

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
POSGRADO INTERINSTITUCIONAL EN CIENCIAS PECUARIAS
DIVISIÓN DE CIENCIAS VETERINARIAS



“EVALUACIÓN *IN VIVO* DE ADSORBENTES PARA AFLATOXINA B₁ EN RACIONES DE BOVINOS CONTAMINADAS Y SU CORRELACIÓN CON LA PRESENCIA DE AFM₁ EN LECHE”

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS PECUARIAS

PRESENTA:

BIOL. SEVERIANO PATRICIO MARTÍNEZ

COMITÉ TUTORIAL:
DRA. WALDINA P. REYES VELAZQUEZ (DIRECTORA)
DR. CARLOS MANUEL BUCIO VILLALOBOS
DR. ROBERTO LEZAMA GUTIERREZ

ASESORES:
DR. FEDERICO ROJO
M.C ERNESTO DE LUCAS PALACIOS

LAS AGUJAS, NEXTIPAC, ZAPOPAN, JALISCO, FEBRERO DEL 2009



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

DIVISIÓN DE CIENCIAS VETERINARIAS

DEPARTAMENTO DE SALUD PÚBLICA



DRA. ESTHER ALBARRÁN RODRÍGUEZ
COORDINADORA DEL POSGRADO
INTERINSTITUCIONAL EN CIENCIAS PECUARIAS
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
P R E S E N T E.

Por medio de la presente me permito informar a Usted que en mi carácter de sinodal del jurado del examen de Maestría del Biól. **SEVERIANO PATRICIO MARTÍNEZ**, quien defenderá la tesis titulada: **“EVALUACIÓN IN VIVO DE ADSORBENTES PARA AFLATOXINA B1 EN RACIONES DE BOVINOS CONTAMINADAS Y SU CORRELACIÓN CON LA PRESENCIA DE AFM1 EN LECHE”**, leí y corroboré que el sustentante hizo los cambios sugeridos al documento, por lo que confirmo que este, cumple con los requisitos para optar por el grado de Maestría en Ciencias Pecuarias.

Me despido de Usted con un cordial saludo y agradeciendo las atenciones que se sirva dar a la presente.

ATENTAMENTE
“PIENSA Y TRABAJA”

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal. 28 de Enero de 2009

DRA. WALDINA PATRICIA REYES VELÁZQUEZ

Profesor Investigador Titular “C”

Universidad de Guadalajara

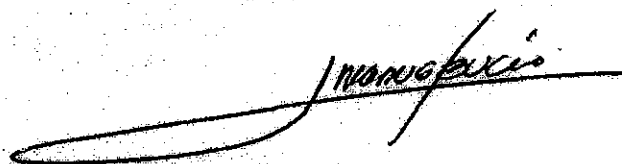
Irapuato, Guanajuato, a 31 de enero de 2009

DRA. ESTHER ALBARRÁN RODRÍGUEZ
COORDINADORA DEL POSGRADO INTERINSTITUCIONAL
EN CIENCIAS PECUARIAS
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
P R E S E N T E.

Por medio de la presente me permito informar a usted que en mi carácter de sinodal del jurado del examen de Maestría de Biól. **SEVERIANO PATRICIO MARTÍNEZ** quien defenderá la tesis titulada: "EVALUACIÓN IN VIVO DE ADSORBENTES PARA AFLATOXINA B1 EN RACIONES DE BOVINOS CONTAMINADAS Y SU CORRELACIÓN CON LA PRESENCIA DE AFM, EN LECHE", leí y corroboré que el sustentante hizo los cambios sugeridos al documento, por lo que confirmo que este, cumple con los requisitos para optar por el grado de Maestría en Ciencias Pecuarias.

Me despido de usted con un cordial saludo y agradeciendo las atenciones que se sirva dar a la presente.

ATENTAMENTE
"LA VERDAD OS HARÁ LIBRES"
"SEMBRANDO CONOCIMIENTO, COSECHANDO PROGRESO"



DR. CARLOS MANUEL BUCIO VILLALOBOS
Profesor Asociado "C"
ICA, Universidad de Guanajuato

c.c.p. INTERESADO.-
c.c.p. ARCHIVO.-



UNIVERSIDAD DE COLIMA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Y AGROPECUARIAS



DRA. ESTHER ALBARRÁN RODRÍGUEZ
COORDINADORA DEL POSGRADO INTERINSTITUCIONAL
EN CIENCIAS PECUARIAS
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
PRESENTE.

Por medio de la presente me permito informar a usted que en mi carácter de sinodal del jurado del examen de Maestría de Biól. **SEVERIANO PATRICIO MARTÍNEZ** quien defenderá la tesis titulada: "EVALUACIÓN IN VIVO DE ADSORBENTES PARA AFLATOXINA B1 EN RACIONES DE BOVINOS CONTAMINADAS Y SU CORRELACIÓN CON LA PRESENCIA DE AFM₁ EN LECHE", lei y corroboré que el sustentante hizo los cambios sugeridos al documento, por lo que confirmo que este, cumple con los requisitos para optar por el grado de Maestría en Ciencias Pecuarias.

Me despido de usted con un cordial saludo y agradeciendo las atenciones que se sirva dar a la presente.

ATENTAMENTE
Tecomán, Colima a 16 de Enero de 2009


DR. ROBERTO LEZAMA GUTIÉRREZ
Profesor Investigador Titular "C"
FCBA, Universidad de Colima

c.c.p. INTERESADO.-
c.c.p. ARCHIVO.-

*A mis hijos José Miguel y Tristan Sebastián
A mi querida esposa Sarai Hernández
Con mucho cariño*

INDICE GENERAL

	Página
ABREVIATURAS	i
INDICE DE CUADROS	ii
INDICE DE FIGURAS	iii
RESUMEN	iv
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 Producción de leche en México	3
II.1.1 Situación de la región de los Altos de Jalisco	5
II.2 Generalidad de las micotoxinas	7
II.3 Aflatoxinas	8
II.3.1. Biotransformación de AFB ₁ a AFM ₁	11
II.3.2. Mecanismo de acción, toxicidad y destoxificación	13
II.3.2.1. Mecanismo de acción	13
II.3.2.2. Toxicidad	15
II.3.2.2a. Efectos en bovinos	15
II.3.2.2b. Efectos en humanos	17
II.3.2.3. Destoxificación y eliminación	18
II.3.3. Incidencia de AFB ₁ y AFM ₁ en alimentos	19
II.3.3.1. Aflatoxina B ₁	19
II.3.3.2. Aflatoxina M ₁	20
II.3.4. Normatividad y Regulaciones para Aflatoxinas	22
II.3.5. Medidas de control y prevención para aflatoxinas	24
II.3.6. Uso de agentes adsorbentes	28
II.3.6.1. Pruebas <i>in vitro</i>	32
II.3.6.2. Pruebas <i>in vivo</i>	33

III. HIPÓTESIS	34
IV. OBJETIVOS	35
V. MATERIALES Y MÉTODOS	36
V.1. Contaminación natural con aflatoxinas en la ración de bovinos y aflatoxina M ₁ en leche bronca proveniente de establos ubicados en 8 municipios de la región de los Altos de Jalisco	36
V.1.1. Muestro	36
V.1.2. Extracción, detección y cuantificación de aflatoxinas (AFT) en alimento para bovinos	38
V.1.3. Extracción, detección y cuantificación de AFM ₁ en leche	38
V.1.4. Análisis estadístico	39
V. 2 Evaluación del uso de adsorbentes en las raciones de bovinos	39
V.2.1 Cultivo y producción de aflatoxina B ₁	39
V.2.1.1 Producción de aflatoxinas	39
V.2.1.2 Análisis de Aflatoxina B ₁ por cromatografía en capa fina (CCF)	40
V.2.2 Efecto de tres adsorbentes sobre la eliminación en leche de AFM ₁ .	40
V.2.2.1. Animales	40
V.2.2.2. Alimentación	41
V.2.2.3. Instalaciones	42
V.2.3. Modelos experimentales.	42
V.2.3.1. Modelo Núcleo.	42
V.2.3.2. Modelo integral.	44
V.2.4. Análisis de aflatoxina M ₁ en leche.	44
V.2.5. Análisis de AFB ₁ por HPLC en las raciones destinadas a la alimentación de bovinos	45
V.2.6. Análisis estadístico	46
V.3 Evaluación del estado del animal y de la calidad de la leche	46
V.4. Financiamiento	47

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
VI.1. Contaminación natural con aflatoxinas en la ración de bovinos	48
VI.2. Contaminación natural con aflatoxina M ₁ en leche cruda	54
VI.3. Evaluación del uso de adsorbentes en las raciones de bovinos	57
VI.3.1. Modelo Núcleo	58
VI.3.2. Modelo Integral	60
VI.3.3. Tasa de Biotransformación de AFM ₁	62
VI.3.4. Producción y calidad de la leche	67
VII. CONCLUSIONES	70
VIII. BIBLIOGRAFÍA	71

ABREVIATURAS

AF-alb	Aducto Aflatoxina-albúmina.
AFB ₁	Aflatoxina B ₁
AFB ₂	Aflatoxina B ₂
AFG ₁	Aflatoxina G ₁
AFG ₂	Aflatoxina G ₂
AFM ₁	Aflatoxina M ₁
AFM ₂	Aflatoxina M ₂
AFT	Aflatoxinas Totales
AOAC	Asociación Oficial de Analistas Químicos
CGG	Coordinación General de Ganadería
CNA	Consumo Nacional Aparente de Leche
COFOCALEC	Consejo para el Fomento en la Calidad de la Leche y sus Derivados
DO	Densidad Óptica
EC	Comunidad Europea
ELISA	Prueba de Inmunoensayo Competitiva
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
GSH	Glutación
GST	Glutación S-Transferasa
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
IARC	Agencia Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer
kg	Kilogramos
L	Litros
MERCOSUR	Mercado Común del Sur
µg	Microgramos
mg	Miligramos
NADPH	Dinucleótido de Nicotinamida y Adenina de Fosfato
ng	Nanogramos
NOM	Norma Oficial Mexicana
OMS	Organización Mundial de la Salud
ppb	Partes por billón
ppm	Partes por millón
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SSA	Secretaría de Salud
TMCA	Tasa Media de Crecimiento Anual

INDICE DE CUADROS

Página

Cuadro 1	Municipios comprendidos en la región de los Altos de Jalisco y Ciénega. Cuenca lechera del estado de Jalisco	6
Cuadro 2	Tasa de biotransformación de aflatoxina B ₁ de la ración a AFM ₁ en la leche.	12
Cuadro 3	Límites máximos permisibles de aflatoxinas en los cereales destinados para el consumo humano y animal según la NOM-188-SSA1-2002	24
Cuadro 4	Características de los animales seleccionados para el desarrollo de la prueba <i>in vivo</i>	41
Cuadro 5	Diseño experimental para la exposición a AFB ₁ con y sin adsorbentes	43
Cuadro 6	Niveles de aflatoxinas totales por municipio pertenecientes a la región de los Altos y Ciénega, Jalisco	48
Cuadro 7	Niveles de aflatoxinas M ₁ por municipio pertenecientes a la región de los Altos y Ciénega, Jalisco	54
Cuadro 8	Valores promedio de los parámetros de calidad de la leche durante el modelo Núcleo de exposición a AFB ₁	67
Cuadro 9	Valores porcentuales de los parámetros de calidad de la leche durante el modelo Integral de exposición a AFB ₁ .	68

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Incrementos en la producción nacional de leche durante el período 1990-2006 (SIAP-SAGARPA, 2007)	4
Figura 2 Estacionalidad de la producción de leche en México (SIAP-SAGARPA, 2007)	4
Figura 3 Principales estados productores de leche en México durante el período 2003-2007 (SIAP – SAGARPA, 2007)	5
Figura 4 Estructura química de las aflatoxinas	9
Figura 5 Biotransformación de la aflatoxina B ₁ a metabolitos reactivos	10
Figura 6 Mecanismo de toxicidad y caminos metabólicos involucrados en la biotransformación y detoxificación	15
Figura 7 Ubicación de los municipios en la región de los Altos de Jalisco y Ciénega (México) examinados durante Septiembre-Octubre del 2007	37
Figura 8 Niveles de aflatoxina totales (AFT) ($\mu\text{g kg}^{-1}$) en raciones de la región de los Altos de Jalisco y Ciénega (México)	49
Figura 9 Niveles de AFM ₁ en leche cruda $\mu\text{g L}^{-1}$ durante la exposición a AFB ₁ (Modelo Núcleo)	59
Figura 10 Porcentaje de reducción de AFM ₁ en leche por efecto de los adsorbentes (Modelo Núcleo)	59
Figura 11 Niveles de AFM ₁ en leche cruda $\mu\text{g L}^{-1}$ durante la exposición a AFB ₁ (Modelo Integral)	60
Figura 12 Porcentaje de reducción de AFM ₁ en leche por efecto de los adsorbentes (Modelo Integral)	61

AGRADECIMIENTOS

Al Departamento de Salud Pública del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara por el apoyo brindado en el laboratorio de Residuos Tóxicos II.

A mi Directora

Waldina Patricia Reyes Velázquez, por permitirme continuar en la investigación, por creer en mí, por su dedicación, paciencia, e invaluable aportación para la realización de este trabajo.

A mis Asesores

Dr. Federico Rojo, por su apoyo incondicional en la realización de los requerimientos metodológicos necesarios, por su legado en mi formación y por su excelente persona.

M.C. Ernesto de Lucas Palacios, por su valiosa aportación con sus conocimientos dentro y fuera del establo.

Hago un reconocimiento a la MVZ. Martha Adriana Nathal Vera y al PMVZ. Víctor Hugo Isaías Espinoza, por su valiosa colaboración para la culminación de la tesis y de mi formación en la Maestría.

A todo el personal del Rancho Cofradía, involucrado en el manejo y funcionamiento del establo, por que sin ellos no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

DEDICATORIAS

A mi madre MARIA TRINIDAD MARTINEZ SILVA, quien en vida me dio todo su amor y cariño, inculcando mi superación, por que no existirá otro amor más grande que el de ella, gracias MAMÁ en cualquier parte del universo que te encuentres.

A mi padre PEDRO PATRICIO MEMBRILA, quien me enseñó con su ejemplo la honradez, dignidad, esfuerzo y respeto, valores que me han permitido enfrentar a la vida.

RESUMEN

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios producidos por especies del género *Aspergillus*, se presentan frecuentemente en granos, cereales y semillas oleaginosas. Estas micotoxinas causan efectos mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos en humanos y animales. En bovinos productores de leche el consumo de alimento contaminado con aflatoxina B₁ (AFB₁) determina la presencia de aflatoxina M₁ (AFM₁) en leche, ambos potentes carcinógenos del grupo 1 (IARC). En México las normas oficiales NOM 188-SSA1-2002 y NOM 184-SSA1-2002 establecen el límite máximo permitido para AFB₁ y AFM₁ de 20 µg kg⁻¹ y 0.5 µg L⁻¹ respectivamente. El objetivo del presente estudio fue conocer los niveles de dichas micotoxinas en la región de los Altos y Ciénega, Jalisco, además de evaluar el uso de adsorbentes de micotoxinas en raciones contaminadas por AFB₁ para la reducción de los niveles de AFM₁ en leche. Durante el periodo de Septiembre-Octubre de 2007 se obtuvieron muestras de leche y ración integral de bovinos provenientes de 40 establos localizados en los municipios de Acatic, Jalostotitlán, Ocotlán, San Juan de los Lagos, Tepatitlán, Tototlán, Valle de Guadalupe y Zapotlanejo. Por otra parte, se evaluaron 3 adsorbentes de micotoxinas bajo dos modelos de exposición a AFB₁ denominados Núcleo e Integral. El primer modelo utilizó un diseño experimental de Cuadrado Latino con 4 tratamientos (T-1: testigo con exposición a 40 µg kg⁻¹ de AFB₁; T-2: 40 µg kg⁻¹ de AFB₁ + montmorillonita; T-3: 40 µg kg⁻¹ de AFB₁ + clinoptilolita y T-4: 40 µg kg⁻¹ de AFB₁ + extracto derivado de paredes celulares de *Saccharomyces cerevisiae*= MOSC), con 4 grupos de 3 vacas cada uno y 4 periodos de 11 días, todos los grupos recibieron todos los tratamientos. El segundo modelo se realizó con un diseño experimental por bloques, un grupo de 4 vacas recibió en diferente periodo los 4 tratamientos previamente descritos. Los resultados fueron analizados mediante ANOVA y las diferencias estadísticas se establecieron por la prueba de Tukey ($P < 0.05$). Se encontró contaminación por aflatoxinas totales en 92.5 % de las raciones de bovinos, los niveles fluctuaron de 4.82 a 24.90 µg kg⁻¹, diferentes estadísticamente entre municipios ($P < 0.05$). Del total de muestras positivas 9.3 % (3/40) presentaron niveles superiores a los permitidos por la NOM. AFM₁ se detectó en el 80 % de las muestras de leche, con un rango de 0.006 a 0.065 µg L⁻¹ en los municipios evaluados, ninguna de las muestras de leche superó el máximo permitido. El estudio del uso de adsorbentes de micotoxinas en raciones de bovinos, permitió comparar dos métodos de exposición a AFB₁ en el alimento. Los resultados reportados bajo el modelo Núcleo no mostraron eficiencia significativa entre tratamientos, observándose una tasa de biotransformación de AFB₁ a AFM₁ de 3.2 % y una eliminación promedio de AFM₁ en la leche de 1.084 µg L⁻¹ (T-2), 1.106 µg L⁻¹ (T-3) y 1.193 µg L⁻¹ (T-4). El porcentaje de reducción en la eliminación de AFM₁ fue de 19 %, 17.6 % y 11.2 % respectivamente para T-2, T-3 y T-4 respecto al testigo. El modelo Integral permitió demostrar la eficiencia de los adsorbentes, encontrándose diferencias estadísticas entre tratamientos ($P < 0.05$). La tasa de biotransformación de AFB₁ a AFM₁ fue de 1.8 %, con niveles de eliminación de AFM₁ de 0.736 µg L⁻¹(T-1), 0.492 µg L⁻¹(T-2), 0.465 µg L⁻¹ (T-3) y de 0.649 µg L⁻¹ (T-4), correspondiendo un porcentaje de reducción de 33.2 %, 36.8 % y 12 % en cada tratamiento respecto al testigo. Los adsorbentes minerales montmorillonita y clinoptilolita permitieron reducir significativamente los niveles de AFM₁ en leche, logrando permanecer por debajo del permitido por la NOM. Se concluye que la contaminación por aflatoxinas en raciones de bovinos y de AFM₁ en leche de los 8 municipios estudiados está dentro de los límites establecidos por las normas Mexicanas y que el modelo Integral permite evaluar con eficiencia el uso de adsorbentes de micotoxinas en pruebas *in vivo* con bovinos productores de leche.

I. INTRODUCCION

Las micotoxinas se definen como compuestos orgánicos, biológicamente activos y de amplio espectro causantes de intoxicaciones agudas y crónicas, con efectos mutagénicos, teratogénicos y carcinogénicos. La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación estima que las micotoxinas afectan el 25 % de la producción agrícola anual.

Los síndromes tóxicos causados por la ingestión de micotoxinas se denominan micotoxicosis. En las explotaciones pecuarias, importantes pérdidas económicas se asocian al efecto subclínico de las micotoxinas. Su presencia ocasiona alteraciones en diversos parámetros productivos, entre ellos, consumo de alimento, ganancia de peso y conversión alimenticia. Las aflatoxinas, micotoxinas producidas principalmente por *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*, representan una de las principales sustancias con elevada frecuencia de aparición en la materia prima destinada a la alimentación de animales. Los sustratos susceptibles o naturalmente contaminados con estas especies son: maíz, sorgo, cacahuete, arroz, trigo, entre otros (Bennett y Klich, 2003).

Las aflatoxinas son un grupo de derivados difuranocumarinas relacionados estructuralmente. Se han identificado 18 tipos de aflatoxinas, de las cuales las más frecuentes en los alimentos son la B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ y M₂. Aflatoxina M₁ (AFM₁) es un metabolito hidroxilado de la aflatoxina B₁ (AFB₁), secretada en la leche de los animales que consumen alimentos contaminados con AFB₁. Se ha establecido que la cantidad de AFM₁ secretada es proporcional a la cantidad de AFB₁ ingerida. La tasa de conversión de AFB₁ en AFM₁ es en promedio a 1.8 % con rango de 0.3-6.2 % (Magan y Olsen, 2004). Las aflatoxinas poseen actividad mutagénica y carcinogénica y, por tanto, su presencia en los alimentos destinado a humanos y piensos representa un potencial riesgo para la salud de los mismos. Los estudios toxicológicos indican que AFB₁ es la especie química más potente, y en orden decreciente se identificaron a AFM₁, AFG₁, AFB₂, AFG₂. La Agencia Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC) y el Comité Mixto de Expertos en Aditivos Alimentarios de la FAO/OMS incluyen a las aflatoxinas dentro del grupo 1, considerándolas cancerígenas para el hombre. La regulación vigente en México y EUA ha establecido que el nivel máximo tolerable para aflatoxinas en

alimentos destinados a bovinos productores de leche es de $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ y para AFM₁ en leche y otros productos lácteos, no debe superar $0.5 \mu\text{g kg}^{-1}$, mientras que la Comunidad Europea (CE) ha fijado como valores permitidos $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ y $0.05 \mu\text{g kg}^{-1}$ respectivamente (FAO, 2004).

Diferentes métodos han sido evaluados para destoxificar o descontaminar los alimentos que presentan niveles de micotoxinas. Entre ellos, se emplean estrategias tendientes a reducir el estrés hídrico (sistemas de riego), utilizar cultivos resistentes y mejorar las condiciones de secado de los granos y alimentos terminados. Estas acciones intentan reducir o prevenir la infección por especies de *Aspergillus* y la síntesis de aflatoxinas (IARC, 2002). Sin embargo, es frecuente la presentación natural de aflatoxinas en los alimentos terminados, particularmente, en regiones tropicales y subtropicales (Prandini *et al.*, 2008). La incorporación de adsorbentes no nutritivos en los alimentos contaminados representa una propuesta práctica en la prevención de la aflatoxicosis (Phillips *et al.*, 2002; 2008). Han sido realizados numerosos estudios de adsorción *in vitro*, pero es necesario que los adsorbentes sean estudiados *in vivo* para establecer su efectividad en animales (Diaz *et al.*, 2004). Particularmente en vacas productoras de leche, existen pocos estudios publicados en comparación con otras especies animales. Entre las principales desventajas, se destacan el elevado costo que implica realizar estudios con bovinos, la labor intensiva asociada al manejo y control de los animales, la diversidad de las formulaciones, la distribución de las micotoxinas y la variabilidad metabólica de las vacas productoras de leche.

El uso de adsorbentes de naturaleza mineral han sido utilizados con el objeto de reducir las micotoxinas. Bentonita de sodio, zeolitas, aluminosilicatos y paredes celulares de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) han demostrado la capacidad de unirse a las micotoxinas y, por tanto, reducir su disponibilidad o absorción en el tracto gastrointestinal de rumiantes durante la digestión del alimento contaminado, así como la eliminación de metabolitos en la leche (Spotti *et al.*, 2005).

II. ANTECEDENTES

II.1 Producción de leche en México

En México, la producción de leche de vaca pasó de 6'141,545 a 10'029,274 miles de litros entre 1990-2006, denotando al final de este período un incremento anual del 1.7 % con respecto a los registros de los años 2005-2006 (SIAP-SAGARPA, 2007) (Figura 1). Así mismo, se destaca que la Tasa Media de Crecimiento Anual (TMCA) en los últimos años se ubicó en el orden del 3 %. Por tanto, es posible enumerar los principales factores que contribuyeron al incremento en la producción de leche. Entre ellos: (i) los avances en la tecnificación de la producción lechera, (ii) el adecuado uso y manejo de las explotaciones pecuarias en relación al suministro de dietas balanceadas, (iii) el manejo de ganado con elevado desempeño productivo y (iv) la adquisición de equipos, los cuales redundaron en procesos más eficientes (SAGARPA, 2005).

A pesar de los incrementos en la productividad, se remarca el déficit existente debido a la demanda de este producto por la población. Las estimaciones realizadas durante el año 2004 por la Coordinación General de Ganadería (CGG – SAGARPA) indicaban que el Consumo Nacional Aparente de leche (CNA) se incrementó en 1 % en relación al año anterior. Este incremento, estaba representado en un 70 % por una mayor oferta nacional siendo el 30 % a causa de importaciones. En igual sentido, la CGG se expide indicando que el mayor consumo también obedece a una mejor situación adquisitiva de algunos sectores de la población mexicana.

Es necesario destacar dos aspectos sobresalientes en cuanto a la producción de leche nacional: (i) la distribución geográfica de las diferentes entidades productivas y (ii) la estacionalidad de la producción de leche (Figuras 2 y 3).

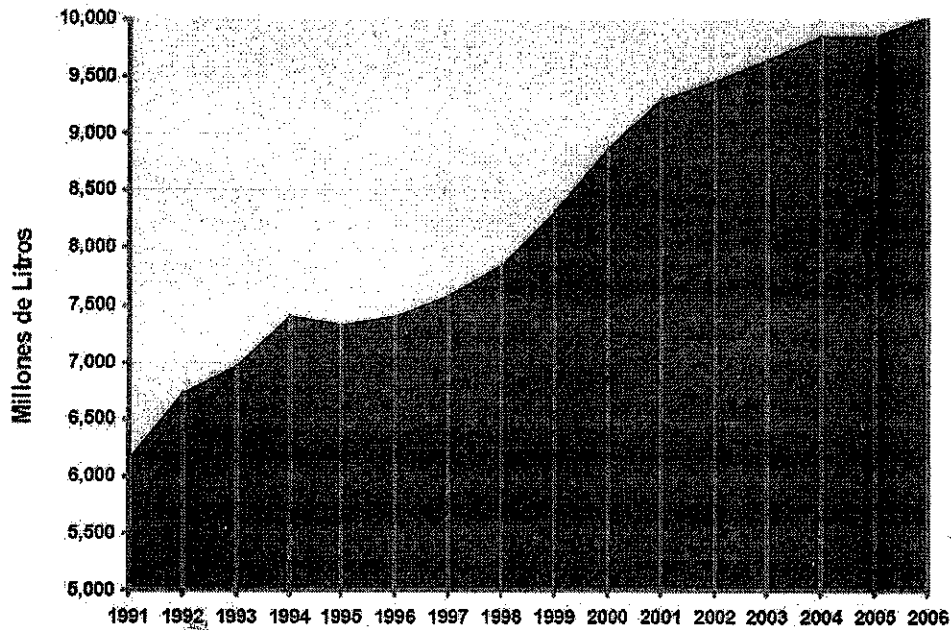


Figura 1. Incrementos en la producción nacional de leche durante el período 1991-2006 (SIAP-SAGARPA, 2007).

