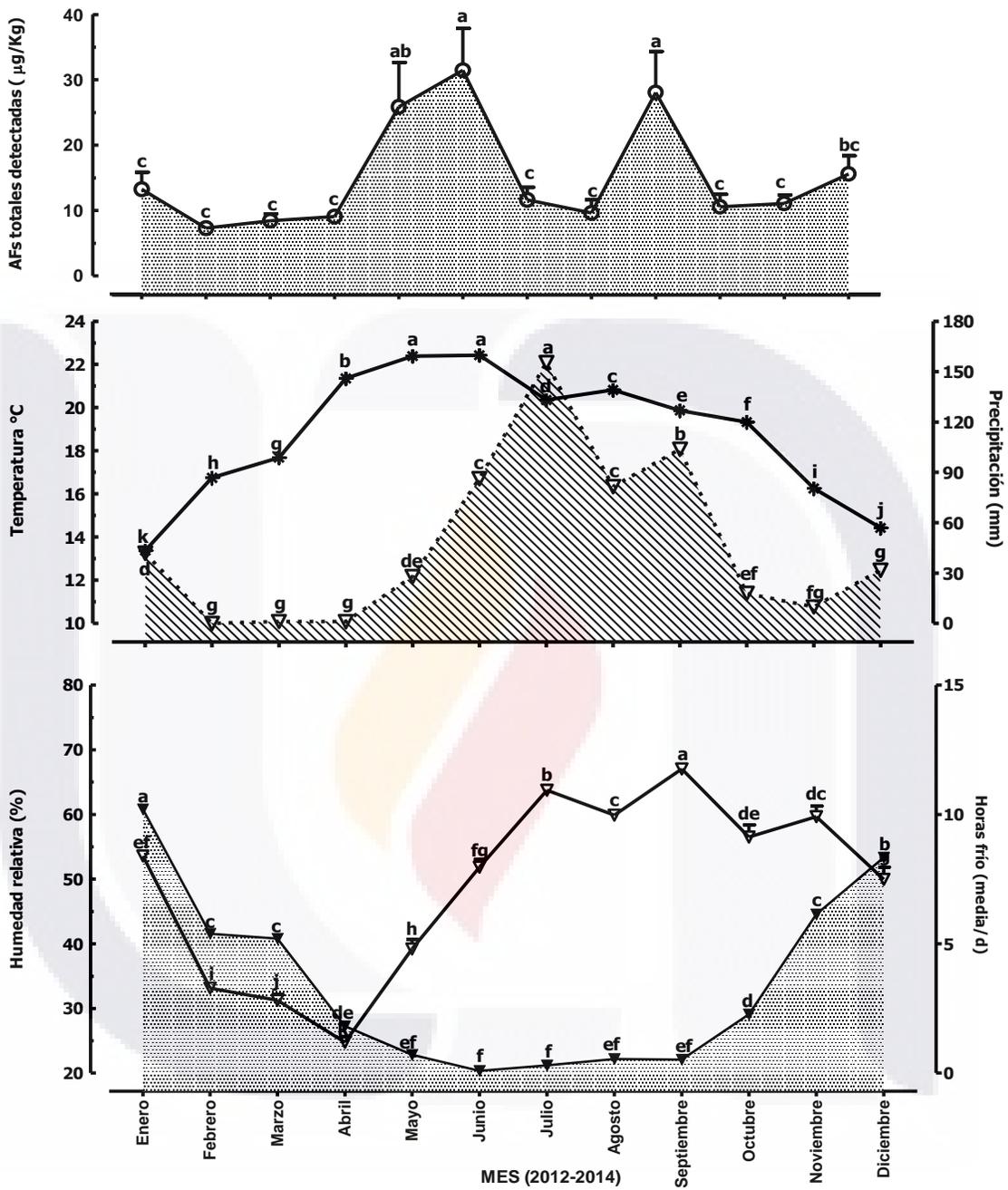


Figura No. 18. Concentración promedio de aflatoxinas totales (AF) en ingredientes alimenticios de vacas lecheras y comparación de la precipitación pluvial, temperatura ambiental, humedad relativa y horas frío en la zona de ubicación de las unidades de producción lechera (Fuente de datos climáticos: INIFAP, 2015)

4.2. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS DEL GÉNERO *ASPERGILLUS*

Se recolectaron 266 muestras de ingredientes alimenticios y RTM, las cuales fueron procesadas y se sembraron en PDA. En 120 de las muestras (45.1%) se encontró una o varias colonias fúngicas.

4.2.1. Frecuencia de hongos

Se identificaron en total 163 aislados, de los cuales el 36.0 % correspondió a hongos con morfología compatible con el género *Aspergillus* (Figura No. 19). También se encontraron aislados congruentes con la morfología típica de los géneros *Cladosporium*, *Rizophus*, *Mucor*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Curvularia* y *Bipolar*, aunque en menor proporción (14.9, 11.8, 11.8, 9.9, 9.9, 3.1, 1.86 y 0.62 %). De los 58 aislados de *Aspergillus spp.* identificados en las muestras de ensilaje de maíz, concentrado y RTM, el 17.2% correspondió hongos que mostraron poseer capacidad aflatoxicogénica, de acuerdo a la técnica de cromatografía en capa fina.

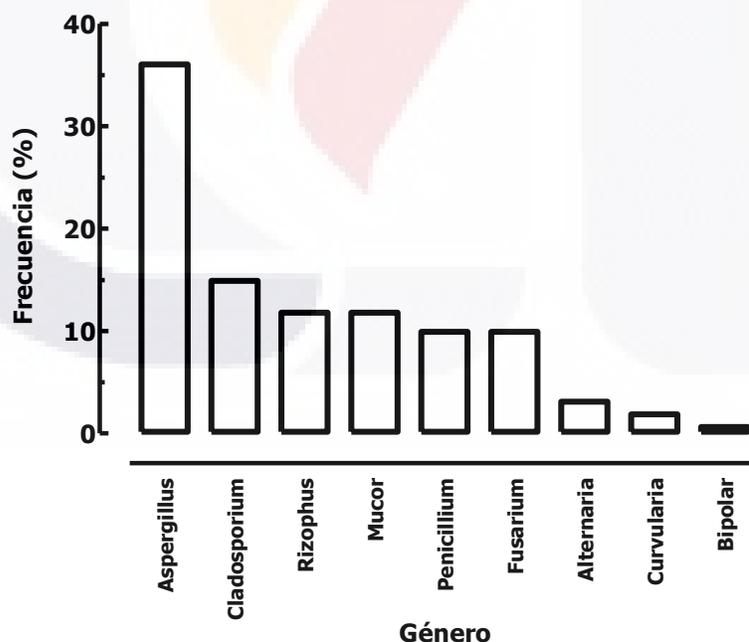


Figura No. 19. Géneros de hongos identificados por sus características morfológicas. Aislados de los ingredientes alimenticios para las vacas lecheras en las unidades de producción lechera participantes en el estudio

4.2.2. Características morfológicas de aislados del género *Aspergillus*

Se obtuvieron 58 aislados con características morfológicas congruentes con el género *Aspergillus*. En estos aislados se identificaron colonias con seis diferentes tipos de morfologías características (Tabla No 19).

Tabla No.19. Características macroscópicas y capacidad de producción de aflatoxinas (AF) en los aislados de *Aspergillus spp* obtenidas de los ingredientes alimenticios de las unidades de producción lechera participantes en el estudio

Aislado	Número	Color anverso	Tamaño y forma	Aspecto	Densidad	Bordes	Velocidad de crecimiento	AF [±]
A	7	Verde brillante en el centro, atenuándose hacia el exterior con periferia blanquecina a amarillo paja	Colonias grandes y circulares	Filamentosa	Media	Regulares	Lenta	±
B	13	Verde soldado opaco homogéneo en toda la superficie	Colonias grandes y circulares	Filamentosa	Media	Regulares	Media	-
C	14	Verde seco intenso en el centro y pálido en la periferia	Colonias pequeñas con tendencia a circular	Polvosa en el centro y filamentosa hacia la periferia	Alta en el centro y escasa en la periferia	Irregulares	Media	-
D	14	Blanquecino en el fondo con pigmentaciones oscuras que le dan un aspecto negro a la colonia.	Colonias grandes y circulares	Filamentosa	Escasa	Regulares	Rápida	-
E	6	Amarillo paja brillante en el centro y blanco amarillento hacia la periferia	Colonias medianas y circulares	Polvosa en el centro y filamentosa hacia la periferia	densa en el centro y escasa hacia la periferia	Pocas irregularidades	Media	±
F	4	Amarillo paja brillante en el centro, periferia blanco amarillenta	Colonias medianas con tendencia a circular	Algodonosa	Muy densa	Algunas irregularidades	Lenta	±

± = algunas colonias fueron capaces de producir AF; - = ninguna colonia produjo AF.

Se identificaron las estructuras típicas presentes en las especies del género *Aspergillus* como el conidióforo o cuerpo fructífero, fíalides, métula, conidios o esporas,

estípite, pie y micelio septado, en base a las tablas de clasificación taxonómica (Raper y Fennell, 1965. Anexo I) (Figura No 20 y tabla No.20).

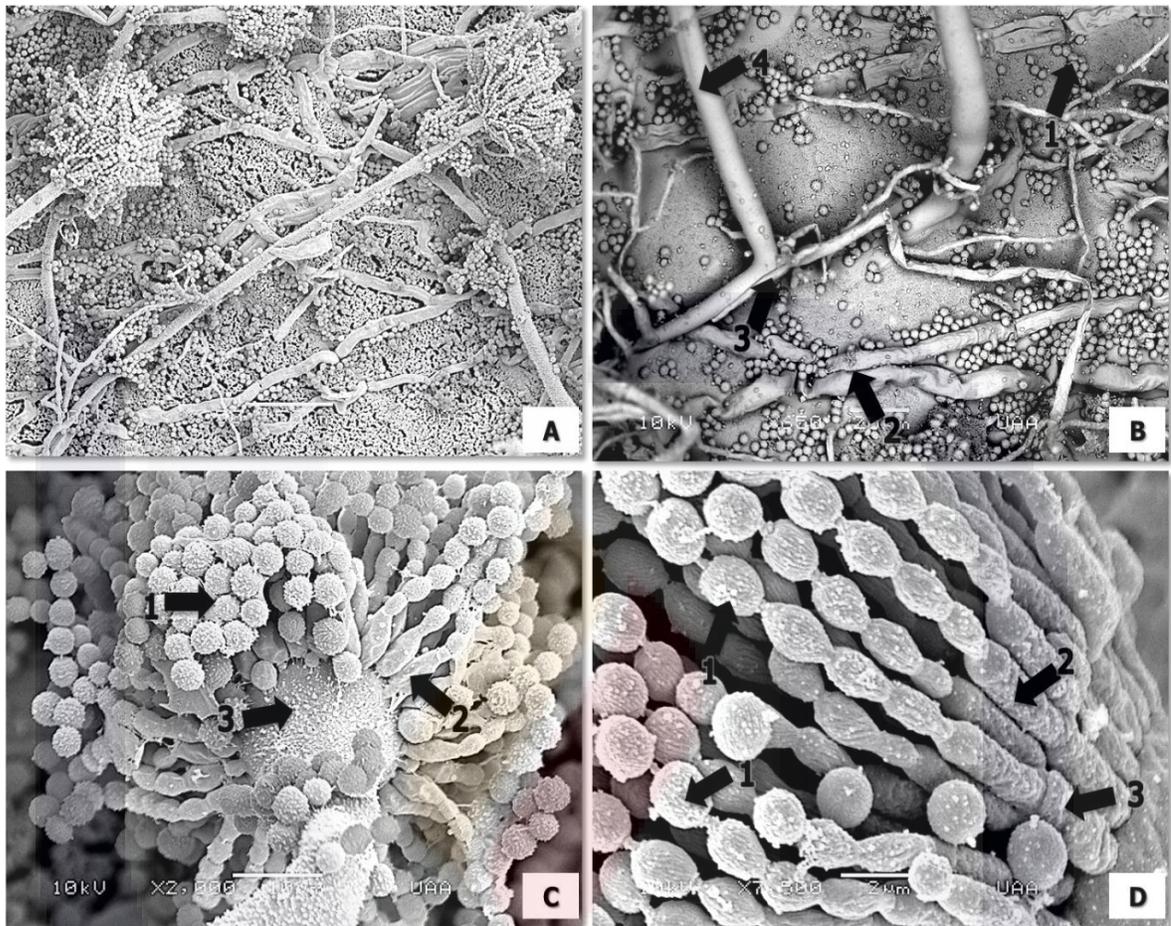


Figura No. 20. Micrografía electrónica de barrido de las características morfológicas típicas de los hongos del género *Aspergillus*. Panel A: Conidióforo, 350X. Panel B: 1. Esporas, 2. Micelio, 3. Pie, 4 Estípite, 650X. Panel C: 1. Conidios, 2. Fiálide, 3. Vesícula, 2000X. Panel D: 1. Conidios, 2. Fiálide, 3. Métula, 7500X

Tabla No 20. Características microscópicas identificadas en los aislados de *Aspergillus spp.* obtenidas de los ingredientes alimenticios de las unidades de producción lechera participantes en el estudio

Aislado	Estípote	Vesícula	Métula	Fiálides	Esporas
A	Largo, delgado y con rugosidades en la superficie	De forma esférica	No presenta	Cortas y abundantes que cubren toda la vesícula	Abundantes, de forma esférica y con irregularidades en la superficie
B	Gruesa de aspecto rugoso	De forma claviforme	No presenta	Biseriadas que cubren el ápice de la vesícula y dejan desprovista la base	Escasas y esféricas en cadenas cortas y de aspecto liso en la superficie
C	Delgada sin irregularidades en la superficie	Globosa	No presenta	Seriadas, cortas y recubren toda la vesícula dándole un aspecto esférico	Escasas y esféricas en cadenas cortas
D	Largo y delgado sin irregularidades en la superficie	Globoso	Abundantes en forma de barrilito que sujeta a las fiálides	Seriadas, abundantes que recubren completamente la vesícula	Abundantes y dispuestas en cadenas largas
E	De aspecto grueso y rugoso	Claviforme ensanchada	No presenta	Cortas y seriadas que cubren casi totalmente la vesícula	Esféricas de aspecto liso y dispuestas en cadenas cortas
F	Delgado con un ligero engrosamiento hacia lavase de la vesícula	Globosa	No presenta	Cortas y abundantes que irradian sobre toda la superficie de la vesícula	Esféricas de aspecto liso y abundantes, dispuestas en cadenas cortas dándole un aspecto esférico a la vesícula

Con la técnica de microscopia electrónica se diferenciaron en los aislados las diferentes estructuras que se presentan durante el desarrollo de los hongos *Aspergillus spp.* (Figura No. 21).

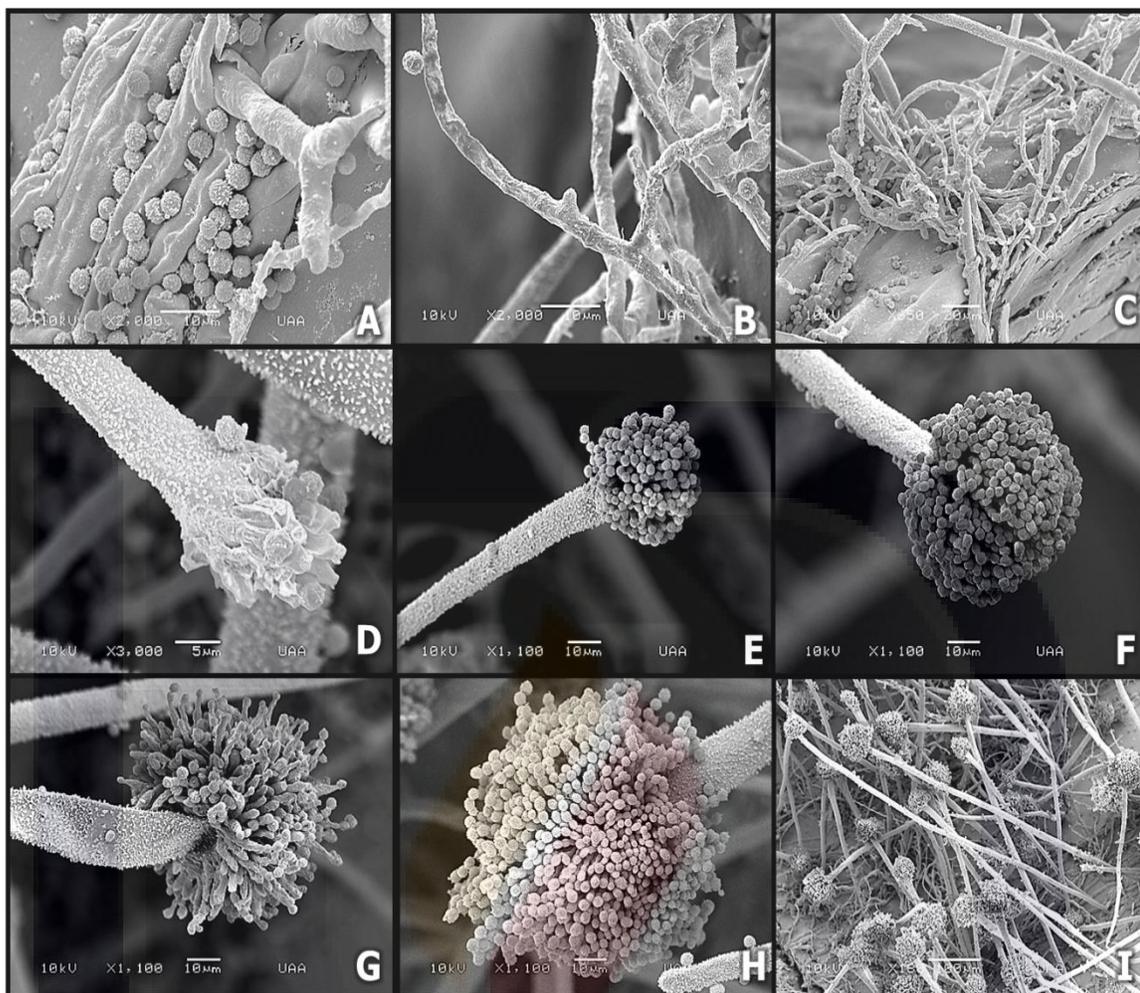


Figura No.21. Micrografía electrónica de barrido de las características morfológicas en los diferentes estadios de crecimiento del aislado de *Aspergillus* tipo A. Panel A: Esporas y micelio, 2000X. Panel B: Septos del micelio, 2000X. Panel C: Estípites inmaduras, 350X. Panel D: Cabeza de conidióforo inmadura con nacimiento de fiálides en la vesícula, 3000X. Panel E: Conidióforo con presencia de algunas esporas inmaduras, 1100X. Panel F: Conidióforo con cadenas simples de conidios que irradian por toda la superficie de la vesícula, 1100X. Panel G: Conidióforo con fiálides y cadenas cortas de conidios, algunos ya maduros, 1100X. Panel H: Vesícula de conidióforo con abundantes esporas emergiendo de las fiálides, 1100X. Panel I: Cuerpos fructíferos o conidióforo maduros, 160X.

