

# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

COORDINACION GENERAL DE INVESTIGACION Y POSTGRADO  
DEL AREA DE CIENCIAS BIOLOGICAS, AGROPECUARIAS Y  
ECOLOGIA



DETECCION DE AFLATOXINA M<sub>1</sub> EN LECHE DE GANADO BOVINO  
EN EL ESTADO DE GUANAJUATO

TRABAJO QUE CON CARACTER DE: TESIS PRESENTA LA C.  
**MARIA DE LOURDES SERRATOS COVARRUBIAS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
**MAESTRO EN CIENCIAS EN NUTRICION ANIMAL**

GUADALAJARA, JALISCO. 1993

RECONOCIMIENTOS

Universidad de Guadalajara

CINVESTAV IPN, Unidad Irapuato.



M en Sc. Doralinda Guzmán de Peña. Directora de tesis

**DETECCIÓN DE AFLATOXINA M1 EN LECHE DE GANADO BOVINO  
EN EL ESTADO DE GUANAJUATO**

## INDICE

	Página
Introducción.....	1
Objetivos.....	10
Hipótesis.....	11
Material y métodos.....	12
Resultados y Discusiones.....	36
Conclusiones.....	53
Resumen.....	55
Bibliografía.....	57
Apéndice.....	72



BIBLIOTECA CENTRAL

## INTRODUCCIÓN

La ganadería de leche en su modalidad especializada, se inició en México en la década de los años veinte, mediante la importación de razas como Holstein, Pardo Suizo y Jersey (11). A partir de los años sesenta, se observó un gran desarrollo tecnológico en los países ganaderos vanguardistas, revolucionando los métodos y sistemas de explotación de ganado lechero (11).

De acuerdo a las proyecciones realizadas en 1985 (11), México contaba con 4.3 millones de vacas lecheras que producían 9.6 millones de litros de leche diarios.

La población ganadera especializada en la producción lechera en nuestro país está determinada por los sistemas empleados, las regiones geográficas adecuadas para las distintas razas y cruzas para este fin. De lo anterior se desprende lo siguiente: la raza Holstein Friesian representa un 12 % de la población total ganadera y produce el 57 % de leche, todo esto bajo el sistema intensivo o estabulado. Las cruzas de cebú y criollo con ganado europeo especializado representa el 20 % de la población y contribuye con el 17 % de la producción lechera, bajo el sistema semiintensivo o semiestabulado y por último, las cruzas de razas lecheras con cebú, criollo y mezclas de éstas dos últimas comprenden el 68 % de la población aportando el 22 % de la producción de leche (11).

La producción láctea es reflejo de la calidad genética, grado de especialización, buen manejo y alimentación del hato. Toda mejora en la alimentación se manifiesta en una eficiencia general de la explotación.

En la producción ganadera la alimentación es la más importante desde el punto de vista económico por su determinación en los costos directos de producción. La alimentación representa entre el 60 y el 85 % de dichos costos, razón por la que se debe mantener un estricto control de calidad y precio de los nutrientes que se usan.

Los alimentos para animales se han clasificado de acuerdo al Consejo Nacional de Investigación de los Estados Unidos (NRC) en las siguientes categorías : a).- forrajes secos y alimentos toscos (+ de 18 % fibra bruta), b).- pasturas cultivadas ( forma verde ), c).- ensilajes, d).- elementos energéticos ( - de 20 % de proteína y - de 18 % de fibra cruda ) granos de cereales, e).- suplementos proteícos ( + de 20 % de proteína ), f).- suplementos minerales, g).- suplementos vitamínicos, h).- aditivos

Dentro de los ingredientes comúnmente usados para elaborar dietas para vacas lecheras se tiene : maíz amarillo , sorgo, harinolina, alfalfa, silc de maíz, subproductos agroindustriales, etc... (71,79)

Cuando existe un mal manejo en producción o almacenamiento éstos ingredientes pueden ser contaminados con productos tóxicos como pesticidas, metales pesados o bien micotoxinas (26,19,20,21,39,58,64,70,74,88,94,95)).

En el caso de las micotoxinas, generalmente contaminan cereales (99), oleaginosas y ensilados entre otros, mediante el desarrollo de hongos los cuales pueden producir toxinas y contaminar estos nutrientes (15,28,56).

Aunque existen procedimientos para eliminar la contaminación de micotoxinas (1,27,38,42,47,48,51,54,64,67,98) y proporcionar materiales aptos para el consumo animal, el ganado en muchas ocasiones, se expone a ingredientes contaminados, sufriendo una amplia variedad de manifestaciones, que dependen de la susceptibilidad del individuo, edad, peso, estado nutricional, sexo etc... éstas manifestaciones pueden ser: ineficiencia a los productos inmunológicos (59,80), crecimiento deficiente, baja de peso y conversión alimenticia, mayor sensibilidad a las enfermedades infecciosas (31), abortos (61), leucoencefalomalacia (caballos) (25,73), inhibición de la síntesis de proteínas (43) y principalmente pérdidas económicas para el productor (45, 31,59).

Los principales hongos productores de micotoxinas, pertenecen a los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* pero, especies de otros géneros también pueden producirlas.

Entre las especies que se reconocen como productoras de micotoxinas, existen cepas no toxigénicas, por lo tanto, la presencia de hongos en un alimento no implica necesariamente la presencia de micotoxinas (13); por otro lado, un mismo hongo puede producir diferentes tipos de toxinas simultáneamente (*Fusarium* produce Zearalenona y fumosinas) (73) y por esta razón, es posible que la dieta diaria esté contaminada con más de una micotoxina (13).

También es importante notar que puede haber contaminación con micotoxinas aunque no haya presencia visible de hongos o cambios de aspecto, color, olor o sabor en los mencionados ingredientes (15).

Las micotoxinas más comúnmente reportadas como contaminantes de granos o alimentos procesados son: aflatoxinas, zearalenona, ochratoxina A, trichothecenos, deoxinivalenol, patulina y fumosinas (55,73). De las anteriores, las aflatoxinas han sido las que más se han estudiado, debido a que constituyen un grupo de compuestos carcinogénicos muy potentes, como es el caso de la aflatoxina B<sub>1</sub>, (AFB<sub>1</sub>) (18,32,33,72,).

Existen otras aflatoxinas como la B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub>, que se pueden encontrar en granos básicos o alimentos destinados al consumo humano y animal (26,33).

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios sintetizados durante el desarrollo del hongo y su producción puede ocurrir en el campo (59,95), durante el cultivo y/c después de la cosecha, así como durante el almacenamiento (33,39).

En el campo, la producción está relacionada con el estrés de la sequía, las prácticas de cultivo, tipos de maíz, humedad y altas temperaturas (14,22,50).

En el almacenamiento de granos, las aflatoxinas se producen en un rango de temperatura de 25° a 35° C, a una humedad relativa mínima de 85 % y un contenido de humedad en el grano de 16 % (70).

Muchas de éstas condiciones se han presentado en la Unión Americana en diferentes años. Así, en el año de 1982 en la localidad de Missouri, los niveles medios de aflatoxina en maíz, variaron de 0.0 partes por billón (ppb), o microgramos por kilogramo ( $\mu\text{g}/\text{k}$ ), a trazas; en 1983 los niveles reportados fueron de 18 a 70 ppb y en 1984, de 37 ppb (53,94). En 1983 y 1984 los



niveles de aflatoxina B1 fueron mayores que en 1982 debido al estres de la sequía y a las altas temperaturas, ocasionando pérdidas económicas de 140 millones de dólares, debido a problemas de comercialización y por representar un alto riesgo para la salud animal (45).

Estudios de incidencia de aflatoxinas en maíz producido en México, (29,30) determinaron, que en maíz recién cosechado durante 1982 en el Estado de Gto., la presencia de aflatoxinas fué negativa. Así mismo se analizaron muestras de maíz (3), almacenado en condiciones rurales en el sureste de la misma entidad federativa y se encontró que la presencia del género *Aspergillus* y *Penicillium* fué baja, tal vez las condiciones climáticas y de cultivo no favorecieron la presencia de *Aspergillus* ni de las aflatoxinas.

En México, D.F., se reportó (43,63) que de 290 muestras analizadas en 1984, 46 (18,96 %) presentaron aflatoxina B1, con niveles de 25 a 100 ppb, de las cuales 41 pertenecían a alimento concentrado, 4 a sorgo y una a silo de maíz.

En 1985 se analizaron 276 muestras, presentando contaminación sólo 15 (5.4 %); tal parece que esta disminución de la contaminación en 1985, con respecto a 1984, puede atribuirse a las condiciones climáticas (37). Mientras que en Monterrey, N.L., en 1990 (82) se analizó maíz que se distribuía en la ciudad encontrándose niveles de AFB1 que variaron de 5.03 - 465.31 ng/g, nivel superior a los permitidos en México (20 µg/k) (23,77) y AFG1 en concentraciones de 1.59 - 57.10 ng/g

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

El órgano más afectado por la aflatoxina en todas las especies es el hígado. El cáncer del hígado se relaciona en muchos de los casos a una larga exposición con alimentos contaminados (16,32,97).

Sí consideramos la presencia de aflatoxinas en alimentos básicos y los efectos de éstos contaminantes al entrar a la cadena alimenticia, podemos comprender el riesgo que implica para la salud pública (49,93,97).

El humano se encuentra expuesto directa o indirectamente al consumo de aflatoxina B1 o aflatoxina M1 ya sea a través de cereales contaminados o productos alimenticios de origen animal, como la leche (esquema No 1) (44,83,90,91,93).