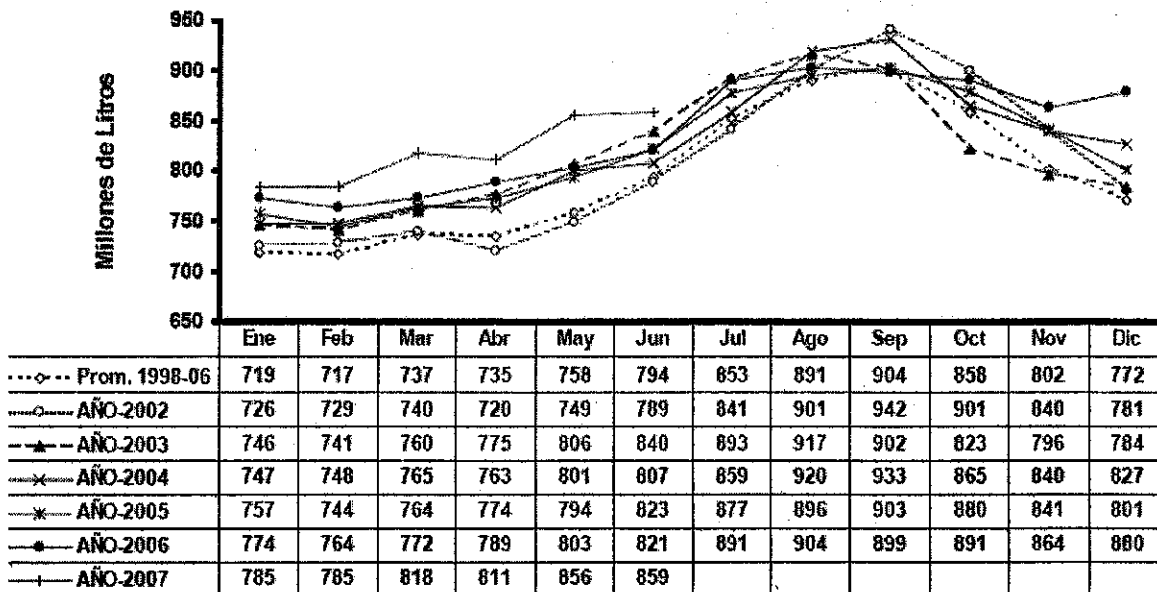


Figura 2. Estacionalidad de la producción de leche en México (SIAP-SAGARPA, 2007).

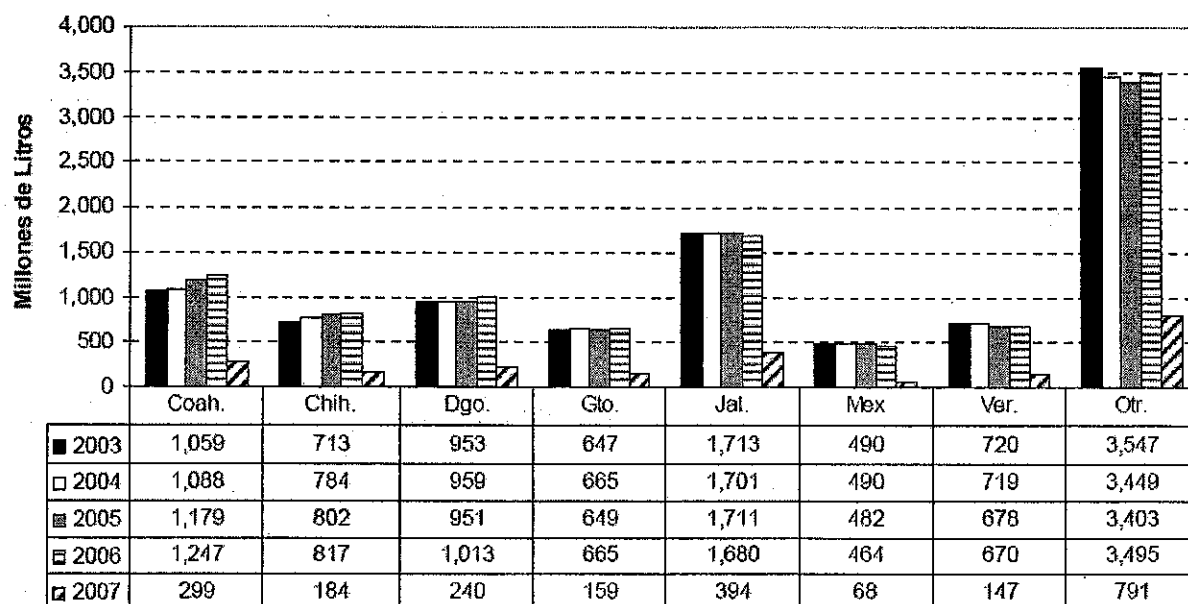


Figura 3. Principales estados productores de leche en México durante el periodo 2003-2007 (SIAP – SAGARPA, 2007).

II.1.1 Situación de la región de los Altos de Jalisco

La producción de leche en el estado de Jalisco representa el 17.4 % de la oferta nacional, con pronóstico al cierre del año 2008 de 1'815,984 miles de litros (<http://www.siap.gob.mx/>). En el estado sobresale la zona lechera de Los Altos, que aporta más del 60 % de la producción estatal. Esta región está caracterizada por ser de tipo familiar (70-80 % de los productores). La distribución dispone de una estructura empresarial con mayor grado de tecnificación en sus etapas de proceso (Gómez *et al.*, 2003). Además de los Altos, las regiones Centro, Sur, Costa y Norte del estado de Jalisco forman parte del sistema productivo. No obstante, los Altos representan la principal zona de producción de leche en función del número de animales concentrados a esta actividad (47 %) y la superficie ocupada en función del estado (20 %).

Los Altos y Ciénega Jalisco están conformados por 26 municipios (Cuadro 1). En esta representatividad, un productor lechero es definido como aquel que posee al menos 10 vacas con una producción continua de leche durante el año. Según lo informado en el Padrón de productores lecheros del estado de Jalisco (2005), el municipio de Acatic contaba con 195 productores activos (sobre un total de 420) con una producción promedio de leche de 14.5 ± 4.1 L día⁻¹.

Cuadro 1. Municipios comprendidos en la región de los Altos Jalisco y Ciénega Jalisco. Zona lechera del estado de Jalisco

Distrito	Región	Municipio
Lagos de Moreno	Altos Norte	San Juan de los Lagos
Lagos de Moreno	Altos Norte	Encarnación de Díaz
Lagos de Moreno	Altos Norte	Lagos de Moreno
Lagos de Moreno	Altos Norte	Teocaltiche
Lagos de Moreno	Altos Norte	Villa Hidalgo
Lagos de Moreno	Altos Norte	Ojuelos de Jalisco
Lagos de Moreno	Altos Norte	San Diego de Alejandría
Lagos de Moreno	Altos Norte	Unión de San Antonio
Lagos de Moreno	Altos sur	Tepatitlán de Morelos
Lagos de Moreno	Altos sur	San Miguel el Alto
Lagos de Moreno	Altos sur	Arandas
Lagos de Moreno	Altos sur	Acatic
Lagos de Moreno	Altos sur	San Julián
Lagos de Moreno	Altos sur	Valle de Guadalupe
Lagos de Moreno	Altos sur	Yahualica de González Gallo
Lagos de Moreno	Altos sur	Cañadas de Obregón
Lagos de Moreno	Altos sur	Jesús María
Lagos de Moreno	Altos sur	Jalostotitlán
Lagos de Moreno	Altos sur	Mexxicacán
La Barca	Ciénega	Tototlán
La Barca	Ciénega	Atotonilco el Alto
La Barca	Ciénega	La Barca
La Barca	Ciénega	Zapotlán del rey
La Barca	Ciénega	Poncitlán
La Barca	Ciénega	Ocotlán
La Barca	Ciénega	Jamay
La Barca	Ciénega	Ixtlahuacán de los Membrillos

En su caracterización, se destaca que en el 85.1 % de los establos disponen de ordeñadora mecánica, el 89.2 % de energía eléctrica, el 59 % de tanque de enfriamiento y el 58 % de asesoría técnica. Así mismo, el 100 % de los establos compran el alimento concentrado y la producción propia de forrajes era levemente superior al 60 %. Durante el relevamiento, el municipio de Jalostotitlán reportaba 784 establos productores de leche. Sobre una muestra de 51 establos productores capaces de producir menos de 1000 L de leche por día, el promedio por vaca es de $13.1 \pm 3.2 \text{ L}^{-1}$. Similares indicadores se presentan en los municipios de San Juan de los Lagos, San Julián, San Miguel y Valle de Guadalupe. No obstante, la producción de leche (L / día / animal) se presenta en un rango de $11.5 \pm 3.1 - 14.5 \pm 4.1$.

Es posible presuponer que los sistemas productivos de leche enfrentan problemas relacionadas con la calidad del alimento destinado a sus animales en virtud del manejo, producción y almacenamiento del mismo. Este alimento, bajo condiciones predisponentes, es susceptible a la infección y/o contaminación por hongos, entre ellos, especies productoras de micotoxinas que se caracterizan por ocasionar un severo impacto en la salud animal y, a través de los productos obtenidos de estos animales (carne, leche) comprometer la salud del consumidor. La caracterización social, cultural y laboral de la región de los Altos, permite hipotetizar que en este modelo productivo pudieran desencadenarse procesos crónicos de exposición a micotoxinas.

II.2 Generalidades de las micotoxinas

Las micotoxinas son aquellos compuestos producidos por el metabolismo secundario de los hongos, de estructuras químicas muy diversas y causantes de intoxicaciones agudas, crónicas y/o desencadenantes de patologías asociadas a la disminución de la resistencia inmunológica en humanos y animales. Al presente, se conocen cerca de 300 micotoxinas pero pocas se han estudiado con detalle (Yiannikouris y Jouany, 2002).

La exposición a micotoxinas en animales y humanos puede ocurrir a través de diversas vías, denominándose "micotoxicosis" a los síndromes ocasionados por estas sustancias. Diversos factores determinan la severidad de los mismos, entre ellos: toxicidad de los compuestos,

grado de exposición, edad, estado nutricional del individuo y presencia de otras sustancias (Peraica *et al.*, 1999). Las micotoxinas son producidas por un sinnúmero de especies fúngicas, entre ellas, los principales géneros de interés en salud humana y animal son: *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. En las explotaciones pecuarias importantes pérdidas económicas se asocian al efecto subclínico de las micotoxinas, entre ellas, aflatoxinas, ocratoxina A, tricotecenos, fumonisinas y zearalenona (Pittet, 1998).

El ingreso de micotoxinas en la cadena de producción de los alimentos para consumo humano y animal puede iniciarse desde la etapa de cultivo, cosecha y almacenamiento de la materia prima o producto elaborado. El grado de contaminación alcanzado dependerá de diversos factores, entre ellos: aeración, temperatura, disponibilidad de agua, daño mecánico, interacciones microbianas, insectos, concentración de inóculo y capacidad toxigénica de/los hongos (Alfred y Magan, 2004).

La producción de micotoxinas no se correlaciona directamente con el crecimiento de hongos, por lo que la aplicación de compuestos fungicidas y fungistáticos no necesariamente ocasiona la alteración sobre los niveles de las micotoxinas (Peraica y Domijan, 2001). Así mismo, en los alimentos pueden encontrarse más de una micotoxina, ya que una misma especie de hongo puede producir diversos metabolitos. Residuos de estas toxinas también pueden encontrarse en alimentos de origen animal como leche, huevos, carne y queso (Spotti *et al.*, 2005).

La naturaleza de los efectos tóxicos observados en animales y humanos a causa del consumo o exposición a micotoxinas pueden ser atribuidos a la constitución química “diversa” de las mismas. Algunas inducen efectos agudos y crónicos a largo plazo resultando en teratogenicidad y carcinogenicidad (principalmente en hígado y riñones), estrogenicidad o inmunosupresión, afectando animales y al hombre (D’ Mello *et al.*, 1999).

II. 3. Aflatoxinas

Las aflatoxinas son una familia de micotoxinas producidas principalmente por *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius*. Su estructura química corresponde a difuranocumarinas formadas por la vía policétida identificándose 18 tipos, de los cuales los más frecuentes en los

alimentos son la B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ y M₂ (Figura 4). La AFB₁ es la forma más común y potente de estas toxinas (Klich *et al.*, 2000).

La AFB₁ es biotransformada a través de diferentes vías, particularmente por el sistema microsomal hepático (citocromo P450), dando lugar a por lo menos siete metabolitos (Eaton y Gallagher, 1994), cada uno con diferente actividad biológica (Figura 5). El principal metabolito de AFB₁ es el epóxido reactivo (AFB₁-8,9 exoepóxido y AFB₁-8,9 endoepóxido), pero la forma exo está implicada en la formación de aductos covalentes con el ADN (8,9-dihidro-8-(N7-guanyl)-9-hydroxy-AFB₁ ó AFB₁-N7-Gua), ARN y proteínas (Iyer *et al.*, 1994; Osweiler, 1996). AFB₁-N7-Gua confiere las propiedades mutagénicas del compuesto (Wild y Turner, 2002).

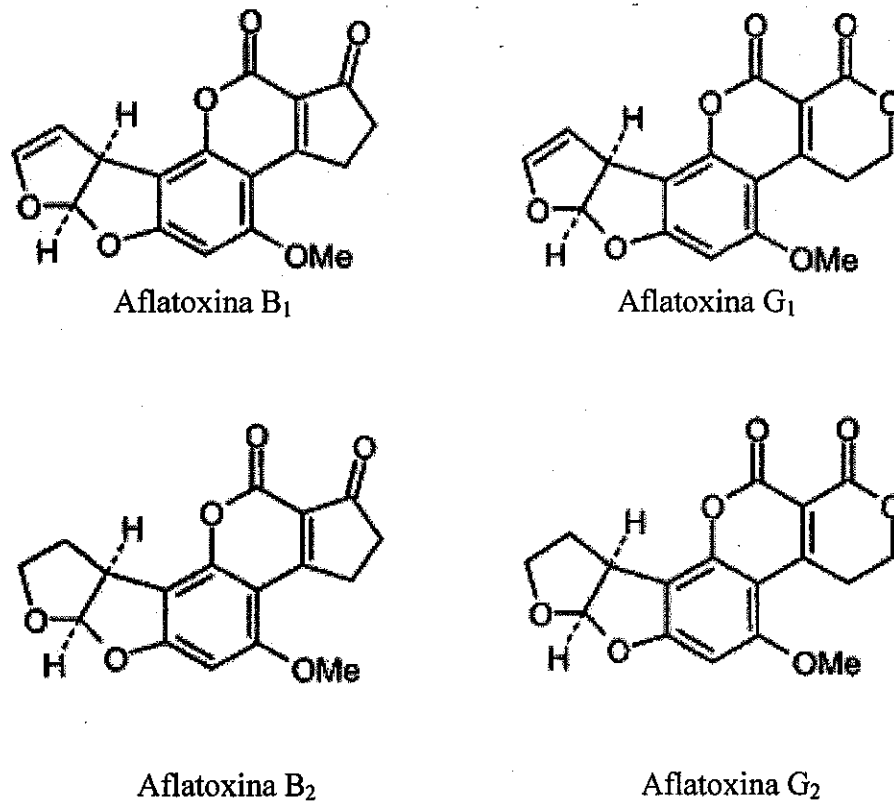


Figura 4. Estructura química de las aflatoxinas

Se han descrito cuatro vías metabólicas involucradas en la transformación de AFB₁, que incluyen: a) alquilación (AFB₁ > AFP₁); b) Cetoreducción (AFB₁ > aflatoxicol), c) epoxidación (AFB₁>AFB₁-8,9-epóxido) y d) hidroxilación (FB₁>AFM₁) (Figura 6).

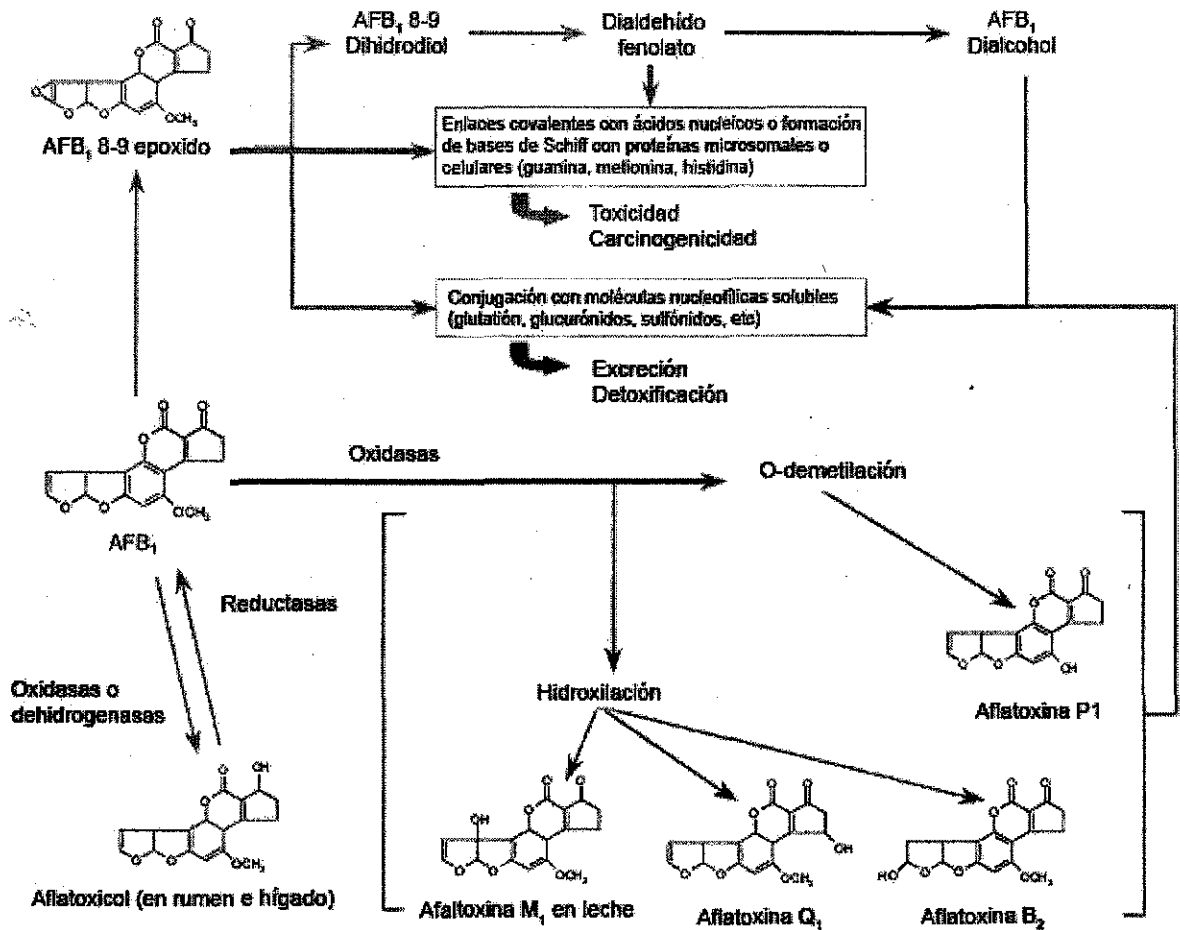


Figura 5. Biotransformación de la aflatoxina B₁ a metabolitos reactivos (Yiannikouris y Jouany, 2002).

II.3.1. Biotransformación de AFB₁ a AFM₁

En ganado bovino la transferencia de aflatoxinas del alimento a la leche es de suma importancia cuando consumen raciones contaminadas con AFB₁, la mayor parte de esta toxina se degrada en rumen, mientras que una porción menor es absorbida para ser metabolizada en hígado a aflatoxina M₁ (Pettersson, 1997). También, se ha descrito biotransformación en la mucosa nasal olfatoria, presentando mayor actividad que a nivel hepático debido a las diferencias en el perfil isoenzimático del citocromo P-450 (Larsson *et al.*, 1989). Posteriormente los metabolitos aparecen en la leche dentro de las primeras horas después del consumo y regresan a niveles basales dentro de los 2-3 días posteriores al retiro de la toxina en la dieta (Ferbisch *et al.*, 1986). Enseguida este metabolito se torna relativamente estable y circula por la sangre hasta que es eliminado en la leche, orina, bilis o se metaboliza (Pettersson, 1997).

La tasa de transferencia para AFM₁ se presenta en un rango de 0.32 a 6.2 %, con un promedio de 1.8 % y una desviación estándar de 1.22 (Cuadro 2). El grado de biotransformación que ocurre en el hígado de las vacas que hayan consumido AFB₁ a través de la alimentación depende de la actividad oxidativa y microsomal, individualidad de los animales, raza, producción de leche, ausencia o presencia de mastitis bacteriana, entre otros (Price *et al.*, 1985; Frobish *et al.*, 1986; Fremy *et al.*, 1987; Munksgaard *et al.*, 1987; Pettersson *et al.*, 1989; Harvey *et al.*, 1991; Veldman *et al.*, 1992; Veldman, 1992; Galvano *et al.*, 1996; Chopra *et al.*, 1999).

La producción de leche representa un importante indicador de variación. Los estudios en Suecia (Pettersson *et al.*, 1989) y en Holanda (Veldman *et al.*, 1992; Veldman, 1992) con vacas de alta producción mostraron elevada tasa de biotransformación de AFM₁ de 2.6 % y 2.7 - 6.2 % respectivamente. Veldman, (1992) demostró que la transferencia se incrementa en aproximadamente 0.1 % por kg de leche producida. El promedio en vacas altas productoras (>25 kg día⁻¹) es 2.66 ± 1.24 %, siendo la principal causa de este efecto la mayor producción de leche y en consecuencia mayor cantidad de AFM₁ excretada.

Cuadro 2. Tasa de biotransformación de aflatoxina B₁ de la ración a AFM₁ en la leche.

Consumo AFB ₁ µg día ⁻¹	Producción lechera kg día ⁻¹	Concentración de AFM ₁ ng kg ⁻¹	Cantidad de AFM ₁ µg día ⁻¹	Tasa de biotransformación %	Cociente AFM ₁ /AFB ₁	Referencia
39	39.5	60	2.40	6.20	1.54	Veldman <i>et al.</i> , 1992
34	16.6	40	0.60	1.80	1.18	
14	17.4	20	0.40	2.60	1.43	
33	39.3	30	1.20	3.80	0.91	
57	37.0	60	2.30	4.00	1.05	
56	14.8	100	1.40	2.50	1.79	
78	24.8	80	2.08	2.70	1.02	Veldman, 1992
53	27.8	51	1.42	2.60	0.96	Pattersson <i>et al.</i> ,
108	28.6	99	2.84	2.50	0.92	1989
492	31.8	360	11.45	2.33	0.73	Frobish <i>et al.</i> ,
349	14.6	330	4.82	1.38	0.95	1986
2491	32.3	1500	48.45	1.94	0.60	
966	30.4	620	18.85	1.95	0.64	
742	18.5	590	10.92	1.47	0.80	
885	20.0	550	11.00	1.33	0.62	
17	27.7	25	0.69	4.07	1.47	Price <i>et al.</i> , 1985
122	27.7	100	2.77	2.27	0.82	
392	27.7	190	5.26	1.34	0.48	
2049	27.7	1250	34.63	1.69	0.61	
589	27.7	380	10.53	1.79	0.65	
56	19.4	16	0.30	0.53	0.28	Galvano <i>et al.</i> ,
56	19.3	16	0.31	0.54	0.28	
56	19.7	16	0.31	0.55	0.28	
67	17.6	17	0.30	0.45	0.26	
67	17.7	18	0.31	0.47	0.27	
67	17.4	18	0.32	0.45	0.27	
57	20.2	44	0.88	1.54	0.77	Munksgaard <i>et al.</i> , 1987
142	19.9	89	1.77	1.25	0.63	
226	18.4	141	2.60	1.15	0.62	
311	20.1	112	2.24	0.72	0.36	
2400	8.2	1850	15.20	0.63	0.77	Harvey <i>et al.</i> ,
2400	8.2	1990	16.32	0.68	0.83	
1200	8.2	910	7.46	0.62	0.76	
1200	8.2	900	7.38	0.62	0.75	
3300	21.0	510	10.71	0.32	0.15	Fremy <i>et al.</i> ,
Media				1.81	0.79	
Desv.				1.22	0.38	
Est.						
Mediana				1.65	0.65	
Máximo				6.20	1.79	
Mínimo				0.32	0.15	

Las vacas afectadas por mastitis presentan una alta eliminación de AFM₁ debido a la gran permeabilidad de las membranas de la ubre (Veldman *et al.*, 1992). La rutina de alimentación y ordeño podría influir en la transferencia, pero esto aun no se ha estudiado.

La estructura química de la AFM₁ corresponde al derivado 4-hidroxi de aflatoxina B₁, su masa molecular es de 328 Da y la fórmula molecular es C₁₇H₁₂O₇. La AFM₁ es usualmente considerada producto de la destoxicación de aflatoxina B₁ y puede estar presente además de la leche de vaca, en la leche materna humana. Los epóxidos de AFB₁ y de AFM₁ generados por la biotransformación se unen al ADN, sin embargo se presenta diferencia en el potencial genotóxico entre la AFB₁ y AFM₁ teniendo esta última menor capacidad para inducir a la formación de dihidrodiol (Hussein y Brasell, 2001).

II.3.2. Mecanismo de acción, toxicidad y destoxicación

II.3.2.1. Mecanismo de acción

Las aflatoxinas son sustancias altamente tóxicas, con efectos inmunosupresores, mutagénicos, genotóxicos, carcinogénicos y teratogénicos. La Agencia Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer encontró que existen suficientes evidencias en humanos para considerarlas cancerígenas, clasificándolas como Grupo 1 (IARC, 2002).

El mecanismo de acción de las aflatoxinas deriva en una inhibición de la síntesis de proteínas por modificación de la cadena de ADN y, consecuentemente, la alteración en la síntesis de ARN mensajero y en los procesos de transcripción. El aducto AFB₁-N7-Gua es capaz de intercalarse en la doble hélice de ADN promoviendo la formación de sitiosapurínicos. Las mutaciones inducidas en el ADN están representadas por transversiones G>T (Foster *et al.*, 1983), G>A (Cariello *et al.*, 1994), G>C (Levy *et al.*, 1992), siendo la primera de ellas la más frecuente. Estas transversiones, los mecanismos de reparación del ADN y las lesiones desencadenan la formación de tumores (Foster *et al.*, 1983).