Aún la microscopia electrónica de barrido con todas sus ventajas y utilidades no es una técnica que permita ayudarnos a identificar claramente y sin error las especies del género *Aspergillus*; sin embargo abre las puertas hacia lo desconocido y facilita la identificación detallada de estructuras específicas y complejas de esta especie como lo son los micelios septados, los conidios o esporas, las fiálides o esterigmas y las métulas.

Al purificar en PDA, teñir con azul de lactofenol y digitalizar con microscopia electrónica de barrido, se encontraron diferencias morfológicas microscópicas entre los 58

aislados de *Aspergillus spp.*, esto sugiere el aislamiento de más de una especie de *Aspergillus*, que pudiera ser complementado con estudios moleculares, precisando la clasificación a nivel de especie por sus características genotípicas.

En medio de crecimiento PDA los aislados A presentaron colonias con aspecto filamentososo, de color verde oliva a verde brillante atenuándose hacia la periferia hasta adquirir un color blanquecino y crecieron en forma circular con bordes regulares; los conidióforos presentaron vesículas globosas con abundantes fiálides que cubrían toda la superficie y con conidias seriadas (esporas) dispuestas en cadenas emergiendo de las fiálides con irregularidades en la superficie; el estípote del conidióforo era largo y delgado con rugosidades en la superficie (Figura No. 22).

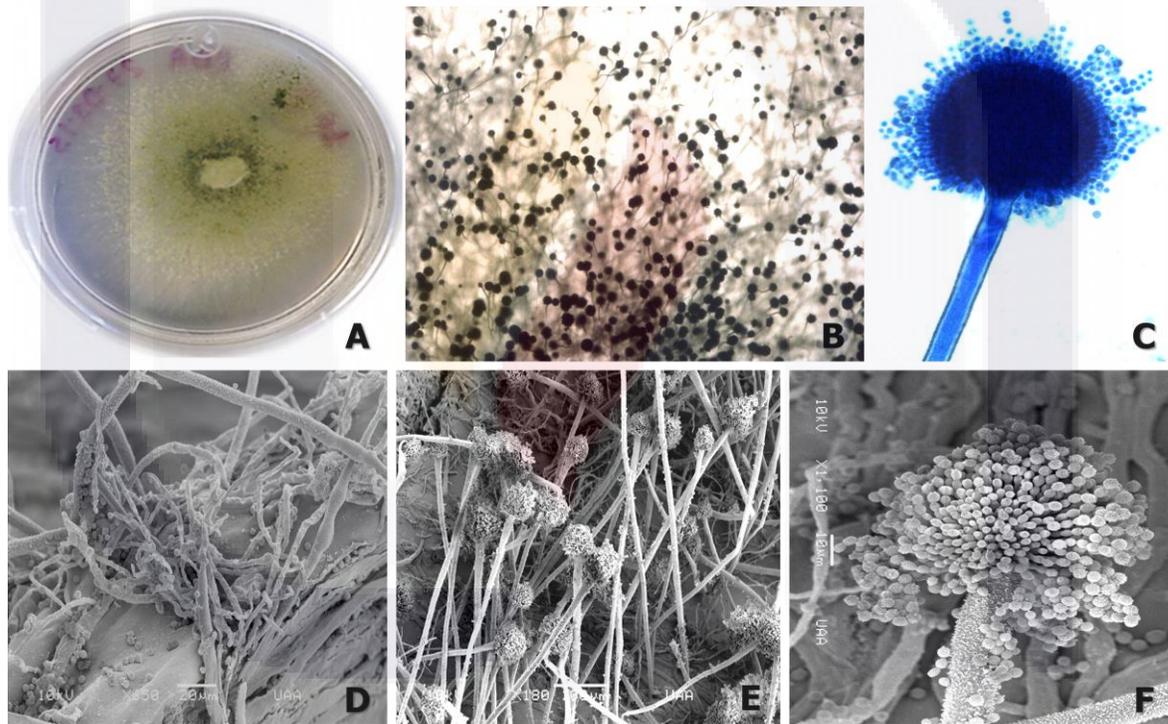


Figura No 22. Características morfológicas de los aislados tipo A de *Aspergillus spp.* Panel A: Características de la colonia. Panel B: Conidióforos vistos al microscopio óptico a 4X. Panel C: Conidióforo teñido con azul de lactofenol 40 X. Panel D: micelio y esporas 650 X. Panel E: cuerpos fructíferos o conidióforos 180 X. Panel F: conidióforo con fiálides y cadenas de conidios 1100 X

En medio de crecimiento PDA los aislados B presentaron colonias de color verde pálido uniforme en toda la superficie con aspecto filamentososo de baja densidad y crecieron de forma circular con bordes regulares y poco micelio; los conidióforos presentaron métulas que emergían de la vesícula claviforme y las fiálides se encontraban unidas a estas métulas que se distribuían sobre la superficie de la vesícula dejando la base de la vesícula desprovista y con cadenas cortas de conidias; el estípite presentó engrosamiento de mayor magnitud conforme se a unía a la vesícula y de aspecto rugoso (Figura No. 23).

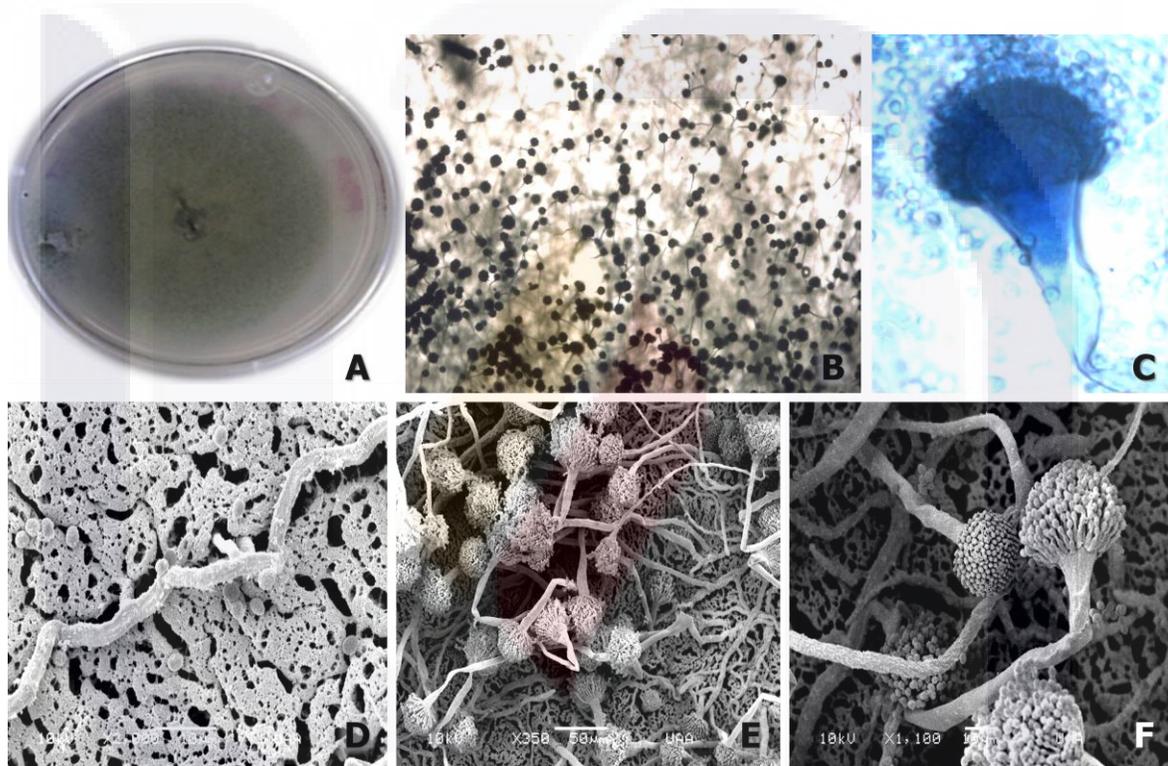


Figura No 23. Características morfológicas de los aislados B de *Aspergillus spp.* presentes en los ingredientes alimenticios de vacas lecheras. Panel A: Colonia en medio de crecimiento PDA. Panel B: Conidióforos en medio de crecimiento PDA vistos directamente al microscopio óptico, 4X. Panel C: Conidióforo teñido con azul de lactofenol visto al microscopio óptico a 40X. Panel D: Micrografía electrónica de barrido del micelio de aislados B, 2000X. Panel D: Micrografía electrónica de barrido de los cuerpos fructíferos o conidióforos de aislados B, 350X. Panel E: Micrografía electrónica de barrido de un conidióforo de los aislados B con métula, fiálides y conidios, 1100X

En medio de crecimiento PDA los aislados C presentaron colonias pequeñas de color verde intenso en el centro y pálido hacia la periferia de aspecto polvosas que crecieron de forma circular con bordes irregulares y filamentosos; los conidióforos se presentaron con vesícula completamente esférica y fíalides que crecieron sobre toda la superficie dándole un aspecto globoso a la vesícula y presentaron cadenas cortas de conidios; la métula se presentó larga y con aspecto lisa en la superficie con un ligero engrosamiento hacia la base de la vesícula del conidióforo (Figura No.24).

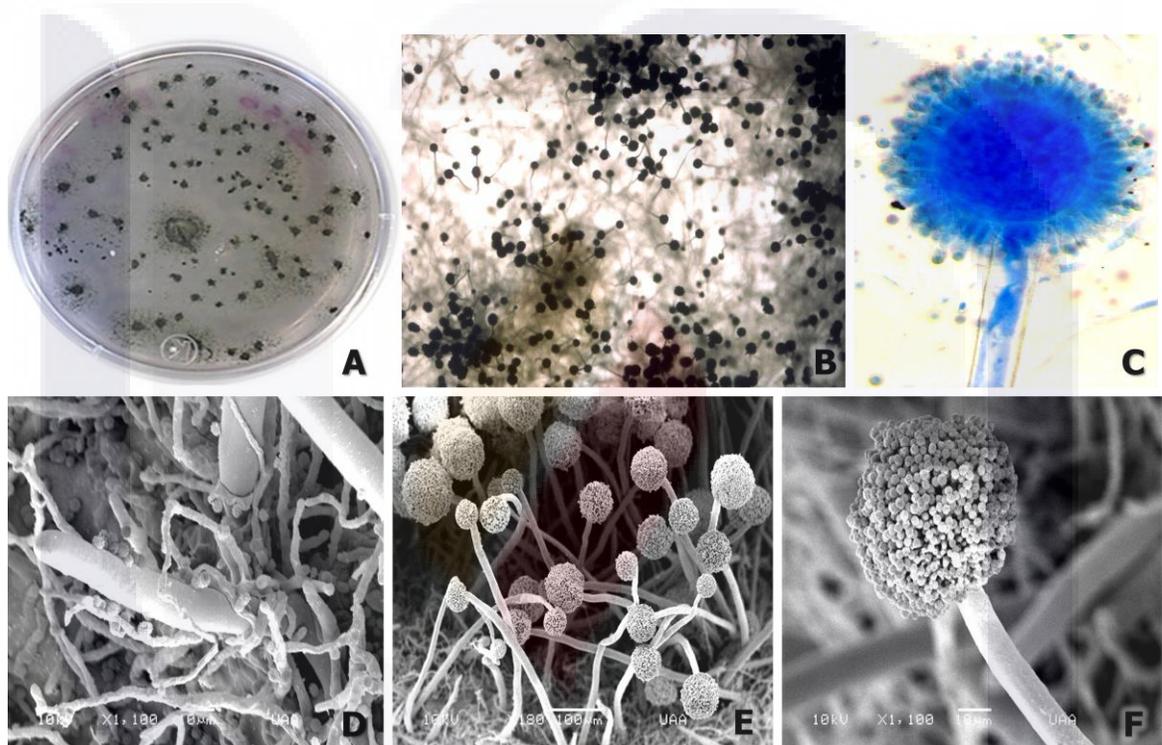


Figura No. 24. Características morfológicas de los aislados C de *Aspergillus spp.* presentes en los ingredientes alimenticios de vacas lecheras. Panel A: Colonia en medio de crecimiento PDA. Panel B: Conidióforos en medio de crecimiento PDA vistos directamente al microscopio óptico a 4X. Panel C: Conidióforo teñido con azul de lactofenol visto al microscopio óptico, 40X. Panel D: Micrografía electrónica de barrido del micelio y algunas métulas de aislados C, 1100X. Panel E: Micrografía electrónica de barrido de los cuerpos fructíferos o conidióforos de aislados C, 180X. Panel F: Micrografía electrónica de barrido de un conidióforo de los aislados C con abundantes conidios, 1100X

En medio de crecimiento PDA los aislados D presentaron colonias de color negro uniforme por toda la superficie con escasa densidad de micelio y de aspecto filamentososo que crecieron de forma circular con bordes regulares; el conidióforo dio un aspecto negruzco a la tinción con azul de lactofenol y presentó una vesícula esférica completamente cubierta de fiálides y cadenas largas de conidios con estípite delgada y ligeramente ensanchada hacia la base de la vesícula (figura No. 25)

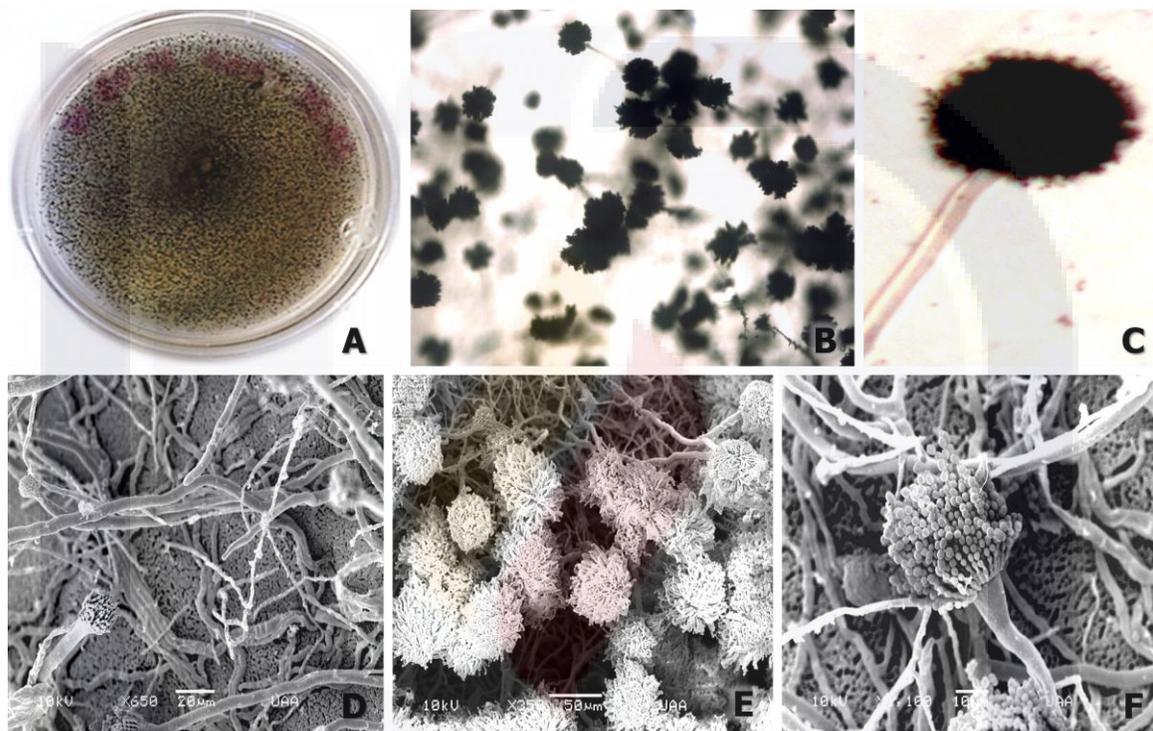


Figura No. 25. Características morfológicas de los aislados D de *Aspergillus spp.* presentes en los ingredientes alimenticios de vacas lecheras. Panel A: Colonia en medio de crecimiento PDA. Panel B: Conidióforos en medio de crecimiento PDA vistos directamente al microscopio óptico, 4X. Panel C: Conidióforo teñido con azul de lactofenol visto al microscopio óptico, 40X. Panel D: Micrografía electrónica de barrido del micelio, algunas métulas con vesículas inmaduras de aislados D, 650X. Panel E: Micrografía electrónica de barrido de los cuerpos fructíferos o conidióforos de aislados D, 350X. Panel E: Micrografía electrónica de barrido de un conidióforo de los aislados D con fiálides y abundantes conidios, 1100X

En medio de crecimiento PDA los aislados E presentaron un color blanco amarillento de aspecto filamentoso hacia la periferia con el centro amarillo paja denso de aspecto polvoso con colonias de formas irregulares con bordes escasos de micelio de color blanco aperlado; el conidióforo se presentó de forma ensanchada con fiálides distribuidas en forma de abanico que dejaban desprovista la base de la vesícula y la estípíte se presentó engrosada de aspecto liso con un mayor engrosamiento hacia la base de la vesícula del conidióforo (Figura No. 26).