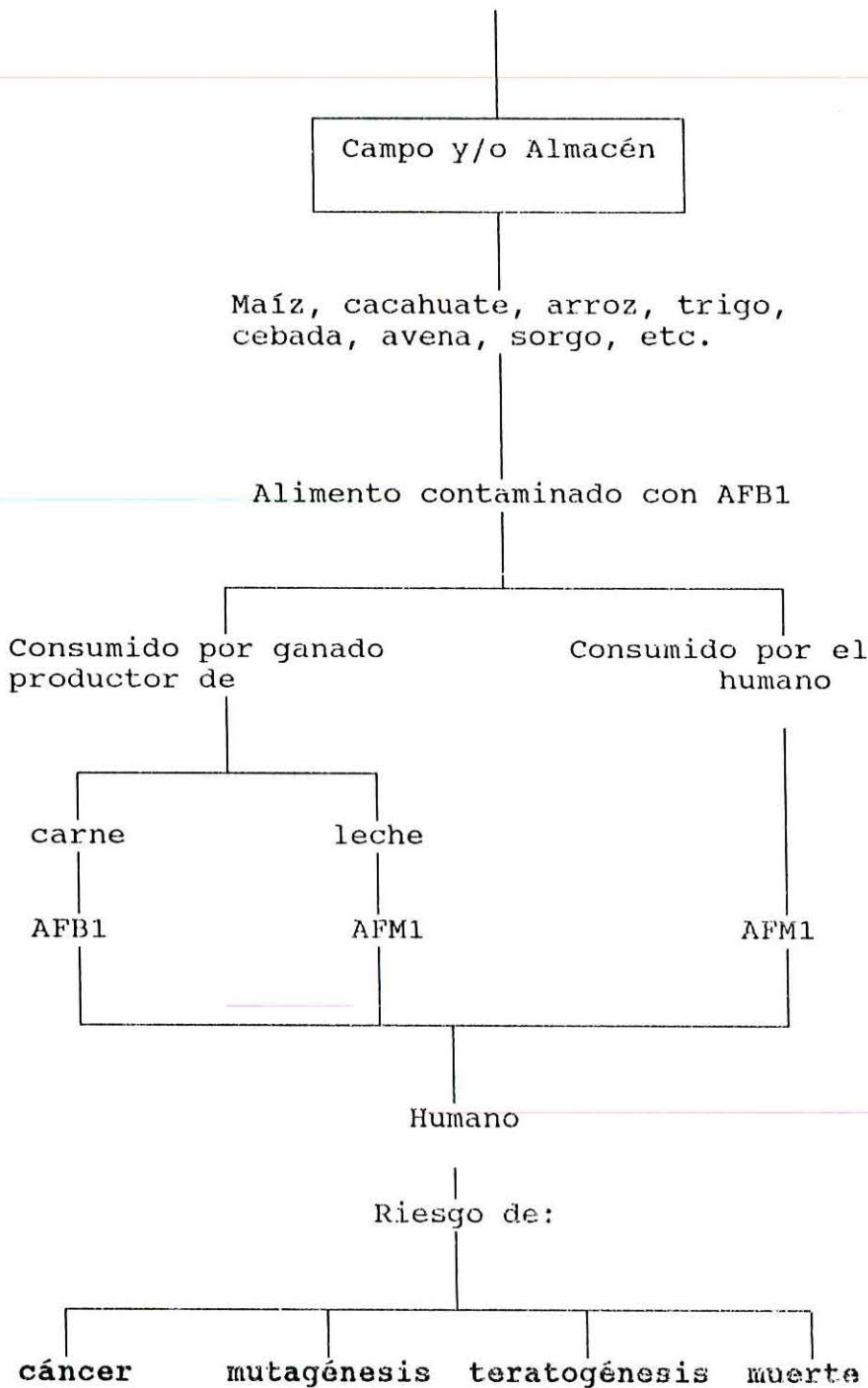
Varios autores han reportado que las aflatoxinas y sus derivados se difunden por todos los tejidos corporales de aves, (18), porcinos (35), equinos (5) y bovinos (10). Especialmente en hígado, riñones, músculo esquelético, tracto gastrointestinal y son excretados en heces, orina y leche (4,9,34,65,75,76,92).

Un estudio de metabolismo de aflatoxina B1 "in vitro", usando homogeneizados de hígado de diferentes animales, mostró diferencias en la actividad metabólica de las células hepáticas.

ESQUEMA 1

Entrada de aflatoxina B1 (AFB1) en la cadena alimenticia

*Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*



Así se observó que de 25  $\mu\text{g}$  de aflatoxina B1, adicionados a cada substrato, el hígado de borrego metabolizó el 30 %, mientras que con 50  $\mu\text{g}$  de AFB1, el hígado de becerro, formaba 1.35  $\mu\text{g}$  de AFM1 por gramo de homogeneizado durante una hora de incubación (10).

Se ha reportado, que cuando la aflatoxina B1 es ingerida por bovinos, ésta inhibe las bacterias ruminales, si se ingiere una dieta a base de granos, inhibe las bacterias gran positivas, bajando la concentración de ácidos grasos volátiles acetato/propionato, si la dieta es a base de heno inhibe las bacterias gran negativas bajando la digestibilidad de la celulosa (9,40,80).

Esta AFB1 es convertida en el hígado (citosol) por hidroxilación (85) a diferentes metabolitos entre ellos la AFM1, aflatoxicol, aflatoxina B2a, parasiticol y P1 (1,7,9,17,34,36,46,49,52,62,65,72,77,81); siendo la aflatoxina M1 el metabolito más abundante en leche (1 a 3 %) (24).

Los efectos carcinogénicos de AFM1, son menores que los de AFB1, aunque su potencial tóxico es muy similar (26,17), también se conoce que algunas vacas pueden producir leche contaminada sin manifestar síntomas subagudos de intoxicación (10).

Por lo antes expuesto la contaminación de leche con aflatoxina M1, puede presentar un riesgo potencial para mamíferos, siendo el riesgo más alto para los recién nacidos ya que su alimentación es exclusivamente a base de leche y son éstos los más susceptibles a los efectos tóxicos de las aflatoxinas (57,58,59).

Con estas bases se realizó un estudio para detectar aflatoxina M1 en leche de ganado bovino en el estado de Guanajuato; ya que la bibliografía consultada no reportó datos de métodos confiables para la detección de AFM1 en nuestro país (37), ni el grado de incidencia en leche de ganado bovino, lo cual no significa que los problemas que causa ésta aflatoxina no existan.

**OBJETIVO GENERAL**

- 1.- Detección de aflatoxina M1, en leche de ganado bovino en el estado de Guanajuato.

**OBJETIVOS PARTICULARES**

- 1.1.- Selección de un método para detección de aflatoxina AFM1 en leche.
- 1.2.- Confirmación de la eficiencia y reproducibilidad del método seleccionado en:
  - a) Leche fluida contaminada experimentalmente
  - b) Leche fluida excretada por una vaca la cual consumió aflatoxina B1 en la dieta

## HIPÓTESIS

Si la aflatoxina B1 (AFB1) es ingerida en el alimento por los bovinos, biotransformada en aflatoxina M1 (AFM1), excretada en leche y consumida por los mamíferos representando un riesgo potencial para la salud pública, entonces será necesario adecuar un método confiable, capaz de detectar la concentración de ésta micotoxina en leche.

## MATERIAL Y MÉTODOS

La realización de éste trabajo se llevo acabo en tres etapas:

Primera etapa

- 1.- Selección de un método para detección de aflatoxina M1 en leche.

Segunda etapa

- 2.- Confirmación de la eficiencia y reproductibilidad del método seleccionado :
  - 1.2- leche fluida contaminada experimentalmente.
  - 2.2.- leche fluida excretada por una vaca la cual consumió aflatoxina B1 en la dieta.

Tercera etapa

- 3.- Detección de aflatoxina M1 en leche de ganado bovino producida en el Estado de Guanajuato.

Primera etapa

- 1.- **SELECCIÓN DE UN MÉTODO PARA DETECCIÓN DE AFLATOXINA M1 EN LECHE.**

Los métodos analíticos evaluados para determinar aflatoxina M1 fueron los siguientes:

- Método 1.- Determinación de aflatoxina M1 por cromatografía líquida (84).



Método 2.- Determinación de aflatoxina M1 en leche y derivados a bajos niveles (17).

Método 3.- Determinación de aflatoxina M1 en leche flúida International Agency for Research on Cancer (37).

Método 4.- Aflatoxina M1 en leche y queso, determinación por cromatografía en capa fina (6).

Método 5.- Determinación de aflatoxina M1 en leche flúida (26).

Estos métodos fueron seleccionados en base a su eficiencia y a la accesibilidad de equipo y reactivos, la eficiencia reportada por los autores de los métodos antes mencionada es la siguiente (cuadro 1).

CUADRO 1

EFICIENCIA DE LOS DIFERENTES MÉTODOS EVALUADAS				
No	MÉTODO	REFERENCIA	NIVEL MÍNIMO DE DETECCIÓN	% DE RECUPERACIÓN
1	TYCZKOWSKA	(84)	0.1	90.8
2	DOMÍNGUEZ	(17)	0.1 (a) 0.02 (b)	92.8
3	IART	(37)	0.05 polvo 0.5 flúida	91.0
4	AOAC	(6)	0.5	no reportada
5	ROBERTS Y ALLCROFT	(26)	0.3 polvo	no reportado

(a) técnica 1  
(b) técnica 11

En el estudio preliminar cada uno de los métodos fué analizado por quintuplicado en 5 y 50 g (para leche en polvo) o ml (fluida) en:

leche en polvo sin adición de aflatoxina M1 (control)

leche en polvo adicionada de cantidades conocidas aflatoxina M1

leche fluida sin adición de aflatoxina M1 (control)

leche fluida adicionada de cantidades conocidas de aflatoxina M1.

Estos métodos de detección de aflatoxina M1 consisten de tres pasos principales: **A)** Extracción, **B)** Purificación y **C)** Cuantificación.

-En la extracción la muestra se pone en contacto con el solvente el cual extrae la toxina, cada método se realizó conforme se menciona en la bibliografía y describe en los esquemas de ésta sección. El material y equipo más importante que se ocupa en esta parte es un agitador de muñeca, bomba de vacío, matraces, pera de decantación y solventes así como campana de extracción (en las tres pasos).

-En el paso de purificación a la toxina extraída se le elimina de contaminantes como colorantes pigmentos y lípidos. En la primera etapa (preliminar) se requirió empaquetar columnas bajo la siguiente metodología: (sin embargo en la segunda etapa; confirmación de la eficiencia y reproductibilidad del método seleccionado, las columnas que se usaron fueron cortas del método CB modificado) (29).

#### Empaquetamiento de la columna:

A la columna de vidrio de 20 cm de altura y 2.5 cm de diámetro (pyrex) se le acopló un poco de lana de vidrio en el fondo como soporte. Después se le adicionó cloroformo a la mitad de la columna, luego dos gramos de gel de ( sílice 60-200 mallas) resuspendido en cloroformo de nuevo se adicionan de 3-4 ml de cloroformo lavando las paredes de la columna luego fué eluido parte de este cloroformo hasta antes del nivel del gel de sílice más o menos medio cm. después se adicionó 2 g de sulfato de sodio y separó el exceso de cloroformo dejando un cm arriba del sulfato de sodio ( ya empacadas las columnas se adicionaron los reactivos que menciona la literatura).

-En la última etapa, la cuantificación se realizó por cromatografía en capa fina (CCF) en todos los métodos, con algunas variaciones en los solventes utilizados. Consiste en separar las micotoxinas en placas revestidas con gel de sílice mediante un solvente migrante. La cuantificación se realizó por comparación visual de la intensidad de los puntos fluorescentes de las sustancias desconocidas con una serie de estandares de referencia de concentración conocida aplicados en la misma placa. De esta manera se llevó acabo el estudio preliminar.

#### Preparación de placas de gel de sílice en capa fina:

Se resuspendió 30 g de gel de sílice (Kiedegel, Merk) con 65 ml de agua destilada en un matraz con tapón de rosca.

Esta suspensión se agitó y aplicó en placas de vidrio de 20x20 cm con un grosor de 0.25 mm empleándose un aplicador de gel para placas (Desaga Helderberg), las placas se dejaron secar a temperatura ambiente 15 minutos y se activaron en un horno a 110 °C durante 1 hora.

#### Aplicación del extracto a la placa:

En una placa para cromatografía en capa delgada se trazaron líneas paralelas imaginarias separadas las primeras, a dos cm de distancia, lugar del punto de aplicación y el frente de solvente se marca a los 17 cm. en la parte superior, la placa se marcó con el número de muestra que se aplicó en el origen para evitar confusión.

