UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLOGICAS
Y AGROPECUARIAS
DIVISION DE CIENCIAS VETERINARIAS

" EVALUACION DEL GRADO DE CONTAMINACION CON AFLATOXINAS B1, B2, G1, G2, EN ENSILADO DE MAIZ EN LA REGION DE COCULA JALISCO "

TESIS PROFESIONAL

PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA
P R E S E N T A

JESUS CARDONA GODINEZ
DIRECTOR DE TESIS
M.C. MARGARITA HERNANDEZ GALLARDO
ASESOR DE TESIS
DR. AGUSTIN RAMIREZ ALVAREZ

LAS AGUJAS NEXTIPAC, JALISCO. JUNIO 1999

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	X
INTRODUCCION	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	5
JUSTIFICACION	8
HIPOTESIS	9
OBJETIVOS	10
MATERIAL Y METODOS	11
RESULTADOS Y DISCUSION	18
CONCLUSIONES	28
BIBLIOGRAFIA	29

RESUMEN

La gran mayoría de los productos agrícolas son invadidos por diversos microorganismos durante su desarrollo en el campo, siendo los hongos los más abundantes y la principal causa de enfermedades, ocasionando severas pérdidas económicas al reducir el potencial de producción. Ciertos hongos dentro de su desarrollo producen diversas sustancias que además de su elevada toxicidad no son biodegradables presentando un serio problema de salud pública al aparecer como residuos tóxicos en las carnes destinadas para el consumo humano. Con el objetivo de evaluar el grado de contaminación de Aflatoxina B1, B2, G1 y G2, en ensilado de maíz por medio de la técnica de cromatografía en capa fina, se llevo a cabo este estudio en el área de Micotoxicologia del Departamento de Salud Pública del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Se obtuvieron 50 muestras de ensilado de maíz en granjas de bovinos de la región de Cocula, Jalisco. Obteniendo los siguientes resultados: En la determinación de humedad se encontró un rango de 41.22% a 58.45% y de Aflatoxina, la B1, B2, G1 y G2 con una concentración de 175ppb a 16ppb. Se concluye que estos niveles de concentración se consideran fuera de norma, y presentan un riesgo de salud (toxicidad) al ser consumidos por el ganado.

INTRODUCCION

En México el problema de las Aflatoxinas como contaminantes naturales potenciales de alimentos es conocido y discutido desde principios de la década de 1960, época en la que fueron descubiertas y las implicaciones sanitarias de estas y otras micotoxinas puestas de manifiesto a nivel mundial. (5).

Los ingredientes para piensos, tales como el maíz, trigo, centeno, cebada y cacahuate, constituyen excelentes medios de cultivo para el desarrollo de hongos. Aunque el hongo perse no se considera peligroso, algunos hongos en el proceso de asegurar su protección ecológica contra bacterias de mas rápido crecimiento sintetizan substancias similares a los antibióticos (micotoxinas) las cuales pueden representar un serio peligro económico para la salud de las personas y los animales que las consumen. (11,19,23).

De todas las micotoxinas las Aflatoxinas son las mas preocupantes. Estas son producidas por *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*. El *Aspergillus flavus* crece y produce Aflatoxinas en productos agrícolas, alimentos procesados y bebidas, entre estos productos, algunos en los que las Aflatoxinas pueden presentar un problema serio son: cacahuate, maíz, pasta de semilla de algodón, arroz, sorgo y otros granos. (5,9,11,21).

Además los hongos productores de Aflatoxinas son oportunistas. Regularmente encuentran el medio de cultivo adecuado para crecer y producir su metabolito. (6,21).

Las condiciones inadecuadas de almacenamiento para los granos, tales como, temperatura y humedad elevadas, crean condiciones óptimas para la producción de hongos productores de Aflatoxinas. (11).

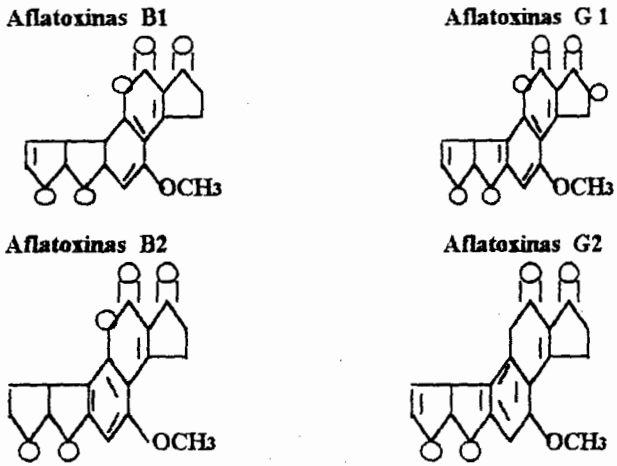
La humedad del substrato es principal factor que regula el crecimiento fungal y la ulterior formación de Aflatoxinas. Otro factor de suma importancia dentro de la producción de Aflatoxinas es la temperatura, de las cuales se determina una mínima de 12°C, una máxima de 40° a 42°C y una óptima de 27° a 30°C, aunque algunas especies de *Fusarium* pueden ser activos a temperatura de 0°C próximas a la congelación, influyendo así mismo, el tiempo de almacenamiento y tipo de alimento. (1,6,11,19,21).

Una vez que se establecen los factores ambientales adecuados para la formación de hongos, éstos producen substancias tóxicas en el alimento, alterando sus propiedades nutricionales con las consecuentes pérdidas económicas. (8,10,21).

Las propiedades químicas de las Aflatoxinas; han sido denominadas B1 y B2 por su fluorescencia azul y G1 y G2 verde. La Aflatoxina B1 tiene un peso molecular de 312, su formula empírica es C17 H12 O6, se descompone sin fundirse a temperaturas de 268° a 269°C, ópticamente activa CHCL3 558, fluorescencia azul brillante en la luz ultravioleta y exhibe absorción U. V. máxima de (ETOH) 233, 265 y 326 mU. La Aflatoxina B2 y G2 son respectivamente, los dehidroderivados de las Aflatoxinas B1 y G1. Otras Aflatoxinas muy afines a las anteriores son las Aflatoxinas B2a, G2a y GM1. Las Aflatoxinas M1, M2 y P1 son los derivados hidroxilados de las Aflatoxinas B1 y B2 los

cuales son excretados en la orina, heces y en la leche como productos resultantes del metabolismo de las Aflatoxinas B1 y B2 después de haberlas ingerido los mamíferos, todos ellos son compuestos heterocíclicos muy oxigenados. (20).