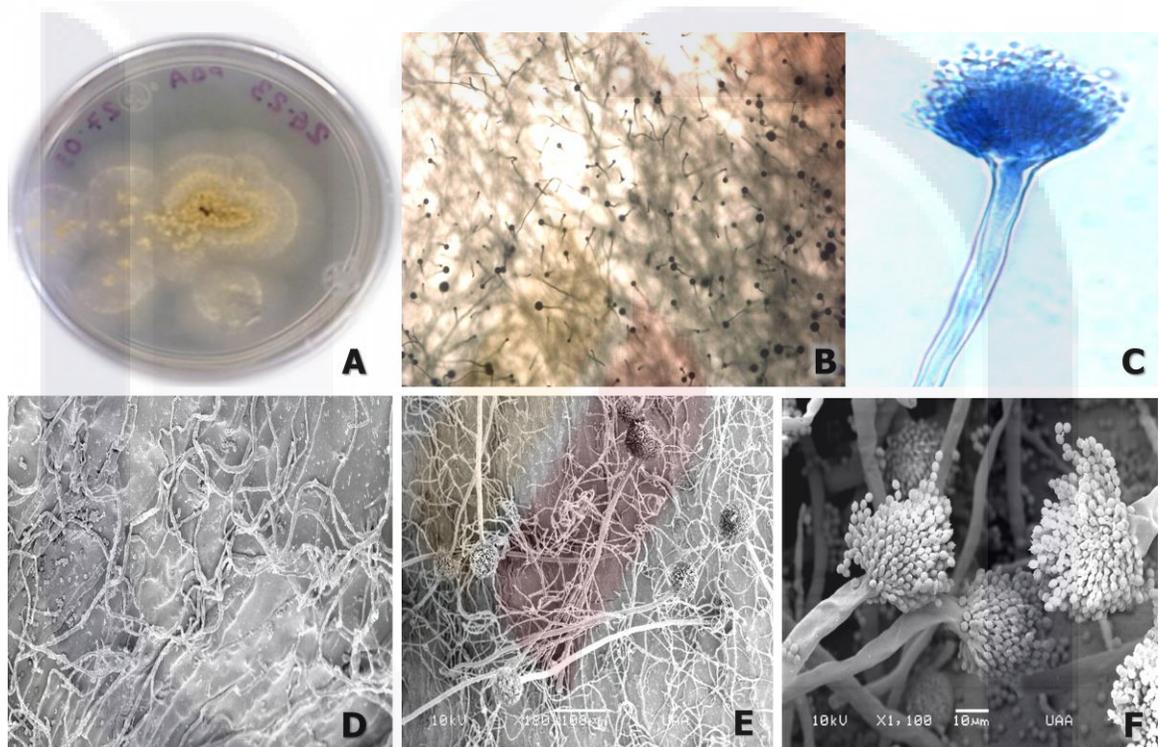


Figura No. 26. Características morfológicas de los aislados E de *Aspergillus spp.* presentes en los ingredientes alimenticios de vacas lecheras. Panel A: Colonia en medio de crecimiento PDA. Panel B: Conidióforos en medio de crecimiento PDA vistos directamente al microscopio óptico, 4X. Panel C: Conidióforo teñido con azul de lactofenol visto al microscopio óptico, 40X. Panel D: Micrografía electrónica de barrido del micelio de aislados E, 650X. Panel E: Micrografía electrónica de barrido de algunos cuerpos fructíferos o conidióforos y micelio de aislados E, 180X. Panel F: Micrografía electrónica de barrido de conidióforos de los aislados E con fiálides y cadenas cortas de conidios, 1100X

En medio PDA los aislados F presentaron un color amarillo paja marrón en el centro y blanco amarillento hacia la periferia con aspecto algodonoso y muy denso con algunas irregularidades en la periferia y de abundante micelio; el conidióforo presentó de forma esférica provisto de fiálides que cubren totalmente la vesícula con cadenas cortas de conidias, el estípite estaba alargada y delgada con un engrosamiento hacia la base de la vesícula y de aspecto ligeramente rugoso (Figura No. 27).

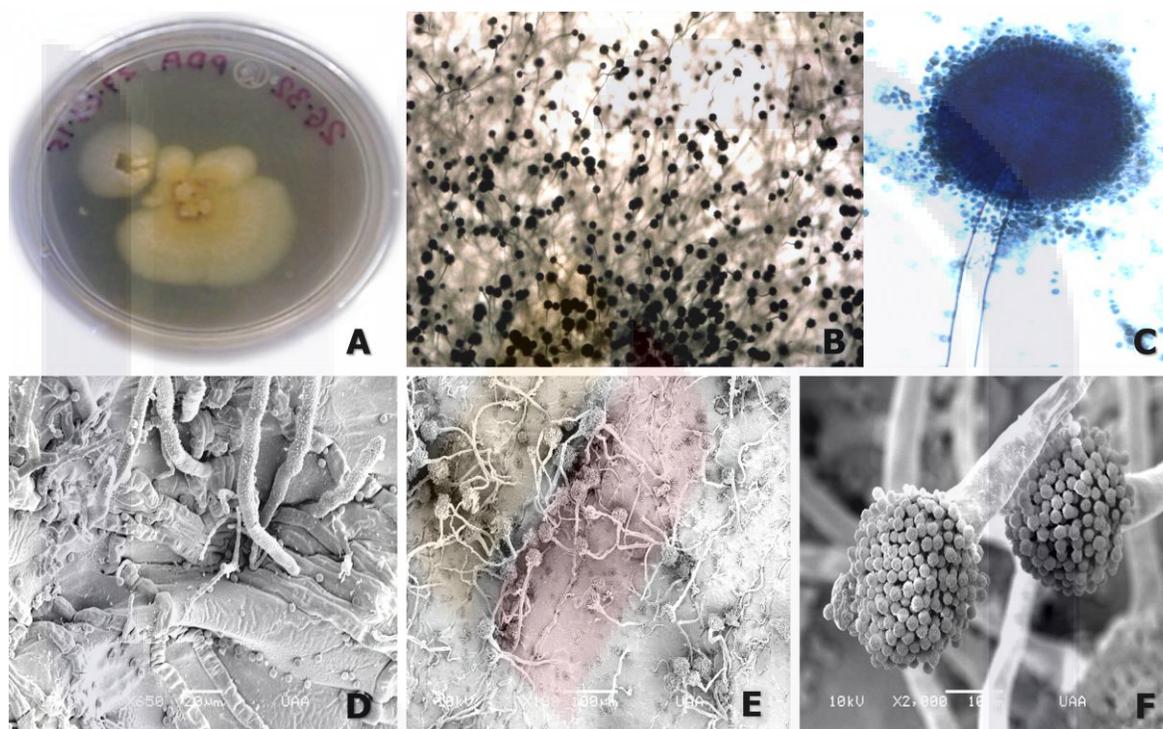


Figura No. 27. Características morfológicas de los aislados F de *Aspergillus spp.* presentes en los ingredientes alimenticios de vacas lecheras. Panel A: Colonia en medio de crecimiento PDA. Panel A: Conidióforos en medio de crecimiento PDA vistos directamente al microscopio óptico, 4X. Panel B: Conidióforo teñido con azul de lactofenol visto al microscopio óptico, 40X. Panel C: Micrografía electrónica de barrido del micelio de aislados F, 650X. Panel D: Micrografía electrónica de barrido de los cuerpos fructíferos o conidióforos de aislados F, 180X. Panel E: Micrografía electrónica de barrido de conidióforos de los aislados F con conidios, 2000X

4.2.3. Capacidad toxicogénica de hongos *Aspergillus*

A los siete días de crecimiento, los 58 aislados se procesaron con la técnica de TLC para identificar la presencia de AF en el medio de cultivo. Se colocaron 5 μ L del estándar de AFB₁ (1.0 mg/mL) sobre la línea de origen y del lado izquierdo (1^{er} carril); se colocaron después los extractos crudos (metanol:agua, 80:20) de los aislados (40 μ L) en cada carril

de la línea de origen. El 17.2% de los aislados (10/58) se clasificó como positivo a la capacidad de producción de AF en comparación con un control positivo de AFB₁ purificada (Figura No. 28). El resto de los aislados (82.8%) se interpretó como negativo a la presencia de AF. Los 58 aislados se identificaron en alguno de los seis tipos de colonias mencionadas en la tabla 19.

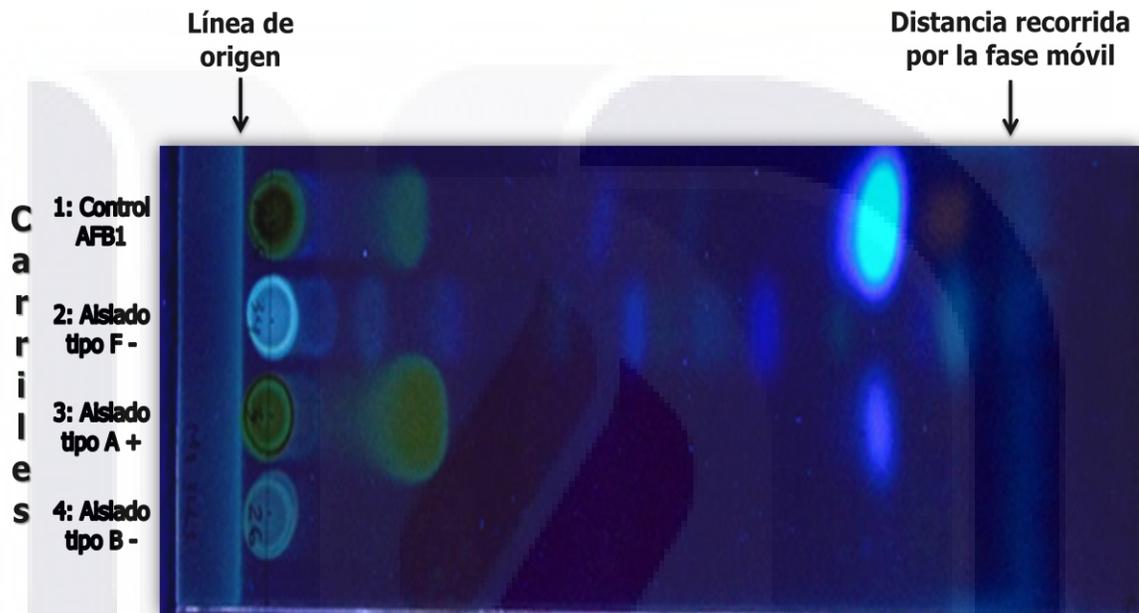


Figura No. 28. Placa de sílica gel después de realizada la cromatografía en capa fina. Carriles 1: control positivo a AFB₁ purificada (AF⁺); 2: aislado B-AF⁻; 3: aislado A-AF⁺; 4: aislado D AF⁻.

4.2.4. Asociación de la presencia de hongos *Aspergillus spp.* con la presencia de aflatoxinas detectadas en las dietas de las vacas lecheras

Aunque hubo diferencias entre la concentración de AF en los ingredientes alimenticios que tuvieron presencia de *Aspergillus spp.* identificados como aflatoxicogénicos, la contaminación de los ingredientes alimenticios con AF fue independiente de la presencia de hongos *Aspergillus spp.* Puesto que valor $p > 0.05$ en la prueba de comparación simple para la concentración de AF y la presencia de *Aspergillus spp.* lo cual nos indicó que no hubo una asociación significativa entre la presencia de hongos *Aspergillus* y la contaminación por AF en los ingredientes alimenticios de las dietas empleadas en las unidades de producción participantes en el estudio (Tabla No. 21).

Tabla No.21. Ausencia de asociación de la presencia de hongos *Aspergillus* con la contaminación por aflatoxinas en los ingredientes alimenticios de las unidades de producción lechera participantes en el estudio

Presencia de <i>Aspergillus</i>	Casos	AF (µg/kg)	EE	Límite de confianza *	
				Inferior	Superior
Negativo	208	16.3	1.32	14.4	18.1
Positivo	58	12.3	2.5	8.9	15.8
Total	266	15.4	1.30	12.2	15.9

* Intervalos de confianza al 95%, basados en el procedimiento de comparación múltiple de Bonferroni. Valor $p > 0.05$.

Se aisló un mayor número de hongos del género *Aspergillus* en los ingredientes alimenticios de la dieta de la UPL B (41 / 58 = 70.7%) y además, esta UPL mostró la mayor frecuencia de aislados con capacidad de producción de AF (9 / 10 = 90.0 %); sin embargo, la UPL-B no mostró niveles promedio mayores de contaminación por aflatoxinas en la RTM (Figura No 15). Por otra parte, se observó una discrepancia entre la concentración de AF y la presencia de *Aspergillus*; ya que en el 99.3% de las muestras de ensilaje de maíz, concentrado y RTM se detectó alguna concentración de AF; mientras que sólo en el 21.8% de las muestras se pudo aislar *Aspergillus spp.* además de que, únicamente en el 3.8% de las muestras procesadas se identificó un aislado con capacidad aflatoxicogénica. El análisis de modelos lineales generales mostró que la presencia de aislados de hongos *Aspergillus spp.* se vio influenciada significativamente ($p < 0.01$; $R^2 = 12.7\%$) por la precipitación pluvial promedio mensual, pero no por las demás condiciones climáticas.

Tabla No. 22. Frecuencia de aislamiento de hongos *Aspergillus* productores de aflatoxinas (AF⁺) de las dietas de vacas lecheras en las unidades de producción lechera (UPL)

ORIGEN	Muestras Total	Aislados de <i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i> AF ⁺
UPL			
A	153	17	1
B	113	41	9
INGREDIENTES			
Ensilaje de maíz	89	16	2
Concentrado	88	19	5
Ración total mezclada	89	23	3
Total	266	58	10

5. DISCUSIÓN

5.1. PRESENCIA DE AFLATOXINAS

5.1.1. Aflatoxinas en los ingredientes de la dieta y en ración total mezclada

En este estudio se cuantificaron aflatoxinas en un total de 266 muestras expuestas a la contaminación natural con AF, de las cuales 88 fueron de alimento concentrado, 89 de ensilaje de maíz y 89 de ración total mezclada. Los resultados obtenidos mostraron una contaminación por AF en el 99% de las muestras, siendo el ensilaje de maíz el ingrediente alimenticio que presentó mayores concentraciones de AF en ambas unidades de producción (UPL-A: 18.3 ± 4.6 y UPL-B: 20.6 ± 2.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$). En la RTM también se detectó la presencia de AF encontrando concentraciones de 15.0 ± 1.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en la UPL A y de 30.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para la UPL B. El 15.4% de las muestras presentó niveles de contaminación superiores (promedio: 52.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) a los niveles máximos permitidos por normatividades extranjeras (UE y FDA: 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) y solo en una de las muestras se detectaron niveles superiores (102.85 $\mu\text{g}/\text{kg}$) a los establecidos por las normatividades nacionales (NOM-188-SSA1-2002) para insumos agrícolas destinados a la alimentación de ganado lechero.

En México hay pocos estudios con respecto a la contaminación natural por aflatoxinas en las dietas de vacas lecheras. Los resultados de este estudio pueden compararse con lo reportado por Reyes y col. (2009) para establos de Jalisco y Aguascalientes, donde encontraron un porcentaje contaminación por AF del 92% de las muestras analizadas, aunque sólo el 9.3% de las muestras sobrepasaron los límites máximos permisibles por la Norma Oficial Mexicana. Es importante resaltar que el número de muestras analizadas por Reyes y col., (2009) es únicamente el 15.0 % de las muestras que se analizaron en este estudio y las concentraciones promedio detectadas de aflatoxinas en la ración total mezclada también resultaron ser menores (18.5 ± 3.7 vs 10.8 ± 5.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

También, Flores y col. (2006) cuantificaron aflatoxinas en 133 muestras de alimentos balanceados producidos en México, identificando, mediante ELISA y HPLC, concentraciones detectables en el 45.1% de las muestras; el porcentaje de las muestras positivas fue menor al reportado en el presente estudio, además de que las concentraciones de aflatoxinas detectadas también fueron menores (14.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Por lo

tanto, los resultados obtenidos en este estudio sugieren que la contaminación por AF en los ingredientes alimenticios para vacas lecheras es un problema con evidencia clara de su existencia en la región del Altiplano Central Mexicano.

La presencia de AFM₁ en leche del Altiplano Central Mexicano sugiere la contaminación por aflatoxinas en las dietas de vacas lecheras de la región. En este sentido, en un estudio realizado por Pérez y col. (2008) demostraron una alta incidencia de AFM₁ en leche cruda, orgánica y ultra pasteurizada; encontrando concentraciones promedio de 18 µg/kg. Otros autores (Reyes y col., 2009) encontraron también una alta incidencia de AFM₁ (80% de las muestras contaminadas), con concentraciones promedio de 0.023 ± 0.016 µg/L y sólo el 9% excedieron los límites máximos permisibles por las normatividades Europeas. Lo que sugiere que las vacas lecheras están ingiriendo alimentos contaminados con AF.

5.1.2. Aflatoxinas en la ración total mezclada adicionada con secuestrante

La UPL-A adicionó secuestrante a la RTM a partir de abril de 2013 cuando se notó un incremento en los niveles de AF de los ingredientes y la UPL-B adicionó secuestrante a la RTM durante todo el periodo del estudio. El promedio de AF en los ingredientes de la dieta (UPL-A: 43.4 ± 5.1 y UPL-B: 30.9 ± 2.6 µg/kg) se redujo en la ración total mezclada (UPL-A: 15.0 ± 1.60 y UPL-B: 13.4 ± 1.31 µg/kg). Se observó una diferencia significativa entre la concentración de AF de la RTM y los ingredientes en ambas UPL; lo que sugirió una reducción de la detección de AF en un porcentaje equivalente al 65.4 en la UPL-A y del 43.3% en la UPL-B. En este estudio no fue evidente un porcentaje de adsorción del secuestrante como el encontrado en algunos estudios in vitro de hasta el 97%, pero si pudimos detectar la eficacia del secuestrante, que al ser agregado en la RTM, redujo significativamente las AF disponibles a menos del 65%.

La UPL-A no aplicó secuestrantes desde el inicio del estudio, por eso en las figuras N° 20 y 21 apreciamos el efecto adsorbente del secuestrante que redujo hasta un 43.3% la contaminación por AF, aunque los problemas de contaminación por AF en los ingredientes de la dieta de esta UPL eran menores (30.9 ± 2.6 µg/kg) en comparación a la UPL-A (43.4 ± 5.1). Como se observó (Figura No. 15) que la UPL-A tenía menores problemas de contaminación en los ingredientes al inicio del estudio, pero esta situación cambió a partir del mes de marzo de 2013; lo cual pudo haber influido en que se tomara

la decisión de utilizar el secuestrante. La Norma Oficial Mexicana (EUM-SS, 2002) establece un límite máximo permisible de AF de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para productos agrícolas destinados a la alimentación del ganado bovino productor de leche; por lo tanto, la concentración de AF detectada en los ingredientes de esta UPL no rebasó los límites máximos permisibles establecidos en nuestro país.