Las muestras se aplicaron cunitativamente con ayuda de microjeringas (Hamilton) de diferentes volúmenes  $\mu\text{l}$ , la aplicación debe ser en una zona circular no mayor de 0.5 cm de diámetro. De los extractos de las muestras se aplicaron 10,20 y 30  $\mu\text{l}$  de cada una de las repeticiones. De igual manera se aplicó el estándar de aflatoxina M1 (Calbiochem,U.S.A) en volúmenes de 30, 40 y 50  $\mu\text{l}$  y con una concentración de 0.9914  $\mu\text{g/ml}$  se hicieron dos aplicaciones intercaladas con las muestras. Una vez hecha la aplicación la placa se desarrolló en cloroformo- acetona- isopropanol (85:10:5) 60 ml, para la separación de las aflatoxinas una vez que esta mezcla alcanzo los 17 cm. la placa se sacó de la cámara de desarrollo y se dejó secar, ya seca se observaron estas placas a una cámara oscura de luz ultravioleta de onda larga (Ultraviolet Cabinet model cc-20 g).

Primero se ve la intensidad de fluorescencia de las manchas del estándar para luego compararlas con las manchas de cada una de las repeticiones del problema. Si el RF de las manchas del estándar y los RF de las manchas del problema coinciden, la muestra se considera positiva.

$$RF = \frac{\text{frente de soluto}}{\text{frente de solvente}}$$

Determinación semicuantitativa de concentración para aflatoxina M1 y B1:

Para determinar la concentración por comatografía en capa fina se utiliza la siguiente fórmula para las dos toxinas.

$$\mu\text{g}/\text{k} = \frac{(s) (y) (v)}{(x) (w)}$$

s = microgramos ( $\mu\text{g}$ ) de aflatoxina M1 aplicados en la placa

y = concentración del estándar de aflatoxina M1 en microgramos por ml ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

v = microlitros ( $\mu\text{l}$ ) adicionados de la muestra

x = microlitros de muestra que aparecen en la placa semejantes a (s)

volumen original o peso de la muestra ) (vol. de filtrado)

w = -----

120

para (AFM1).

w = gramos de muestra aplicados a la columna, para (AFB1)

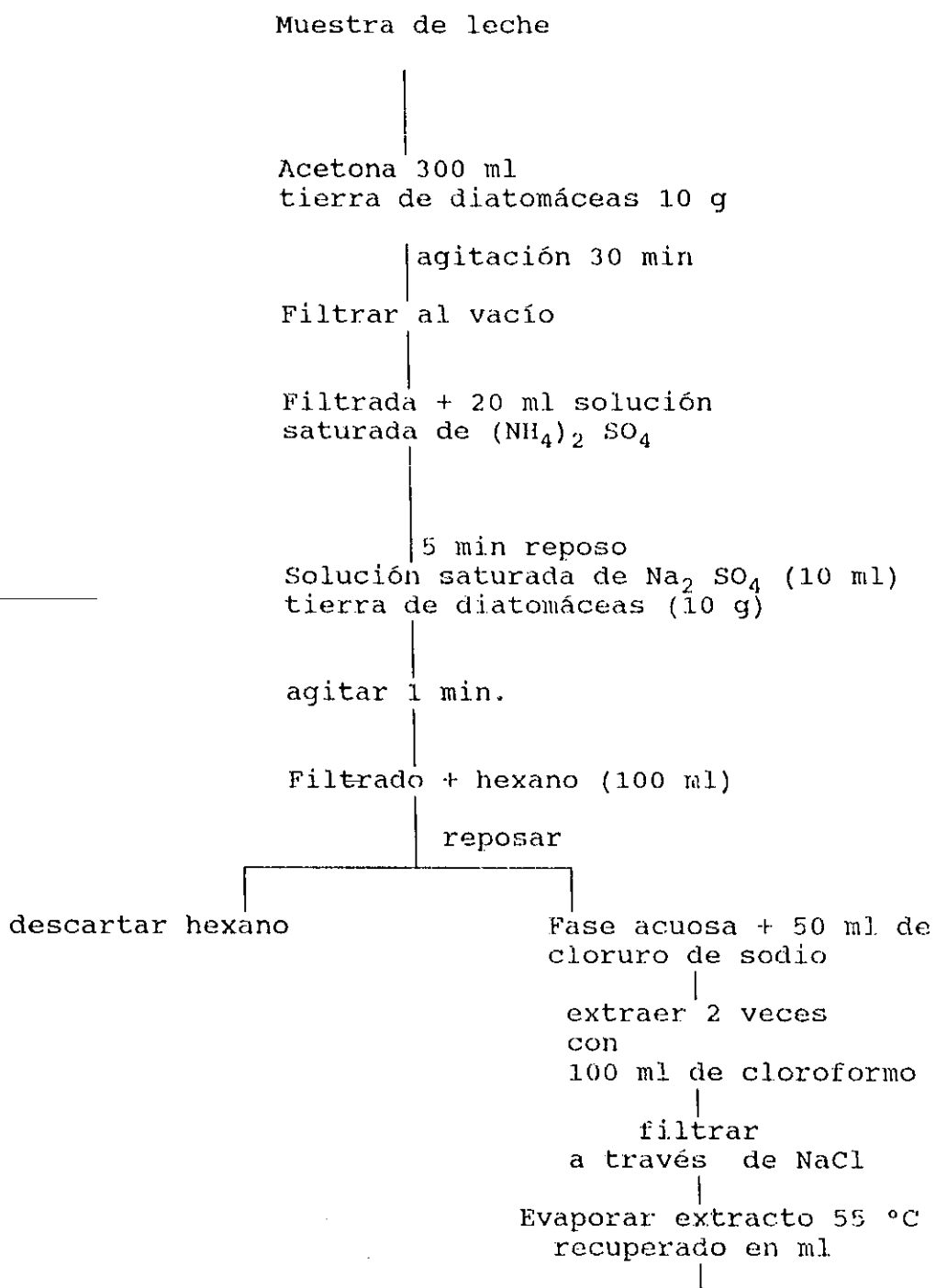
Las diferencias entre éstos 5 métodos, básicamente consiste en el tipo de solventes utilizados y tiempos de extracción.

La descripción de los métodos, en forma esquemática, es la siguiente:

## ESQUEMA 2

## Método 1 (Tyczkowaska)

**Extracción:** Leche fluida (100 ml); leche en polvo 10 g + 100 ml de agua desionizada.



**Purificación**

| columna gel  
 | de sílice  
 Tolueno ac. acético  
 (9:1) 25 ml  
 | desechar  
  
 Hexano:éter:acetonitrilo  
 (5:3:2)  
 | desechar  
  
 Eluir AFM1 con  
 cloroformo:acetona (4:1)  
 40ml  
  
 Evaporar a sequedad  
  
 Resuspender en 100 ml  
 de  
 benceno:acetonitrilo  
 (9:1)

**Cuantificación**  
 por cromatografía de  
 capa fina (ccf).

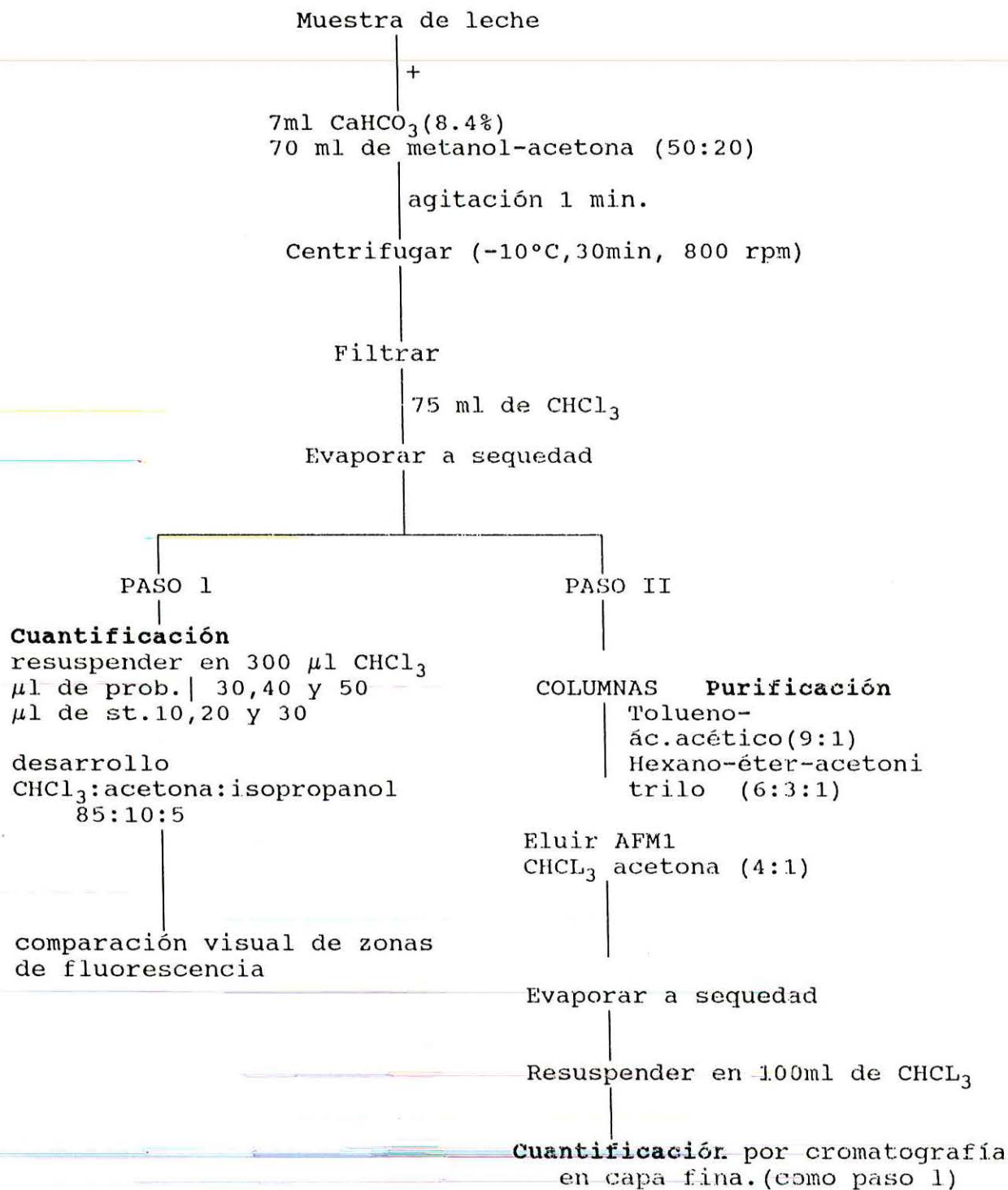
μl aplicados de st de AFM1 10, 20 y 30  
 μl aplicados de problema 30, 40 y 50  
 desarrollo éter  
 CHCl<sub>3</sub>:acetona:isopropanol  
 85:10:5



## ESQUEMA 3

Método No 2 ( Domínguez, 1987)