ESTRUCTURA QUIMICA DE LAS AFLATOXINAS



(3)

La Aflatoxina B1, es la más tóxica de las Aflatoxinas en varias especies animales. Se ha comprobado que otras Aflatoxinas son tóxicas y cancerígenas para distintas especies de peces, mamíferos y aves de corral. Cuando las vacas consumen un pienso que contiene Aflatoxinas, en la leche excretan las Aflatoxinas M1 y M2. Si bien, las Aflatoxinas M1 y M2 son menos tóxicas que los compuestos B1 y B2 de las que se producen. En muchas especies animales la Aflatoxina M1 conserva sus propiedades tóxicas y cancerígenas, esta también ha sido detectada en la orina de mujeres que consumieron mantequilla elaborada con cacahuates que contenían Aflatoxinas. (5,8,10,20).

Estudios de incidencia de Aflatoxinas en maíz producido en México, determinaron, que en maíz recién cosechado durante 1982 en el estado de Guanajuato, la presencia de Aflatoxinas fue negativa. Así mismo se analizaron muestras de maíz, almacenado en condiciones rurales en el sureste de la misma entidad federativa y se encontró que la presencia del género *Aspergillus* y *Penicillium* fue baja, tal vez, las condiciones climatológicas y de cultivo no favorecieron la presencia de *Aspergillus*, ni de las Aflatoxinas. (5,11,20).

En México se reporto que de 290 muestras analizadas en 1984, 46 (18.96%) presentaron Aflatoxina B1, con niveles de 25 a 100 ppb, de las cuales 41 pertenecían a alimento concentrado, 4 a sorgo y una a silo de maíz. (2,6).

En 1985 se analizaron 275 muestras, presentando contaminación solo15 (5.4%); tal parece que esta disminución de la contaminación en 1985, con respecto a 1984, puede atribuirse a las condiciones climáticas. Mientras que en Monterrey N. L., en 1990, se analizó maíz que se distribuía en la ciudad encontrándose niveles de Aflatoxina B1 que varió de 5.03 a 465.31 µg/k, niveles superiores a los permitidos (20µg/k); y de Aflatoxina G1 en concentraciones de 1.59 a 57.10 µg/k. (21).

Lo anterior confirma que la presencia de estos contaminantes (Aflatoxinas) en los alimentos, es estacional y errática y que los riesgos para la salud humana y animal son altos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la producción ganadera la alimentación es la mas importante desde el punto de vista económico por su determinación en los costos, razón por la que se debe mantener un estricto control de calidad y precio de los nutrientes que se usan. (13).

Cuando existe un mal manejo en la producción o almacenamiento de los ingredientes destinados al consumo animal pueden ser contaminados con productos tóxicos como pesticidas, metales pesados o bien micotoxinas. (3,4,).

En el caso de las micotoxinas generalmente contaminan cereales, oleaginosas y ensilados entre otros, mediante el desarrollo de hongos los cuales pueden producir tóxinas y contaminar estos nutrientes. (3,4,12).

Cuando el ensilado de maíz se encuentra contaminado con Aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 constituyen un importante problema de salud animal debido a los efectos tóxicos de estos compuestos.

Además ocasiona un serio problema de Salud Pública al encontrar sus metabolitos en la leche y tejidos.

Se considera la presencia de Aflatoxinas en alimentos básicos los efectos de estos contaminantes al entrar a la cadena alimenticia, se puede comprender el riesgo que implica para la Salud Pública al ingerir estos alimentos contaminados. (3,20).

El humano se encuentra expuesto directa o indirectamente al consumo de Aflatoxinas B1 o Aflatoxina M1, ya sea, a través de cereales contaminados o productos alimenticios de origen animal, como la leche (esquema N° 1). (9,15.25).

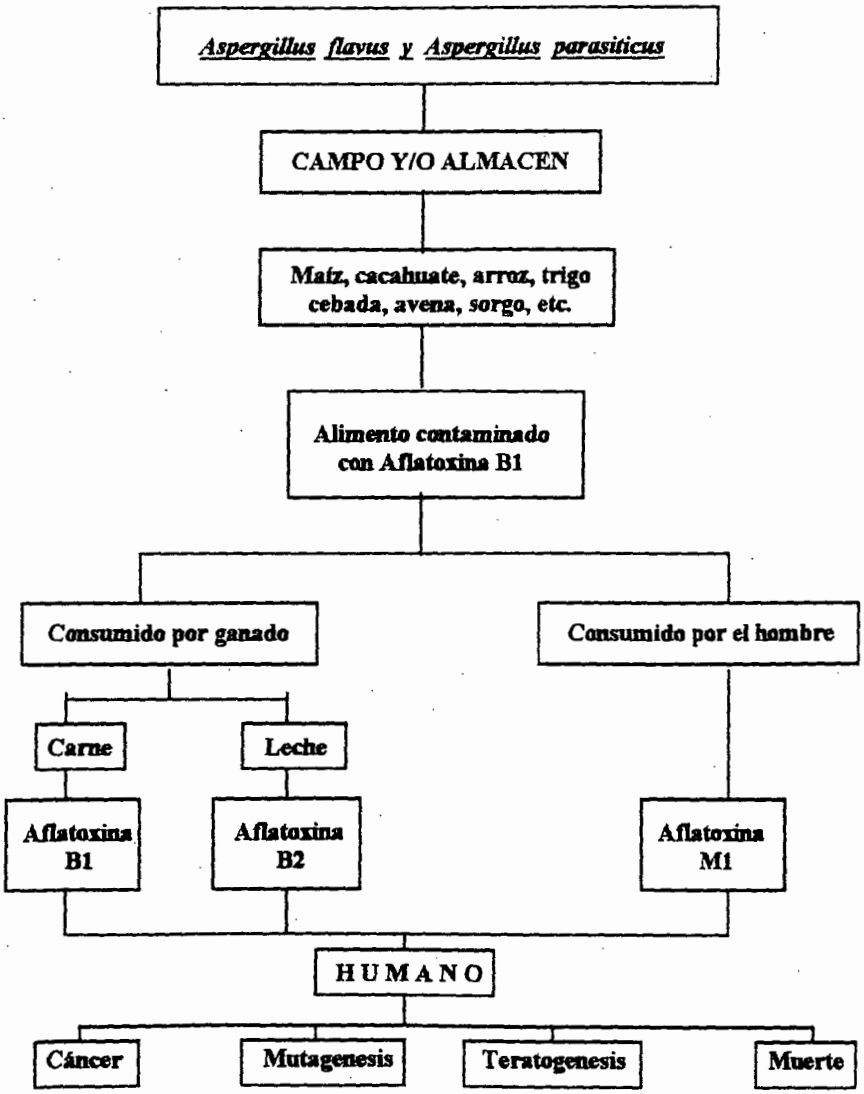
Varios autores han reportado que las Aflatoxinas y sus derivados se difunden por todos los tejidos corporales de aves, porcino, equinos y bovinos. Especialmente en hígado, riñones, músculo esquelético, tracto gastrointestinal y son excretados en leche, heces y orina. (1,3,9,11,20,25).