Se han llevado a cabo numerosos estudios para evaluar la capacidad de adsorción de los productos empleados como secuestrantes de AF, entre ellos están los de Díaz y col. (2002) que evaluaron varios productos adsorbentes (carbón activado, bentonita y glucomananos) bajo condiciones controladas *in vitro*, obteniendo resultados que sobrepasan el 95% de adsorción del total de AF (5 mg/mL); el carbón activado fue el que presentó mayor porcentaje (99%) y según estos resultados las condiciones de pH no influyen en la capacidad de secuestro. En el 2004, Díaz y col., nuevamente reportaron que varios agentes secuestrantes *in vivo* mostraron capacidad para reducir la tasa de eliminación en leche hasta en un 65% con respecto al grupo control. Según Huwig y col. (2001) hay varios factores que influyen para que se lleve a cabo el fenómeno de adsorción, especialmente las características fisicoquímicas del secuestrante y de la micotoxina. Juan-Juan y col. (2010) evaluaron *in vitro* la capacidad de adsorción de varios secuestrantes; los glucomananos presentaron mayor porcentaje de adsorción de AF (97.6%) en comparación a los aluminosilicatos (96.0%). Masoero y col. (2009) obtuvieron una reducción de la AFM₁ presente en la leche (215 ng/kg) del grupo control sin secuestrante, en comparación con la detectada (113 ng/kg) al añadir secuestrante a la RTM. Estos autores señalan que la tasa de eliminación de AFM₁ en leche se ve influenciada por la cantidad de RTM ingerida al día por cada animal, la cantidad de leche que produce al día y la etapa de lactación en la que se encuentra. Rojo y col. (2014) también observaron una reducción en la tasa de eliminación de AFM₁ al proporcionar RTM contaminada artificialmente con AF y la adición de un aluminosilicato (control: 0.736; secuestrante: 0.465 ng/L).

Estos resultados sugieren que la adición de secuestrantes a la RTM mostró la capacidad para reducir significativamente la concentración detectable de AF en la dieta de vacas lecheras así como de reducir la presencia de AFM₁ en la leche producida.

El 6.3% alcanzó niveles superiores (promedio: 80.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$) al rango máximo de detección por el kit de ELISA (45 $\mu\text{g}/\text{kg}$). El kit de ELISA recomienda correr nuevamente

por triplicado y tomando en cuenta una dilución 1:2 aquellas muestras que sobrepasaron los niveles máximos de detección, en este caso se hizo con las muestras que excedieron estos límites y el resultado que se obtuvo fue que el 1.12% de las muestras continuaron excediendo los límites máximos de detección por el kit. Estas últimas muestras fueron corroboradas mediante la metodología de HPLC; no se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p > 0.05$) en la estimación promedio de concentraciones de AF por ELISA y HPLC (67.6 ± 12.9 y 83.8 ± 10.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

5.1.3. Influencia de las condiciones climáticas sobre la presencia de AF

Se observó una influencia altamente significativa ($p < 0.01$) de la precipitación pluvial sobre la concentración de AF en los ingredientes alimenticios; la precipitación pluvial mostró un comportamiento estacional al igual que las AF. Otros factores climáticos como la temperatura ambiental, humedad relativa, evapotranspiración potencial e irradiancia solar no mostraron influencia alguna sobre la presencia de AF. En los meses de mayo, junio y septiembre se presentaron niveles mayores de AF (25.8, 31.4 y 28.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

Astoresca y col. (2014) observaron una influencia altamente significativa ($p < 0.0001$) de la temperatura ambiental en la producción de AF; identificando el rango óptimo de producción de AF entre los 15 y 30°C. A diferencia de los resultados de este estudio donde la temperatura no mostró ($p > 0.05$) tener influencia sobre la concentración promedio de AF.

El periodo de observación comprendió 29 meses; para la UPL-A los meses en los cuales se presentaron problemas mayores de contaminación fueron mayo y junio de 2013, diciembre de 2013, junio, julio y septiembre de 2014. Para la UPL B, los meses críticos fueron enero, mayo y junio de 2013 y septiembre de 2014. Siendo la primavera y el verano de 2013 las estaciones en las que se presentaron mayores concentraciones de aflatoxinas en las dietas de las vacas lecheras.

Reyes y col. (2008) encontraron mayor concentración de AF durante los meses de enero, febrero y marzo; en este estudio los meses en los que se observaron concentraciones mayores de AF mayo, junio y septiembre.

5.2. PRESENCIA DE HONGOS *ASPERGILLUS*

En este estudio se procesaron 266 muestras para el aislamiento de hongos *Aspergillus* y se sembraron en cuatro cajas de PDA con cuatro diluciones por muestra; por lo que se realizaron un total de 1,064 cultivos. Ciento veinte de las muestras presentaron contaminación por algún hongo y en 58 muestras se logró identificar y aislar alguna especie de hongo del género *Aspergillus*. Se identificaron 163 aislados y el 36.2 % correspondieron a especies de *Aspergillus*. De los 58 aislados purificados; 10 se consideraron que tenían un resultado positivo para la producción de AF mediante TLC; sin embargo, la presencia de AF resultó ser independiente a la presencia de *Aspergillus spp.* (Bonferroni, $p > 0.05$).

Las AF pueden instalarse en los productos agrícolas durante la cosecha, el transporte o el almacenamiento con ayuda del viento y algunos vectores (insectos) y el hongo puede contaminar los suelos donde se producen los insumos agrícolas; en este sentido, Ortega y col., (2015) realizaron un estudio de tres años en varias zonas de Sonora, tomaron muestras del suelo donde se produce maíz (83 muestras totales) encontrando un 98% de incidencia de *A. flavus cepas L* (atoxicogénicas) y un 5% para *A. flavus, cepas S* o toxicogénicas. La caracterización de las cepas L y las cepas S coincide con los estudios de Ehrlich (2014). Las concentraciones de aflatoxinas detectadas por Ortega y col., (2015) tuvieron un comportamiento similar al que se obtuvo en este estudio; ya que a pesar de que fueron considerablemente altas (4,386 $\mu\text{g}/\text{kg}$) de las 405 colonias aisladas de *Aspergillus*, sólo 18 resultaron ser toxicogénicas.

Martínez y col. (2013) puntualizan que en México la contaminación de maíz por hongos *Aspergillus* se debe a que no se tienen estrategias de control efectivas para reducir o evitar la infección por hongos *Aspergillus* toxicogénicos, al igual que lo afirmaron García y Heredia (2006). Hernández y col. (2007) encontraron un 50.3% de incidencia de hongos *Aspergillus* en granos de maíz almacenado en el estado de Tamaulipas seguido de *Penicillium* (15.9%) y *Fusarium* (5.5%), hongos identificados como contaminantes durante el almacenamiento (Agrios, 2006). Alrededor del mundo se han logrado varios aislamientos de hongos *Aspergillus* aflatoxicogénico no solo en alimentos, Varga y col. (2011) lograron aislar e identificar dos nuevas especies de *Aspergillus* aflatoxicogénico, en insectos y suelos de EUA. En África Probst y col. (2014) realizaron un estudio en 18 países; recolectaron 364 muestras de maíz y de los 4,469 aislados, el 75%

correspondían a cepas L de *A. flavus*, el 6% a *A. tamarii*, el 1% a *A. parasiticus* y el 3% a cepas S de *A. flavus*. Mobeen y col. (2014) analizaron varias muestras de cacahuate contaminadas con diferentes concentraciones de esporas de varias especies de *Aspergillus*, encontrando sólo tres especies positivas a la producción de AF. Ruadrew y col. (2013) encontraron concentraciones de AF (14.7 $\mu\text{g}/\text{k}$ y 11.4 $\mu\text{g}/\text{k}$) en muestras de alimento para ganado en las cuales no se encontró presencia de hongos *Aspergillus* aflatoxicogénicos. Todos estos reportes apoyan los resultados que se obtuvieron en el presente estudio; donde se aislaron un número mayor de hongos *Aspergillus* no aflatoxicogénicos; estos hongos pudieran ser utilizados como control biológico para reducir la presencia de hongos aflatoxicogénicos debido a que crecen más rápido y gastan las fuentes de energía que ya no pueden ser usadas por los hongos productores de AF (Cotty, 2014; Ehrlich, 2014); por lo tanto la presencia de AF es independiente a la presencia del hongo aflatoxicogénicos; los ingredientes alimenticios pueden contaminarse con AF por la intervención de factores como el viento o vectores que transportan las esporas y las instalan en los productos agrícolas.

6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio confirmaron la existencia del problema de contaminación por AF en los ingredientes alimenticios destinados para vacas lecheras de la región del Altiplano Central Mexicano. La contaminación de AF en los ingredientes alimenticios mostró un comportamiento estacional lo que sugiere la influencia de condiciones climáticas sobre la presencia de AF, especialmente la precipitación pluvial mostró tener mayor influencia en la presencia de AF.

Este estudio mostró una independencia entre la presencia de AF en los ingredientes alimenticios para vacas lecheras y la presencia de hongos *Aspergillus spp.* aflatoxicogénicos.

Este estudio evidenció que la adición de secuestrantes a la ración total mezclada reduce significativamente (65%) la concentración detectable de AF en la RTM de vacas lecheras y la presencia de AFM₁ en la leche producida, ya que del 1-6% esperado disminuyó hasta 0.22 ± 0.25 % (4.5 a 27.3 veces).

La técnica de ELISA fue un método de cuantificación confiable para AF al no presentar diferencias estadísticas significativas entre los resultados obtenidos por esta técnica y HPLC.

Lo anterior sugiere que es importante diseñar, establecer y ejecutar estrategias de control para reducir la presencia y proliferación de hongos *Aspergillus* aflatoxicogénicos y AF en los insumos agrícolas destinados para alimentar a las vacas lecheras y disminuir la frecuencia de AFM₁ en la leche producida en las unidades de producción lechera del Altiplano Central Mexicano destinada al consumo humano, reduciendo el riesgo de exposición a este metabolito carcinogénico para la salud humana y animal.

7. GLOSARIO

Abiótico: Para cuestiones biológicas y ecológicas hace referencia a todo aquello que no pertenece a los seres vivos o no es producto de los seres vivos.

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.

Ácido desoxirribonucleico (ADN): Molécula compleja, integrante de los cromosomas, que almacena la información hereditaria en forma de variaciones en la secuencia de las bases de purina y pirimidina; esta información se traduce en la síntesis de las proteínas, por lo que es determinante de todas las características físicas y funcionales de las células y del organismo.

Actividad de Agua: Se refiere a la porción de agua disponible en un sustrato y que puede ser aprovechada por algún microorganismo.

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

Aflatoxinas: Micotoxinas producidas en pequeñas concentraciones por hongos del género *Aspergillus* spp., principalmente.

Agente oxidante: Agente químico que en reacciones electroquímicas gana electrones, provocando la oxidación de otro agente químico.

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.

Ácido ribonucleico (ARN): Ácido nucleico de cadena sencilla compuesto por los nucleótidos adenina, uracilo, guanina y citosina. En las células sirve como intermediario de

la información genética ya que copia ésta del ADN y en el citoplasma dirige la síntesis de proteínas según su secuencia de nucleótidos.

Biótico: Hace referencia a aquello que resulta característico de los organismos vivos o que mantiene un vínculo con ellos.

Bentonita: Arcilla de gran poder decolorante, de grano muy fino, del tipo de montmorillonita, que contiene bases y hierro utilizada en cerámica.

Biotransformación: Cualquier transformación química de una sustancia producida por organismos vivos o por preparaciones obtenidas de éstos. Conversión de un químico desde una forma a otra por un organismo biológico.

Carcinogénico: Habilidad de una sustancia para causar cáncer.

Cepa: Conjunto de microorganismos derivados de las múltiples divisiones de una célula inicial.

Citocromo P450 (sistema de): Encontrado en la mitocondria adrenal y en los microsomas hepáticos, es una cadena de transporte de electrones en la cual el componente terminal es el citocromo P450; este sistema participa en la detoxificación de sustancias extrañas por alterarlas para aumentar su solubilidad y facilitar la excreción. El término abarca un gran número de isoenzimas que son codificadas por una superfamilia de genes. *Término relacionado:* mono-oxigenasa, oxidasas de función mixta, reacciones de fase I.

Codex Alimentarius: Colección reconocida internacionalmente de estándares, códigos de prácticas, guías y otras recomendaciones relativas a los alimentos, su producción y seguridad alimentaria, bajo el objetivo de la protección del consumidor.

Conidio o espora: Mitosporas asexuales, que se forman a partir de una célula conidiógena o hifa fértil.

Conidióforo: Estructura de los hongos que se encarga de la producción asexual de miles de esporas llamadas conidios. Es una estructura morfológica característica de los hongos imperfectos.

Cuerpo fructífero: Esporocarpo multicelular de los hongos basidiomicetos y ascomicetos, sobre la que se forman otras estructuras y se producen las esporas en el estado reproductivo del ciclo de vida de los hongos.

Cromatografía líquida de alta presión (HPLC): Técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica.

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

Dosis letal media (DL50): Dosis, calculada estadísticamente, de un agente químico o físico (radiación) que se espera produzca la muerte del 50% de los organismos de una población bajo un conjunto de condiciones definidas.

ELISA (enzyme-linked immunosorbent 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.

Esclerocio: Masa compacta de micelio endurecido que contiene reservas alimenticias, capaces de sobrevivir a condiciones ambientales extremas

Fiálide: Célula terminal de conidióforo en forma de botella, que se une por su base a la Métula.

Genotipo: Conjunto de genes característicos de cada especie, vegetal o animal, es decir, son los genes en formato de ADN que un animal o vegetal recibe de herencia de parte de sus dos progenitores y que por tanto se encuentra conformado por las dos dotaciones de cromosomas que contienen la información genética del ser en cuestión.

Hifa: Filamento septado o no de tamaño microscópico, que reunido con otros filamentos forma el cuerpo vegetativo de los hongos.

Hepatotóxico: Sustancia nociva para las células del hígado.

Hongo: Organismo eucariota que pertenece al reino fungi.

Inmunosupresor: Sustancia química que produce la supresión del sistema inmunitario.

Metabolismo: Suma de todos los procesos químicos y físicos que tienen lugar en un organismo; en sentido más estricto, cambios físicos y químicos que sufre una sustancia en un organismo. Incluye la incorporación y distribución en el organismo de los componentes químicos, los cambios (biotransformaciones sufridas) y la eliminación de los compuestos y de sus metabolitos. *Término relacionado:* biotransformación.

Metabolito: Cualquier producto intermedio o final resultante del metabolismo. *Término relacionado:* biotransformación.

Métula: Célula de un conidióforo que lleva las fiálides.

Micotoxicosis: Trastornos en la salud de animales y personas producidos por la ingestión o inhalación de una o varias micotoxinas.

Micotoxina: Metabolito secundario tóxico, de composición variada, producidos por organismos del reino fungi; suele referirse a sustancias tóxicas producidas por hongos que afectan a animales vertebrados en bajas concentraciones.

Monooxigenasas, citocromo P450: Enzimas que usan O_2 e incorporan un átomo de oxígeno dentro de un sustrato y reducen el otro átomo a agua; importante en la síntesis de hormonas esteroides y tirosina, también conocido en la destoxificación de compuestos xenobióticos.

Mutagénico: Cualquier sustancia que puede inducir cambios heredables (mutaciones) en el genotipo de una célula como consecuencia de alteraciones o de pérdida de genes o de cromosomas o de parte de los mismos. Perturba a la secuencia de bases del ADN y causa una mutación; con frecuencia son químicos pero pueden también ser fuentes de energía tales como la luz ultravioleta.

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 total mezclada: 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.

Susceptibilidad: Condición en la que existe una disminución de la resistencia de un individuo frente a determinada enfermedad o intoxicación, y que se experimenta con dosis a exposiciones inferiores a las habitualmente nocivas para el resto de la población.

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

Teratogénico: Agente que por administración a la madre en periodo prenatal induce malformaciones estructurales o defectos en la descendencia.

Toxicidad: Capacidad para producir daño a un organismo vivo, en relación con la cantidad o dosis de sustancia administrada o absorbida, la vía de administración y su distribución en el tiempo (dosis única o repetidas), tipo y severidad del daño, tiempo necesario para producir éste, la naturaleza del organismo afectado y otras condiciones intervinientes.

Unidad de Producción Lechera: Sistema productivo que se basa en la explotación de ganado productor de leche, cuyos elementos son: tamaño del hato, nivel de capacitación, nivel de producción, nivel de tecnología y eficiencia productiva.

Zeolita o Ceolita: Minerales aluminosilicatos que se caracterizan por su capacidad de hidratarse y deshidratarse reversiblemente.

8. REFERENCIAS

- Abousadi, A.; Rowghani, M. and Honarmand, E. 2007. The efficacy of various additives to reduce the toxicity of aflatoxin B₁ in broiler chicks. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 8: 144–150.
- Agrios, G., N. 2006. Fitopatología Agraria. 2ª edición. Editorial México Limusa. pp 101-130.
- Alonso, V., A.; González, M., L.; Armando, M., R.; Dogi, C., A.; Dalcerro, A., M.; Rosa, C., A.; Chiacchiera, S., M. and Cavaglieri, L., R. 2011. Aflatoxins-Detection, Measurement and Control. Ed. Dr Irineo Torres-Pacheco: InTech, p. 364.
- Alonso, V., A.; Pereyra, C., M.; Keller, L., A., M.; Dalcerro, A., M.; Rosa, C., A., R.; Chiacchiera, S., M. and Cavaglieri, L. R., 2013. Fungi and mycotoxins in silage: an overview. *Journal of Applied Microbiology*, ISSN 1364-5072.
- Amaiike, S. and Keller, N., P. 2011. *Aspergillus flavus*. The *Annual Review of Phytopathology*. 49:107–33.
- Armano, M., R.; Pizzolitto, R. P.; Dogi, C., A.; Cristofolini, A., Merkis, C., Polini, V., Dalcro, A.M., and Cavaglieri, L.R., 2012, Adsorption of ochratoxin A and zearalenone by potential probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains and its relation with cell wall thickness. *Journal of Applied Microbiology*. 113: 256-264.
- Arrieta, D., Pérez-Arévalo, M. L. Gómez, C., Ascenio, E., Irausquin, B. y Molero, G. 2006. Efecto del consumo de cultivo de Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y/o selenio en pollos de engorda expuestos a bajos niveles de aflatoxina B₁ en la dieta. *Revista Científica*. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela. Vol. XVI. 6: 613-621.
- Arrieta, D.; Pérez-Arévalo, M., L.; Luengo, A.; Hernández, J., P.; Lista-Alves, D. y Mosquera, J. 2007. Alteraciones histológicas hepáticas e incremento de proteínas séricas en pollos de engorde alimentados con dietas suplementadas con *Saccharomyces cerevisiae*. *Investigación Clínica*. 48: 431–443.
- Arzandehe, S. and Jinap, S. 2011, Effect of initial aflatoxin concentration, heating time and roasting temperature on aflatoxina reduction in contaminated peanuts and process optimization using response surface modelling. *International Journal of Food Science & Technology*. 46: 485-491.