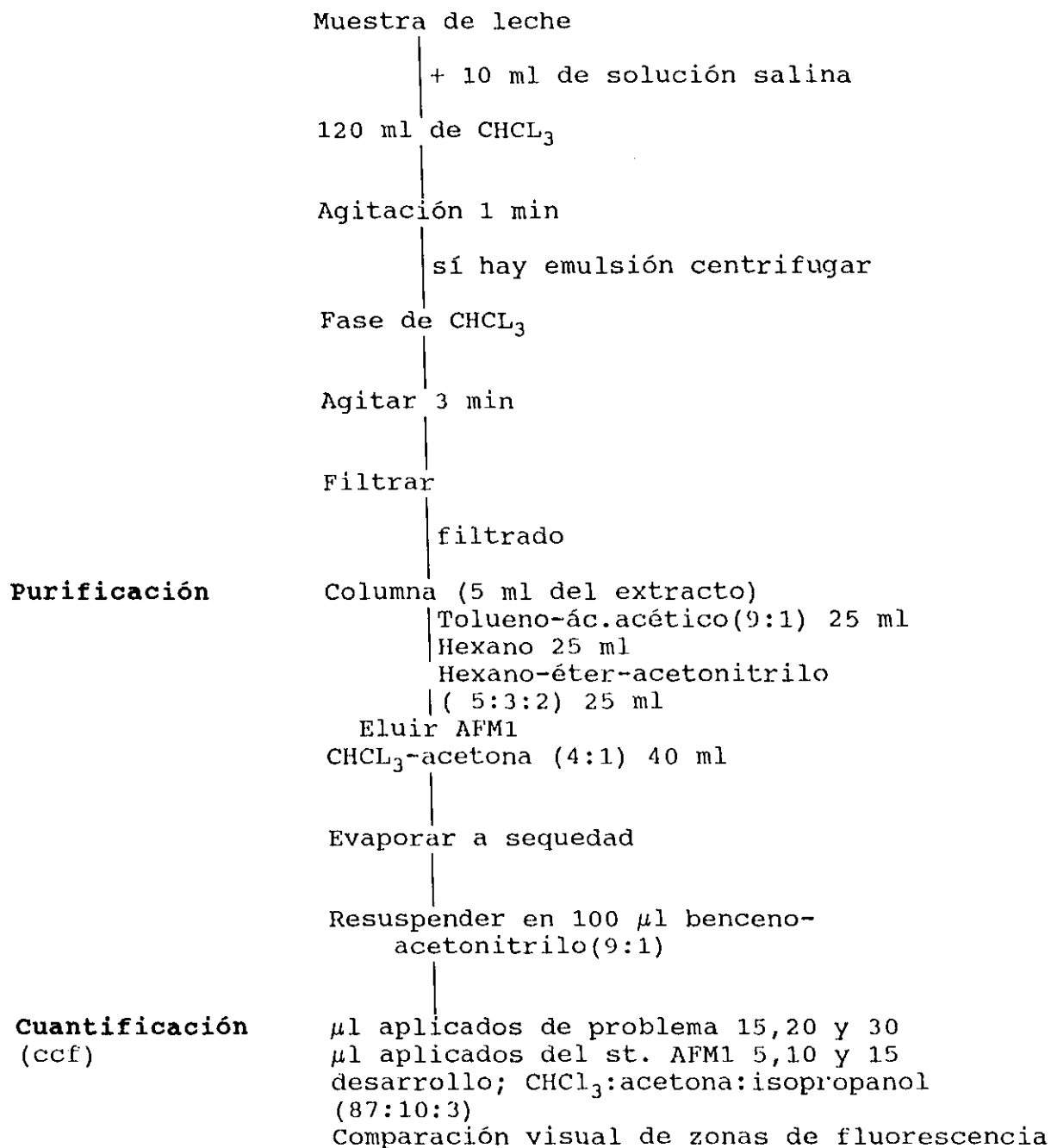
**Extracción;** Leche fluida (50 ml) leche en polvo 5 g + 50 ML de agua destilada.



## ESQUEMA 4

Método No 3 (A.O.A.C.)

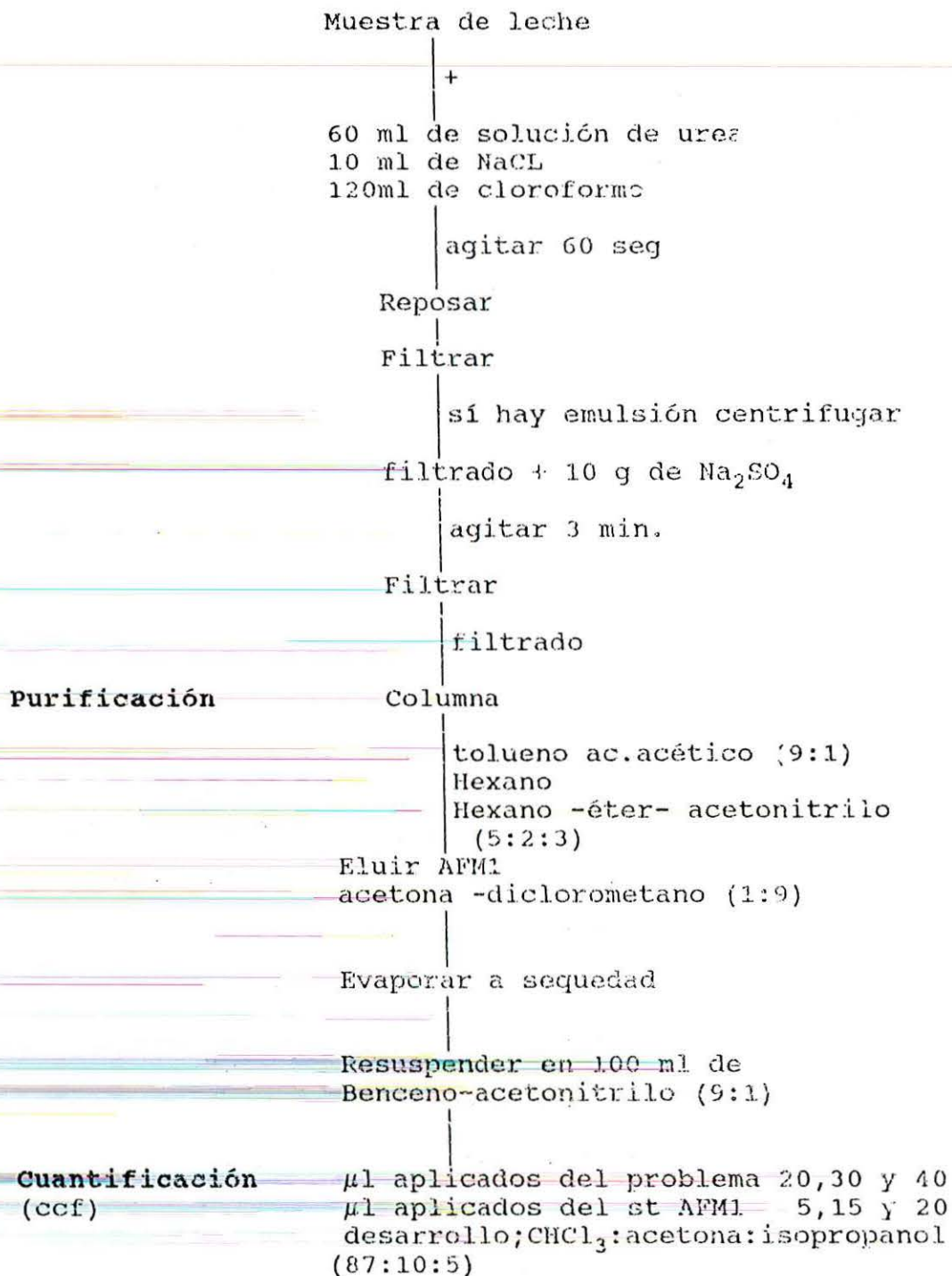
**Extracción** ; Leche fluida ( 50 ml ); leche en polvo 5 g + 50 ml de agua destilada



## ESQUEMA 5

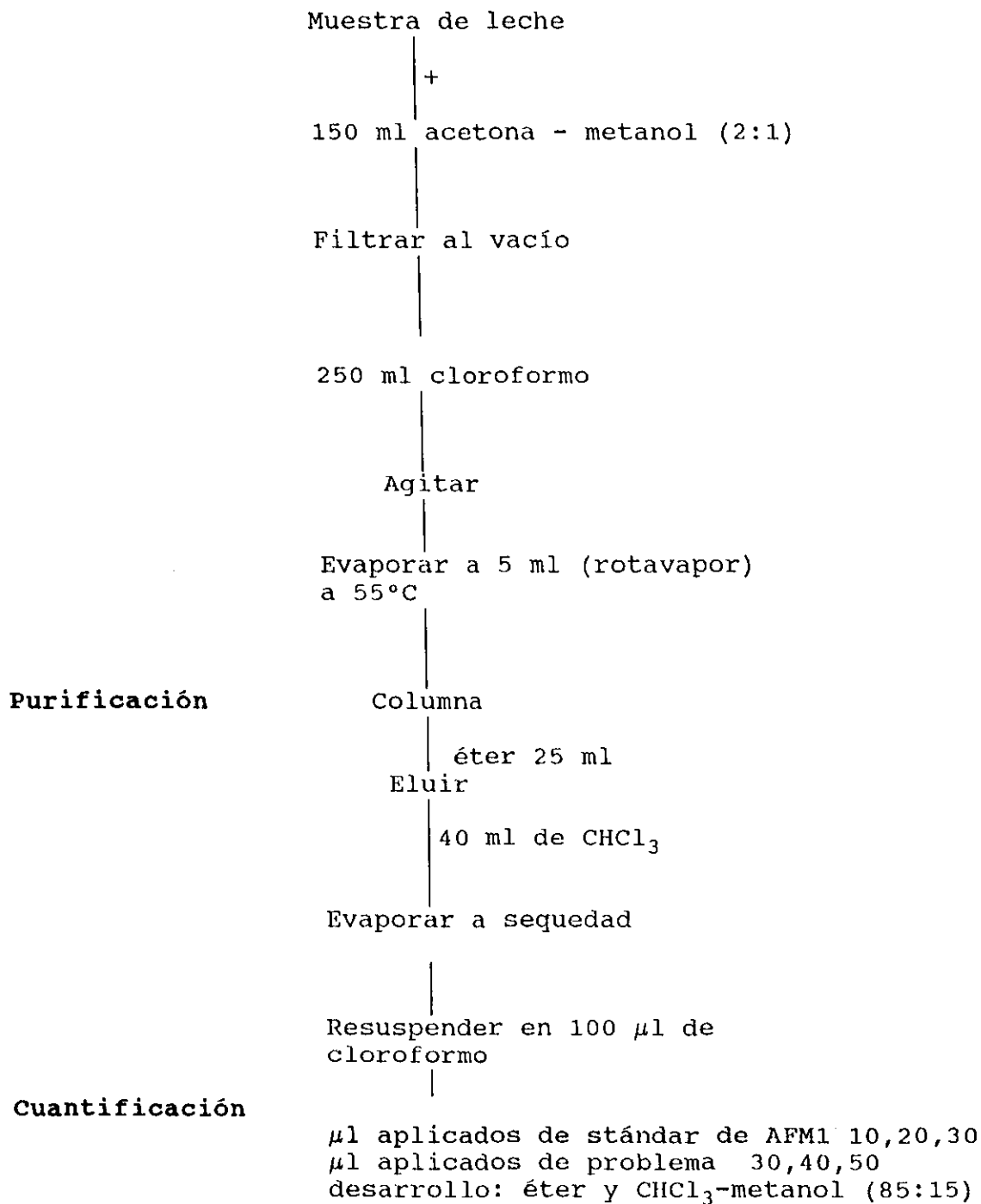
Método No 4 (IART)

Extracción: Leche Fluida (50ml) ; leche en polvo 5 g.