La Aflatoxina B1 es convertida en el hígado por hidroxilación a diferentes metabolitos entre ellas la Aflatoxina M1, Aflatoxicol, Aflatoxina B2a, Parasiticol y P1. Siendo la Aflatoxina M1 el metabólito mas abundante en leche. (3,16,18).

CUCRA

Esquema N° 1

AFLATOXINA B1 EN LA CADENA ALIMENTICIA



JUSTIFICACION

Las micotoxinas se han involucrado como fuentes de Aflatoxinas en casos sospechosos en bovinos al consumir ensilado de maíz o de cereales, en algunos países el maíz mohoso es el que se ha determinado como fuente de estas tóxinas inclusive llamaron a estas micotoxinas con el nombre de " Envenenamiento del maíz mohoso". (3,5,11,14).

Las consecuencias económicas que da la Aflatoxicosis en los animales en crecimiento son sustanciales y variadas. Las Aflatoxinas causan enfermedades clínicas y muerte cuando son consumidas en grandes cantidades. A niveles más bajos, retrasan el crecimiento y la eficiencia en conversión de alimento en animales jóvenes, así como su capacidad para combatir infecciones, indudablemente que las investigaciones van a relevar otros efectos de las Aflatoxinas en la salud de los animales y humanos.

Dada la poca información que existe en México y la importancia sanitaria que representa este problema, el presente trabajo tiene la finalidad de determinar el grado de contaminación con Aflatoxinas en ensilado. Y así formar un sistema de vigilancia para controlar la contaminación de alimento para bovino con Aflatoxinas B1, B2, G1 y G2.

La necesidad de contar con alimento libre de contaminantes por Aflatoxinas es cada día mayor, por lo que es menester lograr un control adecuado y establecer un sistema de vigilancia para detectar niveles de contaminación con técnicas establecidas y confiables.

HIPOTESIS

Si el ensilado de maíz es un alimento el cual es sometido a un proceso de fermentación con un alto porcentaje de humedad, entonces es posible que se encuentre contaminado con hongos productores de micotoxinas y por ende con aflatoxinas, considerando este alimento de alto riesgo, para el consumo de los animales.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el grado de contaminación de Aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en ensilado de maíz por la técnica de cromatografía en capa fina.

OBJETIVOS PARTICULARES

1.- **Determinar el grado de humedad que presenta el ensilado de maíz.**

2.- **Cuantificar las Aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en el ensilado de maíz de la región de Cocula, Jalisco.**

3.- **Obtener la proporción en que se presentan las cuatro principales Aflatoxinas.**

MATERIAL Y METODOS

El presente trabajo se llevo a cabo en el Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la División de Ciencias Veterinarias, en el Departamento de Salud Publica en el área de Micotoxicologia.

Se obturvieron 50 muestras de ensilado de maíz de granjas de bovinos de la región de Cocula, Jalisco. Estas se recolectaron directamente y se transportaron en frascos de vidrio tomando muestras compuestas (de diferentes partes y niveles), para las siguientes determinaciones: (7).

1.- Determinación de humedad mediante la técnica de perdida de agua.

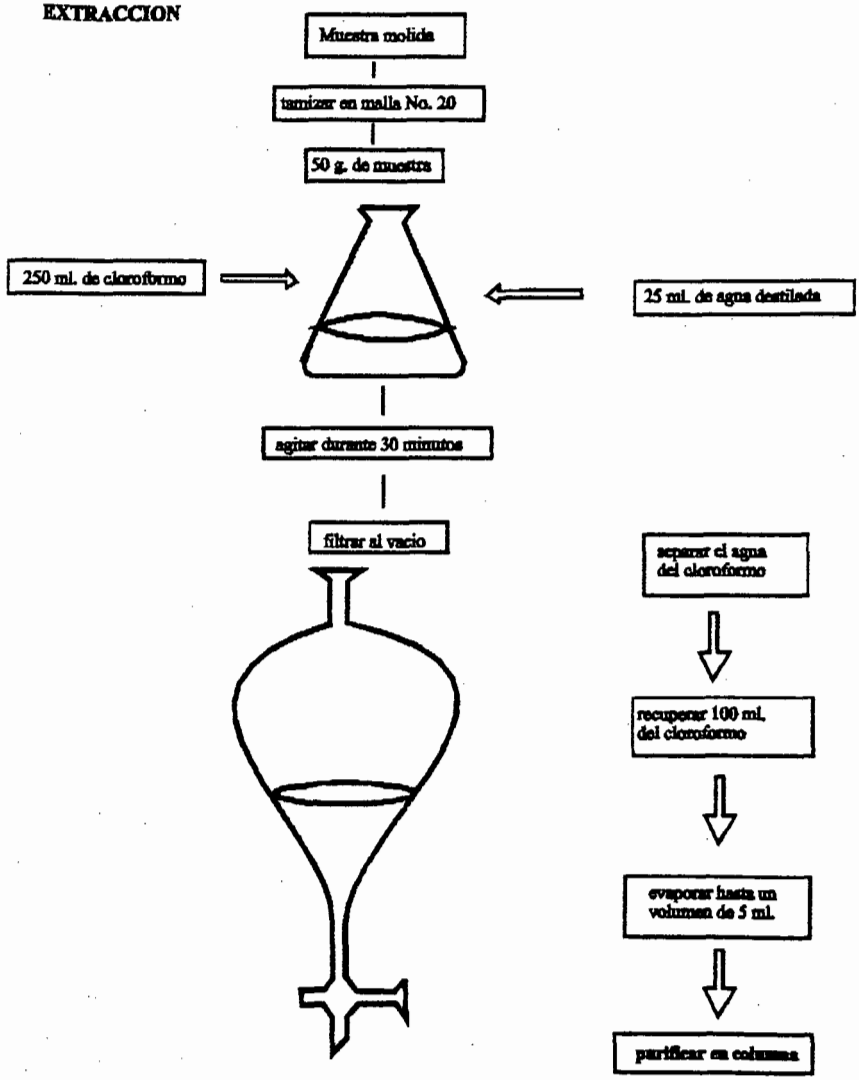
2.- Identificación y Cuantificación de Aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 por la técnica de Cromatografia en capa fina. (diagrama Nº 1); (2,5,13,21,24).