- Astoreca, A.; Vaamonde, G.; Dalcero, A.; Marin, S. y Ramos, A. 2014. Abiotic factors and their interactions influence on the co-production of aflatoxin B1 and cyclopiazonic acid by *Aspergillus flavus* isolated from corn. *Food Microbiology*. 38: 276-283.
- Barnett, H., L. and Hunter, B., B. 2000. *Illustrated genera of imperfect fungi*, Ed. Freedom Palestine: p. 94-95.
- Bauza, R. 2007. Las micotoxinas, una amenaza constante en la alimentación animal. IX Encuentro de Nutrición y Producción en Animales Monogástricos. Montevideo, Uruguay.
- Basilisco, J., C. 2001. Hongos toxicogénicos y micotoxinas. *Revista de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral*. 5: 201-208.
- Baurhoo, B.; Goldflus, F.; Zhao, X. 2009. Purified cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* increases protection against intestinal pathogens in broiler chickens. *International Journal of Poultry Science*, 8: 133–137.
- Bennett, J., W. and Klich, M. 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*. 16: 497-516.
- Benites, V.; Gilharry, R.; Gernat, A., G. and Murillo, J., G. 2008. Effect of dietary mannan oligosaccharide from Bio-Mos or SAF-Mannan on live performance of broiler chickens. *Journal of Applied Poultry Research*. 17: 471–475.
- Binder, E. 2007. Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. *Animal. Feed Science and Technology*. 133: 149-166.
- Bíro, D.; Juráček, M.; Kačániová, M.; Šimko, M.; Gálik, B.; Micháľková, J. and Gyöngyová, E. 2009. Occurrence of microscopic fungi and mycotoxins in conserved high moisture corn from Slovakia. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 16: 227-232.
- 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.
- Bogantes, P.; Bogantes, D. y Bogantes, S., 2004. AF. *Acta Médica Costarricense*, 46:174-178.

- Brand, M., E.; Lockhart, S., R. and Wamock, D., W. 2011. Laboratory Aspects of Medical Mycology. En Kauffman, C. A., Pappas, P. G., Sobel, J. D. and Dismukes. *Essentials of Clinical Mycology*. pp 3-26.
- Bucio, A., M.; Guzmán, D., and Peña. 2001. Aflatoxin synthesis in corn fields in Guanajuato, México. *Revista Iberoamericana de Micología*. 18: 83-87.
- Canafoglia, M.; Comerio, R.; Fernández, V. y Vaamonde, G. 2007. Hongos toxicogénicos contaminantes en frutos de alpataco. *Revista Iberoamericana de Micología*. 24: 56-58.
- Carrillo, L. 2003. Microbiología Agraria. Universidad Nacional de Salta. pp 1-11.
- CAST, Council for Agricultural Science and Technology. 2003. Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems. Report 139. Ames, IA.
- Céspedes, A. 1997. Desarrollo y estandarización de tres técnicas analíticas por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y determinación de los niveles de contaminación con Aflatoxinas zearalenona y ocratoxina A en materias primas y alimento terminado empleado para la nutrición de aves y cerdos en Colombia. *Trabajo de grado en Salud y producción animal*. Universidad Nacional de Colombia.
- Celýk, K.; Denlý, M. and Savas, T. 2003. Reduction of toxic effects of aflatoxin B₁ by using baker yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in growing broiler chicks diets. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 32: 615-619.
- Chavarria, H. y Bernal, G. 2000. El Ensilaje en la Alimentación del Ganado Vacuno. Editorial: Tercer Mundo Editores. pp 1-117.
- Chi, F. and Broomhead, J. 2009. Mycotoxins a Dairy Cattle. *A Review for Dairy Producers*. 1-5.
- Chu, F., S. 1992. Recent progress on analytical techniques for mycotoxins in feedstuffs. *Journal of Animal Science*. 70: 3950-3963.
- Codex Alimentarius*, 193-1995, 2010. CODEX GENERAL STANDARD For Contaminants and Toxins, Codex Standard.
- Codex Alimentarius*, 2012. Prevention and Reduction of Food and Feed contamination. World Health Organization Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Daković, A.; Tomasević-Canović, M.; Dondur, V.; Rottinghaus, G., E.; Medaković, V. and Zarić, S. 2005. Adsorption of mycotoxins by organozeolites. *Colloids and*

Surfaces B: Biointerfaces, 46: 20-25.

- Daniel, J. H.; Lewis, L. W., Reedwood, Y. A.; Kieszak, S.; Breiman, R. F.; Flanders, W., D.; Bell, C., Mwihi, J.; Ogana, G.; Likimani, S.; Straetemans, M. and McGeehin, M., A. 2011. Comprehensive Assessment of Maize Aflatoxin Levels in Eastern Kenya, 2005-2007. *Environmental Health Perspectives*. 119: 1794-1799.
- Deshpande, S. S., 2002. *Handbook of Food Toxicology. Fungal Toxins*. Ed. Marcel Dekker, Inc.:New York, Basel, p.p 387-456
- 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.
- Diaz, D., Hagler, W., Hopkins, B. and Whitlow, L. 2002. Aflatoxin Binders I: *In vitro* binding assay for aflatoxin B1 by several potential sequestering agents. *Mycopathologia*. 156:223-226.
- Díaz, G. 1995. Regulación de niveles máximos tolerables de micotoxinas en materias primas y alimentos terminados. *Veterinaria al día*. 1: 22-27.
- Díaz, G. 2005. Aflatoxina M1: un carcinógeno de potencial presencia en la leche. Grupo Conciencias COL0010403. *Seminario Nacional en Producción y Sanidad Bovina*. Bogota, Colombia.
- Díaz G., Smith, T. S., Boermans, H. J., Caballero, C., and Friendship, R. 2010. Effects of feeding diets naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on protein metabolism in late gestation and lactation of first-parity sows. *Journal of Animal Science*. 88: 998-1008.
- Domínguez, Omar y Pérez Gerardo. ¿La mesa central de México es una provincia biogeográfica? Análisis descriptivo basado en componentes bióticos dulceacuícolas. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 2009, 8:835-852.
- Dorokhin, D., Haasnoot, W., Franssen, M., Zuilhof, H., Nielen, M. 2011. Imaging surface Plasmon resonance for multiplex microassay sensing of mycotoxins. *Anal Bioanal Chem*. 400: 3005-3011.
- 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*, 91:4261-4271.

- Duarte, S., Villamil, L., 2006. Micotoxinas en salud Pública. *Revista de Salud Pública*. 8: 129-135.
- Ehrlich, K. C. Non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* to prevent aflatoxin contamination in crops: advantages and limitations. 2014. *Frontiers in Microbiology*. Doi: 10.3389/fmicb.2014.00050.
- Ehrlich, K. and Yu, J. 2010. Aflatoxin-like Gene Clusters and How They Evolved. En Rai, M. and Varma, J. *Springer Science Mycotoxins in Food, Feed and Bioweapons*. pp 65-76.
- El Mahgubi, A. Puel, O., Bailly, S., Tadrict, S., Querin, A., Ouadia, A., Oswald, I.P., 2013. Distribution and toxigenicity of *Aspergillus* section *Flavi* in spices marketed in Morocco. *Food Control*. 32:143-148.
- Espíndola, S., 2006. Micotoxinas y Micotoxicosis en el Ganado Bovino Lechero. *Revista Chapingo Serie Zonas Aridas*. 5: 89-94.
- EUM-SS; Estados Unidos Mexicanos. Secretaría de Salud. 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-188-SSA1-2002. Productos y Servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones sanitarias. Diario Oficial de la Federación, Primera Sección (15-10-2002): 22-41. Tomado de la red mundial <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/188ssa12.html> [29 May 2015].
- European Commission. 2002. Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council of 7 May 2002 on undesirable substances in animal feed - Council statement. Off. J. Eur. Commun. L;140:10-22. 30/05/2002. Tomado de la red mundial <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32002L0032> [29 May 2015].
- FAO; Food and Agriculture Organization. Tomado de la red mundial <http://www.fao.org/ag/againfo/programmes/es/lead/toolbox/Refer/Glossary.htm> [13 Feb 2013].
- FAO; Food and Agriculture Organization. Castro, E. y Ahumada, F. Rol e importancia de las micotoxinas en nutrición acuícola Tomado de la red mundial. <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB482S/AB482S13.htm> [13 Feb 2013].
- FAO, Food and Agriculture Organization. 2003. 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.
- FAO, Food and Agriculture Organization. 2004. Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y las raciones en el año 2003. *Estudio FAO Alimentación y nutrición 81*, Organización de las Naciones Unidas Para la Agricultura y la Alimentación, Roma, Italia.
- FAO, 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.
- Fink, J., 1999. Micotoxins: Their implications for Human and Animal Health. *The Veterinary Quarterly*. 21: 115-135.
- Fink, J. 2008. Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: A review. *Food Additives and Contaminants*. 25: 172-180.
- Flores, C., M., Hernández, L., B. y Vázquez, J. 2006. Contaminación con micotoxinas en alimento balanceado y granos de uso pecuario en México en el año 2003. *Técnica Pecuaria*, 44: 247-256.
- 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.
- Gallo, A. and Masoero, F. 2010. In vitro models to evaluate the capacity of different sequestering agents to adsorb aflatoxins. *Italian Journal of Animal Science*. doi:10.4081/ijas.2010.e21.
- Galvano, F., A. Piva, A. Ritieni, G. Galvano, 2001. Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins: a review. *Journal Food Protocol*, 64: 120-131
- García, S. y Heredia, N. 2006. Mycotoxins in Mexico: Epidemiology, management, and control strategies. *Mycopathologia*. 162: 255-264. DOI 10.1007/s11046-006-0058-1.
- Geiser, D., Pitt, J. I. and Taylor, J. W., 1998. Cryptic speciation and recombination in the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus flavus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95: 388-393.
- Geiser, D., M.; Dorner, J., W.; Horn, B., W. and Taylor, J., W. 2001. The Phylogenetics of Mycotoxin and Sclerotium Production in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genetics and Biology*. 31: 169-179.

- Grenier, B. and Applegate. 2013. Modulation of Intestinal Functions Following Mycotoxin Ingestion: Meta-Analysis of Published Experiments in Animals. *Toxins*. 5: 396-430.
- Guengerich, F., P.; Arneson, K., O.; Williams, K., M.; Deng, Z. and Harris, T., M. 2002. Reaction of aflatoxin B₁ oxidation products with lysine. *Chemical Research in Toxicology*, 15: 780–792.
- Guzman de Peña, D., 2007. La exposición a la Aflatoxina B₁ en animales de laboratorio y su significado en la salud pública. *Salud Pública de México*. 49: 227-235.
- Gremmels, F. J., 2008a. Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: A review. *Food Additives and Contaminants*, 25: 172-180.
- Gremmels, F. J., 2008b. The role of mycotoxins in the health and performance of dairy cows. *The Veterinary Journal*, 176: 84-92.
- Gross, K., and Eaton, D. L. 2012. Dietary modulation of the biotransformation and genotoxicity of aflatoxina B1. *Toxicology*. 299: 69-79.
- Hernández, S., Reyes, M. A., García, J., G., Mayek, N. Y Reyes, C., A. 2007. Incidencia de hongos potencialmente togígenos en maíz (*Zea mays* L). Almacenado y cultivado en el norte de Tamaulipas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 25:127-133.
- Hruska, Z.; Rajasekaran, K.; Yao, H.; Kinkaid, R.; Darlington, D.; Brown, R.; Bhatnagar, D. and Cleveland, T. Co-inoculation of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus* to study fungal invasion, colonization, and competition in maize kernels. *Frontiers in Microbiology*. 2014. Doi: 10.3389/fmicb.2014. 00122.
- Huwig, A., Freimund, S., Kappeli, O. y Dutler, H., 2001. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicology Letters*, 122: 179-188.
- INEGI, Instituto Nacional de Geografía y Estadística. 2007. Los Bovinos en Aguascalientes, Censo Agropecuario 2007.
- 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.

- INIFAP, Instituto Nacional de Investigación Forestales, Agrícolas y Pecuarias. 2015. Tomado de la red mundial <http://clima.inifap.gob.mx/redinifap/est.aspx?est=26774> [27 May 2015.]
- Ismail, B., Reuhs, B. L. and 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.
- Jeonga, J. S., Leea, J. H., Simizua, Y., Tazakib, H., Itabashia, H. and Kimuraa, N. 2010. Effects of the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol on in vitro rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*. 162: 144-148.
- Juijuang, Y.; Nierman, W., C.; Bennett, J., W.; Cleveland, T., E.; Bhatnagar, D., Campbell; D., C.; Deand, R., A. and Payne, G. 2010. Genetics and genomics of *Aspergillus flavus*. *Progress in Mycology*. Springer Science. DOI: 10.1007/978-90-481-3713-8.
- Jiang, W., Wang, Z., Nölke, G., Zhang, J., Niu, L., Shen, J., 2012. Simultaneous Determination of Aflatoxin B₁ and Aflatoxin M₁ in food Matrices by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Food Analytical Methods*. 10: 1007/s 12161.
- Juan, C., Soriano, J.M. and 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. and Xiao-ou, S., 2010. Binding Capacity for Aflatoxin B₁ 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. and Varma, J. *Springer Science Mycotoxins in Food, Feed and Bioweapons*. pp 208-234.
- Kamdern, L., K.; Meineke, I.; Godtel-Armbrust, U. Brockmoller, J. and Wojnowski, L. 2006. Dominant contribution of P450 3A4 to the hepatic carcinogenic activation of aflatoxin B₁. *Chemical Research in Toxicology*, 19: 577-586.
- Keller, L., A., M. González, M.,L. Keller, K.,M. Alonso, V., A. Oliveira, A., A. Almeida, T., X. Barbosa, T.,S. Nunes, L., M., T. Cavaglieri, L.R., Rosa, C.A.R. 2013. Fungal and mycotoxins contamination in corn silage: Monitoring risk before and fermentation. *Journal of Stored Products Research*. 52:42-47.
- Klich, M. A. 2007. Environmental and developmental factors influencing aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Mycoscience*. 48:71-80. DOI: 10.1007/s10267-006-0336-2.

- Klein P., J., Van Vleet T., R., Hall J., O., Coulombe Jr RA. 2003. Effects of dietary butylated hydroxytoluene on aflatoxin B₁-relevant metabolic enzymes in turkeys. *Food Chemical Toxicology*, 41: 671–678.
- Kong,W., Wei, R., Logrieco, A., F., Wei, J., Wen, J., Xiao, X. and Yang, Y. 2014. Occurrence of toxigenic fungi and determination of mycotoxins by HPLC-FLD in functional foods and spices in China markets. *Food Chemistry*. 146: 320-326.
- Kralj, I.C. and Prosen, H., 2009. An Overview of Conventional and Emerging Analytical Methods for the Determination of Mycotoxins. *International Journal of Molecular Sciences*. 10: 62-115.
- Krijgsheld, P., Bleichrodt, R., van Veluw, G., J., Wang, F., Müller, W., H., Dijksterhuis, J., and Wösten, H., A., B. 2013. Development in *Aspergillus*. *Studies in Mycology*. 74:1-29.
- Lazo, R., y Sierra, G., 2008. Investigación del efecto de las micotoxinas en el ser humano. *Revista Iberoamericana de Micología*. 25: 7-11.
- Li, J., Suo, D. and Su, X. 2010. Binding Capacity for Aflatoxin B₁ by Different Adsorbents. *Agricultural Sciences in China*. 9: 449-456.
- EU-Legislation, Legislación de la Unión Europea. Tomado de la red mundial: http://europa.eu/legislation_summaries/food_safety/contamination_environmental_factors/l21290_es.htm# [10 Mar 2013].
- Lemus, D., Maniscalchi, M.T., Vera, R., De Freitas, J., Sangermano, A., 2007. Presencia de Aflatoxinas y Hongos aflatoxicogénicos en maíz amarillo tipo duro clase I de la zona nororiental de Venezuela. Saber, Universidad de Oriente, Venezuela. 19: 43-49.
- Levin, R. E., 2012. PCR detection of aflatoxin producing fungi and its limitations. *International Journal of Food Microbiology*. 156: 1-6.
- Lin, J. Q., Zhao, X. X., Wang, C. C., Xie, Y., Li, G. H. and He, Z. M. 2013. 5-Azacytidine inhibits aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus*. *Annals of Microbiology*. 63: 763-769.
- López, M., R., Solleiro, J., L., Nuñez, I. y Hernández, H. 1996. *Capacidad tecnológica de los sectores agrícola y agroindustrial de México*. México, Siglo XXI-IIIEC-UNAM, pp. 95–114.