## Esquema 6

MÉTODO No 5 DE ROBERTS Y ALLCROFT (1967)

**Extracción:** Leche fluida 100 ml

Segunda etapa

## 2.- EFICIENCIA Y REPRODUCTIBILIDAD DEL MÉTODO SELECCIONADO

La determinación de eficiencia y reproductibilidad del método se realizó de dos formas.

2.1.- En leche fluida adicionada de cantidades conocidas de estándar de aflatoxina M1:

Cantidades conocidas de estándar de aflatoxina M1 fueron añadidas a la leche bajo obscuridad (la luz inactiva las aflatoxinas) contenida en un matraz erlermeyer con ayuda de jeringa hamilton.

- Se adquirió leche de vaca sin hervir la cual fué adicionada de estándar de aflatoxina M1 (100,200,500,1000  $\mu$ l) de una concentración 0.9914  $\mu$ g/ml donado por (Calbiochem, U.S.A.) se realizaron 8 experimentos (exp.) de 5 repeticiones cada uno así como 1 testigo por cada exp. con opción a realizar las modificaciones perninentes dando un total de 40 análisis.

2.2.- En leche fluida producida por una vaca, la cual consumió AFB1 en la dieta

En el laboratorio de micotoxinas se contaba con maíz amarillo contaminado naturalmente con aflatoxina B1, se tenían 4 bolsas de: 1) de 5100 gr, 2) 4150 gr, 3) 4800 gr y 4) 10,000 gr la concentración de aflatoxina B1 era de 120  $\mu$ g/k, para la bolsa No 1, 82  $\mu$ g/k para la bolsa No 2, 114  $\mu$ g/k para la No 3 y 82  $\mu$ g/k para la No 4. Se homogeneizó el maíz de la bolsa

# 4 y de ésta se tomó para completar el peso a 5500 g de las bolsas 1,2,3 (cuadro 2). Una vez con éste peso se homogeneizaron y se procedió a analizar el contenido final de AFB1 (por el método CB corto modificado por Guzmán y col.) (29), para cada una de las tres bolsas quedando de la siguiente manera (cuadro 2).

CUADRO 2

## AFM1 EN MAÍZ CONSUMIDO POR LA VACA

BOLSA	PESO INICIAL	G.TOMADOS DE LA BOLSA No 4	TOTAL	G.PARA ANÁLISIS	$\mu\text{g}/\text{k}$ AFB1	G.CONSUMIDOS POR LA VACA
1	5100	400	5500	500	59	5000
2	4150	1350	5500	500	98	5000
3	4800	700	5500	500	150	5000

En esta sección se utilizó una vaca Holstein prestada de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Guanajuato

VACA	No 167
EDAD	3 años 3 meses
ETAPA DE LACTANCIA	8 meses
PRODUCCIÓN DE LECHE	17 lts
RAZA	Holstein F.
No. DE PARTOS	1 ( 1 Oct. 1989)
PESO	550 K
DIAS DE GESTACIÓN	4.5 meses
FECHA DE NACIMIENTO	2 DE Marzo de 1987
INSEMINADA	30 de Enero de 1990
HORA DE ORDEÑA	Mañana y tarde

Se aisló del lote y se le dió un período de adaptación de 3 días en un corral techado (paridero), la vaca consumía (cuadro 3) una ración antes del experimento a base de:

CUADRO 3

## ALIMENTACIÓN DE LA VACA

-----		-----	
ANTES DEL EXPERIMENTO		DURANTE EL EXPERIMENTO (3 días)	
Salvado	140	maíz amarillo	5 k/día
Sorgo	730	alfalfa	20 k/día
Pollinaza	110		
Minerales	5		
Sal	5		
Alfalfa	10 Kg		

Siendo la primera dosis de aflatoxina B1 de 295  $\mu\text{g}$ , la segunda de 490  $\mu\text{g}$  y la tercera de 750  $\mu\text{g}$ , habiendo consumido un total de 1535  $\mu\text{g}$  aflatoxina B1 en 3 días.

El muestreo se inició 1 día antes de la ingesta del maíz contaminado y se continuo durante 9 días, considerando a cada ordeña (mañana y tarde) como una muestra, registrando los litros totales para cada una, las muestras se etiquetaron, congelaron y se analizaron para aflatoxina M1 con el método seleccionado y probado en el presente estudio.



El método utilizado para la detección de aflatoxina B1 en el maíz amarillo consumido por la vaca fué el siguiente:

#### MÉTODO CB CORTO MODIFICADO

La muestra de alimento etiquetada, molida y pasada por un tamiz (USA Standard Testing Sieve) No 20 y atemperada se submuestreó por cuarteo, obteniéndose una compósita de 50 g. más 5 repeticiones de 40 g. cada una. Se analizá la compósita y si resulta positiva se analizan las 5 repeticiones.

El método consiste en: A) Extracción, B) Purificación, C) Cuantificación.

#### A.- Extracción

La muestra molida de alimento se colocó en un matraz Erlenmeyer rojo (Low - actinic) de 500 ml de capacidad y se le adicionaron 25 ml de agua destilada, 250 g de tierra de diatomáceas, 250 ml de cloroformo se taparon y agitaron en un agitador de muñeca (Multiwrist shaker) por media hora. La mezcla se ~~filtró al vacío a través de papel whatman No 4. Se pasó a un embudo de separación se separó el cloroformo y de ahí se tomó 100 ml éstos se evaporaron un rotavapor rotatorio~~ (Rotavapor Buchi 115 Ex) hasta un volumen de 5 ml para posteriormente pasar a purificación en columna.

#### B.- Purificación

~~Empaquetamiento de la columna. En la columna (jeringa de 5 ml de plástico) en primer lugar se pone algo de algodón seguido de 5 g de sulfato de sodio anhidro, 1 g de silica gel ( 60 - 200 mallas~~



y 1.5 g de sulfato de sodio anhidro. Posteriormente se adicionó el extracto ( 5 ml) enseguida se adicionó los siguientes reactivos; 5 ml de hexano, 5 ml de éter y 5 ml; de una mezcla de cloroformo metanol ( 97:3) en la cual se eluyó la aflatoxina B1, después estos 5 ml se evaporaron a sequedad.

### C.- Cuantificación

La cuantificación se efectuó en una placa de gel de sílice para capa fina. La preparación de las placas es igual que para AFM1 (pag. 17), así como la cuantificación semicuantitativa de concentración ( pag. 19).

#### Aplicación del extracto al cromatograma

La muestra evaporada a sequedad se resuspendió en 500  $\mu$ l. de cloroformo. Y en una placa preparada como se indicó anteriormente, se trazaron líneas paralelas imaginarias separadas por 2 cm. de distancia.

La longitud entre el punto de aplicación y el frente de solvente fué de 17 cm, las muestras se aplicaron cunitativamente con ayuda de una microjeringa (Hamilton) de 20  $\mu$ l. en una zona no mayor de 0.5 cm. de diámetro. Se aplicó 10, 15 y 20  $\mu$ l de cada una de las repeticiones. El estándar se aplico con una microjeringa de 10  $\mu$ l., éste fué adquirido de la (calbiochem U.S.A) . Se aplicó 1, 2 y 3  $\mu$ l. en dos sitios diferentes e intercalados con las 5 repeticiones. Una vez hecha la aplicación la placa se desarrollo en: 1.- éter, 2.- en una mezcla de acetona- cloroformo -agua,

(15:85: 1.5), para la separación de aflatoxinas una vez que esta mezcla alcanzó los 17 cm, la placa se sacó de la cámara de desarrollo y se dejó secar ya secas se observan estas placas en una cámara oscura de luz ultravioleta de longitud larga (Ultraviolet cabinet model cc- 20 g.). Primero se ve la intensidad de fluorescencia de las manchas del estándar para luego compararlas con las manchas de cada una de las repeticiones del problema. Si el RF de las manchas del estándar y los RF de las manchas del problema coinciden la muestra será positiva. Para la cuantificación ver página 17.

Tercera etapa

### 3.- DETECCIÓN DE AFLATOXINA M1 EN LECHE DE GANADO BOVINO DEL ESTADO DE GUANAJUATO.

#### 3.1.- Selección del lugar para el experimento de campo.

En el Estado de Guanajuato la producción láctea en 1985 fué de 435 237 000 lts. (Anuario Estadístico, SARH. 1987) (cuadro 3.1). El análisis de toda la producción reportada sería un trabajo laborioso, costoso y considerado como un censo. Por lo que se estimó un 20 % como muestra representativa de la producción lechera. De tal manera que de 46 poblaciones productoras de leche en el estado de Guanajuato, 9 poblaciones fueron seleccionadas para realizar el muestreo; obteniéndose un número total de 92 muestras a analizar con 5 repeticiones cada una dando un total de 460 análisis.

Las poblaciones fueron seleccionadas de acuerdo a los siguientes criterios: en base a producción de leche, región geográfica y tipo de agricultura.

Los lugares fueron: Irapuato, Penjamo, Silao, León, San Miguel Allende, Dolores Hidalgo, Acambaro, San Felipe y San Luis de la Paz (esquema 6).