El impacto sobre la síntesis de proteína afecta la formación de enzimas necesarias para el metabolismo energético y la movilización de grasa. Así mismo, resulta en una disminución de las proteínas estructurales, formación de anticuerpos deficientes y síntesis incompleta de factores de la coagulación (Osweiler, 1996). Los efectos citotóxicos vinculados con aflatoxinas podrían estar asociados con las observaciones realizadas por los estudios de Bonsi *et al.*, (1999), quienes demostraron que AFB₁ puede inhibir la actividad nucleótido fosfodiesterasa en cerebro, hígado, corazón y tejidos del riñón. Shen *et al.*, (1995) observaron la peroxidación de lípidos y el consecuente daño oxidativo en los hepatocitos. El hígado es considerado el órgano blanco de la aflatoxicosis.

La sensibilidad de las diferentes especies animales varía aún dentro de una misma especie, y la severidad de la toxicidad depende de la dosis, duración de consumo, edad, sexo, tipo de alimento, contenido de la proteína dietaria, presencia de otras micotoxinas y sustancias farmacéuticas (Bennett y Klich, 2003). Las aflatoxinas pueden ocasionar diversos signos clínicos dependiendo de la especie y edad del animal. Aumentan la susceptibilidad a enfermedades infecciosas al afectar al sistema inmune o bien potencializar la infección bacteriana. Los síntomas de una infección secundaria, enmascaran el cuadro clínico de la aflatoxicosis. Durante la gestación pueden afectar a las hembras y progenie (Miller y Wilson, 1994).

La potencia de AFB₁ y AFM₁ para inducir daño al ADN y genotoxicidad fue evaluada en *Drosophila melanogaster in vivo*, demostrándose que la AFM₁ tiene una actividad genotóxica menor que AFB₁ en los mamíferos (Shibahara *et al.*, 1995). La toxicidad aguda de AFB₁ en patos y conejos fue observada con DL₅₀ de 0.3 a 0.5 mg kg⁻¹ de peso vivo; en perros 1.0 mg kg⁻¹; cerdos 0.62 mg kg⁻¹; monos 2.2 mg kg⁻¹; pollos de 6 a 16 mg kg⁻¹; en ratas 7 mg kg⁻¹ y en ratones 9 mg kg⁻¹ (Phillips *et al.*, 1994). La toxicidad de AFM₁ fue demostrada en patos jóvenes con DL₅₀ de 12-16 µg por ave. El examen histopatológico mostró lesiones en hígado y necrosis en túbulos renales similares a los causados por AFB₁. Los estudios de toxicidad desarrollados en truchas a largo plazo (12-20 meses), mostraron que el desarrollo de hepatomas se presentó en dietas que contenían 20 µg kg⁻¹. Estos resultados demuestran que este metabolito es un potente carcinógeno de hígado pero menor que AFB₁ (van Egmond,

1989). En otros estudios se sugiere que la polaridad de AFB₁ puede ser asociada con la alta incidencia de tumores intestinales. No obstante, van Egmond (1989) concluyó que la toxicidad de AFB₁ es similar o ligeramente menor que la AFB₁ en ratas y patos y, que la carcinogenicidad de AFB₁ es probablemente 1-2 veces menor que la AFB₁.

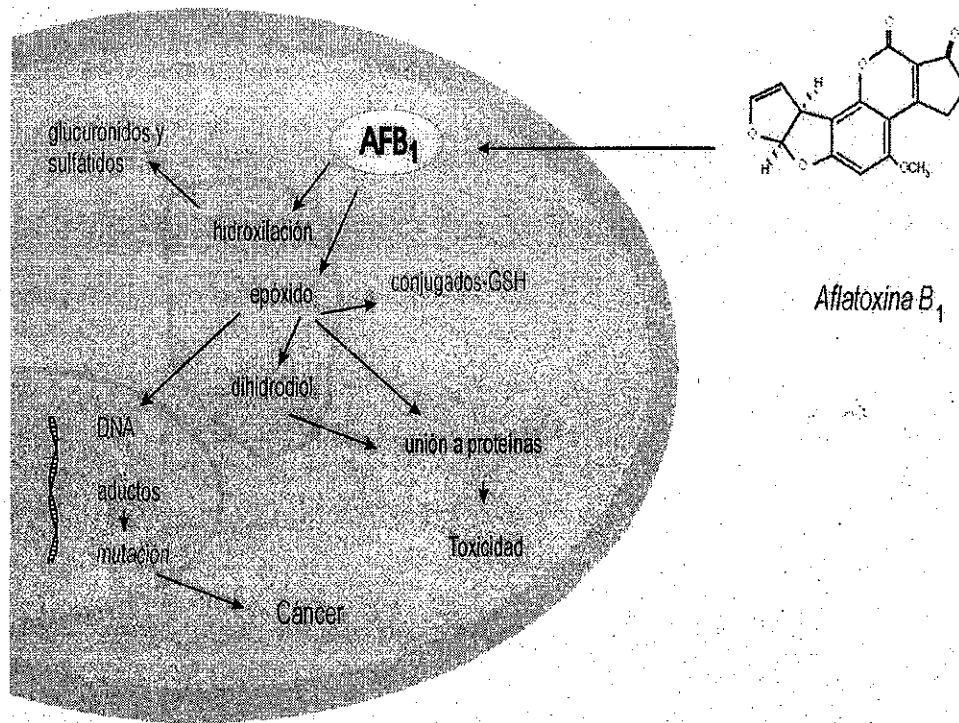


Figura 6. Mecanismo de toxicidad y caminos metabólicos involucrados en la biotransformación y detoxificación

II.3.2.2. Toxicidad

II.3.2.2a Efectos en bovinos

La AFB₁ se absorbe vía tracto gastrointestinal dentro del sistema portal sanguíneo y es conducida hacia el hígado donde se metaboliza. Una porción de aflatoxina es activada y fijada en el tejido hepático, algunos metabolitos conjugados de la AFB₁ solubles en agua, son excretados por la bilis y van a las heces, otras formas conjugadas solubles en agua, productos

de la degradación de AFB₁ y metabolitos no conjugados de ésta son excretados en el sistema circulatorio sanguíneo y se distribuyen sistémicamente. Eventualmente estos residuos van a la leche, músculo y tejidos (Huwig *et al.*, 2001).

En rumen se presenta una degradación de las aflatoxinas menor al 10 % para concentraciones de 1,0 a 10.0 µg mL⁻¹, con formación de aflatoxicol un potente tóxico derivado de AFB₁ (Auerbach *et al.*, 1998). Algunas bacterias son inhibidas por concentraciones menores de 10 µg mL⁻¹ de AFB₁, así estas toxinas llegan a distorsionar el desarrollo y actividad metabólica de los microorganismos del rumen (Kiessling *et al.*, 1984; Kubena *et al.*, 1997).

Cuando se presenta intoxicación aguda por aflatoxinas, se caracteriza por inapetencia, letargia, ataxia, pelo hirsuto y opaco, el animal puede morir en pocas horas o días. Las principales lesiones en hígado son congestión y hemorragias, acumulación de ácidos grasos en hígado, riñones y corazón y puede ser responsable de encefalopatías y edema (Pfohl, 2000). La aflatoxicosis crónica es más común, los síntomas incluyen reducción en la eficiencia alimenticia, de la producción de leche, ictericia y disminución del apetito (Nibbelink, 1986).

En vacas lecheras se ha observado disminución en la eficiencia reproductiva y en la producción de leche por el consumo de alimento que contenía 120 ppb de aflatoxinas, observándose incremento del 25 % en la producción cuando se retiró el alimento contaminado (Guthrie, 1979). En otro estudio se observó que la producción de leche disminuyó en vacas alimentadas con 100 µg kg⁻¹ de AFB₁ (Patterson y Anderson, 1982), mientras que una considerable reducción se apreció cuando se incluyeron de 100-300 µg de AFB₁ por kg⁻¹ de peso corporal (Mertens y Wyatt, 1977).

En general los rumiantes son más resistentes a la mayoría de las micotoxinas que los animales monogástricos, esto sugiere que el rumen y su población microbiana juegan un papel importante en la destoxificación, sin embargo, cuando la concentración de micotoxinas es elevada la población de protozoarios se ve más afectada que la fracción bacteriana lo que favorece las infecciones (Westlake *et al.*, 1989; Yiannikouris y Jouany, 2002). Sin embargo,

las aflatoxinas han demostrado afectar de forma negativa la producción, sistema inmune y metabolismo del rumen en los bovinos productores de leche (Hussein y Brasel, 2001).

II.3.2.2b. Efectos en humanos

La exposición de humanos con aflatoxinas se presenta por consumo de productos vegetales que han sido expuestos a cepas toxicogénicas de *A. flavus* o *A. parasiticus*, durante el crecimiento, cosecha o almacenamiento. La exposición secundaria o micotoxicosis secundaria ocurre por el consumo de productos derivados de animales alimentados con piensos contaminados con micotoxinas (Williams *et al.*, 2004). Entre los principales alimentos susceptibles de ser contaminados con aflatoxinas y utilizados como ingredientes en la alimentación se incluyen: granos (particularmente maíz, sorgo y milo), cacahuete, frijol y nueces de árbol (almendras, pistacho, etc), semillas oleaginosas (algodón, almendra de coco seca, entre otros) (FAO, 2004).

Dicha exposición es considerada un factor de riesgo importante para el desarrollo de carcinoma primario hepatocelular. Diversos estudios han vinculado la incidencia de cáncer de hígado al consumo estimado de aflatoxinas en la dieta (Li *et al.*, 2001). Se ha hipotetizado que el polimorfismo metabólico de los genes que regulan el metabolismo de aflatoxinas podría explicar las diferencias inter especies a la carcinogenicidad y la gran diferencia entre grupos humanos. Estudios de monitoreo de aflatoxinas pueden realizarse mediante el análisis de sus metabolitos en sangre, leche, y orina, además de la presencia de aductos de AFB₁-DNA y AFB₁-proteínas de la sangre, importantes biomarcadores de exposición a aflatoxinas (Wild y Turner, 2002).

La incidencia de carcinoma hepático primario es elevada en regiones de África y Asia. Aunque las poblaciones de esos países no fueron probadas serológicamente con HbsAg (antígeno de la hepatitis B), el resultado señaló que las aflatoxinas juegan un papel importante en el desarrollo de esta patología. En 1992, datos epidemiológicos apoyaron las observaciones previas, considerando además que el metabolito AFM₁ eliminado en la leche era un potencial hepatocarcinógeno de humanos (IARC, 2002).

Gong *et al.*, (2002), en sus estudios realizados en Benin y Togo, confirmaron la relación dosis-respuesta existente entre la exposición de aflatoxinas en niños menores de 8 años con la disminución del crecimiento y el bajo peso. Además, algunos investigadores han observado la disminución de vitamina A en hígado al incrementarse las concentraciones de aflatoxina (Turner *et al.*, 2003). La exposición a aflatoxinas puede también afectar la utilización de selenio y zinc en la nutrición, minerales esenciales para el buen funcionamiento del sistema inmunológico (Williams *et al.*, 2004).

II.3.2.3. Destoxificación y eliminación

La principal vía de destoxificación utilizada por el organismo para las formas tóxicas de las aflatoxinas (endo y exo-epóxidos) es mediada a través de la conjugación con Glutación S-transferasa (GST), reducción a Glutación (GSH) y la formación del conjugado AFB₁ (exo/endo) - GSH (Raney *et al.*, 1992; Johnson *et al.*, 1997; Guengerich *et al.*, 1998). Por otra parte, los epóxidos pueden sufrir una hidrólisis no enzimática, con lenta apertura del anillo y la formación de un dialdehído; el cual no se une al ADN pero sí (dado su ionización) a grupos aminos primarios (bases de Schiff) y, consecuentemente, la formación de aductos con proteínas (Raney *et al.*, 1992). El aducto Aflatoxina-albúmina (AF-alb) es uno de los más importantes (Sabbioni y Wild, 1991). Pasos sucesivos implican la mediación del NADPH y la reducción del dialdehído a formas dialcohólicas del mismo.

Las principales rutas de excreción dependerán del grado de polaridad alcanzado por la molécula o sus derivados luego de su paso por el rumen y de los procesos de biotransformación. Durante la producción de leche, el elevado caudal sanguíneo portando la forma bioactiva AFM₁ podría acumularse en las glándulas mamarias, ya que según Yiannikouris y Jouany (2002), el paso de este compuesto a la leche podría estar mediado por un transporte activo o difusión facilitada través del epitelio.

II.3.3. Incidencia de AFB₁ y AFM₁ en alimentos

II.3.3.1 Aflatoxina B₁

Las aflatoxinas son un importante riesgo para la salud en México por diversas razones: a) México es uno de los mayores consumidores de maíz en el mundo con un promedio de 325 g/día por persona (Elías-Orozco *et al.*, 2002), b) se importan 6 millones de toneladas de maíz por año con un costo de 550 millones de dólares representando el 11 % del total de las exportaciones de Norte América, c) las condiciones de almacenamiento del maíz son deficientes y no existe un monitoreo regular de la contaminación con aflatoxinas (Guzmán de Peña y Peña, 2005). El acuerdo de libre mercado con EUA (TLCAM) ha favorecido la tasa de importación de maíz en 140 %, debiendo cumplir este con las siguientes especificaciones:

- Maíz grano roto y material extraño < 3 % (límite máximo)
- Granos dañados < 5 % (límite máximo)
- Contenido de humedad < 15 %
- Contenido de aflatoxinas < 20 µg kg⁻¹ (límite máximo)

El Servicio Federal de Inspección de Granos de los EUA (Federal Grain Inspection Service - FGIS) lleva a cabo programas de inspección y acciones tendientes a asegurar la calidad de los granos comercializados en EUA y en el mercado internacional. No obstante, es necesario identificar que la calidad del grano en venta sólo es asegurada en el país de origen, por lo que el transporte en bodegas con escasas condiciones de almacenamiento, predisponen al riesgo del desarrollo fúngico y/o síntesis de micotoxinas. Es necesario tomar acciones tendientes a asegurar el arribo de los granos bajo las condiciones fitosanitarias declaradas al momento del embarque.

En México, las concentraciones de aflatoxinas en maíz se reportaron en un rango de 15 a 250 µg kg⁻¹ en 1986 (Guzmán de Peña, 1997). A raíz del elevado consumo de maíz en territorio nacional “120 kg/año/per cápita” (Guzmán de Peña y Peña, 2005), estos datos sugieren que la población podría estar expuesta a los efectos de las aflatoxinas. Además Reyes-Velázquez *et*

al. (2005) reportaron la presencia de aflatoxinas en harina de maíz nixtamalizado (rango 2.7-17 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

En relación a los niveles detectados de AFB₁ en piensos destinados para la alimentación de los animales, Flores *et al.* (2006) determinaron en México la presencia natural de AFB₁ durante el año 2003. Sus resultados indicaron que además de la co-presentación con otras micotoxinas de impacto en la salud animal (toxina T2, ocratoxina, citrinina, zearalenona), AFB₁ estuvo presente a niveles de 15.32 (rango 5-61), 31.4 (rango 8-77), 5.78 (rango 3-10), 9.55 (rango 2-35) ppb en ración completa, gluten, maíz y sorgo, respectivamente. Así mismo, el porcentaje de muestras positivas con valores superiores a los máximos permitidos fueron 18.7, 60, 0 y 3.1 %, respectivamente.

En un estudio reciente en México se evaluó la presentación natural de diferentes micotoxinas durante la etapa de conservación del ensilado de maíz. Los resultados indican que existe una simultaneidad de presentación de las principales micotoxinas de impacto en la salud animal. En dicho estudio, los niveles de aflatoxinas totales oscilaron desde 12.25 hasta 15.71 ppb durante los 6 meses del experimento. El análisis estadístico no determinó diferencias significativas entre los meses en estudio por lo que los resultados indican que las concentraciones detectadas de AFT podrían haber sido producidas durante la etapa de cultivo y cosecha del maíz (Reyes-Velázquez *et al.*, 2008).

II.3.3.2 Aflatoxina M₁

En una revisión realizada por Jonker *et al.* (1999) encontraron contaminación por AFM₁ en leche y derivados procedentes de diferentes países de Europa. En Holanda 15 muestras de derivados de leche presentaron contaminaciones inferiores a 0.02 y 19 muestras de alimentos para niños a base de leche estaban contaminadas con AFM₁ entre 0.02 y 0.06 ppb. En Alemania 284 muestras de leche líquida mostraron niveles inferiores a 0.01 ppb. En Francia e Italia estudios en quesos permitieron detectar AFM₁ en 311 muestras, encontrándose niveles de 0.005 y 0.25 ppb, el mayor porcentaje (65 %) presentaba contaminaciones entre 0.005 y 0.10 ppb.

Los estudios realizados por Rastogi *et al.* (2004) en India demostraron la incidencia de AFM₁ en leche fluida destinada al consumo por diferentes grupos etarios, principalmente infantes. Los resultados indicaron que el porcentaje de muestras positivas fue del 87.3 %. El rango de contaminación de AFM₁ en leche para infantes fue de 65-1,012 ng L⁻¹ resultando altamente superior al resto de la leche fluida (28-164 ng L⁻¹). Del total de muestras positivas, el 99 % excedió el límite máximo permitido por la Comunidad Europea (50 ng L⁻¹) y el 9 % del límite establecido para EUA (0.5 ng L⁻¹).

En Argentina, sobre un total de 77 muestras de leche analizadas el 23 % de las mismas presentaron niveles entre 0.01-0.03 µg L⁻¹. Por lo tanto, los resultados indicaron que las mismas se encontraron por debajo del nivel máximo permitido. Sin embargo, los autores destacan que AFM₁ fue detectada de manera más frecuente en leche en polvo (López *et al.*, 2003). En Brasil, los estudios realizados por Sassahara *et al.* (2005) determinaron la presencia de AFM₁ en el 24 % de las muestras examinadas. Del total de muestras positivas, sólo el 7 % presentó niveles superiores al máximo permitido (0.5 µg L⁻¹).

En EUA los análisis realizados por Stoloff *et al.* (1981) con 992 muestras de productos lácteos (leche en polvo, helado de vainilla, yogurt, queso Cheddar y Cottage) obtenidos en tres periodos durante 1979, permitieron observar solo una muestra de queso cottage contaminada con niveles de 0.3 µg kg⁻¹ de AFM₁. Por otra parte, los reportes de la FDA sobre análisis de leche reportaron de 1995 a 2000, 0.13 % de las muestras con niveles superiores al límite máximo permitido (FDA, 2000). Se describe que en los estados del norte la contaminación con AFM₁ no es significativa por las condiciones climáticas que prevalecen. En Canadá, el Ministerio de Salud en 1994 reportó niveles inferiores a 0.5 µg kg⁻¹ con promedios de 0.063 µg kg⁻¹ en análisis realizados en muestras de leche (Henry *et al.*, 2001).

Actualmente, México dispone de las regulaciones necesarias en materia referidas a los niveles máximos permitidos para AFM₁ pero hasta el momento no se han presentado suficientes estudios sobre su incidencia en leche fluida o subproductos destinados a consumo humano a partir de métodos analíticos validados por organismos internacionales.

Córdova-Izquierdo *et al.* (2007) determinaron directamente del tanque colector la presencia de AFM₁. Un total de 5 muestras fueron analizadas con la detección y cuantificación de AFM₁ por HPLC, los niveles encontrados fueron de 2.25 - 3.32 ng L⁻¹. Debido al bajo número de muestras y escasa descripción del método de recolección no es posible considerar al mismo como un antecedente sólido de la presencia de AFM₁ en leche en México.

Si bien se carece de suficientes investigaciones respecto de AFM₁, el Consejo para el Fomento de la Calidad de la Leche y sus Derivados (COFOCALEC), promueve la calidad de la leche y sus productos en México a través de la normalización y evaluación de normas mexicanas. La NMX-F-712-COFOCALEC-2005 especifica la metodología necesaria para la determinación de aflatoxina M₁ por HPLC dando por tanto, relevancia y antecedentes que sustentan la necesidad de los análisis de esta micotoxina en leche.

II.3.4. Normatividad y Regulaciones para Aflatoxinas

Según FAO (2004), al menos 99 países disponen de regulaciones en relación a las micotoxinas en alimentos y semillas. Al presente existe suficiente información que documenta el impacto de AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ en salud animal y humana. No obstante, existen algunos países con normativas únicamente referidas a la presencia de AFB₁ en piensos y alimentos destinados a humanos. Es necesario, armonizar las regulaciones vigentes en cada país y con aquellos para el cual se tengan intenciones de comercio exterior a fin de facilitar la creación de corredores o regiones de integración. Tal es el caso de lo ocurrido con los países integrantes de la Comunidad Europea, MERCOSUR, Nueva Zelanda y Australia. Estos reglamentos, en acuerdo de todas las partes, regulan numerosos criterios, entre ellos, la recolección de muestras, su procesamiento y análisis. Los máximos niveles tolerables para aflatoxina B₁ en alimentos para humanos es de 1 a 20 µg kg⁻¹, este límite se aplica en 17 países la mitad de estos son de América latina (MERCOSUR), el resto en África y los Estados Unidos (Guzmán de Peña y Peña, 2005).

La restricción de los niveles de AFB₁ contribuye significativamente a la salud pública, siendo esta toxina la más importante de las aflatoxinas en términos toxicológicos. Aunque muchas

personas están en riesgo de exposición a las micotoxinas, los efectos individuales del consumo no son los mismos porque se diferencian en los hábitos alimenticios y los niveles de contaminación son variables. Se conoce que si una persona de 70 kg ingiere $1 \mu\text{g día}^{-1}$ posee de 14-23 ng de los aductos lisina-aflatoxina (AFB_1 – lisina) en sangre (Liang *et al.*, 1988). Sabbioni *et al.* (1987) indican que la exposición crónica a AFB_1 , resulta en niveles de AFB_1 -lisina 30 veces mayores que los producidos por la exposición a una única dosis.

Dentro de las Normas Oficiales Mexicanas (NOM) existen regulaciones para los compuestos tóxicos presentes en los alimentos, pero no existe un organismo que verifique la aplicación correcta de dichas legislaciones presentándose diversos riesgos para la salud humana y animal. La NOM-188-SSA1-2002 establece los límites máximos permisibles 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 productos (Cuadro 3). Mientras que la NOM-184-SSA1-2002, establece los límites máximos permisibles para AFM_1 en leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado destinados al consumo humano en $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$.

Puesto que la contaminación con aflatoxinas en alimentos es inevitable, ya que no pueden ser prevenidas o eliminadas por las prácticas agrícolas, se han establecido límites permisibles en diversos alimentos. La presencia de $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ de aflatoxina B_1 en la ración en base seca de vacas lecheras resulta en niveles menores a $0.5 \mu\text{g kg}^{-1}$ de aflatoxina M_1 en la leche, niveles recomendados aptos para consumo humano por la FDA. Sin embargo la Comunidad Europea y otros países consideran como nivel máximo permitido $0.05 \mu\text{g kg}^{-1}$ AFM_1 en leche y productos derivados (Commission Regulation (EC) N. 466/2001).

Cuadro 3. Límites máximos permisibles de aflatoxinas en los cereales destinados para el consumo humano y animal según la NOM-188-SSA1-2002

Especie/etapa de producción	Límite máximo $\mu\text{g kg}^{-1}$
- Humanos	20
- Animales lactantes y bovinos productores de leche	20
- Aves (excepto pollos de engorda)	100
- Cerdos en engorda	
25 - 45 kg	100
> 45 kg	200
Maduros destinados a reproducción	100
- Rumiantes	
Maduros destinados a reproducción	100
De engorda en etapa de finalización	300

II.3.5. Medidas de control y prevención para aflatoxinas

El control del crecimiento de hongos involucra el mantenimiento de la integridad física de los granos con el objetivo de limitar su acceso a los nutrientes y el estricto control de condiciones ambientales tales como el contenido de agua, concentración del oxígeno y temperatura. La sequedad es el punto esencial en los procesos de conservación de semillas secas, y una anaerobiosis es el prerrequisito para el almacenamiento de semillas en forma húmeda. El uso de agentes antifúngicos puede proveer garantías adicionales si hay un riesgo predecible (Huwigh *et al.*, 2001).

Con el objetivo de reducir la presencia de micotoxinas, destoxificar y/o descontaminar los alimentos, se han investigado diversas estrategias que emplean procesos físicos, químicos y biológicos. Actualmente se conoce con el término *descontaminación* a los métodos por los cuales las micotoxinas son removidas o neutralizadas del alimento. Por otra parte, el término

destoxificación hace referencia a métodos que aseguran la eliminación de las propiedades tóxicas de las micotoxinas (Díaz y Smith, 2005).

El establecimiento de puntos de verificación para micotoxinas en los sistemas de producción, almacenamiento y elaboración de productos representa quizás una estrategia tendiente a reducir la presencia de micotoxinas en los productos elaborados y, por ende, disminuir el efecto asociado al consumo o exposición a los mismos. Además, existen lineamientos para evaluar la eficiencia de un programa de descontaminación y/o destoxificación. Según Sinha, (1998) dichos procesos deberán asegurar:

- a) inactivación, destrucción o remoción del compuesto tóxico
- b) no resultar en la deposición de residuos, sustancias tóxicas o bioproductos en el alimento
- c) retener el valor nutricional del alimento
- d) no afectar la tecnología del proceso de elaboración del producto
- e) destrucción de las esporas fúngicas

Los procesos físicos de descontaminación emplean la separación de las partículas contaminadas por medio de la acción mecánica o a través de las propiedades diferenciales de densidad entre granos contaminados y no contaminados. Estos procesos no han demostrado gran eficiencia debido quizás a los impedimentos prácticos para su ejecución. Por otra parte, los procesos físicos de destoxificación hacen uso de la irradiación, la desactivación térmica y la extracción por solventes. Este último método constituye un proceso eficiente para destoxificar las micotoxinas de los alimentos, pero sus elevados costos lo convierten en impráctico. En especial las aflatoxinas se destacan por ser altamente estables durante los procesos de calentamiento y presentar un comportamiento variable durante la exposición a la luz UV.

Los métodos químicos de destoxificación persiguen la degradación estructural del compuesto a través de su exposición con ácidos, bases, aldehídos, bisulfitos, agentes oxidantes y gases (Phillips *et al.*, 1994). Por otra parte, algunas experiencias han demostrado la destrucción de

ciertas micotoxinas con monoetilamina, ozono, hidróxido de calcio y amonio. Debido a que estos últimos dos procedimientos se destacan por reducir efectivamente los niveles de aflatoxinas en las materias primas, piensos y alimentos, se describen brevemente:

Amoniación: es un procedimiento utilizado para la destoxificación de alimentos contaminados con aflatoxina en algunos países como Brasil, Sudáfrica, México, Sudán, Senegal, Francia, Ucrania y algunos estados de EUA. Este procedimiento consiste en emplear amonio (0.5–2.0 %) bajo condiciones controladas de humedad (12–16 %), presión (45–55 psi [3.2–3.9 kg cm⁻²]) y temperatura (80–100 °C) durante 20–60 min. El procedimiento modifica químicamente la molécula de aflatoxina en compuestos menos tóxicos o con una magnitud inferior en varios ordenes con relación a la molécula original. Los productos de reacción (AFT-amonio) en semillas de algodón y maíz están representados por ser compuestos de tipo volátil (12-14 %), extraíbles con cloruro de metileno (20-24 %) o con metanol (6-13 %). El procedimiento de amoniación a temperatura ambiente requiere de 3-6 semanas, reduciendo efectivamente las concentraciones de aflatoxina pero es necesario analizar los productos de reacción debido a que las condiciones difieren de la descrita originalmente (Park y Price, 2001). Las principales desventajas de este método químico es la ineffectividad contra otras micotoxinas. Así mismo, existe un riesgo asociado con el posible deterioro de la salud animal por los posibles residuos de amonio en los alimentos (Huwig *et al.*, 2001). No obstante, se destaca un incremento en las concentraciones de nitrógeno total y no-proteico, proteína cruda, sólidos solubles, aminoácidos con residuos-SH, lisina y azúcares reductores en las raciones y alimentos tratados por amoniación. Este método se aplica en EUA bajo aprobación con el objeto de incrementar los niveles de nitrógeno no-proteico en piensos y raciones (Park y Price, 2001).