- Marina, H., Mendes, M., M. and d`Almeida F.M. 2007. Occurrence of aflatoxin B1 in dairy cow's feed over 10 years in Portugal (1995-2004). *Revista Iberoamericana de Micología*. 24: 69-71.
- Martins, H. M., Marques, M., Almeida, I., Guerra, M. M., Bernardo, F. 2008. Mycotoxins in feedstuffs in Portugal: an overview. *Mycotoxin Research*. 24: 19-23.
- Martínez, H., Y., Hernández, S., Reyes, C., A. y Vázquez, G. 2013. El género *Aspergillus* y sus micotoxinas en el Maíz en México: Problemática y perspectivas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 31:126-146.
- Masoero, F., Gallo, A., Diaz, D., Piva, G. y Moschini, M. 2009. Effects of the procedure of inclusion of a sequestering agent in the total mixed ration on proportional aflatoxina M₁ excretion into milk of lactating dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*. 150: 34-45.
- McCormick, S. P., 2013. Microbial Detoxification of Mycotoxins. *Journal of Chemical Ecology*. 39: 907-918.
- Mier, T., Toriello, C., Ulloa, M., 2002. Hongos Microscópicos y Saprobios Parásitos: Métodos de Laboratorio. Instituto de Biología, UNAM. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Mobeen, M., Ahmad, M., Ali, A., Hamid, R., Javed, S. and Zainul M. 2014. Detection of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* from aflatoxin-contaminated peanuts and their differentiation using PCR-RFLP. *Annals of Microbiology*. DOI 10.1007/s13213-014-0803-5.
- Moore, G., G. 2014. Sex and recombination in aflatoxigenic *Aspergilli*: global implications. *Frontiers in microbiology*. Doi: 10.3389/fmicob.2014.00032.
- Murata, H., Yamaguchi, D., Nagai, A., and Shimada, N. 2011. Reduction of Deoxynivalenol Contaminating Corn Silage by Short-Term Ultraviolet irradiation: A Pilot Study. *Clinical Pathology*. 1059-1060.
- Murcia, R. 2010. Micotoxinas y Aflatoxina B1, un problema en salud animal. *Teoría y Praxis Investigativa*, 5: 71-78.2015.
- Ortega, A., Jaime, R. and Cotty, P. 2015. Aflatoxin-producing fungi in maize field soils from sea level to over 2000 masl: A three year study in Sonora, Mexico. *Fungal Biology*. 119: 191-200.
- OCDE-FAO, Organización para la Cooperación y el desarrollo Económicos –

- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura. 2010. Perspectivas Agrícolas 2010-2019, Cap. 9. OCDE/FAO 2010, ISBN: 978-92-64-08779-8.
- Paterson, R.R.M., Lima, M., 2011. Further mycotoxin effects climate change. *Food Research International*. 44: 2555-2566.
- Patterson, D. S., 1983. Aflatoxicosis in Farm Animals. *Veterinary Research Communications*, 7:135-140.
- Peralta MF, Miazzo RD, Nilson A. 2008. Levadura de cerveza (*Saccharomyces cerevisiae*) en la alimentación de pollos de carne. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 9: 1–11.
- Pérez, J., Gutiérrez, R., Vega, S., Díaz, G., Urbán, G., Coronado, M., y Escobar, A. 2008. Ocurrencia de aflatoxina M1 en leche cruda, ultrapasteurizada y orgánica, producidas y comercializadas en el altiplano mexicano. *Salud Animal*. 30:103-109.
- Pierre, J., 2007. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. *Animal Feed Science and Technology*. 137: 342-362.
- Pinotti, L., and Dell`Orto, 2011. Feed safety in the supply chain. *Biotechnology Agronomy Society*. 15: 9-14.
- Pitt, J. I. and Hocking, A.D. 2009. The ecology of fungal food spoilage. *Fungi and food spoilage*. Springer Science. DOI: 10.1007/978-0-387-92207-2.
- Pitt, J. I. and Hocking, A.D. 2009a. Aspergillus and related teleomorphs. *Fungi and food spoilage*. Springer Science. DOI: 10.1007/978-0-387-92207-2.
- Placinta, C., D'Mello, J., and Macdonald, A. 1999. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with Fusarium mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology* 78: 21-37.
- Probst, C., Bandyopadhyay, R. y Cotty, P., J. 2014. Diversity of aflatoxin-producing fungi and their impact on food safety in sub-Saharan Africa. *International Journal of Food Microbiology*. 174:113-122.
- 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 and Production*. 40: 649-656.
- Queiroz, O. C. M., Han, J. H., Staples, C. R., and Adesogan, A. T. 2012. Effect of adding a mycotoxin-sequestering agent on milk aflatoxin M1 concentration and the

- performance and immune response of dairy cattle fed en aflatoxina B1-contaminated diet. *Journal. Dairy Science*. 95: 5901-5908.
- Rahimi, E., Bonyadian, M., Rafei, M. y Kazemeini, H. R., 2010. Ocurrence of aflatoxin M1 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. *J Pharm Educ Res.*, 3: 22-30.
- Ramos, A. J., y Hernández, E. 1997. Adsorción in vitro de aflatoxinas mediante la utilización de compuestos adsorbentes: Montmorillonita. *Revista Iberoamericana de Micología*. 14:72-77.
- Raper, K., B. and Fennell, D., I. 1965. The Genus *Aspergillus*. pp 1-686.
- Reyes, W. P., Isaías, V. H., Rojo, F., Jiménez, C., de Lucas, E., Hernández, J., and Ramírez, A. 2008. Occurrence of fungi and mycotoxins in corn silage, Jalisco State, México. *Revista Iberoamericana de Micología*. 25: 182-185.
- Reyes, W., P., Martínez, S., P., Espinosa, V., H., I., Nathal-Vera, M., A., De Lucas, 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*. 47:223-230.
- Reyneri, A. 2006. The role of climate condition on micotoxina production in cereal. *Veterinary Research Communications*. 30: 87-92.
- Refojo, N., Duarte, E., Dignani, M. C., Hevia, A. I., Abrantes, R. A., Davel, G., Cantores, C., Frías, M. G., Acosta, G., Zuñoga, G., and Reyes M. R. 2013. Genotipificación de aislamientos clínicos de *Aspergillus flavus* y su relación con aislamientos ambientales de un centro oncohematológico. *Revista Iberoamericana de Micología*, 30: 25-30.
- Requena F, Saume E, León A. 2005. Micotoxinas: riesgos y prevención. *Zootecnia Tropical*, 23: 393–410.
- Rodríguez, P. 2011. Importancia de las aflatoxinas y Fumonisinias en Algunos Animales Domésticos. *Conexión Agropecuaria JDC*. 1(1): 37-44.
- Rodrigues, I., Hand, J., and Binder, E. M. 2011. Mycotoxin occurrence in commodities, feed ingredients sourced in the Middle East and Africa. *Food Aditives and Contaminants: Part B*. 1-12, iFirst.

- Rojo, F., Martínez, S. P., Isaías, V.H., Nhatal, M. A., De Lucas, E. y Reyes, W. P. 2014. Evaluación de adsorbentes para la reducción de aflatoxina M₁ en leche de vacas alimentadas con dietas contaminadas artificialmente con AFB₁. *Revista Mexicana Ciencia Pecuaria*, 5: 1-15.
- Roze, L. V., Hong, S. Y. y Linz, J. E., 2013. Aflatoxin Biosynthesis: Current Frontiers. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, 4: 293-311.
- Rokas, A., Payne, G., Fedorova, N., D., Baker, S., E., Machida, M., Yu, J., Georgianna, D., R., Dean, R., A., Bhatnagar, D., Cleveland, T., E., Wortman, J., R., Maiti, R., Joardar, V., Amedeo, P., Denning, D., W. and Nierman, W., C. 2007. What can comparative genomics tell us about species concepts in the genus *Aspergillus*?. *Studies in Mycology*. 59:11-17. doi:10.3114/sim.2007.59.02.
- Roze, L. V., Hong, S. Y. and Linz, J. E. 2013. *Aflatoxin Biosynthesis: Current Frontiers. The Annual Review of Food Science and Technology*, 4: 293-311.
- Ross, R. K., Wogan, G. N., Groopman, J. D. and Yuan, J. M., 1992. Urinary aflatoxina biomarkers and risks of hepatocellular carcinoma. *The Lancet*, 339:943-46.
- Ruadrew, S., Craft, J. and Aidoo, K. 2013. Occurrence of toxigenic *Aspergillus* spp. and aflatoxins in selected food commodities of Asian origin sourced in the West of Scotland. *Food and Chemical Toxicology*. 55:653-658.
- Russel, R., and Lima, N., 2010. How will climate change affect mycotoxins in food?. *Food Research International*. 43:1902-1914.
- Sabater, M., Malekinejad, H., Selman M., H., Doelen V., D. and Fink, J. 2007. In vitro assessment of adsorbents aiming to prevent deoxinivalenol and zearalenone mycotoxins. *Mycopathologia*. 163: 81-90.
- SAGARPA, Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural Pesca y Alimentación. 2013. Sistema de producción de leche en granjas bovinas familiares. Subsecretaría de Desarrollo Rural, Dirección General de Apoyos para el Desarrollo Rural. Tomado de la red mundial <http://www.sagarpa.gob.mx/desarrolloRural/Documents/fichasaapt/Sistema%20de%20producci%C3%B3n%20de%20leche%20en%20granjas%20bovinas%20familiares.pdf> [14 May 2013].
- Samson, R., A., Visagie, C., M., Houbraken, J., Hong, S., B., Hubka, V., Klaassen, C., H., W., Perrone, G., Seifert, K., A., Susca, A., Tanney, J., B., Varga, J., Kocsub, S.,

- Szigeti, G., Yaguchi, T. and Frisvad, J., C. 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*. 78:141-173.
- Santibañez, R., Hernández, M., Montañez, O.D., Tapia, J.M., 2001. Identificación y cuantificación de hongos micotoxigénicos en alimento para bovinos. *Ciencia y Tecnología*. 4: 19-23.
- Scott PM. 1995. Natural toxins. *Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemistry*, 49: 1–30.
- SE, SECRETARÍA DE ECONOMÍA, 2012. Dirección General de Industrias Básicas. Análisis del Sector Lácteo en México. Tomado de la red mundial www.economia.gob.mx/files/comunidad.../ analisis_sector_lacteo.pdf, 07/03/13 [12 Mar 2015]
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2013. Tomado de la red mundial <http://www.siap.gob.mx/opt/123/86/85.html> [13 Feb 2015]
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2013. Tomado de la red mundial http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=350. <http://www.siap.gob.mx/opt/123/86/85.html> [13 Feb 2015]
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2014. Tomado de la red mundial <http://www.siap.gob.mx/wp-content/uploads/boletinleche/bboletleche1trim2014.pdf> [30 Abr 2015]
- Soares, C., Calado, T., Venâncio, A. 2013. Mycotoxin production by *Aspergillus niger* aggregate strain isolated from harvested maize in three Portuguese regions. *Revista Iberoamericana de Micología*. 30: 9-13.
- Soares, C., Rodrigues, P., Peterson, S., Lima, N. and Venâncio, A., 2012. Three new species of *Aspergillus* section Flavi isolated from almonds and maize in Portugal. *The Mycological Society of America*. 104: 682-697.
- Stanley VG, Winsman M, Dunkley C. Ogunleye T, Daley M, Krueger WF, Sefton AE, Hinton A. 2004. The impact of yeast culture residue on the suppression of dietary aflatoxin on the performance of broiler breeder hens. *Journal Applied of Poultry Science*, 13: 533–539.
- Steyn, P. S., and Stander, M. A. 1999. Mycotoxins as causal factors of disease in humans. *Journal Toxicol – Toxin Review*. 18: 229-243.

- 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 Acuícola X-Memorias del Décimo Simposio Internacional de Nutrición Acuícola*. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México. 8-10 de Noviembre. p 514-546.
- Takayama, H., N. Shimada., O. Mikami, H. Murata., 2005. Suppressive effect of deoxynivalenol, a *Fusarium* mycotoxin, on bovine and porcine neutrophil chemiluminescence: An in vitro study. *J Vet Med Sci* (67), 531-533.
- Theumer, M., Mary, V., Arias, S., Rubinstein, H., 2012. Mecanismos de toxicidad de fumonisina B₁ en células animales y vegetales. *Revista Biociencia*. 3:32-44.
- Upadhaya, S. D., Park, M. A. y Ha, J. K., 2010. Mycotoxins and Their Biotransformation in the Rumen: A Review Asian-Aust. *J. Animal Science*, 23: No. 9: 1250 – 1260.
- Urrego, J. R. y Díaz, G. J. 2006. Aflatoxinas: Mecanismos de toxicidad en la etiología de cáncer hepático celular. *Revista de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia*. 54: 108-116.
- US-FDA, United States of America-Federal Drug Agency, Office of Regulatory Affairs (ORA), 1994. Compliance Policy Guides (CPG) 7126.33 Sec. 683.100 - Action Levels for Aflatoxin in Animal Feeds, Issued Nov 21, 1979, reissued Oct 1, 1980, Revised Aug 15, 1982, May 18, 1989, and Aug 28, 1994. Tomado de la red mundial <http://www.fda.gov/ICECI/ComplianceManuals/CompliancePolicyGuidanceManual/ucm074703.htm> [29 May 2015].
- Valdivia, A., G., Ortiz R., Quezada, T., De Luna M., C., Martínez, A., Moreno, E. 2010. Aflatoxin production for two Mexican strains of *Aspergillus flavus* in immature corn grains. *Toxicology Letter*, 196S:340–1.
- 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. R., Sánchez, J., Tenorio, M. G., Deng, Y., Waliszewski, S. M., and Valera, M.A. 2012. Preventive Strategies Aimed at Reducing the Health Risks of Aflatoxin B₁. *Toxicology Environmental Health Science*, 4: 71-79.

- Varga, E., Glauner, T., Köppen, R., Mayer, K., Sulyok, M., Schuhmacher, R. Krska, R., Berthiller, F. 2012. Stable isotope dilution assay for the accurate determination of mycotoxins in mize by UHPLC-MS/MS. *Anal Bional Chem*, 402: 2675-2686.
- Varga, J., Frisvad, J., C. and Samson, R., A. 2011. Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. *Studyes in Mycology*. 69:57-80. doi:10.3114/sim.2011.69.05.
- Wang C, Bammler TK, Guo Y, Kelly EJ, Eaton DL. 2000. Mu-class GSTs are responsible for aflatoxin B₁-8,9-epoxide-conjugating activity in the nonhuman primate macaca fascicularis liver. *Toxicology Science*, 56: 26–36.
- Williams JH, Phillips TD, Jolly PE, Stiles JK, Jolly CM, 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.
- Yu, J. 2012. Current Understanding on Aflatoxin Biosynthesis and Future Perspective in Reducing Aflatoxin Contamination. *Toxins*. 4:1024-1057.
- Zaghini A, Martelli G, Roncada P, Simioli M, Rizzi L. 2005. Mannanoligosaccharides and aflatoxin B₁ in feed for laying hens: effects on egg quality, aflatoxins B₁ and M₁ residues in eggs, and aflatoxin B₁ levels in liver. *Poultry Science*, 84: 825–832.
- Yang Y, Iji PA, Kocher A, Mikkelsen LL, Choct M. 2007. Effects of mannanoligosaccharide on growth performance, the development of gut microflora, and gut function of broiler chickens raised on new litter. *Journal of Applied Poultry Research*, 16: 280–288.
- Zaki, M. M., Shaheen, H. M. y Rizzi, L., 2012. Mycotoxins in animals: Occurrence, Effects, Preventionand Management. *Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences*, 4: pp. 13-28.
- Zhang, M., Yu, X., Wang, Y., Hu, Y., Liu, S., 2012. A highly Sensitive Indirect Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ic-ELISA) by Antigen Coating for Diethyl Phthalate Analisis in Foods. *Food Analytical Methods*, 10:1007/s 12116.
- Zinedine, A., 2007. "Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An estrogenic mycotoxin". *Food and Chemical Toxicology*, 1-18.

ANEXOS

Anexo	Contenido
A	Formato para la realización de los Monitoreos
B	Productos comerciales empleados como adsorbentes de Aflatoxinas en las UPL
C	Técnica de ELISA para la cuantificación de aflatoxinas totales
D	Cuantificación de aflatoxinas por Cromatografía Líquida de alta precisión (HPLC)
E	Cuantificación de AFM ₁ con el método de ELISA para muestras de leche cruda
F	Técnica de Cromatografía de Capa Fina (TLC) en aislados de <i>Aspergillus spp.</i> (AOAC 972.26) para la extracción e identificación de aflatoxinas
G	Técnica de vaciado en placa por diluciones para el aislamiento de hongos microscópicos
H	Tinción con azul de lactofenol para identificación de hongos microscópicos
I	Técnica de Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) para la identificación de especies de hongos del género <i>Aspergillus</i> .
J	Claves taxonómicas para la identificación de especies de hongos <i>Aspergillus</i>

ANEXO A. Formato para la realización de los Monitoreos

 UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE AGUASCALIENTES		<h1>MONITOREO</h1>			 SE LUMEN PROFERRE	
RESPONSABLE: <input type="text"/>			FECHA: <input type="text"/>			
I. ALIMENTO INDICACIÓN: DONDE HAYA CAMBIOS ANOTE EL NUEVO VALOR.						
JUDIO						
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 Destileria						
Semilla de algodón						
Px Ordeña						
Soya Plus						
Pasta de soya						
Secuestrante (Mycoad ZT)						
Secuestrante (Mycoad ZT) (kg/ton)						
Total						
TEPETATILLO						
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 (si)
	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					
Glucmiel					
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 B. Productos comerciales empleados como adsorbentes de Aflatoxinas en las UPL

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:** Bentonita, silica y cristales de cuarzo.
- **Indicaciones:** Astra Ben 20A (AB 20A) es un poderoso secuestrante de micotoxinas elaborado a base de bentonitas 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.
- **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^{ra} 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 B₁ (AFB₁), Ocratoxina (OTA), Deoxinivalenol (DON, vomitoxina), Toxina T-2 (T-2), Fumonisina B₁ (FB₁).
- **Dosis recomendada por el fabricante:** De 10 a 20 g/vaca/día
- **Vía de administración:** Oral mezclado en el alimento terminado.

MYCOSORB^{MR}

- **Nombre comercial:** MYCOSORB^{MR}.
- **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, mézclese con el alimento balanceado.

CAPTURE ®

- **Nombre comercial:** Capture ®
- **Laboratorio:** Nuba Comercial, RB Nutrition.
- **Composición:** Aluminosilicatos de última generación adicionado de paredes celulares.
- **Dosis recomendad 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 toxinas de Fusarium.
- **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), Fumonisin, Zearalenona, Citrinina, Ocratoxina A, Aflatoxinas, 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, Fumonisin y Tricoticonos 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.

REG. SAGARPA. Q-7356-007.

- **Nombre comercial:** Duotek.
- **Laboratorio:** IASA
- **Descripción:** Organoaluminosilicato adsorbete de micotoxinas de inclusión media.
- **Fórmula:** 4.3 gr de K₂O, 1.8 gr de Na₂O, 5.2 gr de CaO, vehículo c.b.p. 100 gr.
- **Indicaciones:** **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. **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.
- **Dosis y vía de administración:** 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. Oral, mezclado en el alimento.