CUADRO 3.1

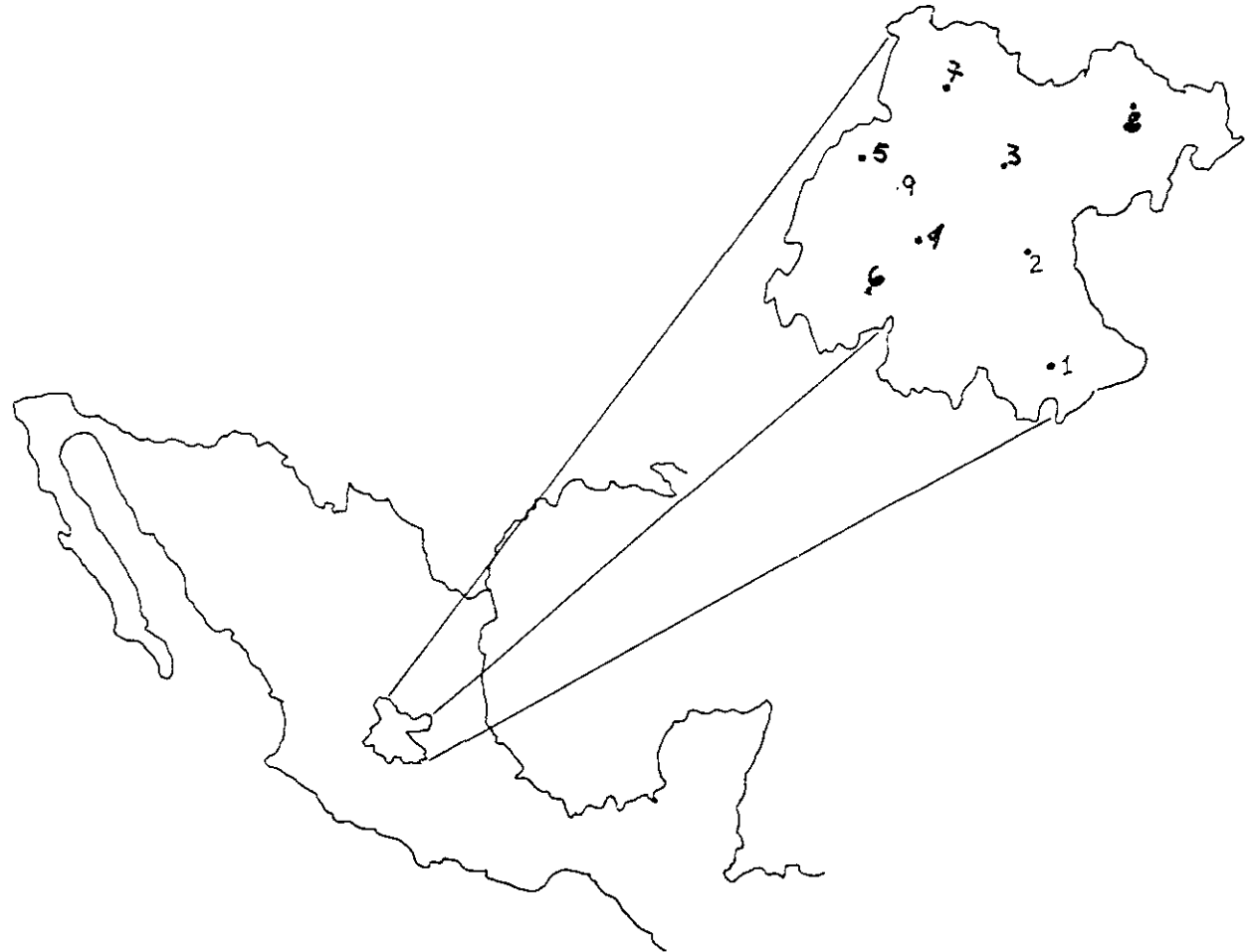
## PRODUCCIÓN DE LECHE EN DIFERENTES MUNICIPIOS DEL ESTADO DE GUANAJUATO

MUNICIPIO	ANUAL	MENSUAL	PORCENTAJE	No DE MUESTRAS *	TOTAL DE ANÁLISIS
ACAMBARO	16 236 000	1 353 000	3.7	8	40
ALLENDE	19 614 000	1 614 000	4.4	9	45
DOLORES HIDALGO	22 852 000	1 904 333	5.2	11	55
IRAPUATO	18 499 000	1 541 583	4.2	9	45
LEÓN	33 516 000	2 793 000	7.7	16	80
PENJAMO	24 724 000	2 060 333	5.6	12	60
SAN FELIPE	21 415 000	1 784 583	4.9	10	50
SAN LUIS DE LA PAZ	16 192 000	1 149 333	3.9	8	40
SILAO	19 413 000	1 617 750	4.4	9	45

De acuerdo al Anuario Estadístico de (S.P.P) 1987

## Esquema No 6.

- 1.- Acámbaro
- 2.- Allende
- 3.- Dolores Hidalgo
- 4.- Irapuato
- 5.- León
- 6.- Pénjamo
- 7.- San Felípe
- 8.- San Luis de la Paz
- 9.- Silao



### 3.1.1 Muestreos realizados

En el presente trabajo se muestreó el 20% de la producción lechera, durante los meses correspondientes a Marzo - Abril de 1990 .

### 3.1.2.- Recolección de las muestras

Estas muestras fueron recolectadas en frascos de plástico con capacidad de un litro y transportadas en refrigeradores de unicel con hielo para posteriormente guardarlas en el congelador, hasta su análisis.

### 3.1.3.- Identificación de la muestra

La identificación de la muestra se realizó en el lugar de su muestreo indicando número de muestra, rancho, población y número de litros de leche obtenida. También se obtuvo información proporcionada por el encargado, la cual nos indicaba lo siguiente: ubicación, temperatura, precipitación pluvial, sistema de explotación, proceso de ordeña, producción de leche y alimentación (apéndice).

### 3.1.4.- Almacenamiento, homogeneización y división de la muestra

Para su análisis la muestra fue descongelada, primero se pasó del congelador al refrigerador 1 día antes de ser analizada,

después se atemperó en refrigeradores de unicel a temperatura ambiente para luego ser homogeneizada.

La homogeneización consistió en mezclar perfectamente la muestra en un frasco de más de 5 litros para obtener una distribución lo más uniforme posible.

### 3.1.5.- Análisis

Una vez homogeneizada la muestra se procedió a tomar 5 submuestras de 50 ml cada una, entre la toma de cada una, se estuvo agitando. Posteriormente se aplicó el método seleccionado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Primera etapa

### 1.- Selección de un método para detección de aflatoxina M1 en leche.

Los resultados obtenidos durante el estudio preliminar de los 5 métodos, fueron diferentes a los reportados por la literatura, los factores que más influyeron, para no recuperar la aflatoxina M1 en leche, tanto en polvo como fluida fueron principalmente en las etapas de extracción, ya que se forma una emulsión bastante densa que impedía recuperar el solvente y en consecuencia la aflatoxina M1 disuelta en éste. De igual manera en la etapa de purificación, se presentaron problemas debido a la presencia de contaminantes como lípidos y pigmentos (cuadro 4).

Los resultados de este estudio sugieren que estos métodos no funcionan bajo las condiciones en que fueron evaluados en el presente estudio.

A pesar de estos resultados el método de la AOAC resultó mejor para leche en polvo (cuadro 5) y el de Roberts y Allcroft para leche fluida, sin dejar de presentar problemas en las etapas de extracción y purificación del extracto, para lo cual se procedió a modificarlos .

A los 2 métodos mencionados se les realizaron modificaciones, las más importantes al método de la AOAC, (cuadro 6) fueron la eliminación de agua y la solución de cloruro de sodio, así como la inclusión de tierra de diatomeas y sulfato de amonio en la etapa de extracción.



CUADRO 4

## PROBLEMAS LOGÍSTICOS PRESENTADOS POR LOS MÉTODOS ESTUDIADOS

Método	Emulsificación	Pigmentos Lípidos	Material	Solventes	Otros
Tyczkowska	-	+	más de 15 vol.grande HPLC	vol. grandes dificultad manejo.	
Domínguez	+	+	centrífuga fría	daño fcos de agitación	mayor exp. luz
AOAC	+	+			modificaciones en la etapa de extracción
IART	+	+			
Roberts y Allcroft	-	+			adaptación a las condiciones del laboratorio

- negativo  
+ positivo

## CUADRO 5

AVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE LOS MÉTODOS ORIGINALES DE LA  
AOAC Y DE ROBERTS Y ALLCROFT

		AFM1 adicionada $\mu\text{g}$	AFM1 recuperada $\mu\text{g}$	EFICIENCIA %
AOAC	Leche fluida	19.9	7.2+	7.2
	Leche en polvo	7.5	1.7*	24.1**
ROBERTS y ALLCROFT Leche fluida		19.9	5.0+	25.6**

CUADRO 6

## MODIFICACIONES REALIZADAS AL MÉTODO DE LA AOAC

	MÉTODO ORIGINAL	MÉTODO MODIFICADO
GR DE MUESTRA	5	20
AGUA	50	no usa
SOLUCIÓN DE NaCl	10 ml	no usa
TIERRA DE DIATOMÁCEAS	no usa	5 gr
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10 gr	no usa
EXTRACCIÓN	120 ml DE CHCl <sub>3</sub>	120 ml CHCl <sub>3</sub>
PRECIPITACIÓN DE CONTAMINANTES	no usa	Sulfato de amonio
REMOCIÓN DE GRASA EN COLUMNA CORTA	Tolueno-Ac. Acético(9:1) Hexano Hexano-eter-acetonitrilo	Hexano éter 5ml descremada éter 10ml entera
ELUCIÓN	CHCl <sub>3</sub> -Acetona (4:1) 40ml	CHCl <sub>3</sub> - acetona (4:1) 10 ml
RESUSPENDER	Benceno-Acetonitrilo (9:1)	100 µl de CHCl <sub>3</sub>
DESARROLLO DEL CROMATOGRAMA	CHCl <sub>3</sub> -Acetona-Isopropanol(87:10:3)	igual

Esto permitió eliminar la emulsión que se formaba y dificultaba mucho el desarrollo de la técnica. Durante la purificación del extracto se modificaron los volúmenes de éter de 5 a 10 ml eliminando la presencia de lípidos y pigmentos.

Al evaluar la eficiencia del método AOAC modificado (esquema 7) en leche en polvo descremada y entera los resultados obtenidos en eficiencia fueron mayores, 20 y 25.6 % respectivamente (cuadro 7), que los obtenidos con el método original, esta eficiencia es baja comparada con la reportada por la literatura. Contar con un método (técnica) eficiente de detección de AFM1 en leche en polvo en México es indispensable ya que nuestro país importa grandes cantidades de leche para su utilización en una gran variedad de productos, los cuales son alimentos básicos y son consumidos principalmente por los infantes.

Segunda etapa

## **2 .- CONFIRMACIÓN DE LA EFICIENCIA Y REPRODUCTIBILIDAD DEL MÉTODO SELECCIONADO**

### **2.1.- En leche fluida contaminada experimentalmente.**

Con respecto al método de Roberts y Allcroft se efectuaron las modificaciones señaladas en el cuadro 8 las cuales permitieron adaptar el método a las condiciones del laboratorio, quedando como se describe en el esquema 8. Posteriormente al evaluar la eficiencia de éste método se observó, que ésta fue aumentando conforme el manejo del método fué dominado (cuadro 9). De tal manera que después de 30 análisis la eficiencia final fue de 50.7%.