Nixtamalización o cocción alcalina: constituye un procedimiento tradicional, pre-hispánico, para la cocción del maíz y elaboración de tortillas en México, Guatemala y otros países de América Central. Cuando es realizado adecuadamente, se produce una significativa reducción (95 %) de la concentración de aflatoxinas en el producto final (Guzmán de Peña *et al.*, 1995; Méndez-Albores *et al.*, 2004). No obstante, estudios posteriores indican que los residuos de la molécula podrían adquirir nuevamente su conformación bajo condiciones ácidas (López-García y Park, 1998).

Por último, los métodos biológicos son poco usados en la práctica y estos incluyen procedimientos de fermentación con microorganismos obteniendo conversiones lentas e incompletas (Huwig *et al.*, 2001). No obstante, Teniola *et al.*, (2005) informan una significativa reducción de AFB₁ en cultivos líquidos y extractos libres de células de *Rhodococcus erythropolis* DSM 14303, *Nocardia corynebacterioides* (= *Flavobacterium aurantiacum*) DSM 12676, *N. corynebacterioides* DSM 20151 y *Mycobacterium fluoranthenivorans* sp. nov. DSM 44556T. Durante la precosecha de cacahuate y algodón en EUA, se han realizado estudios diseminando en el cultivar cepas no-toxigénicas de *Aspergillus flavus* y/o *A. parasiticus*. Esta estrategia intenta desplazar por competencia las cepas nativas o salvajes por aquellas incapaces de producir las aflatoxinas (Cole y Cotty, 1990).

Otra alternativa es el uso de probióticos con capacidad de unir y remover AFB₁. En este campo de estudio se destacan las bacterias ácido lácticas (BAL). Las BAL están conformadas por un grupo heterogéneo de bacterias Gram positivas no esporulados (+) caracterizadas por producir ácido láctico como producto final de la fermentación de los carbohidratos (Axelson, 2004; Gratz, 2007). Solamente se usan como probióticos algunas cepas del género *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. bulgaricus*, *L. reuteri*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*) con la capacidad de remover AFB₁ de manera más rápida y eficiente que cultivos de bacterias Gram negativas (ElNezami *et al.*, 1998; Bueno *et al.*, 2007). Peltonen *et al.* (2001), demostraron que la habilidad de unir AFB₁ presenta importantes diferencias aún en especies relacionadas. Esta unión específica de bacterias a AFB₁, se correlaciona con su potencial para reducir la mutagenicidad de AFB₁ en las pruebas de Ames para *Lactobacilli* y *Bifidobacteria* (Hosoda *et al.*, 1997; Lankaputhra y Shah, 1998).

Por otra parte, la quimioprotección implica el uso adecuado de factores dietarios nutritivos o no, debido a que existen numerosos reportes que detallan la influencia de los mismos en la toxicidad de las aflatoxinas. El contenido de grasa en la dieta, las vitaminas y la presencia de selenio modulan los efectos hepatocancerígenos de las aflatoxinas. Los factores no nutritivos incluidos en las dietas pueden ser: hidroxianisolbutilado (antioxidante) e indol-3 carbinol, entre otros (Galvano *et al.*, 2001). La búsqueda de agentes para quimioprotección se ha focalizado en productos naturales, de alta disponibilidad y económicos que podrían ser usados

para modular el metabolismo de las aflatoxinas (activación, detoxificación). Numerosos fitoquímicos incluyendo: isotiocianatos y indol-3-carbinol a partir de especies de *Brassica* (Manson *et al.*, 1998; Kensler *et al.*, 2005), flavonoides obtenidos de té verde (Luo *et al.*, 2006) son investigados por su potencial para inactivar la fase I y/o inducción a fase II (detoxificación). Esto conduciría en el futuro a la posibilidad de disponer de dietas o alimentos anticancerígenos (Gratz, 2007).

II.3.6. Uso de agentes adsorbentes

Uno de los métodos más recientes propuestos para la prevención de las micotoxicosis, consiste en el uso de sustancias inertes llamados adsorbentes, que se adicionan a los piensos durante el proceso de elaboración (Magnoli, 2002). Estas sustancias se caracterizan por disminuir la biodisponibilidad de las toxinas en el tracto gastrointestinal del animal huésped al formar complejos que se eliminan con las heces.

Una gran variedad de materiales adsorbentes, tales como, carbón activado, bentonitas, zeolitas, aluminosilicato de sodio y calcio hidratado (HSCAS), variedades de arcillas, resinas sintéticas de intercambio iónico (colestiramina y sustancias poliméricas como polivinil-polipirrolidona) han sido evaluados exitosamente en la adsorción de numerosas micotoxinas (Huwig *et al.*, 2001). Es importante destacar que no existen suficientes evidencias de que estas sustancias adsorbentes disminuyan significativamente el valor nutricional de las dietas mediante el secuestro de vitaminas, aminoácidos y minerales esenciales. Recientemente, se ha propuesto el uso de levaduras o *Lactobacillus* spp. para adsorber micotoxinas. El uso de estos últimos aditivos representa beneficios en otros aspectos de la alimentación animal.

La reacción de los adsorbentes con las micotoxinas es similar a una reacción química exérgica. Entre los principales aspectos que determinan la capacidad de adsorción se destaca: la estructura física del adsorbente, la carga total y su distribución, el tamaño de los poros y el área superficial disponible. Al menos dos propiedades deberían reunir los adsorbentes para asegurar su uso en dosis pequeñas en la ración:

- a) elevada afinidad
- b) elevada capacidad de adsorción

Spotti *et al.*, (2005) evaluaron en estudios “*in vitro*” la eficiencia de adsorción de diferentes secuestrantes, empleando como diluyentes fluido ruminal y agua en un modelo semejante al metabolismo de animales con rumen. Los resultados experimentales obtenidos bajo condiciones controladas de laboratorio no necesariamente reflejan el comportamiento de los adsorbentes bajo experimentos “*in vivo*”. Así mismo, es necesario considerar que el uso de los agentes secuestrantes no está aprobado para su uso como tal en procesos de prevención de micotoxicosis, sino como agentes aglutinantes en las formulaciones de tipo pellets. Los productos de arcillas son reconocidos como seguros (GRAS) por la FDA cuando se emplean como agentes de flujo y estabilizadores no excediendo el 2 % en base seca (Code of Federal Regulations Part 582.2727 y 582.2729).

Actualmente, existe un enorme mercado para el comercio de los adsorbentes. Estos productos se destacan como adsorbentes para micotoxinas pero sólo unos pocos poseen reportes experimentales que respalden de manera efectiva su uso bajo condiciones “*in vivo*”. Díaz y Smith (2005) resaltan las características de los principales ingredientes que componen los adsorbentes de uso actual.

Carbón activado (CA): las propiedades secuestrantes del CA dependen de diferentes factores, entre ellos: tamaño de poro, área superficial, estructura de la micotoxina y dosis (Galvano *et al.*, 2001). El área superficial específica varía entre $500 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ a $3500 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ para CA a base de lignina. Algunos resultados demuestran que el uso de CA en pollos a 6 mg AFB_1 y $200 \text{ mg CA kg}^{-1}$ de peso corporal no presentaron alteraciones funcionales en hígado como parte del estudio de funcionalidad del citocromo P450, tasa de metabolismo microsomal y actividad sérica oxala-acética glutámica transferasa. Por otra parte, resultados contradictorios han sido obtenidos por Kubena *et al.* (1990) administrando CA al 0.5 % en alimentos balanceados de pollos.

Zeolitas: pertenecen a este grupo los silicatos que contienen tetrahedros de SiO_4 y AlO_4 . La carga resultante negativa de estos átomos permite la unión de compuestos cargados positivamente. Favorece su capacidad secuestrante, la presencia de grandes poros que permiten la inclusión de cationes (sodio, potasio), agua y amonio. Estos poros pueden interconectarse para formar amplios canales de tamaño variable. Las zeolitas se caracterizan por perder o absorber agua sin daño en su estructura cristalina. Al menos, 45 minerales se hallan descritos por pertenecer al grupo de las zeolitas, las cuales pueden ser divididas dentro de silicatos, zeolitas sintéticas y minerales fosfatos con estructura similar a las zeolitas. Se describen al menos 120 variaciones estructurales. Dvorak, (1989) describe la efectividad “*in vitro*” de estos minerales. Las concentraciones adicionadas en las raciones pueden ser próximas al 1 % pero algunos reportes indican la disminución de fósforo sérico (Scheideler, 1993). Así mismo, la clinoptilolita (zeolita) ha sido evaluada por su capacidad de unión a componentes dietarios moduladores de la aflatoxicosis (Mayura *et al.*, 1998). Además, algunos reportes indican sus efectos benéficos en prevenir la absorción de las micotoxinas en el tracto gastrointestinal.

El grupo más extenso de adsorbentes están compuestos a partir de silicatos minerales. Este grupo se divide en: filosilicatos (montmorillonitas, bentonitas, caolinas y complejos de tipo arcilla-mica) y tectosilicatos (zeolitas).

Montmorillonitas y Bentonitas: La montmorillonita constituye el principal componente de las bentonitas las cuales son capaces de intervenir en procesos de intercambio iónico. Las bentonitas pueden ser clasificadas como de sodio, magnesio, calcio y potasio siendo utilizadas como aditivos estabilizantes de suspensiones. Lindemann *et al.* (1993) informan el efecto de las bentonitas de sodio (0.5 %) en dietas contaminadas para cerdos ($800 \mu\text{g AFB}_1 \text{ kg}^{-1}$) observándose que dicha suplementación mejoró las concentraciones de urea en sangre, albúmina, actividad aspartato aminotransferasa (AST), fosfatasa alcalina (ALP) y γ -glutamyl aminotransferasa (GGT). En la actualidad, numerosos reportes sobre el uso de estas sustancias demuestran los efectos benéficos en diferentes especies animales de interés pecuario.

HSCAS: entre las arcillas minerales (zeolitas naturales), los aluminosilicatos hidratados de Na y K son los más frecuentemente empleados y estudiados como componentes de los productos secuestrantes para micotoxinas. Su capacidad de adsorción no distingue entre cationes y/o aniones. Desde 1987 existen reportes que documentan su uso (Phillips *et al.*, 1987; Davidson *et al.*, 1987). Además, este agente se emplea como aditivo para reducir la humedad en piensos y mejorar las propiedades de flujo de la materia durante el almacenamiento y transporte. Las experiencias realizadas “*in vitro*” han demostrado la capacidad de unir AFB₁ con elevada afinidad y estabilidad. Las porciones B-carbonil en la molécula de aflatoxina han sido observadas por ser el principal sitio de unión con los átomos de aluminio del HSCAS. Ramos y Hernández (1997) realizaron una revisión de literatura de más de 20 artículos donde se documentaba en experimentos “*in vivo*” la capacidad de prevenir los síndromes asociados con la aflatoxicosis en pollos, pavos, cerdos y ganado lechero. Numerosas publicaciones registran el uso de HSCAS a niveles del 0.5 % en la ración alimenticia. De la misma forma HSCAS ha demostrado ser seguro para su uso en humanos (Wang *et al.*, 2005).

Colestiramina: es una resina sintética de intercambio aniónico utilizada para la absorción de ácidos biliares en el tracto gastrointestinal de humanos como terapia para reducir niveles de colesterol. Esta resina ha demostrado “*in vitro*” la capacidad de secuestrar ocratoxina y otras micotoxinas. Su uso ha sido limitado en estudios con animales debido al elevado costo de la misma (Solfrizzo *et al.*, 2000).

Glucomananos esterificados de paredes celulares: estos componentes son obtenidos de *S. cerevisiae*. Originalmente, el uso de la célula en su totalidad permitió identificar componentes específicos de unión a micotoxinas. La biotecnología ha permitido obtener componentes modificados de pared con alto grado de especificidad. Los glucomananos esterificados presentan una elevada capacidad de adsorción, razón por la cual permite su inclusión en las dietas a niveles inferiores al 0.1 % (1-2 kg Ton⁻¹) y, consecuentemente, con un mínimo impacto en la formulación de la ración alimenticia.

II.3.6.1. Pruebas *in vitro*

Existen varios métodos desarrollados para evaluar la capacidad de los adsorbentes para unir AFB₁. Entre ellos, se destacan aquellos que evalúan la eficiencia de adsorción, es decir, la absorción resultante luego de que el complejo adsorbente-AFB₁ es sometido a la acción de condiciones físico-químicas que pudieran favorecer su disociación. En rumiantes y no rumiantes, el paso gastrointestinal del complejo ocurre a través de diferentes pH con lo cual las fuerzas de unión pueden ceder, liberando en parte las moléculas de AFB₁ inicialmente adsorbidas. Lemke *et al.* (2001) reportaron un modelo que evalúa la eficiencia por medio de un digestor que simula el metabolismo de animales. No obstante, la presencia de flora ruminal puede afectar la formación del complejo. Spotti *et al.* (2005) desarrollaron un método que emplea fluido ruminal obtenido de animales fistulados para incluir la flora del rumen como factor durante la adsorción. Sus resultados indicaron que HSCAS, zeolita y bentonita fueron capaces de adsorber el 100 % de AFB₁. Clinoptilolita alcanzó el 80 % de adsorción para AFB₁ y los resultados de PHIL 75 no fueron superiores al 40 %.

Las pruebas *in vitro* no son suficientes para determinar la capacidad de un adsorbente y su posterior comportamiento *in vivo*, no obstante representan una alternativa de bajo costo en relación al uso de pruebas con animales. Las experiencias *in vitro* para adsorbentes de tipo mineral son similares a aquellas empleadas con agentes probióticos con capacidad de unir micotoxinas, entre ellas: AFB₁-*S. cerevisiae* o AFB₁-*Lactobacillus* spp. (Haskard *et al.*, 2001). Estas pruebas permiten incluso calcular las isotermas de adsorción y predecir el modelo teórico de la reacción en su punto de equilibrio, experiencias realizadas por Bueno *et al.* (2007). Luego de realizar pruebas *in vitro* / *in vivo*, es posible establecer el grado de correlación entre ambas metodologías. Los resultados de la suplementación con bentonita (*in vitro*) al 1 % de Spotti *et al.* (2005) se correlacionan con aquellos de Nageswara Rao y Chopra (2001) (*in vivo*) empleando, estos últimos, cabras lactantes y evaluando la reducción en la eliminación de AFM₁ en leche (>60 %). Así mismo, puede ocurrir que las discrepancias entre los métodos *in vitro* / *in vivo* puedan llegar a ser de hasta el 50 %, tal es el caso de los resultados obtenidos con una clinoptilolita por las experiencias de Spotti *et al.* (2005) y Lemke *et al.* (2001), respectivamente.

Así mismo, en los estudios realizados por Diaz *et al.*, (2002) se evaluó la capacidad de diferentes adsorbentes comerciales para unir AFB₁ bajo condiciones de máxima solubilidad para esta micotoxina. Por otro lado, se evaluó la desorción bajo condiciones fluctuantes de pH que podrían favorecer la ruptura del complejo AFB₁-adsorbente y permitir nuevamente la biodisponibilidad en el tracto gastrointestinal. Así mismo, se destaca en dicha prueba el uso de adsorbentes a base de bentonita de sodio y de calcio, carbón activado y en especial uno que integra el uso de glucomananos esterificados obtenidos de la hidrólisis de paredes celulares de *S. cerevisiae*. Los resultados indicaron que todos los adsorbentes evaluados, independiente de su composición, demostraron una fuerte habilidad para unir AFB₁ (superior al 95 %). Así mismo, la desorción luego de producirse los cambios de pH no fue estadísticamente significativa en los adsorbentes evaluados.

II.3.6.2. Pruebas *in vivo*

No es posible encontrar suficientes antecedentes referentes a pruebas con adsorbentes en animales, en especial vacas productoras de leche. Así mismo, igual situación se presenta con la disponibilidad de datos referentes a calidad de leche y/o salud animal durante la experimentación. Entre los posibles factores que condicionen el desarrollo de éstas se incluyen: a) variables metabólicas, b) variables de conducta y consumo de alimento, c) manejo de los animales, d) costo asociado al uso de los animales, etc. No obstante, el uso de adsorbentes y su evaluación ha sido extensamente desarrollada en pollos y aves de corral (Miazzo *et al.*, 2000; Santin *et al.*, 2003; Eraslan *et al.*, 2005).

Battacone *et al.* (2003) evaluaron en ovejas la eliminación de AFM₁ en leche a diferentes dosis de AFB₁. Sus resultados demostraron que la eliminación de AFM₁ es menor a la ocurrida en vacas, además de presentar elevada variabilidad entre ovejas. Por otro lado, las experiencias realizadas por otros investigadores demuestran mediante pruebas de ELISA que el uso de adsorbentes en vacas lecheras reduce la eliminación de AFM₁ en leche a partir de dietas contaminadas naturalmente con AFT, siendo las bentonitas de sodio y las paredes de levaduras los mejores secuestrantes usados. No obstante, no se reportaron datos sobre calidad de la leche obtenida (Diaz *et al.*, 2004; Stroud, 2006).

III. HIPÓTESIS

- I. Los niveles de aflatoxinas en raciones de bovinos y de AFM₁ en leche cruda se encuentran en niveles que superan los límites permitidos por las normas oficiales.

- II. El uso de adsorbentes que incluyen extractos de cultivos de levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* reducen de manera más eficiente que los adsorbentes minerales los niveles de aflatoxina M₁ en leche de animales expuestos a aflatoxina B₁.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

1. Determinar la contaminación natural con aflatoxinas en la ración de bovinos y aflatoxina M₁ en leche cruda proveniente de establos ubicados en 8 municipios de la región de los Altos y Ciénega, Jalisco.
2. Evaluar los adsorbentes montmorillonita, clinoptilolita y extracto de cultivos de levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* para aflatoxina B₁ en raciones de bovinos contaminadas artificialmente y determinar su correlación con la presencia de AFM₁ y parámetros de calidad de la leche.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- 1.1. Cuantificar los niveles de aflatoxinas totales en la ración de bovinos recolectadas de 40 establos ubicados en 8 municipios de la región de los Altos y Ciénega, Jalisco.
- 1.2. Cuantificar los niveles de AFM₁ en leche cruda recolectada del tanque enfriador de los 40 establos ubicados en 8 municipios de la región de los Altos y Ciénega, Jalisco.
- 2.1. Desarrollar un método de exposición para AFB₁ en bovinos productores de leche a fin de determinar la eficiencia de los adsorbentes para micotoxinas.
- 2.2. Evaluar el uso de adsorbentes (aluminosilicatos naturales y glucomanos esterificados derivados de paredes celulares de levaduras) en raciones contaminadas artificialmente de bovinos a fin de reducir la absorción de aflatoxina B₁ y la presencia de aflatoxina M₁ en leche.
- 2.3. Evaluar la calidad de la leche cruda por la ingesta de raciones contaminadas con aflatoxina B₁ con y sin adsorbentes.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se caracteriza por ser de dos tipos:

- I. La evaluación de la contaminación por aflatoxinas en alimentos de bovinos y de AFM₁ en leche es una investigación de tipo observacional, comparativa y prospectiva.
- II. La evaluación de adsorbentes en bovinos es de tipo experimental, prospectiva y comparativa.

V.1. Contaminación natural con aflatoxinas en la ración de bovinos y aflatoxina M₁ en leche cruda proveniente de establos ubicados en 8 municipios de la región de los Altos de Jalisco

El procedimiento analítico para determinar la contaminación con aflatoxinas se realizó empleando equipos comerciales para la determinación inmunoenzimática (ELISA) de AFT y AFM₁ provistos por Romer Labs. El protocolo se realizó acorde a las especificaciones del fabricante.

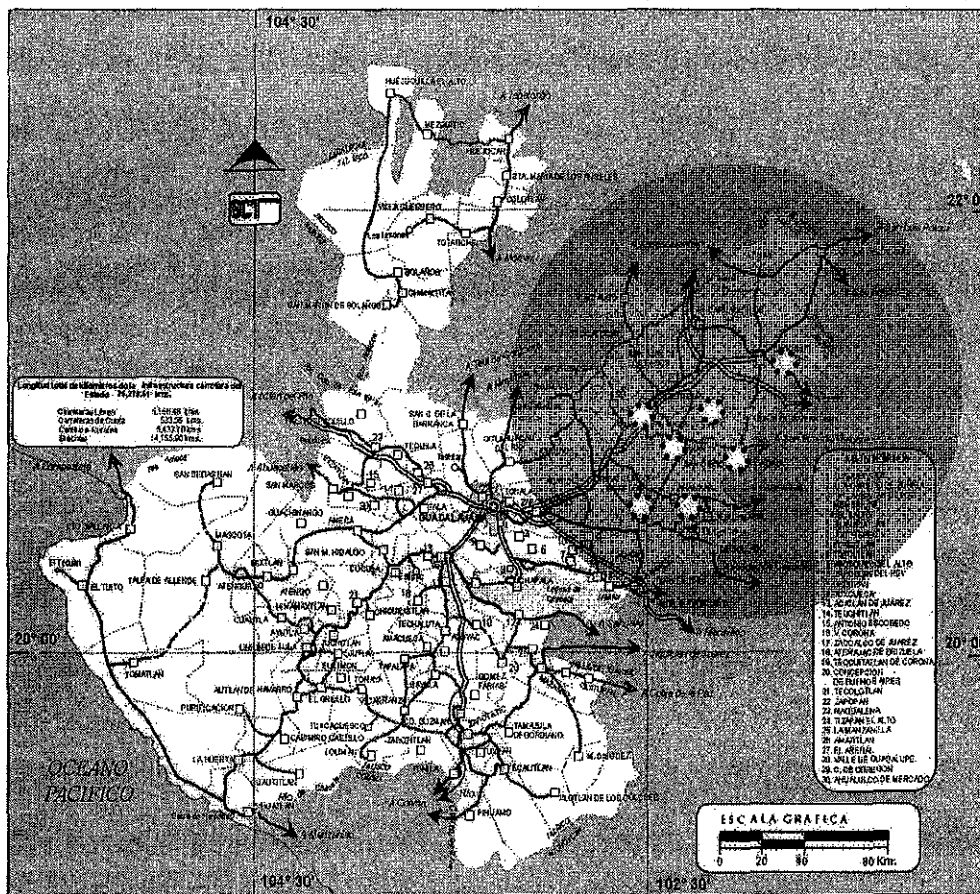
V.1.1. Muestreo

Las muestras de leche y alimento animal de la región de los Altos y Ciénega, Jalisco, se tomaron durante el período Septiembre-Octubre del 2007. Ocho municipios fueron seleccionados (Acatic, Jalostotitlán, Ocotlán, San Juan de los Lagos, Tepatitlán, Tototlán, Valle de Guadalupe y Zapotlanejo) considerando 5 establos en cada uno de ellos (n=40) caracterizados por producir al menos 700 litros de leche por día (Figura 7).

La recolección de leche (2 litros/establo) se realizó directamente de la válvula principal del tanque enfriador de cada establo. Las muestras se mantuvieron refrigeradas hasta su análisis, en un plazo no mayor a 72 h. Así mismo, se recolectaron muestras de raciones de los bovinos en cada establo para determinar la contaminación por aflatoxinas totales (AFT) acorde a la legislación de la Comunidad Europea. Las muestras se analizaron en el Área de Micotoxicología del laboratorio de Residuos Tóxicos II del Departamento de Salud Pública

del CUCBA. Por otra parte, se realizó una encuesta básica para revelar las aptitudes, condiciones y manejo de los establos. La encuesta se compuso con los siguientes datos:

- a) del Establo y de su Productor: nombres, localidad, municipio
- b) de la Composición del hato: número de animales en período activo
- c) de la Producción de leche: cantidad de litros por día del establo
- d) de la Tecnificación: uso de equipos, tanques, sala de ordeña.
- e) del Alimento y uso de secuestrantes: tipo, proporciones en la ración.



Referencia: (☼) municipios

Figura 7. Ubicación de los municipios en la región de los Altos y Ciénega Jalisco (México) examinados durante Septiembre-Octubre del 2007.

V.1.2. Extracción, detección y cuantificación de aflatoxinas (AFT) en alimento para bovinos

Las muestras globales de alimento (3 kg) fueron reducidas representativamente por cuarteo. 20 g de muestra se utilizaron para la extracción de AFT con 100 mL de metanol:agua (70:30 v v^l). Para el proceso se agregaron 200 µL del conjugado a cada pocillo conteniendo los estándares y muestras (100 µL) previamente filtradas. Después de mezclar, se transfirieron 100 µL a los pocillos con anticuerpos y se incubó durante 15 minutos. Se eliminó el contenido, y se lavaron los pocillos (5 veces). El exceso de agua fue secado. Se adicionó 100 µL de sustrato a cada pocillo y se incubó durante 5 minutos, la reacción se detuvo al agregar 100 µL de solución stop (solución de H₂SO₄ dil.). Los resultados de densidad óptica (DO) se obtuvieron en un lector de Elisa (Biotek 800) utilizando el filtro de 450 nm. Las concentraciones fueron calculadas por extrapolación de DO con la respectiva curva de calibración.

V.1.3. Extracción, detección y cuantificación de AFM₁ en leche

La leche se homogenizó manualmente a 37 °C en baño Maria, 50 mL se centrifugaron a 3000 x g durante 10 min previo enfriamiento de la muestra a 4 °C / 30 min. Se separó la grasa por filtrado, 100 µL de estándares y muestras se agregaron a los pocillos y se incubaron en agitación a 100 rpm/60 min a temperatura ambiente. Después de lavar (3 veces), se adicionaron 50 µL del conjugado y se incubó nuevamente en agitación a 100 rpm/30 min. Luego de descartar el contenido, se lavaron nuevamente los pocillos (3 veces). Se agregaron 100 µL de solución sustrato y se incubaron en oscuridad durante 40 minutos. La reacción se detuvo con 100 µL de la solución stop y se procedió a determinar la densidad óptica (DO) en un lector de ELISA (Biotek 800) utilizando los filtros de 450 y 630 nm para lectura y referencia, respectivamente. Las concentraciones se calcularon por extrapolación de la DO con la respectiva curva de calibración.