- **Precauciones:** Consérvese en un lugar fresco y seco.
- **Advertencias:** 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 C. Técnica de ELISA para la cuantificación de aflatoxinas totales

De las muestras secas y molidas se pesaron cinco gr, posteriormente se agregaron 12.5 ml de metanol al 70% y se agitaron durante tres minutos, se filtraron sobre papel filtro con porosidad 1, se usaron 50 µl del filtrado para cada uno de los pocillos de la microplaca. Todos los reactivos se llevaron a temperatura ambiente (20-25°C / 68-77°F). Como tampón de lavado se usó un tampón PBS-Tween, el sobre completo del tampón se disolvió en un litro de agua destilada, este tampón se mantiene estable entre cuatro y seis semanas a una T° de 2 a 8°C (35-46°F). Los estándares de aflatoxina ya vienen listos para su uso.

Se pusieron los pocillos suficientes en el soporte de la microplaca para los estándares y las muestras que se analizaron. Se registró la posición de los estándares y las muestras en una hoja impresa donde se representa la microplaca. Se agregaron 50 µl de los estándares y de las muestras a analizar en los pocillos correspondientes, tomando la precaución de usar una punta nueva y estéril para cada estándar y cada muestra. Se agregaron 50 µl del conjugado aflatoxina-enzima a los pocillos correspondientes. Después se agregaron 50 µl del anticuerpo anti-aflatoxina a los pocillos correspondientes, se mezcló el contenido de la microplaca suavemente y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. El contenido de los pocillos se vació en un recipiente y con golpes enérgicos en el marco portapocillos (tres veces consecutivas) sobre un papel absorbente limpio se aseguró la eliminación completa de restos líquidos.

Se lavaron los pocillos con 250 µl de tampón de lavado utilizando una micropipeta multicanal y se vaciaron nuevamente los pocillos de la forma indicada anteriormente. Este paso se repitió dos veces más. Se agregaron 100 µl de sustrato/cromógeno a cada pocillo, mezclando el contenido de la microplaca suavemente y se incubó 5 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Se agregaron 100 µl de la solución stop a cada pocillo y se mezcló el contenido de la microplaca suavemente, se midió la absorbancia a 450 nm, para tomar esta lectura no se deben dejar pasar más de 10 minutos.

La lectura de las placas se realizó en un lector de microplacas (ELx800™, Bio Tek, EUA). Los resultados de la absorbancia se registraron y se calcularon usando el

software Ridasoft Win versión 1.8, la concentración de AFs correspondiente a la absorción se leyó directamente en la curva de calibración (Figura No. 29).

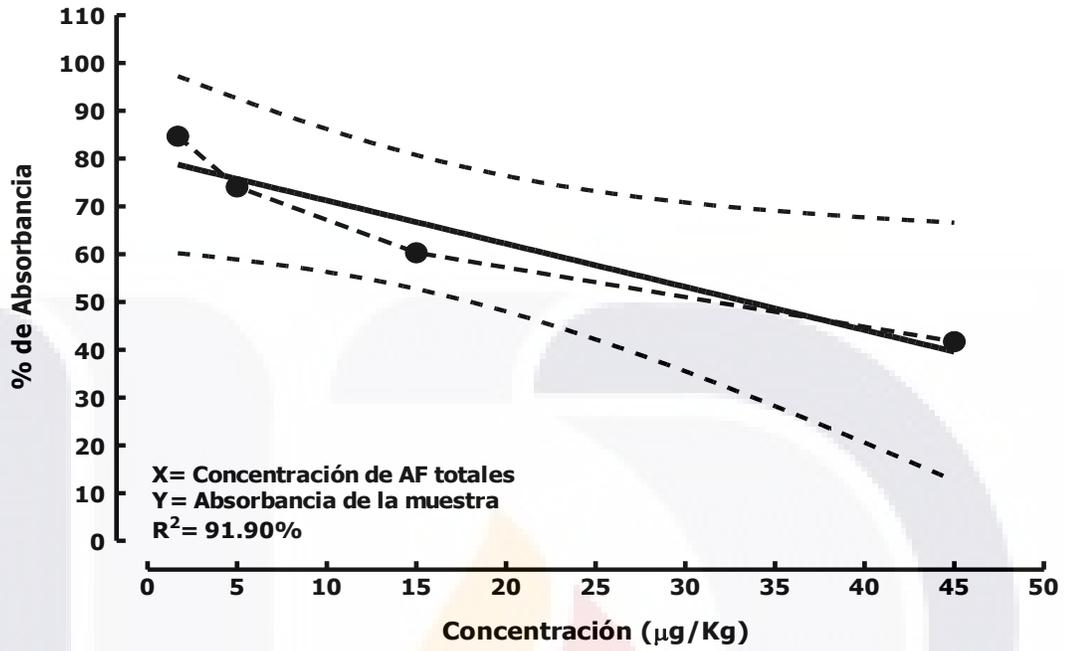


FIGURA No.29. Curva de estándar para aflatoxinas totales cuantificadas con ELISA

ANEXO D. Cuantificación de aflatoxinas por cromatografía líquida de alta precisión (HPLC)

Para extraer las aflatoxinas, se pesaron 50 g de muestra molida y se añadieron 100 mL de metanol:agua (4:1), se mezclaron en licuadora usando un vaso de acero inoxidable durante tres minutos, se filtraron sobre papel filtro de porosidad 1.

Se usaron tubos en fase sólida (Supelclean™ LC-18 SPE tube, Sigma-Aldrich, EUA). Se limpió el extracto con una mezcla de 1.0 mL del extracto filtrado con 4.0 mL de ácido acético en agua al 0.5%.

Se pasa a través de un tubo SPE de 1.0 mL, acondicionado con 2.0 mL de la solución de ácido acético en agua al 0.5%. Posteriormente la muestra se lavó con el siguiente procedimiento: 0.5 mL de tetrahidrofurano (THF) al 20% en ácido acético 0.5%, luego 2.0 mL de hexano, se seca al aire y luego se añaden 3.0 mL de THF al 25% en hexano y se seca. Se utiliza una solución de elución: 2 x 2.0 mL de cloruro de metileno: THF (99:1). El eluato se evapora del tubo SPE y se disuelve el residuo en 100 µL de metanol, luego se añaden 100 µL de ácido acético 0.5% en agua. Se derivatizó con ácido trifluoroacético y se inyectó en el sistema cromatográfico.

Equipo Perkin Elmer Series 2000, bajo las siguientes condiciones: columna (LC-18, USP LI), de 25 cm x 4.6 mm y empaque de 5.0 µm, con guarda columna (LC-18), 2.0 cm x 4.6 mm, mismo empaque, temperatura 25° C, fase móvil acetonitrilo: metanol: agua (22.5: 22.5: 55), flujo 1 mL por minuto, presión 6000 psig, UV visible con arreglos de diodos a 340 nm, volumen de inyección de muestra 20 µL, metanol: ácido acético 0.5% (1:1). Los cromatogramas se visualizaron con el software Total chrom Workstation versión 6.2.0.0.1.

Las muestras problema se procesaron por quintuplicado, se inyectaron en el sistema hasta obtener tres repeticiones consecutivas y se comparan contra estándares positivos, contra estándares negativos y contra una curva patrón de AFB₁ y su derivatizada AFB_{2a} (Figuras No. 30 y 31) (Scott, 1995).

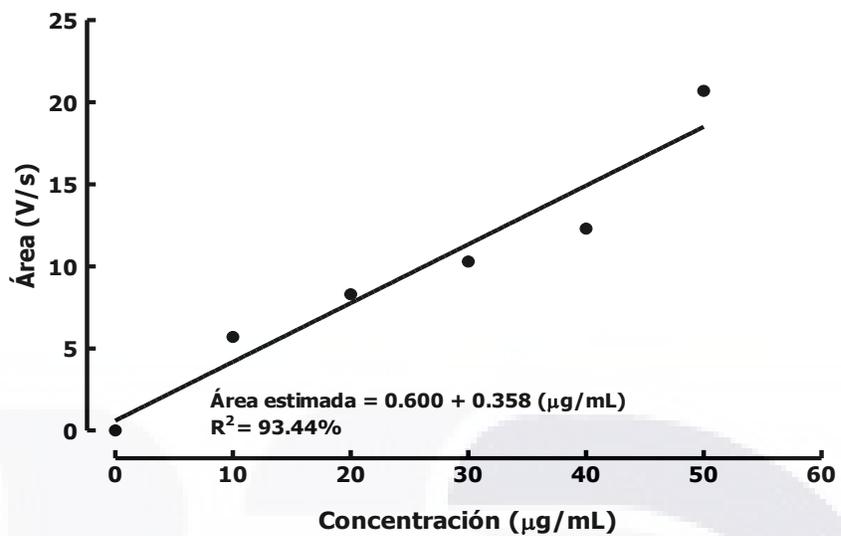


FIGURA No. 30. Curva de Calibración para HPLC

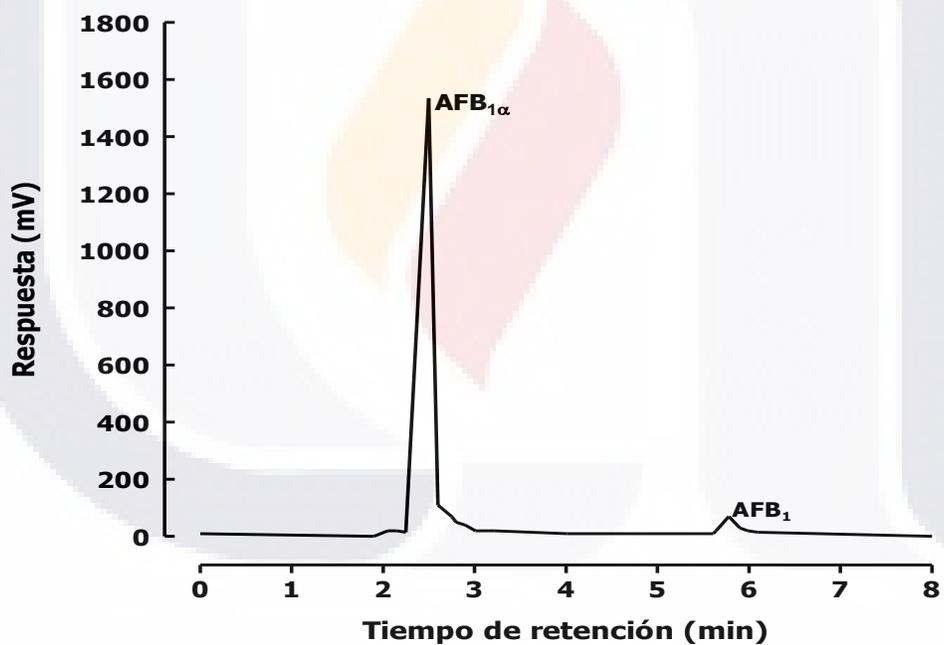


FIGURA No. 31. Cromatograma de AFB_1

ANEXO E. Cuantificación de AFM₁ con el método de ELISA para muestras de leche cruda

El Material necesario se enlista a continuación:

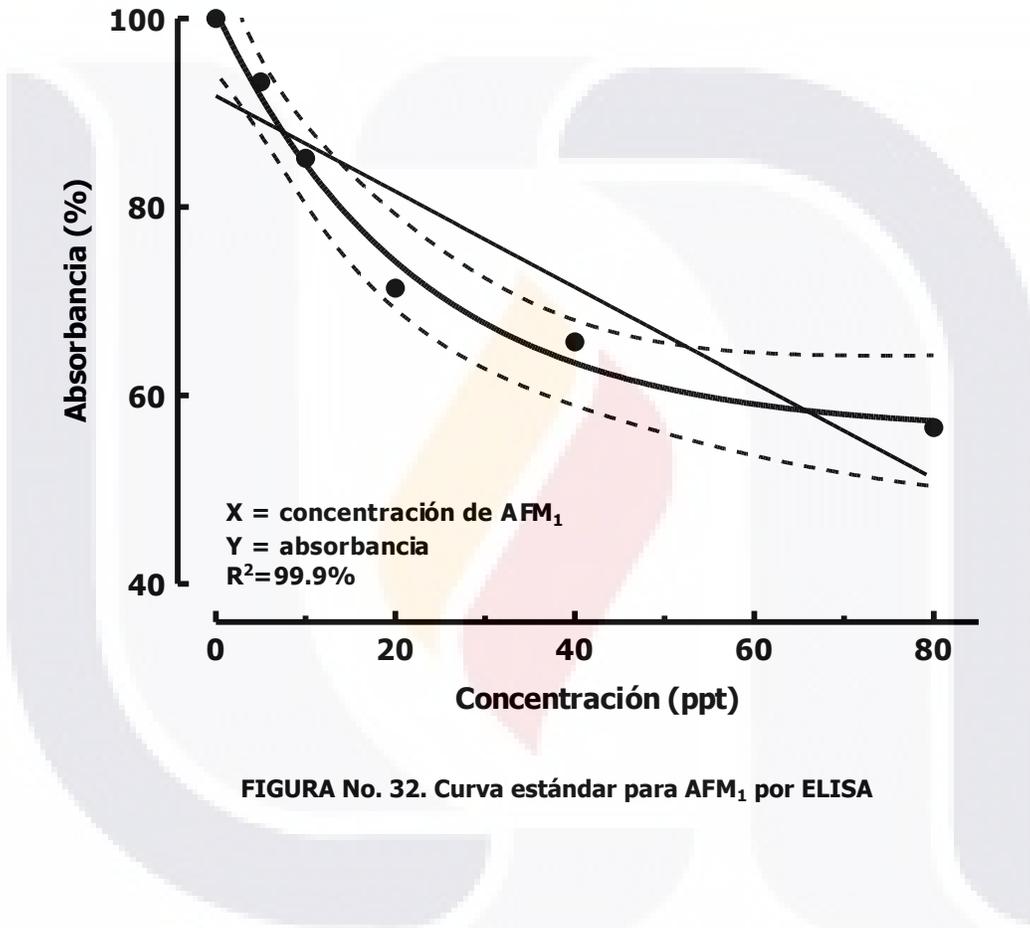
- Placas de 96 pozos recubiertos con anticuerpos anti- aflatoxina M1.
- Estándares de aflatoxina M1 con las siguientes concentraciones: 0.0 (estándar cero), 5.0, 10.0, 20.0, 40.0 y 80.0 ng/L.
- Conjugado enzimático (peroxidasa) con aflatoxina M1.
- Substrato/cromógeno, contiene tetrametilbencidina.
- 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 µL de anticuerpo diluido e incubar 15 min.
5. Eliminar los líquidos de la placa y lavarla con 250 µL de solución de lavado dos veces. Al final secar la placa con papel absorbente.
6. Agregar 100 µL de cada estándar por duplicado en la placa.
7. Agregar 100 µL 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 µL de solución de lavado dos veces. Al final secar la placa con papel absorbente.
10. Agregar 100 µL 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 µL de solución de lavado dos veces. Al final secar la placa con papel absorbente.
12. Agregar 100 µL de substrato/cromógeno a cada pozo. Agitar la placa e incubar durante 15 min a temperatura ambiente en oscuridad.

13. Agregar 100 μ 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 (Figura 32)



ANEXO E. Técnica de Cromatografía de Capa Fina (TLC) en aislados de *Aspergillus spp.* (AOAC 972.26) para la extracción e identificación de aflatoxinas

Bajo las medidas de seguridad recomendadas, dentro de una campana de extracción se fragmentó el medio de cultivo con el aislado y se colocó en un matraz erlenmeyer de 125 mL que se tapó con papel aluminio. Se agregaron 15 mL de metanol:agua (8:2), se homogeneizó por agitación durante aproximadamente 5 minutos.

El contenido del matraz se pasó a un tubo falcón de 50 mL para centrifugarse a seis mil rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se recuperó filtrándolo con papel filtro de porosidad chica en un tubo limpio. Se agregaron 5 mL de hexano, recuperando la fase hidrofílica en otro tubo limpio.

A la fase hidrofílica se le agregaron 5 mL de cloroformo, se agitaron durante 5 minutos, recuperando la fase del cloroformo para repetir nuevamente éste paso. En un tubo limpio se recuperaron 2.5 mL de la fase de cloroformo que se evaporaron a sequedad en baño María y se resuspendieron en 500 µL de cloroformo.

Para la realización de la cromatografía, las placas de sílica gel sin indicador de fluorescencia (Z265829, sigma-Aldrich, EUA) se activaron a 110°C en una estufa de alta temperatura (OF-22G JEOI-TECH, Lab Companion, Corea) durante 30 minutos.

En la placa cromatográfica se marcó la línea de origen (1.5 cm del borde inferior de la placa). Se colocaron 5 µL del estándar de AFB₁ sobre la línea de origen y del lado izquierdo (1^{er} carril). Se colocaron después 40 µL de cada muestra (una muestra por carril) sobre la línea de origen y con un espacio entre muestras de un cm aproximadamente.

Las placas con el estándar y las muestras se colocaron en una cámara cromatográfica con fase móvil cloroformo:acetona:isopropanol (85:10:5), dejando correr la fase móvil durante una hora y media. Se retiró la placa de la cámara y se secó a 100°C en una estufa de alta temperatura durante 10 minutos. La placa se visualizó bajo luz UV en un transiluminador para identificar la presencia o ausencia de manchas correspondientes a AFB₁ con respecto al estándar.

Toda la información se registró en una hoja de cálculo electrónica con el software Microsoft Excel para realizar los análisis estadísticos correspondientes.

ANEXO F. Técnica de vaciado en placa por diluciones para el aislamiento de hongos microscópicos (Santibañez y col., 2011).

En una balanza semi analítica (BBADAM PGW 453e, Adam Equipment, EUA), se pesaron 39 gr de papa dextrosa agar (PDA) (Bioxon[®], BD Becton Dickinson, EUA), se disolvieron en un litro de agua destilada, el preparado se agitó frecuentemente hasta su ebullición. Se esterilizó en autoclave a 16 libras de presión durante 15 minutos.

El medio estéril se vació dentro de una campana de flujo laminar vertical clase II tipo A2 (LVC-180, Luministell^{MR}, México), se limpió la superficie de la campana con alcohol, se introdujo el medio de cultivo PDA estéril, las cajas de petri estériles, un marcador permanente, tijeras, un atomizador con alcohol al 96% y algodón; todo el material requerido para vaciar el medio se dejó dentro de la campana de flujo laminar bajo luz ultravioleta (UV) durante 15 minutos.

Pasados los 15 minutos se vaciaron 15 ml del medio en cada caja de petri estéril, se dejaron enfriar durante 10 minutos dentro de la campana y se taparon, se almacenaron en refrigeración después de solidificado el medio, para su posterior uso. Se retiró el material utilizado y se limpió la superficie con alcohol al 96% y se bajó por completo la puerta de seguridad.