## ESQUEMA 7

## MÉTODO DE LA AOAC MODIFICADO PARA LECHE EN POLVO (Guzmán y Serratos)



CUADRO 7

AVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DEL MÉTODO DE LA AOAC MODIFICADO EN LECHE EN POLVO

	AFM1 ADICIONADA $\mu/K$ *	AFM1 RECUPERADA $\mu/K$ *	MANCHAS	EFICIENCIA %
CONTROL	-	-	a) amarillo limón b) azul verde	-
DESCREMADA	7.5	1.5	a) amarillo limón b) azul verde c) azul fluorescente	20
CONTROL	-	-	a) amarillo limón b) azul verde	-
ENTERA	7.5	1.9	a) amarillo limón b) azul verde c) azul fluorescente	25.6

a) RF 0.11

b) RF 0.18

c) RF 0.24

AFM1 RF 0.24

\* media de 15 repeticiones

CUADRO 8

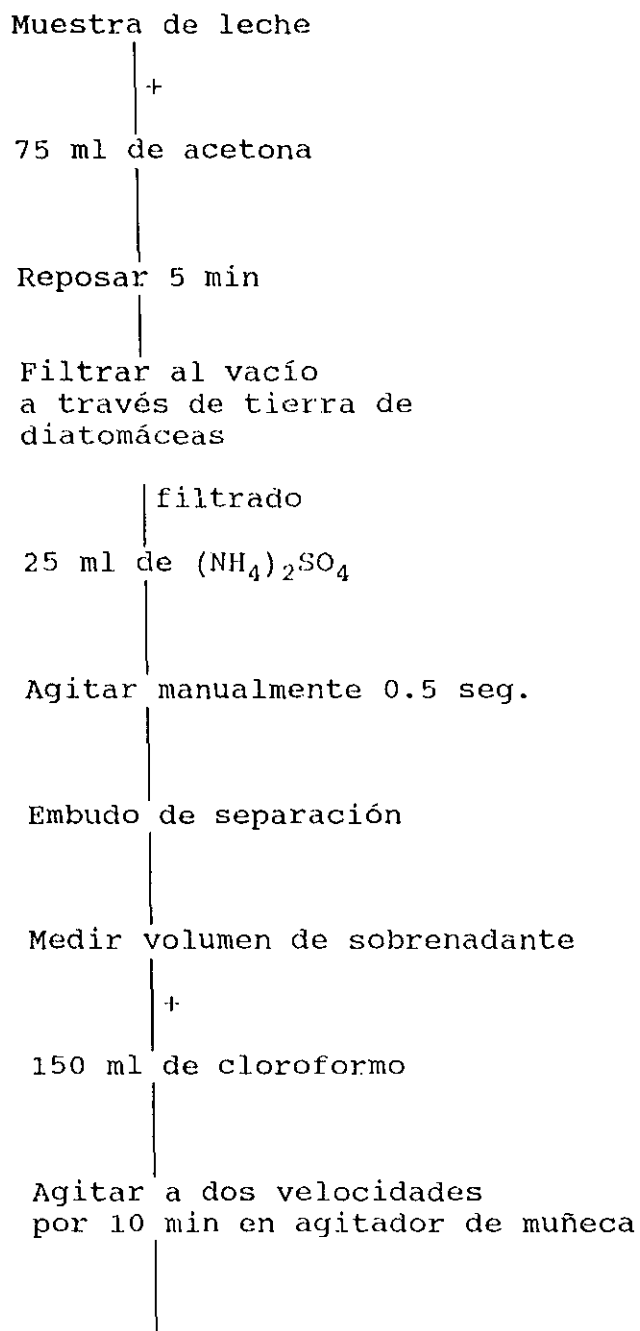
## MODIFICACIONES REALIZADAS AL MÉTODO DE ROBERTS Y ALLCROFT

	MÉTODO ORIGINAL	MÉTODO MODIFICADO
Precipitación de proteínas	acetona -metanol	acetona o
Precipitación de contaminantes	no se realiza	sulfato de amonio *
Extracción	cloroformo	cloroformo *
Eliminación de agua	no se realiza	sulfato de sodio anhidro *
Remoción de grasa en columna corta	éter	éter- hexano *
Elución	cloroformo	cloroformo -acetona +
Desarrollo del cromatograma	cloroformo - metanol	cloroformo-acetona-iso-propanol +
o tomado del método de Roberts y Allcroft.		
* "	"	CB modificado ( AFB1) Guzmán y col.(1992)
+ "	"	AOAC

## ESQUEMA 8

MÉTODO No 5 DE ROBERTS Y ALLCROFT (1967), (modificado por Guzmán y Serratos).

Extracción: Leche fluida 50 ml





Embudo de separación a través  
de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$

Medir y anotar volumen de  
 $\text{CHCl}_3$

Evaporar a 5 ml (rotavapor)  
a  $55^\circ\text{C}$

Columna

5 ml de hexano  
5 ml de éter

Eluir con 10 ml de  
 $\text{CHCl}_3$  - acetona (4:1)

Evaporar a sequedad  
en baño maría a  $55^\circ\text{C}$

Resuspender en  $100\ \mu\text{l}$  de  $\text{CHCl}_3$

Cuantificar por cromatografía  
en capa fina.

$\mu\text{l}$  aplicados del problema: 15, 20, 30

$\mu\text{l}$  aplicados del estandar AFM1: 5, 10, 15

desarrollo  $\text{CHCl}_3$ -acetona-isopropanol (87:10:3)

CUADRO 9

## EFICIENCIA DEL MÉTODO DE ROBERTS Y ALLCROFT MODIFICADO EN LECHE FLUIDA

EXPERIMENTO	No DE RE PETICIONES	AFM1 ADICIONADA $\mu\text{g/Lt}$	AFM1 RECUPERADA $\mu\text{g/Lt}$	EFICIENCIA %
CONTROL	15	0	0	-
1	5	19.8	8.0	40.3
2	5	19.8	9.4	47.5
3	5	19.8	10.0	50.7

Considerando, que al efectuar este trabajo en México no existía ningún grupo trabajando con aflatoxina M1, los logros obtenidos en la eficiencia de los métodos pueden ser considerados aceptables para ser usados como un punto de referencia en la detección de aflatoxina M1, en leche en nuestro país.

2.2.- En leche fluida excretada por una vaca la cual consumió aflatoxina B1 en la dieta.

Como se describió en material y métodos se utilizó en este experimento una vaca de 550 k en estado de gestación de 4.5 meses se alimentó durante tres días con maíz contaminado de AFB1 1535  $\mu$ g totales.

Como se puede observar la leche producida por la vaca antes de la ingestión del maíz con AFB1, no presentó AFM1 (cuadro 10).

La primera ingesta de maíz contaminado fué por la tarde y la toma de la primera muestra a la mañana siguiente (cuadro 10) aproximadamente a las 12 h, estos datos son similares a los reportados por la literatura (9,16,18,97).

También se observó que el porcentaje de conversión de AFB1 a AFM1 en la vaca fué de 3.22 %, resultados que igualmente concuerdan por los descritos por Applebaum (1982) (4,70,81).

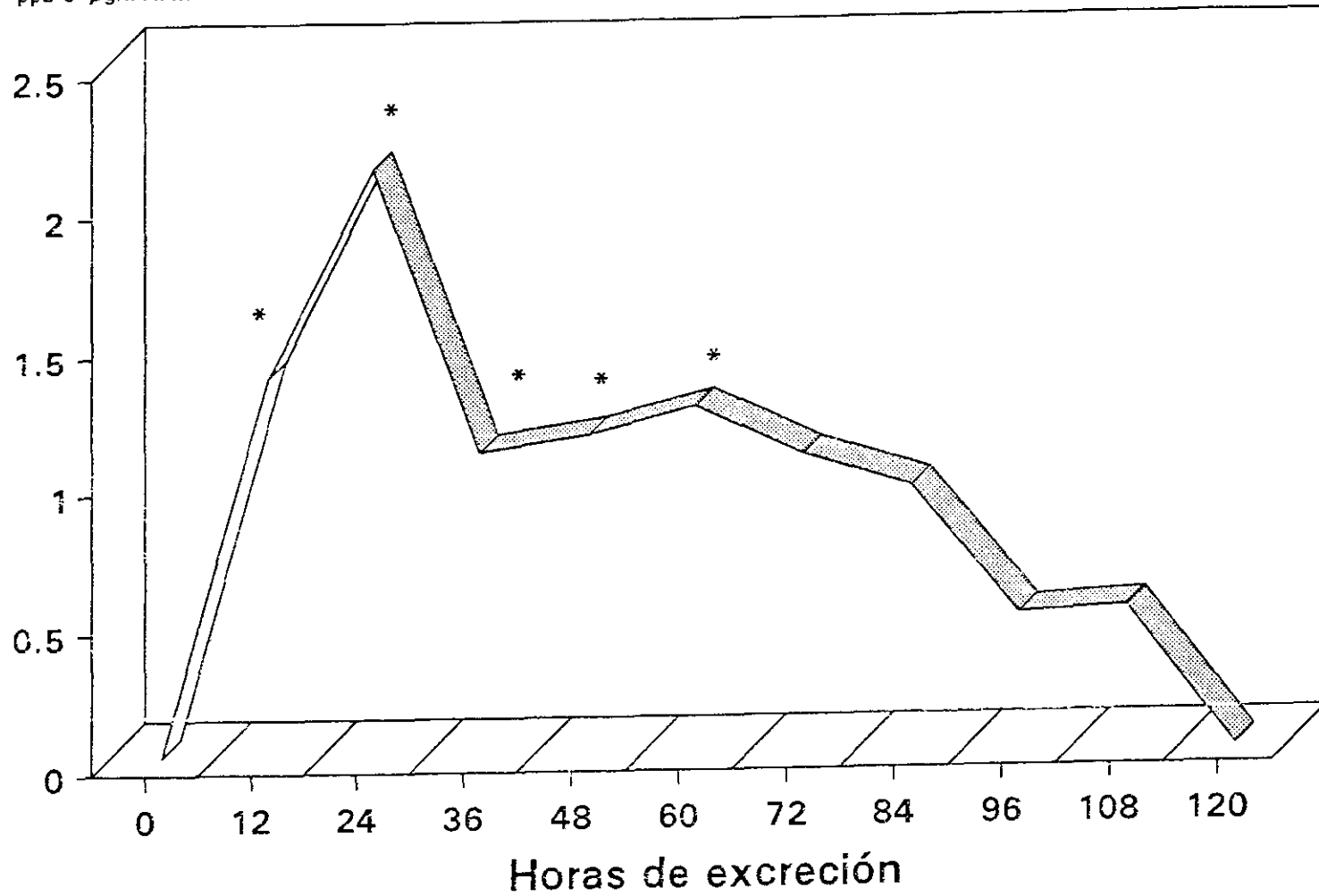
CUADRO 10

CONVERSIÓN DE AFB1 A AFM1 POR UNA VACA ALIMENTADA CON MAÍZ  
NATURALMENTE CONTAMINADO.

DIAS	MAÍZ CONTAMINADO K	CONCENTRACIÓN AFB1 EN MAÍZ µg / K	No DE MUESTRA	TOMA DE MUESTRA hr	LECHE PRODUCIDA L/ORDENA	AFM1 EXCRETADA µg/L	PORCENTAJE DE CONVERSIÓN
1 m	0	0	0	0	8	-	0
t	5	59.0	0	basal	6	-	0
2 m	5	98.3	1	12	8.2	1.36	
t			2	24	4.5	2.11	
3 m	5	150.0	3	36	8	1.08	
t			4	48	5.5	1.14	
4 m	0	0	5	60	8	1.24	
t	0	0	6	72	7	1.06	
5 m	0	0	7	84	8.25	0.94	
t	0	0	8	96	5.25	0.48	
6 m	0	0	9	108	9	0.5	
t	0	0	10	120	5.75	0.0	
m mañana		307				9.91	3.22
t tarde							

### Excreción de aflatoxina M1 en la leche de una vaca alimentada con maíz amarillo contaminado naturalmente con AFB1

ppb o  $\mu\text{g}/\text{k}$  AFM1



\* Ingesta de maíz contaminado

FIGURA No. 1

En la leche producida durante las primeras 24 horas del experimento la cantidad de AFM1 detectada fué mayor que el resto así como su porcentaje de conversión como se observa en la figura 1, la cantidad de AFM1 fué disminuyendo aun cuando la vaca consumió AFB1, dos días mas. Este comportamiento en el porcentaje de conversión se puede deber: a) que se activó su sistema de excreción. b) después posiblemente se saturó y se excretó a velocidades normales del organismo.