3.- Los datos obtenidos serán ordenados en forma tabular y posteriormente en una gráfica de frecuencia acumulada para su análisis estadistico.

DIAGRAMA Nº 1

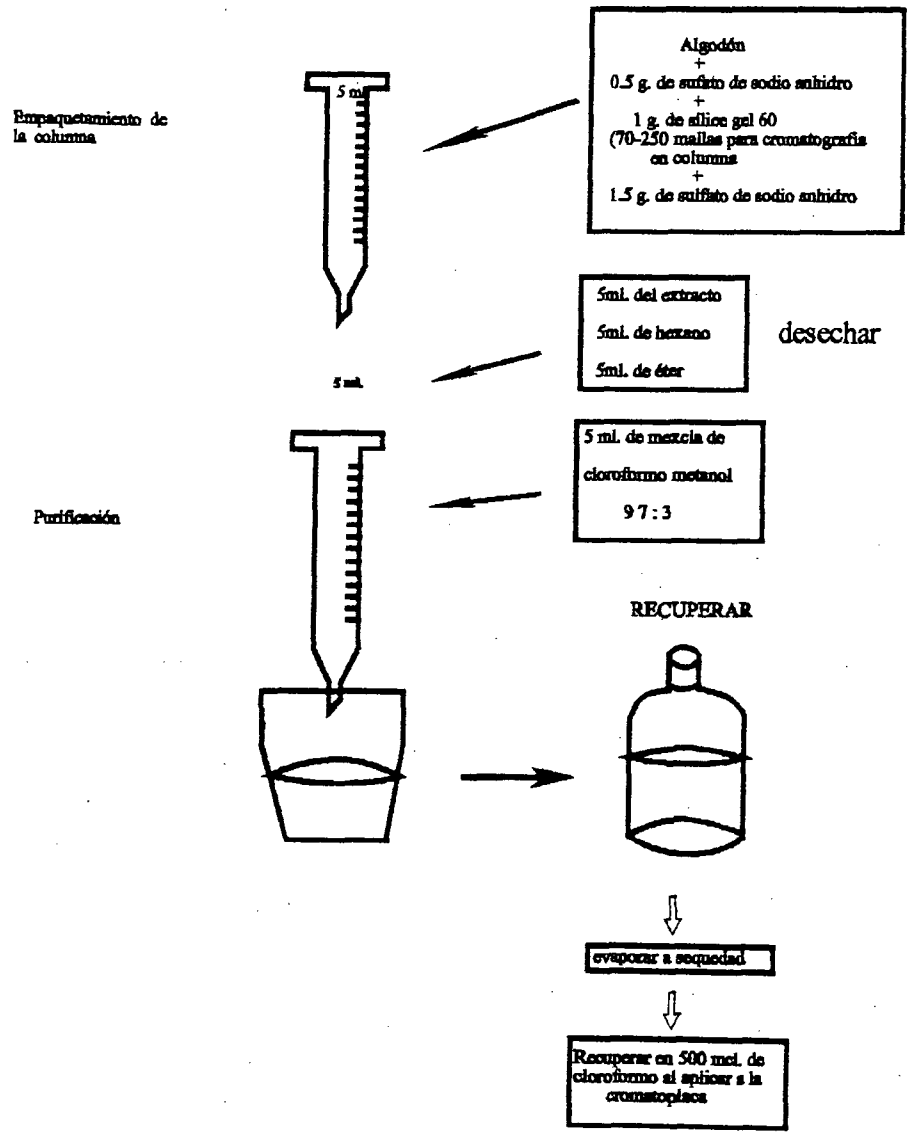
DETERMINACION CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE AFLATOXINA B1, B2, G1 Y G2. POR LA TECNICA DE CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

EXTRACCION



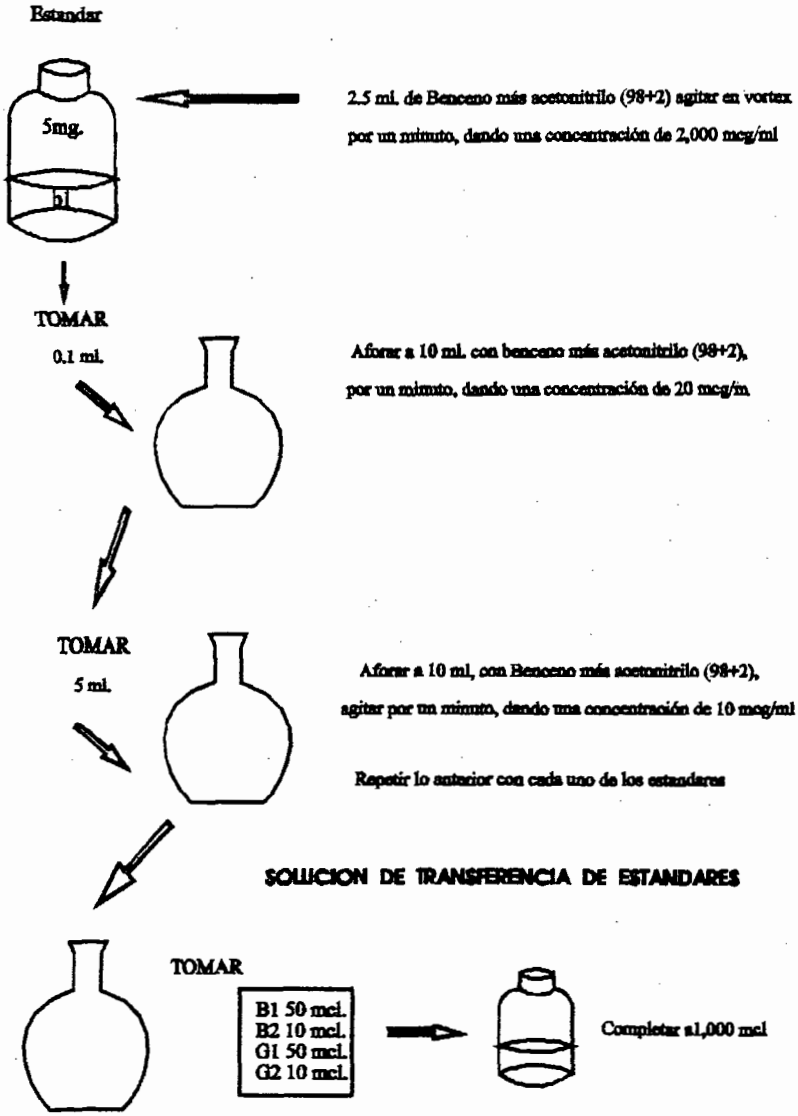
(24)