V.1.4. Análisis estadístico

Los niveles promedio de contaminación con AFT en la ración totalmente mezclada (RTM) y de AFM₁ en leche de los municipios estudiados fueron analizados mediante el ANOVA a un nivel de significancia del 95 %. La determinación de las diferencias estadísticas entre municipios se realizó mediante la prueba de Tukey aplicando el programa Sigma STAT v3.1 para Windows. El análisis descriptivo de las variables encuestadas fueron procesadas por medio de la aplicación SPSS v15 para Windows.

V. 2. Evaluación del uso de adsorbentes en las raciones de bovinos

V.2.1. Cultivo y producción de aflatoxina B₁

Una cepa de *Aspergillus parasiticus* NRRL2999 fue utilizada para la producción de AFB₁. Esta cepa se mantuvo en medio de cultivo Agar Extracto de Malta (AEM) a 28 °C.

V.2.1.1. Producción de aflatoxinas

La producción de aflatoxinas se realizó según la metodología de Shotwell *et al.* (1966). Para ello se colocaron 50 g de arroz tipo grano largo en matraces Erlemmeyer de 250 mL de capacidad, los cuales fueron hidratados con 25 mL de agua y esterilizados a 121 °C por 30 minutos (dos días consecutivos). El arroz fue inoculado con discos de agar de 6 mm de diámetro provenientes de una colonia de *A. parasiticus* NRRL2999.

Los matraces inoculados se incubaron a 28 °C de 8-10 días en oscuridad. Luego de la incubación, el arroz fermentado se esterilizó con vapor (121 °C, 20 min) para inactivar formas vegetativas y esporas de *A. parasiticus*. Previo a su molienda, el arroz fue secado a 60 °C en estufa de aire forzado durante 24 h, finalmente se molió y almacenó a 4 °C hasta su incorporación en la dieta de los animales.

V.2.1.2. Análisis de Aflatoxina B₁ por cromatografía en capa fina (CCF)

125 mL de metanol: agua (60:40), 2 g de NaCl y 80 mL de hexano se adicionaron a 25 g de arroz molido. Después de 30 minutos de agitación, la mezcla se filtró por papel Whatman N° 2. De la capa inferior se tomaron 25 mL y se colocaron en una ampolla de decantación agregando 25 ml de cloroformo y se agitó durante 1 min colectando la fase inferior. Una segunda extracción con 15 mL de cloroformo se realizó y finalmente los extractos clorofórmicos reunidos se llevaron a sequedad en rota evaporador (80 °C).

El residuo seco fue resuspendido en 10 mL de tolueno: acetonitrilo (9+1) y se aplicaron (1- 2 µL) sobre una cromatoplaque de sílica gel 60 sin indicador de fluorescencia (Merck 5553). Como sistema de solvente se utilizó cloroformo: acetona (9:1) desarrollando a temperatura ambiente en cámara sin saturar. La observación de las placas se realizó bajo luz UV a 366 nm. Para realizar la cuantificación se utilizó un estándar de AFB₁ [1,2635 µg mL⁻¹ en tolueno:acetonitrilo (9+1) Sigma, St. Louis, MO, USA]. El análisis de las cromatoplaque se realizó mediante la aplicación TLSee v2.0 para Windows.

V.2.2. Efecto de tres absorbentes sobre la eliminación en leche de AFM₁.

El presente estudio se desarrolló en el Centro de Biotecnología Animal, Rancho Cofradía ubicado en el km 7.5 de la carretera a San Isidro Mazatepec, en la población de Cofradía Municipio de Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco y el laboratorio de micotoxinas del Departamento de Salud pública del CUCBA de la Universidad de Guadalajara.

V.2.2.1 Animales

Se seleccionaron 12 animales de la raza Holstein, libres de cojeras, salivación excesiva y descargas oculares y nasales. Así mismo, los animales presentaron posturas, movimientos y sonidos apropiados para su edad, sexo, raza y condición fisiológica.

El cuadro 4 muestra las características de los animales seleccionados durante la experiencia. La producción de leche presentó un promedio de 27.9 ± 2.8 kg/día/animal durante la selección y aclimatación de los animales. Por otra parte, los niveles de aflatoxina M₁ presentes en la leche durante esta fase fueron de $0.02 \mu\text{g L}^{-1}$. Finalmente, los parámetros se mantuvieron en sus niveles promedios para cada animal durante la experimentación.

Cuadro 4. Características de los animales seleccionados para el desarrollo de la prueba *in vivo*

	Modelo Núcleo	Modelo Integral
Condición corporal	2.7	27
Edad (años)	3.2	3.2
Número de partos	2	2
Producción de leche (kg)	27.9	25.1
Niveles de AFM ₁ en leche ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0.02	0.02

Límite de cuantificación AFM₁: $0.02 \mu\text{g L}^{-1}$

En las etapas pre, durante y post-experimento, se monitoreó y registró la conducta animal para asegurar que no disminuyera el consumo de alimento.

V.2.2.2. Alimentación

Durante la experiencia los animales recibieron 9 kg de alimento concentrado por día, basado en maíz y suplementos minerales. El forraje se ofreció a libre acceso considerando el peso de cada animal. Esta formulación alcanzó los requerimientos mínimos dietarios y energéticos especificados por el NRC.

El alimento principal estuvo compuesto de ensilado de maíz, producido por el “Rancho Cofradía” destinado para la alimentación habitual de su hato. El cultivo de maíz fue cosechado cuando alcanzó el 30 % de humedad. El corte fue de manera mecánica en fragmentos de 0,95 cm de longitud. Para la manufactura del ensilaje se utilizó el silo tipo trinchera, ubicado en las

instalaciones del Rancho Cofradía. La superficie fue cubierta con una capa plástica, permaneciendo cerrado durante 30 días. A fin de asegurar la calidad nutricional de este, antes y durante la experiencia, se determinó: proteína (P, AOAC 954.04), humedad y materia volátil (H, MV, AOAC 930.36), extracto etéreo (EE, AOAC 954.02), cenizas (CN, 942.05) y, extracto libre de nitrógeno y materia seca (MS) por diferencia.

La exposición de los animales a aflatoxina B₁ (40 µg kg⁻¹ MS) se calculó de acuerdo al consumo de materia seca de 21 kg de los animales, considerado para la producción de leche. De esta manera se estimó la inclusión diaria de 800 µg kg⁻¹ de AFB₁.

V.2.2.3. Instalaciones

Se construyeron cuatro corrales individuales de 60 m² dentro del establo del Rancho Cofradía y en cada corral se alojaron grupos de tres animales con el fin de mantenerlos dentro de su hábitat y del manejo del establo, también fueron adaptados comederos individuales en el corral de inseminación del establo para asegurar la ingesta total de la AFB₁, los adsorbentes utilizados fueron aluminosilicatos naturales (montmorillonita y clinoptilolita) y extractos de cultivos de levaduras de *S. cerevisiae* (MOSC).

V.2.3. Modelos experimentales

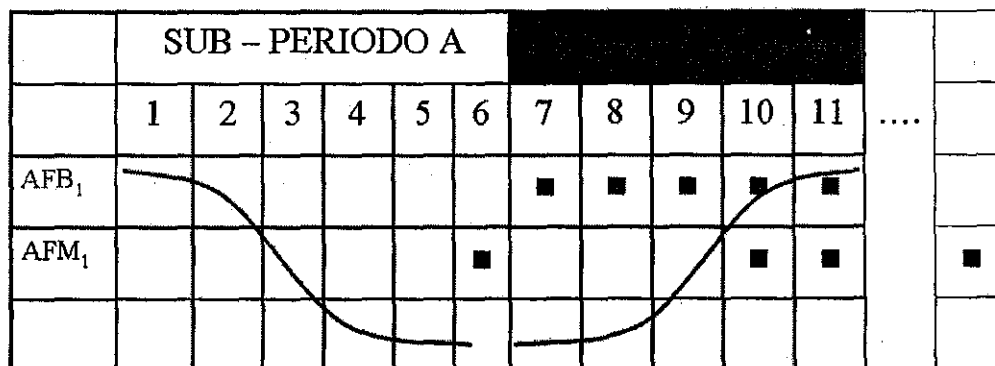
V.2.3.1. Modelo Núcleo

Consistió en un diseño cuadrado latino con cuatro grupos o tratamientos, tres animales por grupo y cuatro períodos de 11 días. Los cuatro grupos o tratamientos se identificaron como: 1) Testigo; 2) AFB₁ + montmorillonita; 3) AFB₁ + clinoptilolita; 4) AFB₁ + extractos de cultivos de levaduras de *S. cerevisiae* (MOSC). El tratamiento testigo se define como la dieta contaminada con AFB₁ sin el adsorbente. Los animales del grupo dos y tres recibieron los adsorbentes a razón de 40 g / animal / día, y el tratamiento cuatro recibió 15 g / animal / día. Todos los tratamientos incluyeron 40 µg kg⁻¹ de AFB₁ en base a la materia seca ingerida. La duración de la prueba fue de 44 días.

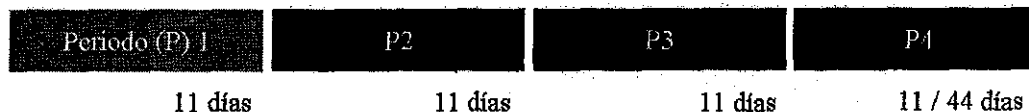
Para todos los tratamientos, cada período de 11 días fue dividido en dos sub-períodos (A y B). En los primeros seis días (subA) los animales fueron alimentados con dieta libre de AFB₁, e incluyeron el adsorbente correspondiente a cada tratamiento excepto por el grupo testigo, este sub-período A permitió monitorear la presencia de AFM₁ previa exposición a AFB₁, además de retornar a valores basales la concentración de AFM₁ al finalizar los periodos dos, tres y cuatro (Cuadro 5). Durante el sub-período B (duración cinco días) todos los grupos fueron alimentados con la formulación AFB₁ + adsorbente, excepto el testigo, el cual solo recibió AFB₁. Al final de cada período, los animales fueron rotados, de manera que todos los grupos formados recibieron todos los tratamientos, con la finalidad de minimizar efectos del comportamiento asociado al consumo de alimento, metabolismo, producción láctea e individualidad del animal.

De acuerdo al modelo Núcleo, la exposición a AFB₁ se realizó después del suministró del 50 % de la ración integral (concentrado + ensilado de maíz), la cual se proporcionó después de la ordeña matutina. Para la administración de los tratamientos, los animales fueron conducidos al corral de inseminación adaptado con la finalidad de asegurar la ingesta en los niveles previamente descritos. La administración se realizó en comederos individuales y se proporcionó el “Núcleo” (AFB₁ con o sin adsorbente en 280 g de concentrado). Una vez que recibieron los tratamientos se les regresó a los corrales y recibieron el resto de la ración.

Cuadro 5. Diseño experimental para la exposición a AFB₁ con y sin adsorbentes.



ICL= Indicadores de calidad de la leche



V.2.3.2. Modelo Integral

El presente modelo se realizó bajo un diseño de bloques o periodos con un grupo experimental conformado por cuatro animales que cursaron cuatro períodos de 11 días (duración de 44 días). Los animales fueron seleccionados al azar de los previamente evaluados. En forma similar que en Modelo Núcleo, cada periodo se dividió en dos sub-periodos (A y B), previamente descritos. La diferencia consistió en que un solo grupo de animales recibió todos los tratamientos de manera secuencial. Tanto la AFB₁ como los adsorbentes se incluyeron primeramente en el concentrado y posteriormente se mezclaron con el ensilado, de manera que toda la ración totalmente mezclada (RTM) presentó una distribución homogénea y fueron consumidos en el total de la ración suministrada por día.

Los cuatro bloques o periodos se ordenaron de la siguiente manera: 1) Testigo (AFB₁); 2) AFB₁ + montmorilonita; 3) AFB₁ + clinoptilolita; 4) AFB₁ + MOSC. Los tratamientos fueron formulados de igual manera que para el Modelo Núcleo. La prueba se inició con el bloque uno o Testigo, para continuar sucesivamente con los bloques dos, tres y cuatro. Se emplearon los corrales previamente adaptados, sin traslado al corral de inseminación.

V.2.4. Análisis de aflatoxina M₁ en leche

Durante los días 6, 10 y 11 de cada período de los dos modelos de exposición (Núcleo e Integral), se recolectaron tres litros de leche de la mañana y tres litros por la tarde, correspondientes a cada animal (n=192). Obteniendo una muestra compuesta, a partir de la cual se determinó la presencia de AFM₁. La extracción, detección y cuantificación de AFM₁ se realizó de acuerdo al protocolo AOAC2000.08.

Se calentó la leche a 37 °C y centrifugó a 2000 x g para separar la grasa. La fase acuosa se filtró por papel Whatman N° 2 y del filtrado se pasaron 50 mL al reservorio de la columna de inmunoafinidad (STARLINE, Romer Labs). La columna se lavó con agua y seco bajo flujo de nitrógeno. La AFM₁ se eluyó con acetonitrilo (4 mL) y secó con flujo de nitrógeno a 45 °C. El residuo se resuspendió en 200 µL de agua: acetonitrilo (75:25 vol/vol).

Una alícuota de 50 μL del extracto se inyectó en el sistema HPLC/FLD. El sistema consistió de una bomba AGILENT 1100 (Palo Alto, CA, USA) y un detector de fluorescencia programable AGILENT 1100, conectados a una estación de trabajo AGILENT (ChemStation Rev. A.10.01). Las separaciones cromatográficas se realizaron en una columna de fase reversa (C18, 250 mm x 4.6 mm., 5 μm) (Beckman Coulter, Ultrasphere), conectada a una precolumna (C18, 20 mm x 4.6 mm., 5 μm , Phenomenex). La fase móvil empleada fue agua: acetonitrilo (3:1), a un flujo de 0.8 mL min^{-1} . Las longitudes de excitación y emisión fueron de 365 nm y 435 nm, respectivamente. La detección y cuantificación se realizó utilizando el método del estándar externo determinando la medida del área bajo la curva.

V.2.5. Análisis de AFB₁ por HPLC en las raciones destinadas a la alimentación de bovinos

El alimento fue examinado para determinar el nivel de exposición natural de los animales a AFB₁. Se recolectaron tres kg del alimento integral cada tercer día y se redujeron representativamente las muestras por el método de cuarteo. La detección y cuantificación de las aflatoxinas fueron realizadas siguiendo la metodología AOAC 2003.02 y 994.08.

A 50 g de muestra se le adicionaron 250 mL de acetona:agua (85+15 v v⁻¹) luego de agitar enérgicamente por 30 seg se llevaron a agitación constante por 30 min. Posteriormente, el extracto se filtró a través de papel Whatman N° 4 y 5 mL del filtrado se diluyeron en 100 mL en matraz volumétrico aforando con solución salina amortiguada o agua destilada (pH=7; SSB). Del extracto diluido, 50 mL se colocaron en el reservorio de una columna de inmunoafinidad (Aflatest, Vicam). La AFB₁ se eluyó con 1.25 mL de metanol (grado HPLC). Finalmente, el extracto fue llevado a sequedad con N_{2(g)} y resuspendido en 1 mL de acetonitrilo:agua (9+1 v/v). Se derivatizó antes de inyectar al HPLC tomando una alícuota de 200 μL del extracto con 700 μL de solución derivatizante [ácido trifluoroacético/ácido acético glacial/agua (20:10:70)] durante 8.5 min a 65 °C según la metodología propuesta por Trucksess *et al.* (1994). Una alícuota de 50 μL de la solución fue inyectada en el sistema HPLC (descrito en el punto V.2.4.).

La fase móvil utilizada fue agua:acetonitrilo:metanol (4:1:1), a un flujo de 1.5 mL min^{-1} . Las longitudes de excitación y emisión fueron de 360 nm y 440 nm, respectivamente. La detección y cuantificación se realizó utilizando el método del estándar externo determinando la medida del área bajo la curva.

V.2.6. Análisis estadístico

Los resultados de la detección de AFM_1 en la leche en ambas pruebas o Modelos experimentales fueron analizados utilizando ANOVA a un nivel de significancia del 95 %. La determinación de las diferencias entre promedios se realizó mediante prueba de Tukey. Se utilizó el paquete estadístico Sigma STAT v3.1 para Windows.

V.3 Evaluación del estado del animal y de la calidad de la leche

Antes del inicio de la prueba y durante la misma se obtuvieron muestras de sangre de los animales en experimentación con la finalidad de realizar exámenes hematológicos y de química sanguínea. Las muestras de sangre se recolectaron al momento de la selección, y durante la experimentación (ambos Modelos) con la finalidad de monitorear el estado de salud de los mismos. La sangre de cada animal fue dividida en dos alícuotas, una de ellas, tratada con EDTA, utilizada para el recuento de células. La fracción sin anticoagulante permitió determinar la química sanguínea y los niveles de las enzimas TGO (transaminasa oxalacética) y TGP (transaminasa pirúvica), indicadores inespecíficos de funcionalidad y daño hepático.

La calidad de la leche fue evaluada de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NMX-F-700-COFOCALEC- Sistema Producción Leche-Alimentos-Lácteos-Leche cruda de vaca. Un total de 128 muestras de leche, obtenidas durante los 88 días de experimentación, fueron examinadas para determinar su calidad. Se consideró un muestreo antes y después de la exposición a AFB_1 por vaca en todos los periodos y en ambos modelos experimentales. Los análisis a realizar fueron porcentaje de grasa, proteína, sólidos totales y sólidos no grasos. Las determinaciones se realizaron por el método infrarrojo (IR).

V.4. Financiamiento

Para la realización del presente trabajo se contó con el apoyo Institucional del Programa P3E (Universidad de Guadalajara), además del financiamiento por parte de las Empresas Bayer de México, Sud – Chemie y Técnica Mineral S.A. de C.V. El costo total del Proyecto se aprobó con un monto de \$ 180.000 MN.

VI. RESULTADOS Y DISCUSION

VI.1. Contaminación natural con aflatoxinas en la ración de bovinos

El análisis del alimento en los establos productores de la región de los Altos y Ciénega, Jalisco permitió detectar aflatoxinas totales (AFT) en el 92.5 % de las raciones de bovinos productores de leche. Los niveles fluctuaron de 4.82 - 24.90 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (promedio = $10.84 \pm 5.84 \mu\text{g kg}^{-1}$). La cuadro 6 y la figura 8 muestran los niveles promedio de aflatoxinas totales en la ración de los 8 municipios evaluados.

Cuadro 6. Niveles de aflatoxinas totales por municipio pertenecientes a la región de los Altos y Ciénega, Jalisco.

Municipios	AFs Totales ($\mu\text{g kg}^{-1}$)				
	Positivos (%)	Rango	Media	\pm DE	ESM
Acatic	100	5.83 - 13.11	10.15b	2.88	1.29
Jalostotitlán	60	4.95 - 9.91	6.90b	2.65	1.53
Ocotlán	100	6.61 - 8.30	7.57b	0.68	0.30
San Juan	80	4.82 - 13.95	8.23b	4.04	2.02
Tepatitlán	100	17.99 - 24.90	22.04a	2.84	1.27
Tototlán	100	4.89 - 7.22	5.99b	1.00	0.45
Valle de Guadalupe	100	5.99 - 18.35	12.89b	5.53	2.47
Zapotlanejo	100	6.40 - 17.13	10.85b	4.30	1.92

DE: desviación estándar ESM: error estándar de la media

Ref. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadística ($P < 0.05$) entre municipios.

Límite cuantificación AFT = 4 ng kg^{-1}

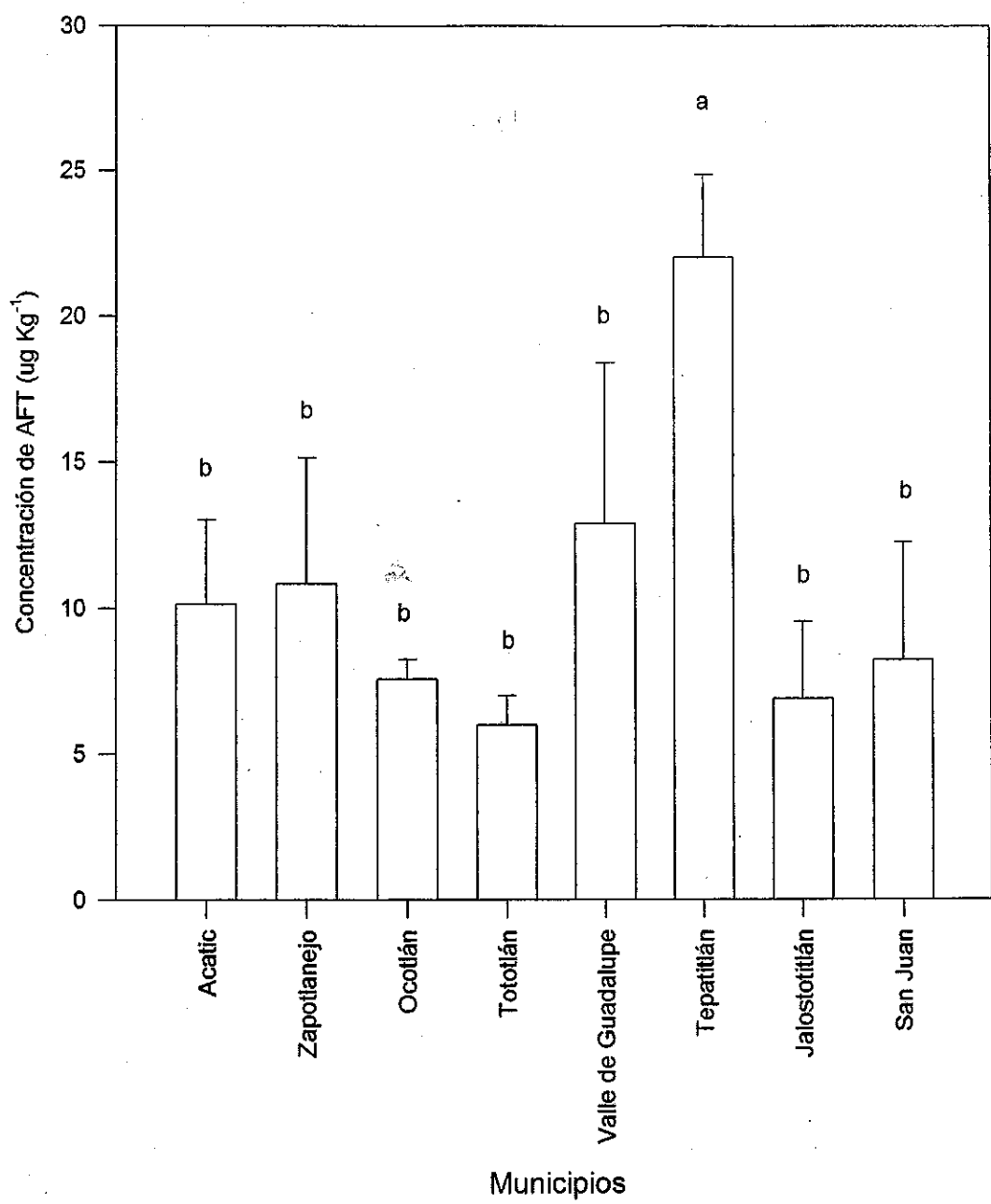


Figura 8. Niveles de aflatoxina totales ($\mu\text{g kg}^{-1}$) en raciones de la región de los Altos y Ciénega, Jalisco (México)

El análisis estadístico demostró diferencia estadística entre los municipios ($P < 0.05$), siendo mayor la contaminación por aflatoxinas en las muestras recolectadas en el municipio de Tepatitlán. Del total de muestras analizadas para AFT, 3 (9.3 %) presentaron niveles superiores a los permitidos por la Norma Oficial ($20 \mu\text{g kg}^{-1}$), todas provenientes del municipio de Tepatitlán.

Los resultados encontrados en el presente estudio demuestran la presencia de aflatoxinas durante el periodo evaluado, si bien, los niveles detectados en la mayoría de los municipios se encuentran por debajo del límite permitido por la NOM 188-SSA1-2002, es importante considerar que los niveles podrían fluctuar durante diferentes épocas del año. Aún cuando Tepatitlán presentó niveles de AFT superiores a la Norma Oficial, este nivel de exposición no ha sido relacionado con efectos en los parámetros productivos de bovinos productores de leche. Guthrie (1979) determinó efectos sobre la eficiencia reproductiva y producción de leche cuando el consumo fue de $120 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFT. Se destaca que la reglamentación para establecer los límites máximos de AFT ($20 \mu\text{g kg}^{-1}$) fundamenta este nivel de acción al considerar la tasa de biotransformación promedio (1.8 %) en rumiantes productores de leche y el potencial riesgo a la Salud del consumidor por la presencia de residuos de AFM_1 en niveles superiores a $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$.

Los reportes de otros investigadores relacionados con aflatoxinas en raciones de bovinos y en alimentos procesados concuerdan con los encontrados en la presente investigación. Destacan los trabajos desarrollados en los países de Asia, Oceanía y Europa.

Binder *et al.* (2007) reportan la contaminación por aflatoxinas en ingredientes y alimentos para consumo animal. De un total de 1,291 muestras de granos y alimentos terminados para animales obtenidas de la región de Asia-Pacífico, se encontró contaminación por AFB_1 en el 3 % (media $35 \mu\text{g kg}^{-1}$), 34 % (media $38 \mu\text{g kg}^{-1}$) y 63 % (media $52 \mu\text{g kg}^{-1}$) de las muestras correspondientes a las regiones Norte, Sureste y Sur respectivamente. En Europa el porcentaje de contaminación fue de 28 a 33 %, los niveles promedio fluctuaron de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Norte de Europa) a $67 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Sur de Europa). En Oceanía la contaminación fue del 22 % con valores promedio de $34 \mu\text{g kg}^{-1}$. El maíz fue el ingrediente más frecuentemente contaminado, seguido

por el trigo y harina de soya. El alimento terminado para animales presentó niveles promedio de $24 \mu\text{g kg}^{-1}$ y, en ensilados y rastrojos de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$.

En América los reportes se concentran en EUA, Canadá y países sudamericanos. Durante el período 1989-1991, Wood (1992) realizó un estudio sobre la contaminación con micotoxinas en diferentes regiones agrícolas de EUA, entre ellas, Arkansas, Texas, Oklahoma, Virginia y Maryland. En dicha investigación se observó alta contaminación por micotoxinas en maíz y cacahuate. Los niveles de AFT en el maíz destinado a consumo animal se incrementaron durante 1991, destacando el mayor porcentaje de muestras positivas en los estados de Arkansas, Texas y Oklahoma, estados que presentaron niveles superiores a $300 \mu\text{g kg}^{-1}$. En otro estudio realizado en el estado de Georgia, Chamberlain *et al.* (1993) determinaron niveles promedio de $73 \mu\text{g kg}^{-1}$ de aflatoxinas en muestras de maíz.