Se pesó un gr del polvo de peptona de caseína (Bioxon[®], BD Becton Dickinson, EUA) y se disolvió en un litro de agua destilada, se esterilizó en autoclave a 16 libras de presión durante 15 minutos, para tener una solución estéril de peptona de caseína al 0.1%.

Se pesaron 10 g de las muestras molidas, se diluyeron en 90 ml de peptona de caseína al 0.1% y se obtuvo una dilución de 1:10, de esta dilución se tomó un ml que se colocó en un tubo estéril con 9 ml de peptona de caseína al 0.1% y se obtuvo una dilución 1:100, de esta dilución se tomó nuevamente un ml que se depositó en un tubo estéril con 9 ml de peptona de caseína al 0.1% y se obtuvo una dilución 1:1000, finalmente se tomó un ml de esta dilución y se pasa a un tubo estéril con 9 ml de peptona de caseína al 0.1% y se obtiene una dilución final de 1:10000.

Se inocularon 500 μ l de cada dilución en una caja petri con PDA, las cajas se taparon, se sellaron con parafil y se incubaron a 27°C durante un periodo de 72 a 120 hrs.

Las cajas se revisaron diariamente y las observaciones se registraron en una bitácora. Se prepararon laminillas con la tinción de azul de lactofenol de las colonias fúngicas para identificar sus características morfológicas microscópicamente y poder determinar el tipo de hongo. Los criterios que se utilizaron para la identificación de hongos del género *Aspergillus*, se basó en las claves taxonómicas para esta especie descritas por Fennel y Raphel (1965).



ANEXO G. Tinción con azul de lactofenol para identificación de hongos microscópicos

Se limpió la campana de extracción con alcohol al 96%, se introdujeron los portaobjetos, los cubreobjetos, las agujas de disección, el gotero con azul de lactofenol y las cajas con PDA en las cuales se observó crecimiento fúngico.

Se dejó bajo luz UV durante 15 min, con ayuda del mechero se flamearon los portaobjetos después de pasarles una torunda con alcohol por ambas superficies, las colonias de hongos que crecieron en las cajas petri se identificaron con un número consecutivo, se colocó una gota de colorante de azul de lactofenol en el centro del portaobjetos previamente desinfectado, con la aguja de disección se tomó una porción de la colonia de interés y se colocó sobre la gota del colorante, extendiendo la preparación cuidadosamente con ayuda de otra aguja de disección y se cubrió con un cubreobjetos previamente esterilizado.

Las laminillas se identificaron con el número de la muestra en la que creció la colonia, el número de aislado, la fecha de preparación y las iniciales de quien realizó la preparación. Al terminar la preparación de laminillas, las cajas con los aislados se sellaron y se dejaron a temperatura ambiente, se retiró de la campana de extracción el material que se utilizó, se limpió la superficie con alcohol y se bajó por completo la puerta de seguridad.

Las laminillas se observaron al microscopio óptico (Carl Zeiss, Axiostar plus, EUA) con menor y mayor aumento: 10x y 40x respectivamente, se registró en una bitácora el género del aislado.

Los aislados que correspondieron al género *Aspergillus* se resemebraron bajo las mismas medidas de esterilidad en una caja de petri con PDA, para lograr su purificación. Una vez obtenidos los aislados puros se prepararon para ser procesados con la técnica de cromatografía en capa fina (TLC) e identificar la presencia o ausencia de aflatoxinas, la presencia de aflatoxinas nos indica la capacidad toxicogénica que tienen los hongos del género *Aspergillus* aislados de las muestras analizadas.

ANEXO H. Técnica de Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) para la identificación de especies de hongos del género *Aspergillus*.

Preparación de la Muestra. Bajo las medidas de seguridad recomendadas, se pasaron los aislados identificados como *Aspergillus* a una campana de extracción previamente estéril, con ayuda de una aguja de disección estéril se cortó un trozo de la colonia de aproximadamente 0.5 cm³, se colocaron en una placa de cultivo celular, se recubrieron totalmente con glutaraldehído al 2% y se dejaron en refrigeración 24 hrs para su fijación. Se extrajo por completo el glutaraldehído.

La deshidratación de la muestra se hizo usando alcoholes graduales; primero se recubrieron las muestras totalmente con alcohol al 60%, se dejó actuar el alcohol durante 15 minutos y se retiró por completo de la placa, nuevamente se recubrieron las muestras con alcohol, ahora a una concentración del 70%, se dejó actuar durante 15 minutos y se retira por completo. Esto se repite para cada alcohol, usando concentraciones de 80, 90, 96 y 100%.

Para completar el secado de las muestras, se sometieron a un secado por punto crítico dentro del secador de punto crítico (Samdri 795, Tousumis Research, Rockville, Maryland) durante cuatro minutos, el punto crítico se alcanzó a una temperatura de 31.1 °C y una presión de 1072 psi.

Montaje de las muestras. Las muestras 100% libres de humedad se colocaron sobre cintas de grafito adheridas a un cilindro de aluminio de 1cm x 1 cm y se colocaron en un metalizador para muestras (DESK II, DENTON VACUUM, EUA) durante 260 segundos, se recubrieron con oro y se obtuvo un espesor de 100 Å⁰.

Digitalización de imágenes. Los trozos de cultivo recubiertos con oro se colocaron dentro de la cámara de vacío del microscopio electrónico de barrido (JSM-5900 LV, JOEL, EUA) y se observaron bajo condiciones óptimas de 10 Kv de voltaje de aceleración, a una distancia de trabajo de 10 mm y a diferentes magnificaciones.

Las imágenes fueron capturadas con detector de electrones secundarios (SE), algunas de las muestras mostraron problemas de resolución por lo que la digitalización de la imagen se hizo con electrones retro-dispersados (BSE).

ANEXO I. Claves taxonómicas para la identificación de especies de hongos *Aspergillus*

Claves taxonómicas para grupos de *Aspergillus* basada principalmente en el color de los hongos (Raper y Fennell, 1965).

- A.** Cabezuelas conidiales mostrando algún tono de verde durante su desarrollo..... **B.**
- AA.** Cabezuelas conidiales en otro color..... **L.**
- B.** Vesículas clavadas o subclavadas; esterigmas en una serie..... **C.**
- BB.** Vesículas no clavadas; esterigmas en una o en dos series..... **D.**
- C.** Vesículas clavadas (prominentes) cabezuelas conidiales verde-azul, tornándose de color gris en colonias viejas.
Grupo *A. clavatus*
- CC.** Vesículas subclavadas; esterigmas en una serie; cabezuelas conidiales de color verde-amarillo, verde-gris o verde-azul cuando son jóvenes, oscureciéndose la mayoría de las especies.
Grupo *A. ornatus*.
- D.** Cabezuelas conidiales de color verde-amarillo brillante cuando son jóvenes, algunas veces se tornan de color café con la edad, radiada y laxas, esterigmas en dos series en la mayoría de las especies.
Grupo *A. flavus*
- DD.** Cabezuelas conidiales en otros tonos de verde; esterigmas en una o dos series..... **E.**
- E.** Colonias mostrando cleistotecios amarillos descubiertos e hifas de color amarillo o rojo.
Grupo *A. glaucus*
- EE.** Colonias que no presentan cleistotecios amarillos descubiertos, ni hifas de color amarillo o rojas..... **F.**
- F.** Cabezuelas conidiales con forma definitivamente columnar..... **G.**
- FF.** Cabezuelas conidiales globosas, radiadas o en forma columnar muy laxa..... **L.**

G. Esterigmas en una serie..... **H.**

GG. Esterigmas en dos series, comúnmente con células de hülle globosas o subglobosas; cleistotecios en algunas especies; ascosporas de color rojo-anaranjado a violeta.

Grupo *A. nidulans*

H. Cabezuelas conidiales columnares, largas, delgadas, a menudo torcidas, irregulares, conidios que usualmente se forman como segmentos cilíndricos del esterigma; sin cleistotecios; típicamente osmofílicos.

Grupo *A. restrictus*

HH. Cabezuelas conidiales columnares, compactas, uniformes en su diámetro a lo largo de la columna; los conidios no se forman como segmentos cilíndricos de los esterigmas; cleistotecios en algunas especies; no son típicamente osmofílicos.

Grupo *A. fumigatus*

I. Vesículas pequeñas, variables en su forma..... **J.**

II. Vesículas grandes, estrictamente globosas; conidióforos constreñidos debajo de la vesícula..... **K.**

J. Cabezuelas conidiales de color verde-azul y verde-amarillo opaco; o verde-azul, gris, de radiadas a columnares laxas; células de hülle globosas a subglobosas.

Grupo *A. versicolor*

JJ. Cabezuelas conidiales color oliva, gri-oliva, café oscuro; radiadas a columnares; células de Hüller alargadas o enrolladas.

Grupo *A. ustus*

K. Cabezuelas conidiales grisáceas en colonias viejas a partir de tonos de color verde-azul o amarillo-oliva.

Grupo *A. sparsus*

KK. Cabezuelas conidiales de color verde-amarillo pálido, verde-azul, o café pálido.

Grupo *A. cremeus* (ver también el Grupo *A. wentii*)

L. Crecimiento escaso y con una esporulación pobre en el medio Czapek.

Grupo *A. cervinus*

- LL.** Crecimiento y esporulación generalmente abundante en el medio de Czapek..... **M.**
- M.** Cabezuelas con las cadenas de conidios sueltos o libres hasta formar columnas compactas..... **N.**
- MM** Cabezuelas de forma globosa a radiada..... **O.**
- N.** Cabezuelas con las cadenas de conidios en columnas no compactas, blancas, de color carne, o crema pálido (o pardo).

Grupo *A. flavipes*

- NN.** Cabezuelas con cadenas de conidios formando una columna compacta, color avellana a canela.

Grupo *A. terreus*

- O.** Cabezuela siempre de color blanco, grandes, de forma globosa o radiada.

Grupo *A. candidus*

- OO.** Cabezuelas no blancas..... **P.**

- P.** Cabezuelas en tono de amarillo, ocre, o café claro..... **Q.**

- PP.** Cabezuelas de color negro o café oscuro.

Grupo *A. niger*

- Q.** Cabezuelas de color azufre a color ocre.

Grupo *A. ochraceus*

- QQ.** Cabezuelas con tonos de café-amarillo a tonos pardo.

Grupo *A. wentii* (en parte también el Grupo *A. cremeus*)

Clave para grupos de *Aspergillus*, basada principalmente en características morfológicas

I. Esterigmas en una sola serie

- A.** Cabezuelas clavadas, en cultivos viejos las cadenas se separan, en tonos de color verde-azul; las vesículas con forma de clava muy marcada.

Grupo *A. clavatus*.

- B.** Cabezuelas cuya forma va de radiada a columnar, variable su color, variable la forma de su vesícula de globosa a subclavada o turbinada.

1. Cabezuelas radiadas, variable su tamaño, en tonos de verde-azul o verde oliva (café en una especie); osmofílicos; cleistotecios de color amarillo brillante en la mayoría de las especies.

Grupo *A. glaucus*.

2. Cabezuela con cadenas de conidios sueltas a columnas compactas, a menudo largas, delgadas y enrolladas, en tonos de verde; conidios cilíndricos cuando son jóvenes; osmofílicos; sin cleistotecios.

Grupo *A. relictus*.

3. Cabezuelas con cadenas de conidios arregladas en forma columnar compacta, en tonos que van de verde-gris pálido a verde-azul oscuro; no esmofílicos; cuando son jóvenes los conidios no son cilíndricos.

Grupo *A. fumigatus*

(a) Sin cleistotecios : Serie *A. fumigatus*.

(b) Con cleistotecios, de color blanco a tonos claros de amarillo: Serie *A. fischeri*.

II. Esterigmas en una o dos series, predominando las de dos series, o bien con ambas formas en la misma cabeza

- A.** Cabezuelas generalmente globosas cuando son jóvenes, radiadas cuando están jóvenes y cuando son viejas las cadenas se separan en grupos: raramente, pero se encunetran, cabezuelas en forma columnar no compacta; vesículas globosas, subglobosas o un poco alargadas; conidióforos sin constricción debajo de la vesícula, en muchas especies se presenta esclerocios.

1. Cabezas conidiales globosas cuando son jóvenes, en algunas especies esta condición prevalece, sin embargo, hay especies en que las cadenas de conidios, se separan formando columnas bien definidas cuando son viejas.

(a) Cabezuelas de color amarillo, tonos de color ocre o pardo; conidióforos rugosos y a menudo pigmentados; cleistotecios en una especie:
Grupo *A. ochraceus*.

(b) Cabezuelas en tonos de negro; conidióforos usualmente lisos e incoloros o bien pigmentados debajo de la vesícula: Grupo *A. niger*.

(c) Cabezuelas de color blanco o crema; conidióforos lisos y sin pigmentación: Grupo *A. candidus*.

2. Cabezuelas típicamente radiadas, con cadena de esporas usualmente separadas, en ocasiones formando columnas no bien definidas.

(a) Cabezuelas en tono de verde-amarillo a café-oliva; conidióforos usualmente rugosos y sin color: Grupo *A. flavus*.

(b) Cabezuelas en tono de color café-amarillo a pardo opaco; conidióforos lisos o ligeramente rugosos, sin color oligermanete pigmentados: Grupo *A. wentii*.

B. Cabezuelas grandes, radiadas, vesículas estrictamente globosas; conidióforos definitivamente con una constricción debajo de la vesícula; sin esclerosis: Grupo *A. cremeus*. Grupo *A. sparsus*.

Claves para especies del grupo *Aspergillus flavus*

I. Cabezuelas conidiales de color amarillo pálido a intenso amarillo a de color verde-amarillo cuando son jóvenes.

A. Colonias que no cambian al color café cuando se cultivan en el medio Czapek; conidios definitivamente equinulados.

1. Esterigmas en una o dos series predominando en dos series, cabezuelas radiadas o columnar, las columnas no compactas: *A. flavus Link.*

2. Esterigmas en una serie.

a. Cabezuelas columnares; esterigmas usualmente en una serie: *A. flavus var. columnaris* Raper y Fenell.

b. Cabezuelas radiadas, esterigmas en serie: *A. parasiticus* Speare.

B. Colonias viejas que cambian a un color café pálido en el medio Czapek; conidios irregularmente rugosos o lisos.

1. Conidios largos, casi siempre de 4.5 a 7.0 micras, pero hasta de 8.0 a 10.0 micras, al principio elípticos, después globosos o subglobosos, lisos o irregularmente rugosos.
 - a. Conidióforos que nacen principalmente del substrato o medio: *A. oryzae* (Ahib) Cohn.
 - b. Conidióforos que nacen principalmente como ramascortas de hifas aéreas: *A. oryzae* (Ahib) Cohn var. *Effusus* (Tirasboschi) Ohara.
2. Conidios pequeños, de forma oval o elíptica, la mayoría de 3.0 a 3.5 micras, lisos o casi lisos.
 - a. Crecimiento muy reducido en el medio de Czapek; estructuras conidiales abundantes, en zonas, cuando crece en Malta: conidióforos lisos o casi lisos: *A. zonatus* Kwon y Fennell.
 - b. Crecimiento abundante en medios de Czapek y Malta; conidióforos en agregados coremioformnes; conidióforos marcadamente rugosos: *A. clavato-flavus* Raper y Fenell.

II. Cabezuelas conidiales en color verde-amarillo intenso, cuando son jóvenes; conidios marcadamente verrucosos.

- A. Cabezuelas que al principio son de color verde-amarillo intenso, se vuelven de color verde-café o café en el medio Czapek: *A. tamarri* Kita.
- B. Cabezuelas que rápidamente son de color café-oliva y después café obscuro: *A. flvo-farcatis* Batista y Maia.

III. Cabezuelas conidiales de color oliva-amarillo pálido u oliva grisáceo; conidios lisos o casi lisos.

- A. Conidióforos marcadamente equinulados: *A. subolivaceus* Raper y Fanell.
- B. Conidióforos lisos o casi lisos: *A. avenaceus* Smith.

Claves para grupos o especies de *Aspergillus* productores de micotoxinas

I. Cabezuelas conidiales grandes en forma de clava, de color verde-azul: Grupo *A. clavatus*.

II. Cabezuelas conidiales columnares.

A. Cabezuelas usualmente de color canela, algunas veces de color beige o café: *A. terreus* Thom.

B. Cabezuelas azules, verde-azul overde obsucro.

1. Esterigmas en una serie, cabezuelas usualmente largas y columnares.

(a) Clesitotecios ausentes, intolerantes a medios con alta presión osmótica: *A. fumigatus* Fresenius.

(b) Cleistotecios presentes, ascosporas incoloras: *A. fischeri* Wehmer.

2. Esterigmas en dos series, cabezas columnares cortas, a menudo se presentan células de Hüller; en caso de presentarse el estado sexual (cleistotecios), las ascosporas son de color anaranjado a rojo púrpura: Grupo *A. nidulans*.

C. Cabezuelas de color verde-amarillo; los esterigmas casi siempre en una serie: *A. flavus* var. *columnaris* Raper y Fenell.

1. Cabezuelas que permanecen de color blanco o que se tornan color marfil con la edad, esterigmas primarios de igual tamaño que los secundarios: *A. niveus* Blochwitz (var. *A. candidus*).

III. Cabezuelas conidiales globosas o radiadas.

A. Cabezuelas conidiales grandes, vesículas largas, globosas o casi globosas, esclerocios presentes en ocasiones.

1. Cabezuelas de color amarillo al ocre; Grupo *A. ochraceus*.

2. Cabezuelas en tonos de verde-amarillo.

(a) Cabezuelas de color verde-amarillo brillante, esterigmas en dos series: *A. flavus* Link.

(b) Cabezuelas de color verde-amarillo obscuro, esterigmas en una serie: *A. parasiticus* Speare.

3. Cabezuelas blancas, generalmente globosas, esterigmas primario más grandes que los secundarios: *A. candidus* Link.
- B.** Cabezuelas conidiales pequeñas, vesículas ovaladas a elípticas, esclerocios ausentes.
1. Cabezuelas de color verde-azul, esterigmas en dos series, células globosas de Hüller, no presentan estado sexual (cleistotecios): *A. sydowi* (Bain. y Sart.).
 2. Cabezuelas de color verde-amarillo pálido, en lo demás semejante a *A. sydowi*: *A. versicolor* (Viull.) Tiraboschi.