PURIFICACION EN COLUMNA POR LA TECNICA DE CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA



(24)

PREPARACION DE ESTANDARES DE AFLATOXINA B1, B2, G1 Y G2



(24)

DETERMINACION

PREPARACION DE CROMATOPLACAS

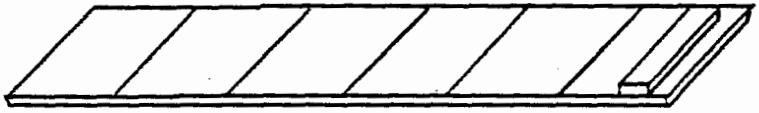
CUCBA
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
PIENSA Y TRABAJA
BIBLIOTECA CENTRAL

30 g. de sílica gel

66 ml. de agua destilada

agitar

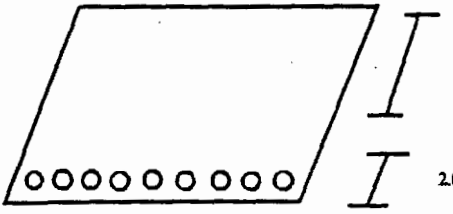
aplicación en placas de cristal 20 x 20 x 0.3 mm.



dejar a temperatura ambiente durante 30 minutos

activar en horno a 110° C. durante 60 minutos

APLICACION DEL EXTRACTO Y ESTANDAR A LA CROMATOPLACA



15 cm. Frente del solvente

2.0 cm Punto de aplicación

Muestra 3.5 5 6.5 ml

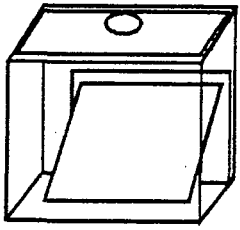
(Estandar 5, 3.5, 5, 6.5, 5, 1)

(24)

DESARROLLO DE LA CROMATOPLACA

30 ml. de acetona
+
170 ml. de cloroformo
+
3 ml de agua destilada

sellar con grasa silicona



papel filtro 20 x 20

Dejar el tiempo necesario para que los solventes alcancen una altura de 15cm. a partir del punto de aplicación

Retirar la cromatoplaca y dejar secar a temperatura ambiente

Observar a la luz ultravioleta para comprobar fluorescencia de la muestra contra el estandar

Determinar Rf de la muestra contra el Rf del estandar mediante la formula

$$Rf = \frac{\text{frente del soluto}}{\text{frente del solvente}}$$

(24)

DETERMINACION SEMICUANTITATIVA

Se realizo por la formula siguiente:

$$mg / kg = (SxYxV) / (XxW)$$

En donde:

S = **mcl de la solución estándar igual a la de la muestra problema.**

Y = **Concentración del estándar mcl / ml.**

V = **mcl de la dilucion final del extracto de la muestra.**

X = **mcl del extracto de la muestra obtenida.**

W = **gramos de la muestra aplicados a la columna.**

(2 4)

BIBLIOTECA CENTRAL

RESULTADOS Y DISCUSION

L a presentación de Micotoxinas producidas por hongos en los alimentos es un problema muy serio en todo el mundo. Existen varios géneros de hongos que pueden producir micotoxinas siempre que haya condiciones adecuadas de temperatura, humedad y un medio adecuado donde reproducirse. (17,22).

Con base a lo anterior en el presente trabajo se planteo el objetivo de determinar la humedad del ensilado de maíz, en donde se pudo determinar humedades optimas para el desarrollo de hongos productores de micotoxinas. Presentando un rango del 40.5 al 58.5% de humedad, y a la vez, se determino la frecuencia que fue de 46.6 a 47.5 en un mayor numero de muestras. (Tabla N. 1,2 y Gráfica N. 1).

Además se reconoce que los hongos de campo requieren humedades relativas de 90 a 100%, condiciones de humedad muy frecuentes en el almacenamiento de granos. (16,18).

Al determinar la presencia de las Aflatoxinas, se detectaron las 4 Aflatoxinas en concentraciones consideradas fuera de norma. Esto concuerda con otros estudios realizados por Rosiles en 1989, en donde determina la presencia de estas micotoxinas en ensilado de maíz. (18). (Gráfica N. 2).

Con lo que respecta a las concentraciones en las que se presentaron las Aflatoxinas, se obtuvo un rango de 175 ppb. A 16 ppb. (Tabla N° 3, Gráfica N° 3).

El análisis estadístico de los resultados nos muestra lo siguiente:

A) Se analizó el porcentaje de humedad en el ensilado de maíz, en 50 muestras y de acuerdo a los resultados obtenidos se obtuvo un rango de humedad del 40.5 al 58.5%. La mayor frecuencia la presentó el intervalo del 46.6 al 47.5 %, con un numero de 8 muestras que corresponde a un 16% del total, èstos 2 intervalos contiguos nos dan un 28% del total. (Tabla N° 1, 2, y Gráfica 1).

B) Al determinar la presencia de Aflatoxinas se detectaron 4 Aflatoxinas B1, B2, G1, G2.

C) Al analizar la Tabla N° 3 podemos observar que la Aflatoxina B1 se detecto en mayor frecuencia, en 8 muestras que corresponde al 16 % del total.