En Brasil, Rodríguez y Sabino (2002) presentaron la revisión de 128 artículos publicados durante 1991-2000 relacionados con micotoxinas. El 30 % de las publicaciones correspondían a trabajos sobre la contaminación en alimentos para consumo humano y animal. El cacahuate y productos derivados para consumo humano presentaron los mayores niveles de aflatoxinas. Destacan los estudios realizados por Correa *et al.* (1997), Nordin y Luchese (1998) y Oliveira *et al.* (1998) en Sao Paulo, Río Grande do Sul y Amazonas, en dichos estudios los niveles fluctuaron de 10 a $4,130 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Por otra parte, en Colombia se reportó la presencia de AFB_1 en alimentos para consumo animal. De un total de 200 muestras de materias primas y alimentos terminados se encontró contaminación en el 29 % de las muestras, los niveles oscilaron entre 1.0 y $66.1 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Céspedes y Díaz, 1997).

En México, Flores *et al.* (2006) determinaron la presencia natural de AFB_1 en granos y alimentos de uso pecuario. Los niveles promedio detectados en la ración completa fueron de $15.32 \mu\text{g kg}^{-1}$, en maíz de $5.78 \mu\text{g kg}^{-1}$ y en sorgo de $9.55 \mu\text{g kg}^{-1}$. Los resultados indicaron además la co-presentación con otras micotoxinas de impacto en la salud animal como toxina T2, ocratoxina, citrinina, zearalenona.

Así mismo, Reyes *et al.*, (2008) evaluaron la presentación natural de diferentes micotoxinas durante la etapa de conservación del ensilado de maíz. Los resultados indicaron que existió simultaneidad de presentación de las principales micotoxinas de impacto en la salud animal. En dicho estudio, los niveles de aflatoxinas totales oscilaron de 12.25 a 15.71 $\mu\text{g kg}^{-1}$. El análisis estadístico no determinó diferencias significativas entre los meses en estudio por lo que los resultados indican que las concentraciones detectadas de AFT podrían haber sido producidas durante la etapa de cultivo y cosecha del maíz.

Si bien, los estudios realizados por Buccio *et al.*, (2001) indican que la contaminación del maíz con aflatoxina en México pudiera ocurrir principalmente durante el almacenamiento y no durante las diferentes etapas del cultivo. Diferentes reportes informan las condiciones medio-ambientales que favorecen la síntesis de aflatoxinas en etapas pre- y pos-cosecha. Se destacan las altas temperaturas y períodos de sequía durante el desarrollo del cultivo (Widstrom *et al.*, 1990). Así mismo, durante el almacenamiento altas temperaturas y humedad aunada al daño causado por roedores e insectos favorecen la colonización y/o desarrollo de especies potencialmente productoras de aflatoxinas (Widstrom, 1992). Bajo condiciones deficientes de almacenamiento que incluyen temperatura, humedad y tensión de gases, la síntesis y acumulación de aflatoxinas pudiera ocurrir.

Como parte de este trabajo fue posible identificar la variabilidad en las prácticas y/o manejo del alimento en los productores de la región estudiada de Jalisco. El análisis de la información obtenida de los propietarios de los establos permitió suponer que en la región de los Altos y Ciénega del estado de Jalisco las prácticas de manejo, producción y/o almacenamiento de los alimentos destinados a las raciones pudieran favorecer la síntesis y/o acumulación de micotoxinas (AFT, AFB₁) debido al empleo de labores de tipo familiar (70-80 %), con mediano asesoramiento y tecnificación.

En términos generales, los establos de la zona estudiada se caracterizaron por mantener a los animales semiestabulados, consumir forrajes como rastrojo de maíz o alfalfa deshidratada, y solo temporalmente ensilados de maíz, según disponibilidad. El suministro de alimento concentrado depende de la producción de leche y en algunos establos se mezcla con el forraje,

o bien se proporciona a los animales durante la ordeña. Estos factores condicionaron el muestreo, atribuyéndose la variabilidad de los niveles de AFT y AFM₁. Además debe destacarse que el almacenamiento del alimento es deficiente, ya que se mantiene en la mayoría de los casos, en bodegas improvisadas y en ocasiones a la intemperie.

Además, debe mencionarse que actualmente se ha incrementado el uso de granos secos de destilería (DDG), y derivados de cervecería, lo cual se observó en algunos establos estudiados. Estos subproductos se destinan principalmente al consumo del ganado para evitar su eliminación y posterior contaminación en el ambiente y representan un alto riesgo de exposición a micotoxinas al concentrarse después del procesamiento hasta triplicar los niveles inicialmente presentes. Por lo tanto, deben incluirse en los programas de monitoreo al igual que las materias primas convencionales.

El grado de tecnificación y aspectos relacionados con la higiene de la sala de ordeña fueron igualmente heterogéneos. Las salas de ordeña fueron variables, observándose de tipo rústico y tecnificadas (carrusel, rotativas, de espina de pescado, entre otras). A partir del año 2002, las empresas que obtienen la leche de esta región realizaron un emplazamiento hacia los productores de los Altos para que dejaran de participar de las entidades colectivas de comercialización de leche fría (tanques de enfriamiento de uso común) a fin de elevar los estándares de calidad del producto (Gómez *et al.*, 2003).

Por otra parte, se pudo observar que el 32.5 % de los establos incorporaban adsorbentes para micotoxinas en el alimento, siendo en todos los casos bentonita de sodio. Dicho adsorbente se agregó en una proporción de 4 kg Tn⁻¹ de concentrado (32 g a cada animal por día). El principal municipio que se destacó por el uso de estos aditivos fue Acatic (100 %), seguido por San Juan y Valle de Guadalupe (60 %) y, finalmente, Jalostotitlán y Tepatitlán (20 %).

VI.2. Contaminación natural con aflatoxina M₁ en leche cruda

Se encontró contaminación por AFM₁ en el 80 % de las muestras (Cuadro 7), destacándose los municipios de Acatic, Jalostotitlán, Valle de Guadalupe y Zapotlanejo por presentar el 100 % de muestras positivas, mientras que el municipio de Tepatitlán presentó el menor porcentaje (40 %). Se consideraron muestras positivas aquellas en que los niveles fueron mayores a 0.005 µg L⁻¹. Los niveles detectados fluctuaron de 0.006 – 0.065 µg L⁻¹ de leche (media 0.023 ± 0.016 µg L⁻¹). Todas las muestras de leche presentaron valores por debajo de los permitidos por la NOM-184-SSA-1994 (0.5 µg L⁻¹) y solo tres (9.4 %) estuvieron sobre los niveles permitidos por la Comunidad Europea.

Cuadro 7. Niveles de aflatoxinas M₁ por municipio pertenecientes a la región de los Altos y Ciénega, Jalisco.

Municipios	AFM ₁ (µg L ⁻¹)				
	Positivos (%)	Rango	Media	±DE	ESM
Acatic	100	0.014 – 0.065	0.035	0.020	0.008
Jalostotitlán	100	0.015 – 0.055	0.030	0.017	0.008
Ocotlán	60	0.006 – 0.030	0.016	0.013	0.007
San Juan	80	0.017– 0.061	0.031	0.021	0.010
Tepatitlán	40	0.006 – 0.009	0.008	0.002	0.002
Tototlán	60	0.009 – 0.012	0.010	0.002	0.001
Valle de Guadalupe	100	0.006– 0.027	0.014	0.009	0.004
Zapotlanejo	100	0.010 – 0.046	0.027	0.014	0.006

Ref. Límite cuantificación AFM₁= 0.005 µg L⁻¹. DE: desviación estándar. ESM: error estándar de la media.

Se destaca que el presente estudio no determinó una posible correlación entre el consumo de AFT y los niveles de eliminación de AFM₁ en leche, así como por el efecto del uso de adsorbentes de micotoxinas en las raciones. Esto fue considerado debido a que en los municipios estudiados durante el periodo de recolección de muestras, los establos empleaban diferentes técnicas para el manejo del alimento (previamente descritas), lo cual condiciona la distribución de las micotoxinas en la ración y por tanto una fuente de variabilidad en los resultados obtenidos. A fin de poder establecer una correlación en futuros estudios, se recomienda incrementar el número de establos a muestrear en cada municipio, además de categorizar los mismos de acuerdo al manejo empleado durante la alimentación.

Los resultados observados en el presente estudio pueden compararse con los reportados en otros países. Si bien algunas determinaciones fueron realizadas por cromatografía de líquidos, la mayoría utilizaron métodos inmunoenzimáticos (ELISA).

Destaca la contaminación en países Asiáticos como Irán y Turquía. Los estudios realizados por Oruc *et al.* (2005) mostraron contaminación con AFM₁ en 115 muestras de leche procedentes de Turquía, siendo todas las determinaciones realizadas por la técnica de ELISA. Las concentraciones de AFM₁ fluctuaron de 0 - 0.212 µg L⁻¹ (media de 0.078 µg L⁻¹) y de 0.012 - 0.164 µg L⁻¹ (media de 0.072 µg L⁻¹) en valles y regiones montañosas, respectivamente. No se observó diferencia significativa entre las regiones, encontrándose que el 60 % de las muestras estudiadas excedían los límites establecidos por la Unión Europea. Así mismo, Tarik Haluk *et al.* (2005) encontraron 64 % (n=85) de muestras de leche con niveles de AFM₁ que excedían los límites permitidos.

En Irán, Abolfazl-Kamkar, (2005) detectaron AFM₁ en 111 muestras de leche en un rango de 0.015 - 0.28 µg L⁻¹. Se detectó que el 40 % de las muestras positivas presentaron niveles superiores al límite máximo tolerable. En otro estudio Tajkarimi *et al.* (2007) evaluaron la contaminación de AFM₁ por HPLC en 98 muestras de leche recolectadas de tanques enfriadores en 5 regiones de Irán. Las muestras presentaron niveles entre 0.041 - 0.065 µg L⁻¹, (media 0.039 µg L⁻¹), ninguna superó los límites establecidos por la FDA (0.5 µg L⁻¹).

En la India, Rastogi *et al.*, (2004) detectaron niveles elevados de AFM₁ en leche y subproductos mediante la técnica de ELISA. El 87 % de las muestras (n=87) fueron positivas y, de estas el 99 % excedieron los niveles permitidos por la Comunidad Europea. Sólo el 9 % de las muestras superaron los límites máximos permitidos por la FDA. Previamente, Vasanthi y Bath, (1988) detectaron niveles de AFM₁ de 0.05 a 0.3 µg L⁻¹.

Es importante mencionar el impacto de AFM₁ en los derivados de la leche como los quesos, ya que el proceso de fabricación implica la concentración de los componentes de la leche, lo cual puede incrementar los niveles de contaminación (Prandini *et al.*, 2008). En Turquía, se detectó la presencia de AFM₁ en quesos reportándose un rango de 0.006-0.6 µg L⁻¹. Todas las determinaciones fueron realizadas por ELISA (Yaroglu *et al.*, 2005).

En Europa, los reportes sobre la contaminación por AFM₁ muestran porcentajes de incidencia y niveles variables, entre estos, destacan los realizados por Rodríguez-Velasco *et al.* (2003), quienes reportaron 3.3 % de incidencia de AFM₁ en leche recolectada de establos de la provincia de León, España. Los niveles promedio de AFM₁ fueron 0.02 ± 0.005 µg L⁻¹ y 0.017 ± 0.003 µg L⁻¹ cuando se analizaron con ELISA y HPLC, respectivamente. En contraste, en Grecia el porcentaje de incidencia de AFM₁ fue del 50.6 %, mientras que los niveles fueron menores a 0.005 µg L⁻¹ (Markaki y Melissari, 1997). En Portugal se determinó la presencia de AFM₁ en 96 muestras de yogurt. En el caso de yogurt de fresa y natural, el porcentaje de contaminación fue de 33 % y 4.2 %, respectivamente. Los niveles fluctuaron desde 0.019 - 0.098 µg kg⁻¹ (Martins y Martins, 2000).

Con respecto a Latinoamérica, López *et al.* (2003) reportaron la presencia de AFM₁ en 18 de 77 muestras de leche obtenidas en Argentina (23 %). El período de recolección se realizó de marzo a septiembre de 2002, encontrando niveles de AFM₁ en el rango de 0.01 a 0.03 µg L⁻¹, valores por debajo de los máximos permitidos. En Brasil, Garrido *et al.* (2003) encontraron AFM₁ en 29 muestras de leche (20.9 %) con niveles de 0.05-0.24 µg L⁻¹. En Colombia, el estudio realizado durante 2004-2005 por Díaz y Espitia, (2006), determinaron la contaminación por AFM₁ en leche para consumo humano mediante HPLC. Sobre un total de 241 muestras recolectadas, los niveles de contaminación fluctuaron de 0.011 - 0.289 µg L⁻¹.

En EUA, Stoloff *et al.*, (1981), analizaron muestras de leche en polvo, helado de vainilla, yogurt, queso Cheddar y Cottage, no detectando contaminación por AFM₁, excepto por una muestra de queso Cottage que presentó niveles de 0.3 µg kg⁻¹. Por otro lado, el Centro para la Seguridad Alimentaria y Nutrición Aplicada de la FDA reportó contaminación por AFM₁ en 4.6 % de 4,225 muestras de leche cruda, los niveles promedio fueron de 0.05 µg kg⁻¹. Durante 1996 del total de las muestras, 0.13 % mostraron niveles mayores a 0.5 µg kg⁻¹. De 1998 a 2000 se encontró contaminación por AFM₁ en la región suroeste (n= 5,801), medio oeste (n = 438) y en el suroeste (n = 13,093), detectándose del 72 al 100% de las muestras niveles de 0-0.5 µg kg⁻¹. En los estados del suroeste se reportó 21 % (n = 3,942) de las muestras de leche contaminadas con niveles menores al límite permitido y 0.78 % con niveles mayores a 0.5 µg kg⁻¹ (FDA, 2000).

En México, Córdoba- Izquierdo *et al.* (2007) analizaron la incidencia de AFM₁ de muestras tomadas de un tanque enfriador ubicado en el estado de Hidalgo. Cada muestra fue tomada con un intervalo de una semana y analizadas por HPLC. Los niveles fluctuaron de 0.225 a 0.332 µg L⁻¹. Debido al número limitado de muestras analizadas, es necesario realizar más estudios que permitan evaluar la incidencia de AFM₁ en la leche así como los niveles de contaminación presentes en diferentes regiones productoras. Además, es importante promover la implementación de programas de vigilancia para el cumplimiento de la normatividad vigente.

Es importante considerar que la contaminación por AFM₁ reportada en los diferentes países presenta variaciones debido a los sistemas de alimentación, a factores propios de los animales y ambientales, así como por los procedimientos analíticos utilizados (Galvano *et al.*, 1996).

VI.3. Evaluación del uso de adsorbentes en las raciones de bovinos

Durante los dos experimentos (modelos Núcleo e Integral) fueron determinados los niveles de AFM₁ previo exposición a AFB₁ (subA). En ambos casos, la presencia de AFM₁ fue siempre detectada después de la exposición a AFB₁, acorde con estudios previos (Allcroft y Roberts, 1968; Trucksess *et al.*, 1983). Se ha documentado que la exposición a AFB₁ en bovinos

productores de leche determina la presencia de AFM₁ en un lapso de 48 h posterior al consumo del alimento. Al interrumpir el consumo de AFB₁ (subA), los niveles promedio detectados de AFM₁ en leche fueron de 0.027 - 0.032 µg L⁻¹, lo cual concuerda con otros estudios (Applebaum *et al.*, 1982; Veldman *et al.*, 1992; Caggioni y Pietri, 1999; Battacone *et al.*, 2003, Diaz *et al.*, 2004; Battacone *et al.*, 2005), donde fue demostrado el retorno de la concentración AFM₁ a niveles basales en leche en un lapso de 72-96 h.

VI.3.1. Modelo Núcleo

La figura 9 presenta los resultados obtenidos de la eliminación de AFM₁ en leche por la exposición a 40 µg kg⁻¹ de AFB₁. El grupo testigo presentó una concentración de 1.343 ± 0.341 µg L⁻¹ de AFM₁ en leche. Respecto a los niveles de eliminación de AFM₁ por los grupos tratados con adsorbentes, los resultados mostraron concentraciones de 1.084 ± 0.421, 1.106 ± 0.423 y 1.193 ± 0.353 µg L⁻¹ para montmorillonita, clinoptilolita y extractos de cultivos de *S. cerevisiae* (MOSC), respectivamente. No se encontró diferencia estadística entre los tratamientos ($P > 0.05$).

El porcentaje de reducción de AFM₁ en leche por efecto de la inclusión de los adsorbentes en la dieta se presenta en la figura 10. Los valores fueron de 19 %, 17.6 % y 11.2 % para montmorillonita, clinoptilolita y MOSC, respecto al tratamiento testigo. No se presentó reducción estadísticamente significativa entre los tratamientos ($P > 0.05$).

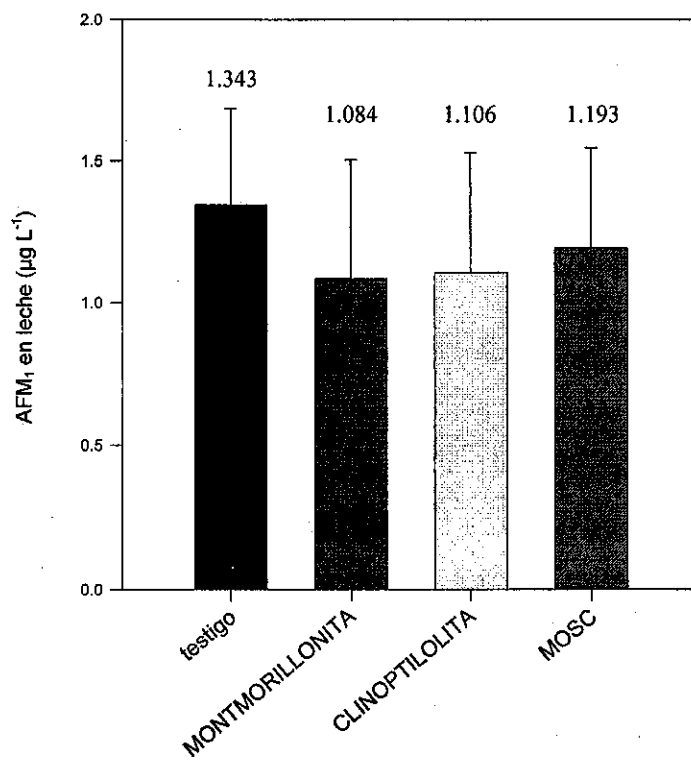


Figura 9. Niveles de AFM₁ en leche cruda (µg L⁻¹) durante la exposición a AFB₁ (Modelo Núcleo)

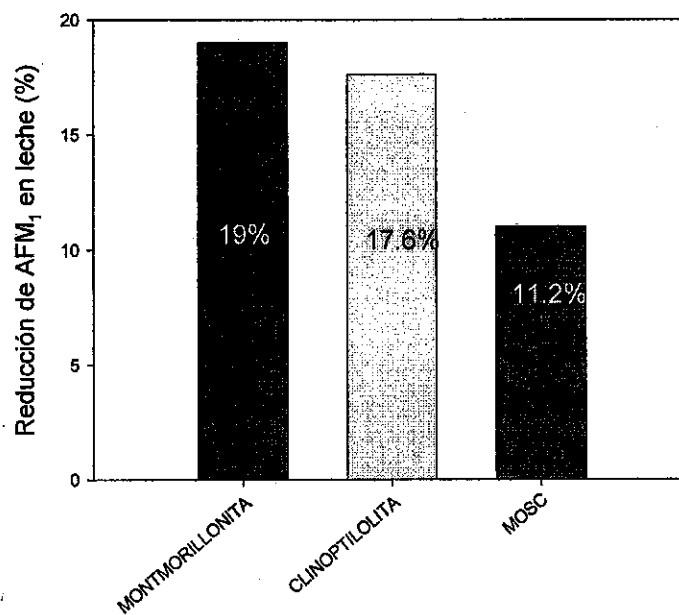


Figura 10. Porcentaje de reducción de AFM₁ en leche por efecto de los adsorbentes (Modelo Núcleo)

VI.3.2. Modelo Integral

Bajo este modelo experimental, los resultados permitieron observar diferencias estadísticas entre tratamientos ($P < 0.05$). Los niveles de AFB₁ en leche del grupo testigo que no recibió ningún adsorbente y solo incluyó AFB₁ fueron de $0.736 \pm 0.096 \mu\text{g L}^{-1}$, mientras que los niveles para los grupos que recibieron montmorillonita, clinoptilolita y adsorbente MOSC fueron de $0.492 \pm 0.097 \mu\text{g L}^{-1}$, $0.465 \pm 0.081 \mu\text{g L}^{-1}$ y $0.649 \pm 0.100 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente (Figura 11). El porcentaje de reducción de AFB₁ en los grupos que incluyeron adsorbentes fue de 33.2 %, 36.8 % y 12 %, respectivamente (Figura 12). La disminución en la eliminación de AFB₁ en leche por parte de los grupos que incluyeron montmorillonita y clinoptilolita fue diferente estadísticamente tanto al grupo testigo como al que recibió el adsorbente MOSC, el cual a su vez no mostró diferencia estadística con el testigo ($P > 0.05$).

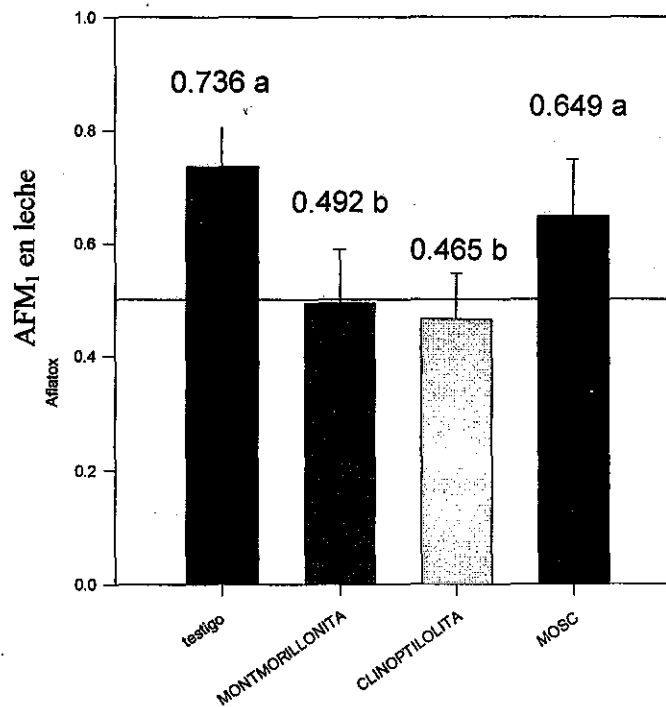


Figura 11. Niveles de aflatoxina M₁ en leche cruda ($\mu\text{g L}^{-1}$) durante la exposición a AFB₁ (Modelo Integral). Las literales indican diferencia estadística ($P < 0.05$)

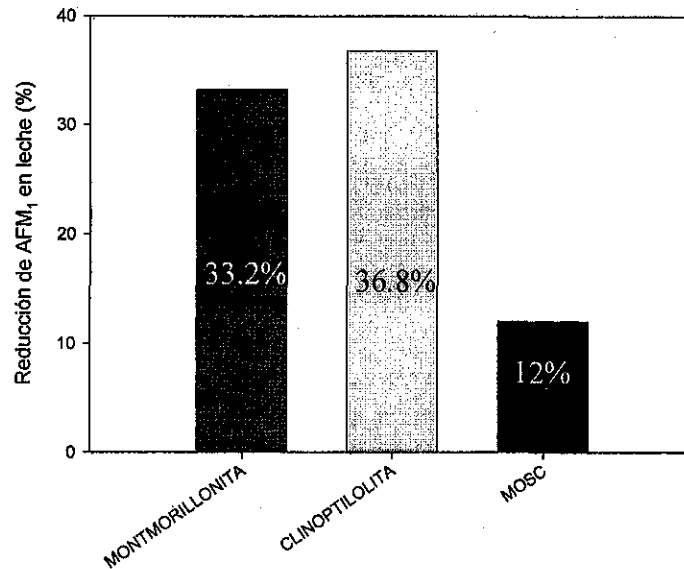


Figura 12. Porcentaje de reducción de AFM₁ en leche por efecto de los adsorbentes (Modelo Integral)

En la literatura existen pocos reportes sobre la eficiencia de adsorbentes de micotoxinas en vacas productoras de leche. Entre los estudios relacionados se encuentran los de Harvey *et al.*, (1991), quienes analizaron el efecto de un aluminosilicato de sodio y calcio hidratado (HSCAS) incluido en alimento de vacas productoras de leche. Los resultados obtenidos por la inclusión al 0.5 % del HSCAS con 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁ demostró una reducción del 24 % en los niveles de AFM₁ en leche. Así mismo, la inclusión al 1.0 % de la ración contaminada con 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁, reportó reducción del 44 %. La tasa de biotransformación en el grupo testigo fue de 0.92 %, resultados similares a los que se encontraron en el modelo integral, en el cual el porcentaje de reducción para montmorillonita y clinoptilolita fue de 33.2 % y 36.8 % respectivamente.

Díaz *et al.* (2004) realizaron dos estudios para evaluar la capacidad de agentes secuestrantes para prevenir o reducir la tasa de biotransformación de AFB₁ a AFM₁. En el primer experimento, Astra Ben, Flow Guard y Microsorb (bentonitas de sodio) fueron incluidas al 1.2 % en base a la materia seca de la ración contaminada con 55 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁. Los resultados obtenidos mostraron niveles de AFM₁ de 1.24 $\mu\text{g L}^{-1}$ para el grupo control y 0.52, 0.43 y 0.62

$\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente para cada adsorbente. Los niveles representaron una reducción del 61 %, 65 % y 50 % respecto al grupo testigo, con diferencias estadísticas entre los tratamientos ($P < 0.001$). Los resultados de esta investigación son mayores a los obtenidos en ambos modelos (Núcleo – Integral) utilizados en el presente estudio, sin embargo, cabe destacar que la detección y cuantificación de los niveles realizados por Díaz *et al.* (2004) fue realizado por radioinmunoanálisis.

En el segundo experimento realizado por Díaz *et al.* (2004) se utilizaron los adsorbentes: bentonita de sodio (1.2 %), bentonita de calcio (1.2 %), glucomananos de levaduras (0.05 %) y carbón activado (0.25 %). Los resultados permitieron observar reducción estadística ($P < 0.01$) de los niveles de AFM₁ en leche, a excepción del carbón activado. La mayor reducción fue observada en el grupo que recibió bentonita de sodio (64.6 %), seguido por los glucomananos de levaduras (58.5 %), mientras que la bentonita de calcio y el carbón activado mostraron reducciones de 31.4 % y 5.4 %, respectivamente. De manera similar a lo reportado por Díaz *et al.* (2004), el presente estudio permitió observar mayor eficiencia de los adsorbentes minerales montmorillonita y clinoptilolita que el adsorbente MOSC, si bien la eficiencia de este último no superó el 12 % de reducción respecto al testigo, ambos resultaron similares estadísticamente. Así mismo, Stroud *et al.* (2006), evaluó la inclusión de bentonitas de sodio comparativamente con glucomananos derivados de *S. cerevisiae*. Se destaca que ambos adsorbentes se agregaron al 0.5 % en base a la materia seca en raciones contaminadas con $170 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁. Se encontró reducción significativa en los niveles de AFM₁ en la leche para los grupos que recibieron bentonitas de sodio, en tanto los glucomananos no mostraron eficiencia.

VI.3.3. Tasa de biotransformación de AFM₁

La tasa de biotransformación de AFB₁ a AFM₁ durante el modelo Núcleo fue de 3.35 %, mientras que en el modelo Integral el valor fue de 1.8 %. Estos resultados se encuentran dentro de lo reportado por otros autores (Price *et al.*, 1985; Frobish *et al.*, 1986; Munksgaard *et al.*, 1987; Pettersson *et al.*, 1989; Harvey *et al.*, 1991; Veldman, 1992; Veldman *et al.*, 1992; Galvano *et al.*, 1996). Si bien, se debe destacar que el mayor porcentaje en la tasa de

biotransformación mostrado en el primer modelo experimental afectó directamente la eficiencia de los adsorbentes evaluados.

Durante el modelo Núcleo, la vía de exposición a AFB₁ se caracterizó por el suministro en una porción de alimento concentrado (280 g) conteniendo la cantidad total diaria de AFB₁ (800 µg) en un comedero estrecho, entrampado e impidiendo el retiro del animal hasta el consumo total del concentrado contaminado. Este método pudo influir incrementando la tasa de biotransformación a AFM₁ ya que favoreció el rápido pasaje de la toxina por el rumen, reduciendo la formación del complejo AFB₁-adsorbente, incrementado su absorción en secciones posteriores del tracto gastrointestinal, favoreciendo su biotransformación y eliminación en leche a niveles mayores a los esperados.

Por otra parte, el manejo de las vacas utilizado bajo este modelo implicó la exposición directa de la mucosa nasal del animal con la posible aspiración del material tóxico. Estudios experimentales han sido desarrollados comparativamente en investigaciones con hígado y mucosa olfatoria nasal utilizando aflatoxina marcada radiactivamente (³H-AFB₁). Larrison *et al.* (1989) demostraron mayor capacidad en la mucosa nasal para formar metabolitos derivados de AFB₁. Esto pudo demostrar la formación de diversos metabolitos destacando AFM₁, en niveles diferentes estadísticamente que los presentes en el hígado. Aunque el citocromo P450 en la mucosa olfatoria nasal se encuentra en menor nivel que el correspondiente en hígado, la actividad de la NADPH citocromo c reductasa fue mucho mayor en la mucosa nasal, además de una relación mayor entre citocromo b₅: citocromo P450. Por lo tanto, el metabolismo de AFB₁ fue mayor en la mucosa nasal que en hígado (Larrison *et al.*, 1989). Estudios posteriores han demostrado variaciones en los niveles de P450, funciones de las isoformas del P450 y actividad GST entre especies (Ball y Coulombe, 1991) y dentro de los tejidos de una misma especie (Larrison *et al.*, 1994), factores que pueden influir en el incremento de AFM₁ a nivel sanguíneo y el posterior paso a la leche a través de la glándula mamaria.

Este trabajo permite observar que durante el modelo Núcleo, el método de exposición empleado a través de la ingesta de AFB₁ falló en reproducir la tasa promedio de

biotransformación que se presenta en animales consumiendo raciones naturalmente contaminados con AFB₁. Así mismo, esto podría explicar la baja eficiencia observada por los diferentes adsorbentes comerciales para micotoxinas.

El modelo Integral permitió realizar la exposición a AFB₁ de forma similar a la que se presenta bajo condiciones naturales, ya que la tasa de biotransformación observada en este modelo (1.8 %) concuerda con el promedio estimado (1.81 ± 1.22 %) por Magan y Olsen (2004) a partir de datos observados en diferentes experimentos, los cuales presentan un rango de 0.3-6.2 % (Price *et al.*, 1985; Frobish *et al.*, 1986; Munksgaard *et al.*, 1987; Pettersson *et al.*, 1989; Harvey *et al.*, 1991; Veldman, 1992; Veldman *et al.*, 1992; Galvano *et al.*, 1996). Esta variación en la biotransformación depende de diversos factores como la producción de leche (Pettersson *et al.*, 1989; Veldman *et al.*, 1992), estado de lactación (Munksgaard *et al.*, 1987; Pettersson *et al.*, 1989; Veldman *et al.*, 1992), diferencias entre especies productoras de leche (Battacone *et al.*, 2003), variabilidad animal (Van Egmond, 1989; Veldman, 1992) e integridad de la membrana celular alveolar mamaria (Lafont *et al.*, 1983). Alteraciones en la ubre pueden afectar la permeabilidad de las membranas alveolares celulares de la glándula mamaria y, por lo tanto, afectar la cantidad AFM₁ que se difunde a través de la membrana y la secreción a la leche (Veldman *et al.*, 1992).

A su vez, la tasa de biotransformación de AFB₁ a AFM₁ en animales productores de leche depende de (i) la concentración y tipo de contaminación a AFB₁ (natural o artificial), (ii) tipos de ingredientes (maíz, semillas de algodón o cacahuate) y (iii) composición de las raciones (Munksgaard *et al.*, 1987; Chopra *et al.*, 1999). Frobish *et al.* (1986) también observaron diferencias por la fuente de contaminación de aflatoxinas en una prueba utilizando cantidades similares de aflatoxinas en semilla de algodón y maíz (44 y 49 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente). El porcentaje de AFM₁ secretada en la leche fue afectado significativamente ($P < 0.02$) por la fuente de contaminación con 1.73 y 1.32 % de biotransformación con algodón y maíz, respectivamente.

Así mismo, las fluctuaciones diarias en la producción de leche y entre ciclos de lactación, pueden afectar la estimación de la tasa de biotransformación, lo que dificulta establecer

comparaciones entre investigaciones desarrolladas *in vivo*. Además, otro obstáculo en su estimación esta representado por la variación del proceso analítico, desde el muestro hasta su detección y cuantificación (Whitaker *et al.*, 2005). Las diferencias en los reportes de ingesta de aflatoxina hacen difícil las comparaciones en forma paralela entre dos o más experimentos. El contenido en la ración y en la leche a menudo se reporta como cantidades por día, cantidad total y/o concentraciones. Para un mejor análisis de datos, todas las concentraciones deberían expresarse en la misma unidad. Esto es difícil porque muchos documentos no reportan ingesta de materia seca (IMS) o la producción de leche.

Por lo tanto, para el diseño confiable de estudios que estimen la tasa de biotransformación de AFB₁ a AFM₁, se han desarrollado modelos matemáticos basados en la relación lineal existente entre ambos metabolitos, siendo la excreción de AFM₁ dependiente de: *i*) contaminación con AFB₁ y producción de leche, *ii*) fuente de contaminación en el concentrado y *iii*) composición del concentrado y de la ración.

Van Eijkeren *et al.* (2006) desarrolló un modelo matemático simple para determinar la concentración de AFM₁ en leche, utilizando la ecuación:

$$\text{AFM}_1 \text{ en leche } (\mu\text{g kg}^{-1}) = \mu\text{g de AFB}_1 \text{ d}^{-1} \times 0.032 / 17 + \text{producción de leche } (\text{kg d}^{-1})$$

La ecuación se describe de la siguiente manera: la exposición a AFB₁ por día ($\mu\text{g de AFB}_1 \text{ d}^{-1}$) se multiplica por la constante 0.032. El resultado es dividido por la sumatoria de la constante 17 y la producción de leche diaria (kg d^{-1}). De acuerdo a esta ecuación, el modelo de exposición Núcleo calculó un valor de AFM₁ de $0.597 \mu\text{g kg}^{-1}$ (valor observado $1.299 \mu\text{g kg}^{-1}$) mostrando una diferencia de $0.702 \mu\text{g kg}^{-1}$. Mientras que en el modelo Integral el valor estimado de AFM₁ fue de $0.664 \mu\text{g kg}^{-1}$ (valor observado $0.713 \mu\text{g kg}^{-1}$) con una diferencia mínima de $0.049 \mu\text{g kg}^{-1}$. Puesto que la cuantificación de AFM₁ en leche se realizó expresando los resultados como $\mu\text{g L}^{-1}$, para el empleo de las ecuaciones fue necesario realizar una conversión a $\mu\text{g kg}^{-1}$ con el correspondiente valor de densidad. Densidad para la leche del experimento 1 de 1.0333 g mL^{-1} y del experimento 2 de 1.0326 g mL^{-1} .

Por otra parte, Pettersson (1998), elaboró una ecuación para predecir la concentración de AFM₁ en leche luego de reunir observaciones procedentes de 5 experimentos controlados con vacas, de acuerdo a:

$$\text{AFM}_1 \text{ en leche (ng kg}^{-1}\text{)} = [10.95 + 0.787 \times \text{AFB}_1 (\mu\text{g d}^{-1})]$$

La ecuación se describe de la siguiente manera: la exposición a AFB₁ por día ($\mu\text{g de AFB}_1 \text{ d}^{-1}$) se multiplica por la constante 0.787 y el resultado se suma a la constante 10.95. De acuerdo a esta ecuación, el modelo de exposición Núcleo calculó un valor de AFM₁ de 703 ng kg⁻¹ (valor observado 1299 ng kg⁻¹) mostrando una diferencia de 596 ng kg⁻¹. Mientras que en el modelo Integral el valor estimado de AFM₁ fue de 703 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (valor observado 713 ng kg⁻¹) con una diferencia mínima de 10 ng kg⁻¹. La estimación se realizó de manera similar a la descrita en el primer modelo matemático. De acuerdo a la aplicación de los modelos matemáticos, se puede destacar el impacto del modelo Integral al generar valores de AFM₁ en leche comparables a los obtenidos en investigaciones que utilizaron raciones contaminadas en forma natural. Además, este modelo permitió reproducir la biotransformación de AFB₁ en AFM₁ de manera confiable y similar a lo que sucede en animales no sujetos a experimentación.

Por tanto, dicho modelo de exposición resultó adecuado para evaluar la eficiencia de los adsorbentes para micotoxinas. Con relación a dicha eficiencia, los residuos de AFM₁ en los grupos montmorillonita y clinoptilolita fueron inferiores al límite máximo permitido por la respectiva NOM, aun cuando los animales consumieron el doble de los niveles de AFB₁ permitidos en la ración. Bajo las condiciones experimentales utilizadas en el presente estudio, los resultados demostraron que los adsorbentes minerales montmorillonita y clinoptilolita disminuyeron de manera efectiva los niveles de AFM₁ en leche. El adsorbente MOSC no mostró eficiencia significativa en la reducción de la biodisponibilidad de AFB₁.

VI.3.4. Producción y calidad de la leche

La producción de leche promedio durante el modelo Núcleo fue de 30.1 ± 3.4 kg d⁻¹ en el grupo testigo, 29.9 ± 3.7 kg d⁻¹ grupo montmorillonita, 29.6 ± 3.1 kg d⁻¹ grupo clinoptilolita y 29.4 ± 4.7 kg d⁻¹ grupo MOSC. El cuadro 8 muestra los valores promedios de los parámetros de la calidad de la leche. La comparación estadística demostró que no existió diferencias estadísticas entre grupos o tratamientos ($P > 0.05$), lo cual indica que la inclusión de adsorbentes de la ración, así como la exposición a concentraciones de $40 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁ no altera los nutrientes de la leche así como los niveles de producción.

Cuadro 8. Valores promedio de los parámetros de calidad de la leche durante el modelo Núcleo de exposición a AFB₁

Grupos	Calidad de la leche (%)			
	Proteína	Grasa	Sólidos totales	Sólidos no grasos
Testigo	3.19	3.31	11.40	8.80
Montmorillonita	3.18	3.29	11.30	8.72
Clinoptilolita	3.23	3.28	11.07	8.76
MOSC	3.21	3.40	11.20	8.74

Respecto a la producción y calidad de la leche en el modelo Integral, se apreció el mismo comportamiento que el observado en el experimento Núcleo. La producción promedio de leche por los grupos fue de 25.4 ± 3.0 , 26.4 ± 3.1 , 23.8 ± 1.0 y 24.9 ± 2.2 kg d⁻¹ para grupo testigo, montmorillonita, clinoptilolita y adsorbente MOSC, respectivamente, sin presentar diferencias significativas ($P > 0.05$). En cuanto a los parámetros de calidad, el cuadro 9 muestra los niveles promedio por grupo, sin que se observaran diferencias estadísticas entre ellos ($P > 0.05$).

Cuadro 9. Valores porcentuales de los parámetros de calidad de la leche durante el modelo Integral de exposición a AFB₁

Grupos	Calidad de la leche (%)			
	Proteína	Grasa	Sólidos totales	Sólidos no grasos
Testigo	3.18	3.17	12.09	8.92
Montmorillonita	3.09	3.35	12.23	8.77
Clinoptilolita	2.92	3.30	11.92	8.50
MOSC	3.26	3.30	12.07	8.82

Según Frobish *et al.* (1986), la producción de leche no fue afectada por la exposición AFB₁. El porcentaje promedio de biotransformación no fue afectado por la concentración de aflatoxina en la ración, pero un efecto positivo significativo ($P < 0.01$) fue observado con el incremento de la producción lechera. Las vacas altas productoras resultaron en una tasa de 2.14 % comparado con un 1.35 % en vacas bajas productoras.

Las diferencias en la producción observada en los experimentos Núcleo e Integral se debieron principalmente a un incremento proporcional en los días del ciclo productivo de la leche. Lafont *et al.* (1980) condujeron un experimento con vacas en lactancia temprana (2-4 semanas) y tardía (34-36 semanas), recibiendo 0.09, 0.18, 0.86 y 2.58 mg de AFB₁ diariamente. Concluyendo en este estudio que el porcentaje de AFB₁ secretada como AFM₁ en la leche estuvo en un rango de 0.14 a 0.34 % (media 0.22 %) en vacas en lactancia tardía y un rango del 0.66 a 0.95 %, (media 0.78 %) observada en vacas produciendo más de 20 L d⁻¹ de leche. Aunque la producción de leche en el estudio conducido por Patterson y Anderson (1982) no difiere de las vacas en lactancia temprana del reportado de Lafont *et al.* (1980), el porcentaje experimental de transferencia difiere en un 0.56 %.

Finalmente, los resultados de este trabajo indican que existe una fuerte variabilidad en la tasa de biotransformación en función del método de exposición a AFB₁ empleado en bovinos productores de leche. El método que empleó una RTM artificialmente contaminada con AFB₁ demostró ser un método confiable para estudiar la efectividad de diferentes adsorbentes

comerciales para micotoxinas. Este método podría facilitar la comparación de resultados entre diferentes estudios similares al eliminar fuentes de variabilidad como el efecto matriz debido al ingrediente contaminado con aflatoxinas. Así mismo, el método demostró resultados de biotransformación similares a los estudios con dietas naturalmente contaminadas con aflatoxinas. Por otra parte, las concentraciones de AFM₁ en leche se presentaron acorde con los cálculos teóricos obtenidos de dos modelos matemáticos. Finalmente, las concentraciones de AFM₁ fueron reducidas de manera significativa por la inclusión de los adsorbentes montmorillonita y clinoptilolita.

VII. CONCLUSIONES

- Se encontró contaminación por aflatoxinas totales en el 92.5 % de las muestras de alimento para ganado bovino productor de leche (rango 4.95 – 24.90 $\mu\text{g L}^{-1}$), presentándose en el 7.5 % de las muestras niveles que excedieron el máximo permitido por la Norma Oficial Mexicana NOM-188-SSA1-2002.
- Se detectó contaminación con aflatoxina M₁ en el tanque enfriador del 80 % de los establos analizados (rango 0.006 – 0.065 $\mu\text{g L}^{-1}$). Todos los niveles de AFM₁ en leche se encontraron por debajo de lo especificado por la regulación en México (NOM-184-SAA1-2002).
- El 32.5 % de los productores de leche de los municipios estudiados incorporaban adsorbentes de micotoxinas en la ración, destacando el uso de adsorbentes minerales.
- El modelo Integral de exposición artificial a AFB₁ demostró ser un método confiable para evaluar los adsorbentes al reproducir parámetros de biotransformación presentes en animales que consumen raciones naturalmente contaminadas con aflatoxinas, así como cuando son estimados por modelos matemáticos.
- En animales expuestos a raciones contaminadas con 40 μg de AFB₁ kg^{-1} de alimento, la inclusión de montmorillonita y clinoptilolita en las raciones redujo la eliminación del nivel de AFM₁ en leche de manera estadísticamente significativa y por debajo del nivel máximo permitido en México.
- El adsorbente derivado de cultivos de levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* (MOSC) no demostró eficiencia para reducir los niveles de AFM₁ en leche.
- Los parámetros de calidad de leche y salud animal no fueron afectados por la exposición a AFB₁ ni por inclusión de los adsorbentes en la ración de los animales.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Abolfazl, K. 2005. A study on the occurrence of aflatoxin M₁ in raw milk produced in Sarab city of Iran. *Food Control* 16: 593-599.

Alfred, D., Magan, N. 2004. Prevention strategies for trichothecenes. *Toxicology letter*. 153(1): 165-171.

Allcroft R, Roberts B. A. 1968. Toxic groundnut meal: The relationship between aflatoxin B₁ intake by cows and excretion of aflatoxin M₁ in milk. *The Veterinary Records* 82:116-118.

Applebaum, R. S., Brackett, R. E., Wiseman, D. W., Marth, E. H. 1982. Responses of dairy cows to dietary aflatoxin: Feed intake and yield, toxin content, and quality of milk of cows treated with pure and impure aflatoxin. *J. Dairy Sci* 65:1503-1508.

Auerbach, H., Olderburg, E., Weissbach, F. 1998. Incidence of *Penicillium roqueforti* and roquefortine C in silage. *J Sci Food Agric* 76:565-572.

Axelson, L. 2004. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In *Lactic Acid Bacteria, Microbiology and Functional Aspects.*, (Eds. Salmien, S., von Wright, A., Ouwehand A.) Marcel Dekker, Inc., New York, pp 1-66 ISBN 0-8247-5332-1.

Ball, R. W., Coulombe, R. A. 1991. Comparative biotransformation of aflatoxina B₁ in mammalian airway epithelium. *Carcinogenesis* 12:305-310.

Battacone, G., Nudda, A., Cannas, A., Cappio-Borlino, A., Bomboi, G., Pulina, G. 2003. Excretion of aflatoxin M₁ in milk of dairy ewes treated with different doses of aflatoxin B₁. *J Dairy Sci*. 86: 2667-2675.

Battacone, G., Nudda, A., Palomba, M., Pascale, M., Nicolussi, P., Pulina, G. 2005. Transfer of aflatoxin B₁ from feed to milk and from milk to curd and whey in dairy sheep fed artificially contaminated concentrates. *J. Dairy Sci* 88:3063-3069.

Bennett, J. W., Klich, M. 2003. Mycotoxins. *Rev Clin Microbiol* 16: 497-516.

Binder, J. W., Tan, L. M., Chin, L. J., Richard, J. 2007. Worldwide occurrence of micotoxins in commodities feeds and feed ingredients. *Anim Feed Sci Technol* 137: 265-282.

Bonsi, P., Agusti-Tocco, G., Palmery, M., Giorgi, M. 1999. Aflatoxin B₁ is an inhibitor of cyclic nucleotide phosphodiesterase activity. *Gen Pharmacol* 32: 615-619.

Bucio-Villalobos, C. M., Guzmán-de-Peña, D., Peña-Cabriales, J. J. 2001. Aflatoxin synthesis in corn fields in Guanajuato, Mexico. *Rev Iberoam Micol* 18: 83-87

Bueno, D. J., Casale, C. H., Pizzolitto, R. P., Salvano, M. A., Oliver, G. 2007. Physical adsorption of aflatoxin B₁ by lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*: a theoretical model. *J Food Prot* 70(9): 2148-54.

Caggioni C, Pietri A. 1999. Le aflatossine nel latte: dove nasce il problema e come prevenirlo. *L'Informatore Agrario* 45(55):35-42.

Cariello, N. F., Cui, L., Skopek, T. R. 1994. In vitro mutational spectrum of aflatoxin B₁ in the human hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase gene. *Cancer Res* 54: 4436-4441.

Céspedes, A. E., Díaz, G. J. 1997. Analisis of aflatoxins in poultry and pig feed and feedstuffs used in Colombia. *JAOAC Int* (6): 1215-1219.

Chamberlain, W. J., Bacon, C. W., Corred, W. P., Voss, K. A. 1993. Levels of fumonisins B₁ in corn naturally contaminated with aflatoxins. *Food Chem Toxicol* 12: 995-998.

Chopra, R. C., Chabra, A., Prasad, K. S. N., Dudhe, A., Murthy, T. N., Prasad, T. 1999. Carryover of Aflatoxin M₁ in milk of cows fed aflatoxin B₁ contaminated ration. *Ind J Anim Nutr* 16: 103–106.

Cole, R. J., Cotty, P. J. 1990. Biocontrol of aflatoxin production by using biocompetitive agents. Pp. 62–66. En: Perspectives on Aflatoxin in Field Crops and Animal Food Products in the United States (ARS-83). National Technical Information Services, Springfield, Virginia.

Commission regulation (EC) N. 466/2001 of March 2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Off. J. EC, L 077, March 16, 2001.

Córdova-Izquierdo, A., Saltijeral Oaxaca, J., Ruiz Lang, G., Cortez Suarez, S., Xolalpa Campos, M., Peña Betancourt, S., Córdova-Jiménez, S., Pérez-Gutierrez, F., Guerra Liera, E. 2007. Identification of M₁ aflatoxin in milk of the collector tank. *J Anim Vet Adv* 6(2): 194–197.

Correa, B., Galardo, Costa, E. O. Sabino, M. 1997. Distribution of molds and aflatoxins in dairy cattle feeds and raw milk. *Rev Microbiol* 28: 279–283.

Davidson, J. N., Babish, J. G., Delaney, K. A., Taylor, D. R., Phillips, T. D. 1987. Hydrated sodium aluminosilicate decreases the bioavailability of aflatoxin in the chicken. *Poult Sci* 66: 89.

Diaz, D. E., Hagler Jr., W. M., Hopkins, B. A., Whitlow, L. W. 2002. Aflatoxin Binders I: *In vitro* binding assay for aflatoxin B₁ by several potential sequestering agents. *Mycopathologia* 156: 223–226.

Diaz, D. E., Hagler Jr W. H., Blackwelder, J. T., Eve, J. A., Hopkins, B. A., Anderson, K. L., Jones, F. T., Whitlow, L. W. 2004. Aflatoxin Binders II: Reduction of aflatoxin M₁ in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed. *Mycopathologia* 157: 233–241.

Diaz, D. E., Smith, T. K. 2005. Mycotoxin sequestering agents: practical tools for the neutralization of mycotoxins. En: *The Mycotoxin Blue Book*. Diaz, D. E (Editor) Nottingham University Press, Uk.

Diaz, G. J., Espitia, E. 2006. Occurrence of aflatoxin M₁ in retail milk samples from Bogotá Colombia. *Food Addit Contam* (8): 811-815.

D'Mello, J. P., Placinta, C. M., Macdonald, A. M. 1999. *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Anim Feed Sci Technol* 80: 183-205.

Dvorak, M. 1989. Ability of bentonite and natural zeolite to adsorb aflatoxin from liquid media. *Vet Med* 34: 733-741.

Eaton, D. L., Gallagher, E. P. 1994. Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 34: 135-172.

Elías-Orozco, R., Castellanos-Nava, A., Gaytan-Martínez, M. Figueroa-Cárdenas, J. D., Loarca-Piña, G. 2002. Comparison of nixtamalization and extrusion processes for a reduction in aflatoxina content. *Food Addit Contam* 19: 878:885.

ElNezami, H., Kankaanpää, P., Salminen, S., Ahokas, J. 1998. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B₁. *Food Chem Toxicol* 36: 321-326.

Eraslan, G., Essz, D., Akdogan, M., Sahndokuyucu, F., Altntas, L., Hsmogullar, S. E. 2005. Effects of dietary aflatoxin and sodium bentonite on some hormones in broiler chickens. *Bull Vet Institute Puawy* 49(1): 93-96

FAO. 2004. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. En: *FAO Food and Nutrition Papers* 81 2004; ISBN: 9251051623.

FDA (Food and Drug Administration) 2000. Center for Food Safety and Applied Nutrition, Washington DC.

Ferbisch, R. A., Bradley, B. D., Wagner, D. D., Long-Bradley, P. E., Hariston, H. 1986. Aflatoxin residue in milk of dairy cows after ingestion of naturally contaminated grain. *Food Prot* 49:781-785.

Foster, P. L., Eisenstadt, E., Miller, J. H. 1983. Base substitution mutations induced by metabolically activated aflatoxin B₁. *Proc Natl Acad Sci* 80: 2695-2698.

Fremy, J. M., Gautier, J. P., Herry, M. P., Terrier, C. and Calet, C. 1987. Effects of ammoniation on "carry over" of aflatoxins into bovine milk. *Food Addit Contam.* 5: 39-44.

Frobish, R. A., Bradley, D. D., Wagner, P. E., Long-Bradley, and Hairston, H. 1986. Aflatoxin residues in milk of dairy cows after ingestion of naturally contaminated grain. *J. Food Prot* 49:781-785.

Galvano, F., Galofaro, V., Ritieni, A., Bognanno, M., De Angelis, A., Galvano, G. 2001. Survey of the occurrence of aflatoxin M₁ in dairy products marketed in Italy: second year of observation. *Food Addit Contam* 18(7): 644-646.

Galvano, F. V., Galofaro, G., Galvano. 1996. Occurrence and stability of aflatoxin M₁ in milk and milk products: A Worldwide Review. *J. Food Protect.* 59: 1079-1090.

Garrido, N. S., Iha, M. H., Santos Ortolani M. R., and Duarte Favaro, R. M. 2003. Occurrence of aflatoxins M(1) and M(2) in milk commercialized in Ribeirao Preto- SP., Brazil. *Food Addit. Contam.* 20: 70-73.

Gómez Cruz, M. A., Schwentesius Rindermann, R., Cervantes Escoto, F., Whiteford, S., Chávez Márquez, M. 2003. Capital Social y Pequeños Productores de Leche en México: Los

Casos de los Altos de Jalisco y Aguascalientes" En Capital Social y Reducción de la Pobreza en América Latina y el Caribe: En Busca de un Nuevo Paradigma 529-554.