D) La Aflatoxina G1 le sigue en frecuencia con 4 muestras correspondiendo a un 8 % del total.

Finalmente la Aflatoxina B2 yG2 se detectaron en un 4% del total.

La mayor concentración se presenta en la Aflatoxina B1 en un rango de 60 - 175 ppb.

La Aflatoxina G1 le sigue en concentración con un rango de 16 - 12 ppb. (Tabla 3).

Como se puede observar la Aflatoxina B1 se presenta en mayor frecuencia y concentración siguiendo la Aflatoxina G1. (Gráfica 2).

Montemayor A., 1993., Determina la importancia de las Aflatoxinas en la salud humana y en la producción animal, y manifiesta que al ser ingerida la Aflatoxina B1 por mamíferos es biotransformada y excretada como Aflatoxina M1 en leche. Aunque la Aflatoxina M1 es menos tóxica que la Aflatoxina B1, también representa un riesgo potencial para la Salud Publica. (12,16).

Existen referencias de diversos países sobre la incidencia de Aflatoxina en leche, queso y yogurt, en México se desconoce la magnitud del problema. (19,22).

Al ser metabolizada la Aflatoxina B1 en bovinos y eliminada con la leche en forma de Aflatoxina M1, constituye un problema ya que tiene efectos mutagénicos, hepatotóxicos, inmunosupresivos y carcinogénicos en quienes la consumen, por lo que es recomendable establecer un sistema de control y vigilancia, estableciendo un límite máximo de concentración de estas Aflatoxinas en productos lácteos destinados para el consumo humano como se ha establecido en otros países. (22,23,25).

Dada la necesidad de contar con alimento libre de contaminantes es cada día mayor, por lo que es menester lograr un control adecuado y establecer un sistema de vigilancia para detectar niveles de contaminación con técnicas establecidas y confiables.

Uno de los objetivos de esta investigación es saber la correlación existente de la humedad del ensilado y la concentración de Aflatoxinas de acuerdo con los resultados obtenidos (Tabla N° 1 y 3).

Podemos observar que la Aflatoxina B1 es la que se presenta con mayor frecuencia y concentración y da en muestras que tienen un porcentaje de humedad por encima del 50 al 58%. Con relación a las otras Aflatoxinas el porcentaje de humedad es variable y la concentración mínima que se detecto de alguna de ellas.

Se detecto a un porcentaje de humedad mínimo de 42% no pudiendo establecer una correlación entre estas y la humedad.

TABLA Nº 1

DETERMINACION DE PORCENTAJE DE HUMEDAD EN EL ENSILADO DE MAIZ

1.- 58.45	18.- 43.22	35.- 42.10
2.- 52.07	19.- 47.10	36.- 52.46
3.- 41.22	20.- 54.13	37.- 46.92
4.- 54.11	21.- 51.51	38.- 57.10
5.- 46.92	22.- 50.67	39.- 45.70
6.- 48.44	23.- 46.92	40.- 44.72
7.- 52.27	24.- 50.67	41.- 58.17
8.- 43.32	25.- 55.32	42.- 48.70
9.- 49.74	26.- 52.07	43.- 52.27
10.- 47.20	27.- 48.44	44.- 47.76
11.- 47.76	28.- 58.40	45.- 57.30
12.- 48.43	29.- 54.10	46.- 43.70
13.- 46.90	30.- 47.77	47.- 51.20
14.- 45.00	31.- 58.17	48.- 53.17
15.- 41.10	32.- 47.20	49.- 57.76
16.- 47.12	33.- 49.70	50.- 58.17
17.- 42.07	34.- 43.32	

TABLA Nº 2

PORCENTAJE DE HUMEDAD OBTENIDA EN FORMA AGRUPADA DE ENSILADO DE MAIZ DE LA ZONA DE COCULA JAL.

Media	Rango		Frec. Nº muestra
41	40.5	41.5	2
42	41.6	42.5	2
43	42.6	43.5	3
44	43.6	44.5	1
45	44.6	45.5	2
46	45.6	46.5	1
47	46.6	47.5	8
48	47.6	48.5	6
49	48.6	49.5	1
50	49.5	50.5	2
51	50.6	51.5	4
52	51.6	52.5	5
53	52.6	53.5	1
54	53.6	54.5	3
55	54.6	55.5	2
56	55.6	56.5	0
57	56.6	57.5	1
58	57.6	58.5	6

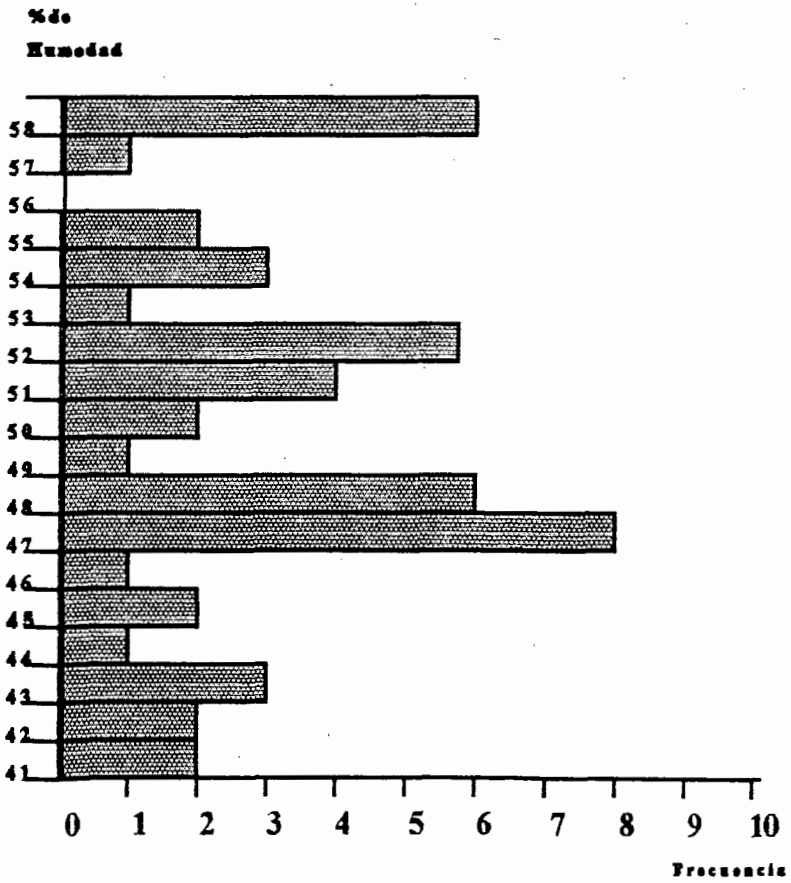
TABLA Nº 3

MUESTRA LA CONCENTRACION DE AFLATOXINAS ENCONTRADA EN EL ENSILADO DE MAIZ

Muestra #	Af. + B1 ppb	Af. + B2 ppb	Af. + G1 ppb	Af. + G2 ppb
1	120	—	80	—
2	75	—	—	—
4	16	—	—	—
7	—	—	120	—
10	60	—	—	—
17	—	16	—	—
20	175	—	—	—
27	—	—	—	16
28	120	—	—	72
31	—	—	16	—
38	—	—	20	—
41	72	—	—	—
50	80	16	—	—

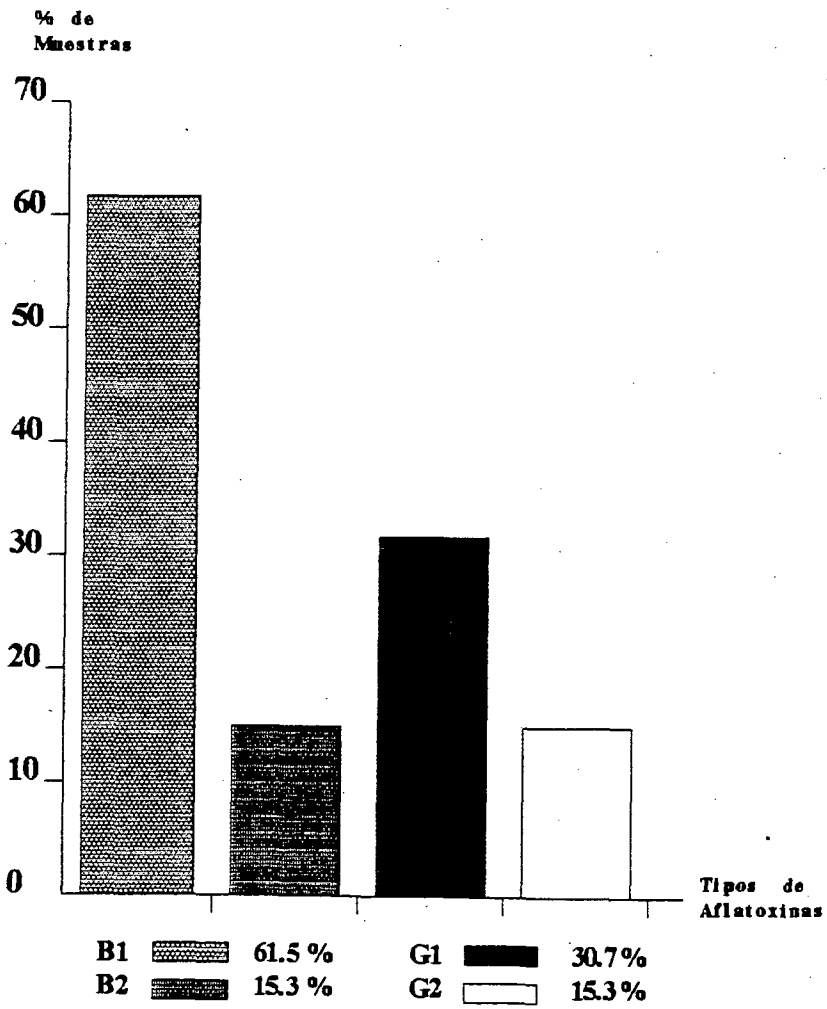
GRAFICA Nº 1

Porcentaje de humedad obtenida en forma agrupada de ensilado de maiz en la zona de Cocula Jal.



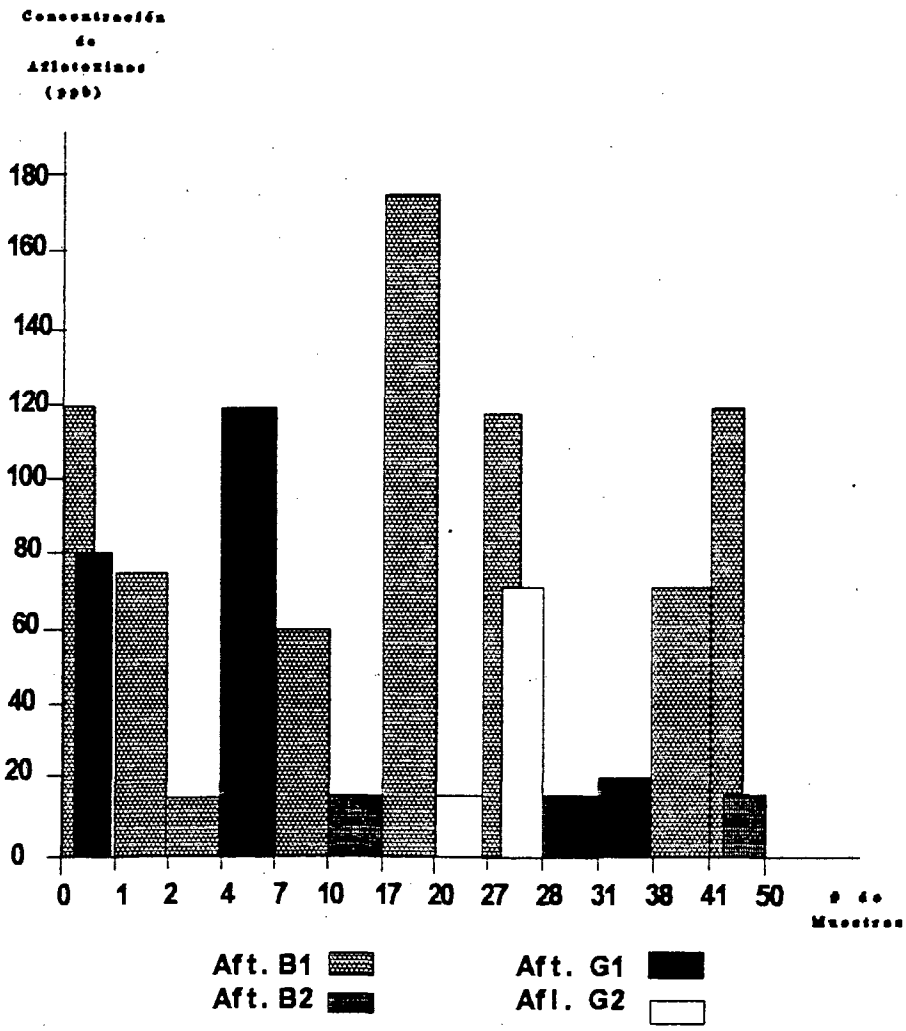
GRAFICA Nº 2

Porcentaje de Aflatoxina B1, B2, G1 y G2 en ensilado de maíz de la zona de Cocula Jal.