Gong, Y. Y., Cardwell, K., Hounsa, A., Turner, P. C., Hall, A. J., Wild, C. J. 2002. Dietary aflatoxin exposure and impaired growth in young children from Benin and Togo: cross sectional study. *J Br Med* 325: 20-21.

Gratz, S. 2007. Aflatoxin Binding by Probiotics. Experimental Studies on Intestinal Aflatoxin Transport, Metabolism and Toxicity. Doctoral dissertation. School of Public Health and Clinical Nutrition, Clinical Nutrition and Food and Health Research Centre University of Kuopio. ISBN 978-951-27-0741-6.

Guengerich, F. P., Johnson, W. W., Shimada, T., Ueng, Y. F., Yamazaki, H. Langouet, S. 1998 Activation and detoxication of aflatoxin B₁. *Mutat Res* 402, 121-128.

Guthrie, L. D. 1979. Effects of Aflatoxin in corn on production and reproduction in dairy cattle. *J Dairy Sci* 62: 134.

Guzmán de Peña, D. 1997. El estudio de las aflatoxinas en México. En: perspectivas de la microbiología en México. Ruiz-Herrera, J., Guzmán de Peña D., Peña C.J.J (Eds). Talleres Gráficos de la Dirección de Publicaciones y Materiales Educativos del Instituto Politécnico Nacional. México DF.

Guzmán-de-Peña, D., Trudel, L. T., Wogan, G. N. 1995. Fate of 3H-aflatoxin during "nixtamalización". *Bull Contamination Toxicol* 55: 858-864.

Guzmán de Peña D., Peña C. J. J. 2005. Regulatory considerations of aflatoxin contamination of food in Mexico. *Rev Lat Microbiol* 47(3-4): 160-164.

Harvey, R. B., Phillips, T. D., Ellis, J. A., Kubena, L. F., Huff, W. E., Petersen, H. D. 1991. Effects on aflatoxin M₁ residues in milk by addition of hydrated sodium calcium aluminosilicate to aflatoxin-contaminated diets of dairy cows. *Am J Vet Res* 52(9): 1556-9.

Haskard, C. A., El-Nezami, H. S., Kankaanpää, P. E., Salminen, S., Ahokas, J. T. 2001. Surface Binding of Aflatoxin B₁ by Lactic Acid Bacteria. *Appl Environ Microbiol* 67(7): 3086-3091

Henry, S.H., Whitaker, T., Rabbani, I., Bowers, J., Park, D., Price, W., Bosch, F. X., Pennington, J., Verger, P., Yoshizawa, T., van Egmond, H., Jonker, M.A., Coker, R. 2001. Aflatoxina M₁. JEFCA, FDA, 41.

Hosoda, M., Hashimoto, H., He, F., Yamazaki, K., Hosono, A. 1997. Inhibitory Effect of Milk Cultured with Lactobacillus Strains on the Aflatoxin Mutagenicity. *Anim Sci Technol* 68: 555562.

Hussein, S. H., Brasell, J. M. 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. Review. *Toxicology* 167: 101-134.

Huwig, A., Freimund, S., Kappeli, O., Dutler, H. 2001. Mycotoxin detoxification of animal feed by different adsorbents. *Toxicol Lett* 122: 179-188.

IARC. 2002. Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene. Summary of data reported and evaluation. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk to Humans. Vol. 82. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.

Iyer, R. S., Voehler, M. W., Harris, T. M. 1994. Adenine adduct of aflatoxin B₁ epoxide. *J Am Chem Soc.* 116: 8863-8869.

Johnson, W. W., Ueng, Y. F., Widersten, M., Mannervik, B., Hayes, J. D., Sherratt, P. J., Ketterer, B., Guengerich, F. P. 1997. Conjugation of highly reactive aflatoxin B₁ exo-8,9-epoxide catalyzed by rat and human glutathione transferases: estimation of kinetic parameters. *Biochemistry* 36: 3056–3060.

Jonker, M. A., van Egmond, H. P., Stephany, R. W. 1999. "Mycotoxins in food of animal origin: a review" in CRL, document 389002 095 from European Commission, European Union Community Reference Laboratory and National Institute of Public Health and the *Environment* 1-39

Kensler T. W., Chen J. G., Egner P. A., Fahey J. W., Jacobson L. P., Stephenson K. K., Ye L., Coady J. L., Wang J. B., Wu Y., Sun Y., Zhang Q. N., Zhang B. C., Zhu Y. R., Qian G. S., Carmella S. G., Hecht S. S., Benning L., Gange S. J., Groopman J. D., Talalay P. 2005. Effects of glucosinolate-rich broccoli sprouts on urinary levels of aflatoxin DNA adducts and phenanthrene tetraols in a randomized clinical trial in He Zuo township, Qidong, People's Republic of China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14: 2605-2613.

Klich, M. A., Mullaney, E. J., Daly, C. B., Cary, J. W. 2000. Molecular and physiological aspects of aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis by *A. tamaritii* and *A. ochraceoroseus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 53: 605–609.

Kiessling, K. H., Petterson, H., Sandholm, K., Olsen, M. 1984. Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone and three trichotecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria. *J Appl Environ Microbiol* 47: 1070 – 1073.

Kubena, L. F., Harvey, R. B., Phillips, T. D., Corrier, D. E., Huff, W. E. 1990. Diminution of aflatoxicosis in growing chickens by the dietary addition of a hydrated sodium calcium aluminosilicate. *Poult Sci* 69: 727-735.

Kubena, L. F., Edrington, T. S., Harvey, R. B., Buckley, S. A., Phillips, T. D., Rottinghaus, G. E., Casper, H. H. 1997. Individual and combined effects of fumonisin B₁ present in

Fusarium moniliforme culture material and diacetoxyscirpenol or ochratoxin A in turkey poult. *Poult Sci* 76: 256 – 264.

Lafont, P., J. Lafont, S. Mousset and C. Frayssinet. 1980. Contamination du lait de vache suite à l'ingestion de quantités faibles d'aflatoxine. *Ann. Nutr. Alim.* 34:699-708.

Lafont, P., Sarfati, J., Jacquet, J., Gaillardin, M. and Lafont, J. 1983. Influences de facteurs pathologiques et nutritionnels sur l'élimination de l'aflatoxine par la memelle chez la vache. *Microbiologie Aliments Nutrition* 1, 293–300.

Lankaputhra, W. E., Shah, N. P. 1998. Antimutagenic properties of probiotic bacteria and of organic acids. *Mutat Res* 397: 169182.

Larsson, P., Pettersson, H., Tjälve, H. 1989. Metabolism of aflatoxin B₁ in the bovine olfactory mucosa. *Carcinogenesis* 10(6):1113-1118.

Larsson, P., Busk, L., Tjälve, H. 1994. Hepatic and extrahepatic bioactivation and GSH-conjugation of aflatoxin B₁ in sheep. *Carcinogenesis* 15:947-955.

Lemke, S.L., Ottinger, S.E., Mayura, K., Ake, C.L., Pimpukdee, K., Wang N., Phillips T.D. 2001. Development of a multi-tiered approach to the in vitro prescreening of clay-based enterosorbents. *Anim Feed Sci Technol* 93(1): 17-29.

Levy, D. D., Groopman, J. D., Lim, S. E., Seidman, M. M., Kraemer, K. H. 1992. Sequence specificity of aflatoxin B₁-induced mutations in a plasmid replicated in xeroderma pigmentosum and DNA repair proficient human cells. *Cancer Res* 52: 5668–5673.

Li, F.-Q., Yoshizawa, T., Kawamura, S., Luo, S.-Y., Li, Y.-W. 2001. Aflatoxins and fumonisins in corn from the high-incidence area for human hepatocellular carcinoma in Guangxi, China. *J Agric Food Chem* 4122–4126.

Liang-Shang G., Skipper, P.L., Peng, X., Groopman, J.D., Chen, J.S., Wogan, G. N., Tannenbaum, S. R. 1988. Serum albumin adducts in the molecular epidemiology of aflatoxin carcinogenesis: Correlation with aflatoxin B₁ intake and urinary excretion of aflatoxina M₁. *Carcinogenesis* 9: 1323-1325.

Lindemann M. D., Blodgett D. J., Kornegay E. T., Schurig G. G. 1993. Potential ameliorators of aflatoxicosis in weanling/growing swine. *J Anim Sci* 71(1): 171-178.

López, C. E., Ramos, L. L., Ramadán, S. S., Bulacio, L. C. 2003. Presence of aflatoxin M₁ in milk for human consumption in Argentina. *Food Cont* 14: 31-34.

Lopez-Garcia, R., Park, D. L. 1998. Effectiveness of postharvest procedures in management of mycotoxin hazards. En: *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*. Editores: Sinha, K. K., Bhatnager, D. New York, Marcel Dekker, 407- 433.

Luo H., Tang L., Tang M., Billam M., Huang T., Yu J., Wei Z., Liang Y., Wang K., Zhang Z. Q., Zhang L., Wang J. S. (2006): Phase IIa chemoprevention trial of green tea polyphenols in high risk individuals of liver cancer: modulation of urinary excretion of green tea polyphenols and 8hydroxydeoxyguanosine. *Carcinogenesis* 27: 262- 268.

Magan, N., Olsen M. 2004. *Mycotoxins in food. Detection and control*. CRC Press. Boca ratón. Boston. New Cork, Washington, DC.

Magnoli C. 2002. Estudios sobre prevención y control de micotoxinas en alimentos balanceados para aves. Universidad Nacional de Río Cuarto, Tesis Doctoral en Ciencias Biológicas, pp. 56 - 65.

Manson M. M., Hudson E. A., Ball H. W., Barrett M. C., Clark H. L., Judah D. J., Verschoyle R. D., Neal G. E. 1998. Chemoprevention of aflatoxin B₁ induced carcinogenesis by indol3carbinol in rat liverpredicting the outcome using early biomarkers. *Carcinogenesis* 19: 1829- 1836.

Martins, M. L., Martins, H. M. 2000. Aflatoxin M₁ in raw and ultrahigh temperatura – treated milk commercialized. *Food Addit Contam* 17: 871-874.

Martins, M. L., Martins, H. M. 2004. Aflatoxin M₁ in yoghurts in Portugal. *International J Food Microbiol* 91: 315– 317.

Markaki, P., Melissari, E. 1997. Occurrence of aflatoxin M₁ in commercial pasteurized milk determined whit ELISA and HPLC. *Food Addit Contam* 5: 461-466.

Mayura, K., Abdel-Wahhab, M. A., McKenzie, K. S., Sarr, A. B., Edwards, J. F., Naguib, K., Phillips, T. D. 1998. Prevention of maternal and developmental toxicity in rats via dietary inclusion of common aflatoxin sorbents: potential for hidden risks. *Toxicol Sci* 41: 175-182.

Méndez-Albores, J. A, Arambula-Villa, G., Loarca-Piña, M. G., González-Hernández, J. Castaño-Tostado, E., Moreno-Martínez, E. 2004. Aflatoxins' fate during the nixtamalización of contaminated Maize by two tortilla-making processes. *J Stored Prod Res* 4: 87-94.

Mertens, D.R., Wyatt, R.D. 1977. Acute aflatoxicosis in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 60, 153-154.

Miazzo, R., Rosa, C.A.R., De Queiroz Carvalho, E. C., Magnoli, C., Chiacchiera, S. M. Palacio, G., Saenz, M., Kikot, A. Basaldella, E. Dalcerro, A. 2000. Efficacy of Synthetic Zeolite to Reduce the Toxicity of Aflatoxin in Broiler Chicks. *Poult Sci* 79: 1–6.

Miller, D. M., Wilson, D. M. 1994. Veterinary diseases related to aflatoxins. In: Eateon, D.L. and Groopman, J.D. (eds) *The toxicology of aflatoxins*. Academic Press Inc. San Diego – New York. 347-364.

Munksgaard, L., J. Larsen, H. Werner, P. E. Andersen, and B. T. Viuf. 1987. Carry over of aflatoxin from cows' feed to milk and milk products. *Milchwissenschaft* 42:165–167.

Nageswara Rao, S. B., and R. C. Chopra. 2001. Influence of sodium bentonite and activated charcoal on aflatoxin M₁ excretion in milk of goats. *Small Rumin. Res.* 41:203-213.

Nibbelink, S. K. 1986. Aflatoxicosis in food animals: A clinical review. Iowa State Univ. Vet. 48: 28-31.

Nordin, N., Luchese, R. H. 1998. Deteccao de aflatoxina e zearalenona em milho, destinado a alimentacao animal. *Biol. Soc Bras Cienc Tecnol Aliment* 32: 35-39.

Norma Oficial Mexicana NOM-184-SSA1-2002. Productos y servicios. Leche, formula láctea y producto lácteo combinado. Especificaciones sanitarias.

Norma Oficial Mexicana NOM-188-SSA1-2002. Producto y servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones sanitarias.

Norma Mexicana NMX-F-712-COFOCALEC-2005. Sistema producto leche alimentos-lácteos-determinación de aflatoxina M₁ en leche fluida por cromatografía de líquidos de alta resolución-método de prueba.

Oliveira, J. A. A., Correa, B., Castrillon, A. L., Cortez, A.C. A. 1998. Ocurrence of filamentous fungi and aflatoxins in poultry feedstuffs. *Rev Microbiol* 29: 138-142.

Flores, O. C., Hernández, P. L., Vázquez, M. J. 2006. Contaminación con micotoxinas en alimento balanceado y granos de uso pecuario en México en el año 2003. *Tec Pecu Méx* 44(2): 247-256.

Oruc, H. H., Kalkanli, O., Cengiz, M., Sonal, S. 2005. Aflatoxin M₁ in raw milks collected from plain and mountain villages in Bursa Turkey. *Milchwissenschaft* 60 (1): 71-72.

Osweiler, G. D. 1996. Toxicology. Ed. Williams & Wilkins. ISBN 0-683-06664-1. PA 19063. USA.

Park, D. L., and W. D. Price. 2001. Reduction of aflatoxin hazards using ammoniation. In *Reviews Of Environmental Contamination And Toxicology, Vol 171*. New York: Springer-Verlag.

Patterson, D. S., Anderson, P. H. 1982. Recent aflatoxin feeding experiments in cattle. *Vet Rec.* 16; 110(3) : 60.

Peltonen K., ElNezami H., Haskard C., Ahokas J., Salminen S. 2001. Aflatoxin B₁ binding by dairy strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria. *J Dairy Sci* 84: 21522156.

Pettersson, H. 1997. Carry over of aflatoxins from feedingstuffs to milk. *Swedish derogations from EC legislation in the area of feedingstuffs – Undesirable substances and products*, Ministry of Agriculture. 23-27.

Pettersson, H., Bertilsson, J. and Wennberg, O. 1989. carry over of aflatoxins from dairy cattle feed to milk. *World Association of Veterinary Food Hygenists Simposium*. Stockholm. July 2-7, Proceeding 97-102

Pettersson H. 1998. Concerning Swedish derogation on aflatoxin. Complement to the Memo of 97-03-03 on 'Carry-over of aflatoxin from feedingstuffs to milk'. Uppsala (Sweden): Department of Animal Nutrition and management, Swedish University of Agricultural Sciences.

Peraica, M., Domijan, A. M. 2001. "Contamination of food with mycotoxins and human health." *Arh Hig Rada Toksikol* 52(1): 23-35

Peraica, M., Radic, B., Lucic, A., Pavlovic, M. 1999. Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bull. W.H.O.* 77: 754–766.

Pfohl-Leszkowicz, A. 2000. Écologie des moisissures et des mycotoxines. Situation en France, *Cah Nutr Diét.* 35: 379–388.

Pittet A. 1998. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds – an update review. *Rev Méd Vét* 149: 479–492.

Phillips, T. D., Clement, B. A., Park, D. L. 1994. Approaches to the reduction of aflatoxin. En: Eaton, D. L., Groopman, J. L. (Eds.). *The Toxicology of Aflatoxins*. Academic Press, San Diego, 365–381.

Phillips, T. D., Kubena, L. F., Harvey, R. B., Taylor, D. R., Heidelbaugh, N. D. 1987. Mycotoxin hazards in agriculture: new approach to control. *J Am Vet Med Assoc* 12: 1617.

Phillips TD, Lemke SL, Grant PG. 2002. Characterization of clay-based enterosorbents for the prevention of aflatoxicosis. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 504:157-171.

Phillips TD, Afriyie-Gyawu E, Williams J, Huebner H, Ankrah NA, Ofori-Adjei D, Jolly P, Johnson N, Taylor J, Marroquin-Cardona A, Xu L, Tang L, Wang JS. 2008. Reducing human exposure to aflatoxin through the use of clay: A review. *Food Addit Contam* 25(2):134-145.

Prandini A, Tansini G, Sigolo S, Filippi L, Laporta M, Piva G. 2008. On the occurrence aflatoxin M₁ in milk and dairy products. Review. *Food Chem Toxicol In Press*.

Price RL, Paulson JH, Lough OG, Gingg C, Kurtz AG. 1985. Aflatoxin conversion by dairy cattle consuming naturally contaminated whole cottonseed. *J Food Prot* 48:11-15.

Ramos, A. J., Hernández, E. 1997. Prevention of aflatoxicosis in farm animals by means of hydrated sodium calcium aluminosilicate addition to feedstuffs: a review. *Anim Feed Sci Technol* 65: 197-206.

Raney, K. D., Meyer, D. J., Ketterer, B., Harris, T. M., Guengerich, F. P. 1992. Glutathione conjugation of aflatoxin B₁ exo- and endo-epoxides by rat and human glutathione S-transferases. *Chem Res Toxicol* 5: 470-478.

Rastogi, S., Premendra, D., Dwivedi., Shubhash, K., Khanna., Mukul Das. 2004. Detection of aflatoxin M₁ contamination in milk and infant milk products from indian markets by ELISA. *Food Control* 15: 287-290.

Reyes-Velázquez, W.P., Landeros-Ramirez, P., Anguiano-Ruvalcaba, G.L. y Guzmán-de-Peña, D. 2005. Presencia de aflatoxinas y fumonisinas en harinas de maíz nixtamalizado comercializadas en la zona Metropolitana de Guadalajara, 2004. V Congreso del Noroeste I Nacional en Ciencias Alimentarias y Biotecnología. Nov. Hermosillo Sonora, México.

Reyes-Velázquez, W. P., Isaías-Espinoza, V. H., Rojo, F., Jiménez-Plasencia, C., de Lucas-Palacios, E., Hernández-Góborra, J., Ramírez-Álvarez, A. 2008. Occurrence of fungi and mycotoxins in corn silage, Jalisco State, Mexico. *Rev Iberoam Micol.* 25: 182-185.

Rodríguez-Amaya, D. B., Sabino, M. 2002 Mycotoxin research in Brazil: The last decade in review. *Brazilian J Microbiol* 33: 1-11.

Rodriguez-Velasco, M. L., M. M. Calonge Delso, and D. Ordonez Escudero. 2003. ELISA and HPLC determination of the occurrence of aflatoxin M₁ in raw cow's milk. *Food Addit Contam* 20:276-280.

Sabbioni, G., Skipper, P. L., Tannenbaum, S. R. 1987. Isolation and characterization of the major serum albumin adduct formed by aflatoxin B₁ in vivo in rats. *Carcinogenesis* 8: 819-824.

Sabbioni, G., Wild, C. P. 1991. Identification of an aflatoxin G₁-serum albumin adduct and its relevance to the measurement of human exposure to aflatoxins. *Carcinogenesis* 12: 97-103.

SAGARPA. 2005. Situación actual y perspectiva de la producción de leche de bovino en México 2005. Coordinación General de Ganadería (CGG) - Sagarpa. www.sagarpa.gob.mx/Dgg.

Santin, E., Paulillo, A. C., Maiorka, A., Satiko, L., Nakaghi, O., Macari, M., Fischer da Silva, A., Alessi, A. C. 2003. Evaluation of the efficacy of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broilers. *Int J Poult Sci* 2 (5): 341-344.

Sassahara, M., Pontes Netto, D., Yanaka, E. K. 2005. Aflatoxin occurrence in foodstuff supplied to dairy cattle and aflatoxin M₁ in raw milk in the North of Parana' state. *Food Chem Toxicol* 43: 981-984.

Scheideler, S. E. 1993. Effect of various types of aluminosilicates and aflatoxin B₁ on the aflatoxin toxicity, chick performance and mineral status. *Poult Sci* 72: 282-288.

Shen, H. M., Ong, C- N., Shi, C. Y. 1995. Involvement of reactive oxygen species in aflatoxin B₁-induced cell injury in cultured rat hepatocytes. *Toxicology* 99: 115-123.

Shibahara, T., Ogawa, H. I., Ryo, H., Fujikawa, K. 1995. DNA-damaging potency and genotoxicity of aflatoxin M₁ in somatic cells in vivo of *Drosophila melanogaster*. *Mutagenesis* 10: 161-164.

Shotwell O. L, Hesseltine C. W, Stubblefield R. D, Sorenson W. G. 1966. Production of aflatoxin on rice. *Applied Microbiology* 14(3):425-428.

Siap – Sagarpa - DIM BOL 04-07. 2007. Boletín de leche. ISSN 1405-681X

Sinha, K. K. 1998. Detoxification of mycotoxins and food safety. In: *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety* (K.K. Sinha and D. Bhatnagar, eds). Marcel Dekker, Inc., New York, NY, pp. 45-65.

Solfrizzo, M., Visconti A., Giuseppina, A., Torres, A., Chulze, S. 2000. In vitro and in vivo studies to assess the effectiveness of cholestyramine as a binding agent for fumonisins. *Mycopathologia* 151(3): 147-153.

Spotti, M., Fracchiolla, M., Arioli, F., Caloni, F., Pompa, G. 2005. Aflatoxin B₁ binding to sorbent in bovine ruminal fluid. *Vet Res Comm* 29(6): 507-515.

Stoloff, L., Wood, G., Carter, L. 1981. Aflatoxin M₁ in manufactured dairy products produced in the United States in 1979. *J Dairy Sci.* 64 : 2426-30.

Stroud, J. S. 2006. The effect of additives on aflatoxin in milk of dairy cows fed aflatoxin-contaminated diets. North Carolina State University, Thesis Master of Science in Animal Science and Nutrition, pp. 23-29..

Tajkarimi, M., Shojaee, A. F., Salah, N. M., Pursoltani, H., Motallebi, A.A., and Mahdavi, H. 2007. Seasonal study of aflatoxin M₁ contamination in milk in five regions in Iran. *International J Food Microbiol* 116(3): 346-349

Tarik, H. C., Belgin, S., Olzem, K. 2005. Aflatoxin M₁ contamination in pateurized milk. *Veterinarski Archiv* 75(1): 57-65.

Teniola O.D., Addo P.A., Brost I.M., Färber P., Jany K.-D., Alberts J.F., van Zyl W.H., Steyn P.S., Holzapfel W.H. 2005. Degradation of aflatoxin B₁ by cell-free extracts of *Rhodococcus erythropolis* and *Mycobacterium fluoranthenvivorans* sp. nov. DSM44556T. *Int J Food Microbiol* 105(2): 111-117

Trucksess MW, Richard JL, Stoloff L, Mcdonald JS, Brumley WC. 1983. Absorption and distribution patterns of aflatoxicol and aflatoxins B₁ and M₁ in blood and milk of cows given aflatoxin B₁. *Am J Vet Res* 44:1753-1756.

Turner, P. C., Moore, S. E., Hall, A. J., Prentice AM, Wild CP. 2003. Modification of immune function through exposure to dietary aflatoxin in Gambian children. *Environ Health Perspect* 111: 217-220.

Van Egmond HP. 1989. Aflatoxin M₁: occurrence, toxicity, regulation. In: Van Egmond, H.P. (Ed.), *Mycotoxins in dairy products*. Elsevier Applied Science, London and New York, pp 11-55.

Van Eijkeren JCH, Bakker MI, Zeilmaker MJ. 2006. A simple steady-state model for carry-over of aflatoxins from feed to cow's milk. *Food Additives and Contaminants* 23:833-838.

Vasanthi, S., Bath, R. V. 1988. Micotoxins in foods-ocurrence, Healt & economic significance & food control measures. *Indian J. Med Res* 108: 212-24.

Veldman A. 1992. Effect of sorbentia on carry-over of aflatoxin from cow feed to milk. 545. *Milchwissenschaft* 47:777-780

Veldman, V. A., Meijs, J.A.C., Borggreve, G. J. & Heeres van der Tol, J. J. 1992. Carry-over of aflatoxin from cows' food to milk. *Anim. Prod* 55: 163-168.

Wang J. S., Luo H., Billamf M., Wang Z., Guan H., Tang L., Goldston T., AfriyieGyawu E., Lovett C., Griswold J., Brattin B., Taylor R. J., Huebner H. J., Phillips T. D. 2005. Shortterm safety evaluation of processed calcium montmorillonite clay (NovaSil) in humans. *Food Addit Contam* 22: 270279.

Westlake, K., Mackie, R. I., Dutton M. F., 1989. In vitro metabolism of mycotoxins by bacterial protozoal and ovine ruminal fluid preparations. *Anim Feed Sci Technol* 25: 169-178.

Whitaker, T.B., A.B. Slate, and A.S. Johansson. 2005. Sampling feeds for mycotoxin 548. analysis. Pages 1-23 in *The Mycotoxin Blue Book*. D.E. Diaz, ed. Nottingham 549. Publishing Press, Nottingham, UK.

Widstrom, N.W., W.W. McMillian, R.W. Beaver, and D.M. Wilson. 1990. Weather-associated changes in aflatoxin contamination in preharvest maize. *J Prod Agric* 3:196-199.

Widstrom, N. W. Aflatoxin developing maize: interactions among involved biota and pertinent economic factors. In: Bhatnagar D, Lillehoj EB, Arora DK. (Eds.) Handbook of Applied Mycology Vol: 5 Mycotoxins in Ecological Systems. Marcel Dekker, New York, 1992: 23-58.

Wild, C. P., Turner, P. C. 2002. The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. *Mutagenesis* 17(6): 471-481.

Williams, J. H., Phillips, T. D., Jolly, P. E., Stiles, J. K., Jolly, C. M., Aggarwal, D. 2004. Human D. aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *Am J Clin Nutr* 80: 1106-22.

Wood, G., E. 1992. Mycotoxins in foods and feeds in the United States. *J Anim Sci* 70: 3941-3949.

Yaroglu, T., Oruc, H. H., Tayar, M. 2005. Aflatoxin M₁ levels in cheese samples from some provinces of turkey. *Food control* 16: 883-885.

Yiannikouris, A., Jouany, J. P. 2002. Mycotoxins in feeds for ruminants; fate and effects on animals. *INRA Prod Anim* 15(1): 3-16.