GRAFICA Nº 3

Concentración en ppb de Aflatoxinas en las muestras de ensilado de maíz de la zona de Cocula Jal.



CONCLUSIONES

1.- **Los rangos de humedad que se determinaron en el ensilado de maíz se consideran propios para el desarrollo de hongos productores de aflatoxinas.**

2.- **Al determinar la presencia de las cuatro aflatoxina en el ensilado y al encontrar la aflatoxina B1, en concentraciones sumamente elevadas se considera que este alimento es de alto riesgo para el consumo de los animales.**

3.- **Se hace necesario una reglamentación para el control y vigilancia de la contaminación por aflatoxinas tanto en el alimento para el consumo humano como animal.**

BIBLIOGRAFIA

1.- Buck W. B., "Toxicología Veterinaria Clínica y Diagnostica". E d. Acribia. Pág. 322-323, 1981.

2.- Fernández E., "Microbiología Sanitaria Agua y Alimentos". Vol. 1. Universidad de Guadalajara. Pág. 109, 1981.

3.- Frazier W. C. Westhoff D. C., " Microbiología de los Alimentos". E d. Acribia. Zaragoza, España. Pág. 15-21-75-78, 1993.

4.- Frobish R. A. Bradley D. D. Wagner D. D., y Hairston H. "Aflatoxin Residues in Milk ofd airy Cows after Ingestión of Naturally Contaminated grain". Journal of Food protectiónm vol. 49 (10); Pág. 781-785, 1996.

5.- García A. C., "Manual de Métodos para el Análisis de Micotoxinas en granos". Universidad Nacional Autónoma de México. Pág. 13-16, 1989.

6.- Guzmán de P. A. L. Mathieu y J. U., "Presencia de Aflatoxinas en Maíz Recién Cosechado". Cinvestav. IPN. Irapuato Gto. México. R. L. A. M. 27; 249, 1985.

7.- Hancock Dale. A. Dennis., "Colección de Muestras para Laboratorio". Porcicultura Mexicana. Pág. 22-27, 1992.

8.- Heathcote. J. G. Hibbert. J. R. "Aflatoxin; Chamical Bilogical Aspects". E d. Heathcote. J. G. and Hibbert. Elsevier Scientific Publishig Company. Amsterdam Oxford. New York. Pág. 32-38, 1987.

9.- Jeremija, Lj. R., Skrinjar M. and Markov S., "Decrese of Aflatoxin B1 in Yoghurt and Acidified Milks", Mycopathologia. Pág. 113, 117, 119, 1991.

10.- Márquez M. R., " Evaluación de la inactivación con amonio de las Aflatoxinas B1, en maíz mediante ganancia de peso y estudio Histológico en ratones". Técnica Pecuaria en México. Vol. 31 N° 2. Pág. 112-113, 1993.

11.- Miller B. M., "Aflatoxin M1". Technical Report. N° 7. In A. Series. Pág. 78-79, 1987.

12.- Montemayor A., "Micotoxinas, su importancia en salud humana y producción animal". Agricultura N° 20, Pág. 20-21, 1993.

13.- Montemayor M. D., "El muestreo y el análisis en la correcta determinación de su concentración en los granos y alimentos". Agricultura N° 77, Pág. 40-47, 1994.

14.- Organización Panamericana de la Salud., "Criterios de Salud Ambiental II Micotoxinas". O. P. S. N° 453. Pág. 4, 35, 1979.

15.- Peña D. S. Bázua D. M., "Efecto Tóxico de las Aflatoxinas en la dieta". Ciencia y Desarrollo Vol. XVI, N° 94. Pág. 61-64, 1990.

16.- Phelps. A. R., "Micotoxin Contamination in Rumiant Raitons: A Review". F. S. Vol. 63. N° 20. Pág. 11-12, 1991.

17.- Ray A. C., Abbit. B., Cotter R. S., "Bovine Abortion and Death Associated. With Consumption of Aflatoxin Contaminated Peanuts". JAVMA, Vol. 188 N° 10 Pág. 15, 1986.

18.- Rosiles M. R., "Estudio de Aflatoxinas en Ensilado de Maíz". Veterinaria. México N° 9. Pág. 163-165, 1989.

19.- Romo A. P., "Resultados de Investigación sobre ingredientes, Micotoxinas, Equipos y Enfermedades". Tecnología Avipecuaria. Año 5. N° 59. Pág. 41-42, 1992

20.- Serratos C. M. L., "Detección de Aflatoxina M1 en leche de ganado bovino en el estado de Guanajuato". Tesis de Maestría. Universidad de Guadalajara. Pág. 51-57, 1993.

21.- Torres E. Nacha. R. L. Acuña K. Montoya., "Cuantificación de Aflatoxinas en granos distribuidos en la ciudad de Monterrey N. L.". Internacional IUPAC. Micotoxin and Phycotoxin. México, D. F. Pág. 171-175, 1992.

22.- Van Diuk H. J. O´dell. G. D. and Bodine., "Effects of Aflatoxin M1 intake at Physiologic Level on Newborn Dairy Calves". Am. Vet. Res. Vol. 45. N° 10. 1984-1994.

23.- Veltman V. R. "Las Micotoxinas mediante la Nutrición". Industria Avicola. N° 2. Pág. 14, 1984.

24.- Williams - Sidney., "Official Methods of Analisis of the Association of Afficial Analytical Chemist". Chapter 26. 1984.

25.- Wood G. E., "Micotoxinas". Porcicultura Mexicana. Año V. N° 3. Pág. 32-33, 1993