La mínima cantidad de AFM1 detectada en este experimento fué 0.48%  $\mu\text{g}/\text{l}$  a las 96 h cantidad menor a la permitida por la Food Drug Administration 0.5 ppb. Esto significa que el método de Roberts y Allcroft modificado es adecuado para la detección de Aflatoxina M1 en leche fluida y permite detectar valores por debajo del nivel máximo permitido para productos lácteos, por el gobierno de los EUA.

Como se sabe, la producción de leche en los establos regularmente es almacenada enfriada y mezclada (las 2 ordeñas, mañana y tarde) antes de salir a la venta. Se consideró necesario determinar si la leche contaminada con AFM1 podría sufrir un efecto de dilución al ser mezclada con leche no contaminada. Para éllo se midió el efecto de dilución mezclando leche contaminada 2.11  $\mu\text{g}/\text{l}$  de AFM1 con no contaminada en una relación 1:1, 1:2 y 1:3.

Al realizar los análisis correspondientes, no se detectó AFM1. Esto puede deberse a que la cantidad de aflatoxina M1 presente en la leche era baja y se diluyó adicionalmente con la leche no contaminada (cuadro 11). Por lo cual la dilución podría

ser una forma de aprovechar la leche que presentara contaminación con aflatoxina M1 en niveles que respondieran a la dilución para manejar niveles no riesgosos. Esta práctica de dilución ha sido recomendada para granos y semillas (1,27,39,42,48,) con el fin de diluir los niveles de AFB1.

Tercera etapa

### 3.-DETECCIÓN DE AFLATOXINA M1 EN LECHE DE GANADO BOVINO EN EL ESTADO DE GUANAJUATO.

Con respecto a este estudio se puede decir que esta fué negativa, ya que no se determinó AFM1 en ninguna de las 492 análisis realizados a las muestras (cuadro 10) .

La explicación que se puede dar al respecto es:

- a) niveles de AFM1 no ingeridos
- b) suponiendo que las vacas ingirieron AFB1 no se excretó como AFM1 en niveles detectables por el método aquí probado en leche
- c) la leche con baja cantidad de aflatoxina M1 sufrió un efecto de dilución y el nivel no fué detectable

CUADRO 11

## EFECTO DE DILUCIÓN SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE AFLATOXINA M1 EN LECHE

LECHE CONTAMINADA		LECHE NO CONTAMINADA	DILUCIÓN	CONCENTRACIÓN AFM1 detectada $\mu\text{g}/50\text{ml}$
volumen ml	AFM1 $\mu\text{g}/\text{l}$	volumen ml	vol/vol	
250	2.11	250	1:1	0.0
250	2.11	500	1:2	0.0
250	2.11	1000	1:3	0.0



## CONCLUSIONES

### Primera etapa

#### **1.- Selección de un método para detección de aflatoxina M1 en leche.**

- 1.1.- Con la sensibilidad de nuestro sistema en el presente estudio no fué posible recuperar la aflatoxina en los niveles descritos por los autores.
- 1.2.- De los métodos que se probaron en su versión original dos dieron menos problemas en su ejecución:  
El método de la AOAC para leche en polvo y el de Roberts y Allcroft para leche fluida.
- 1.3.- Ambos métodos requirieron ser modificados para su adaptación al laboratorio.
- 1.4.- El máximo porcentaje de recuperación obtenido con el método de la AOAC modificado fué de 20 y 25 %, en leche en polvo.

### Segunda etapa

#### **2.- Confirmación de la eficiencia y reproductibilidad del método seleccionado para leche fluida ( Roberts y Allcroft).**

- 2.1.- En leche fluida contaminada experimentalmente
  - 2.1.1.- El máximo porcentaje de recuperación con el método de Roberts y Allcroft modificado fue de 50.7 %, en leche fluida.

2.1.2.- Este método permitió detectar hasta  $0.48\mu/l$  dichos niveles se encuentran por debajo del máximo permitido por la Food Drog Administration FDA (0.5 ppb).

2.2.- En leche fluida excretada por una vaca la cual consumió aflatoxina B1 en la dieta

2.2.1.- Después de doce horas (primera muestra tomada) de haber consumido AFB1 la vaca, se excretó en la leche como AFM1.

2.2.2.- La media del porcentaje de conversión de AFB1 a AFM1 en la vaca fue de 3.22%.

Tercera etapa

### **3.- DETECCIÓN DE AFLATOXINA M1 EN LECHE DE GANADO BOVINO EN EL ESTADO DE GUANAJUATO.**

3.1- En las 92 muestras colectadas en el estado de Guanajuato, no se detectó AFM1.

Con este trabajo se inició el estudio de la aflatoxina M1 en leche, los resultados aunque alentadores ilustran la necesidad de continuar con estos estudios para poder derivar la información necesaria sobre este tema y conocer el riesgo potencial de las aflatoxinas en México.

## RESUMEN

De las micotoxinas hasta ahora reportadas, las aflatoxinas son las que más se han estudiado debido a que éstas conforman un grupo de compuestos carcinogénicos muy potentes. La aflatoxina B1 (AFB1), se puede encontrar en granos básicos o alimentos destinados al consumo humano y animal, su producción puede ocurrir en el campo y/o postcosecha.

Cuando la AFB1 es ingerida por mamíferos es biotransformada y excretada como aflatoxina M1 (AFM1) en leche.

Aunque la aflatoxina AFM1, es menos tóxica que la AFB1, también representa un riesgo potencial para la salud pública.

Existen referencias de diversos países sobre incidencia de AFM1 en leche, quesos y yogurth, en México se desconoce la magnitud del problema.

Con estas bases se realizó un estudio para detectar aflatoxina M1 en leche de ganado bovino. Este trabajo se llevó acabo en el CINVESTAV IPN, Unidad Irapuato. Se inició con la selección de un método para detectar aflatoxina M1 en leche, se evaluaron 5 métodos: 1).- Tyczkowska (84), 2).- Domínguez (17), 3).- AOAC (37), 4).- IART (6), 5).- Roberts y allcroft (26). El de Roberts y Allcroft ofrecio mejores ventajas, éste método se modificó y se adaptó a las condiciones del laboratorio obteniéndose una eficiencia de detección de 50.7 %.

El nivel de detección del mencionado método fue de 0.48  $\mu\text{g/l}$ , valor inferior al límite máximo permitido por la Food Drug Administration, FDA (0.5  $\mu\text{g/l}$ ).

Los resultados sobre detección de AFM1 en leche producida en el estado de Guanajuato, indican que de las 92 muestras colectadas ninguna presentó aflatoxina M1 en los niveles de detección del método.

La ausencia de AFM1 puede interpretarse de la siguiente manera:

- a).- que la cantidad de AFM1 que estaba presente es tan baja que escapó a la sensibilidad de éste método.
- b).- que el alimento consumido por las vacas no estaba contaminado con AFB1.

Con este trabajo se inició el estudio de la aflatoxina M1 en leche, los resultados aunque alentadores ilustran la necesidad de continuar con estos estudios para poder derivar la información necesaria sobre este tema y conocer el riesgo potencial de las aflatoxinas en México.

## B I B L I O G R A F I A

1. ANDRADE, F. and Rosiles, R. 1992. Efficiency of aluminosilicates as sequestring of aflatoxin B1 in Chicken feed. Vlll International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. México, D.F.
2. ARIM, H.R., Ferolin,A.C., Loreto,M. and Dumada,U.G. 1992. Compararison of three methods for the determination of aflatoxin in copra meal. Vlll International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. México, D.F.
3. ANGUIANO, R.G.L. 1986. Producción de aflatoxinas por varios hongos en maíz. CINVESTAV, IPN. Unidad Irapuato. Gto.
4. APPLEBAUM, S.R., Brackett,E.R., Wiseman,W.D. and Marth, H.E. 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. Journal of Dairy Science Vol.65, No.8. 1503-1508
- . ASQUITH, R.L. 1983. Biological effects of aflatoxin in horses. Aflatoxin and *Aspergillus flavus* in corn. In U.L.Diner., R.L.Asquith., J.W.Dickens. Eds. Opelika, Alabama.
- . Association of official Analitycal Chemists., 1984. Official Methods of Analysis, 14 ed. sect. 26.
- BALDWIN, R.L., Smith,E.N., Taylor,J. and Sharp, M. 1980 Manipulating metabolic parameters to improve growth rate and milk secretion. Journal of Animal Science, Vol.51, No.6

BIBLIOTECA CENTRAL

8. BIRD, C.B., Dixon-Hallond, D.E. and Hamess, J.R. 1992. Principles and applications of Elisa method for detection of mycotoxins. VIII International IUPAC Symposium on mycotoxins and phycotoxins. México D.F.
9. BROWN, W.R., Pier, A.C., Richard, L.J. and Krogstad, R.E. 1981. Effects of dietary aflatoxin on existing bacterial intramammary infections of dairy cows. Amer. J. Vet. Res., Vol 42, No.6. 927-933
10. BODINE, A.B. and Mertens, D.R. 1983. Toxicology, metabolism, and physiological effects of aflatoxin in the bovine. In aflatoxin and *Aspergillus flavus* in corn. U.L. Diner., R.L.Asquith., J.W.Dickens. Eds. Opelika, Alabama.
11. CABELLO, E.F. 1988. Marco de referencia sobre la problemática tecnológica de la ganadería lechera del estado de Querétaro. Memorias; Avances tecnológicos en producción de leche.
12. Carta Estatal de Clima y Agricultura. 1980. Síntesis geográfica de Guanajuato. Secretaría de Programación y Presupuesto (SPP).
13. DE CAMPOS, M. 1987. Relación entre micotoxinas y alimentos en países en desarrollo. Segunda conferencia internacional mixta. FAO/OMS/PNUMA sobre micotoxinas. Bangkok, Tailandia. tema 4.
14. DE LEON, C., Kitbamroong, C., Bungsuwan, D. and Tanboonask, P. 1992. Selection for resistance to aflatoxin production in three maize populations. VIII International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. México,D.F.

15. CHRISTENSEN, C.M., Kaufmanh.H. 1976. Contaminación por hongos en granos almacenados. México, Ed. Pax. México.
16. CUSUMANO, V., 1991. Aflatoxins in sera from patients with lung cancer. *Oncology*. 48; 194-195.
17. DOMINGUEZ, L., Blanco, L.J., Gomez, L.E., Rodríguez, F.E., and Suarez, G. 1987. Determination of aflatoxin M1 in milk and products contaminated at low levels. *J. Assoc. Anal. Chem.* 70; 470- 472.
18. EDDS, G.T., and Bortell, R.A. 1983. Biological effects of aflatoxin poultry. In aflatoxin and *Aspergillus flavus* in corn. U.L.Diner., R.L.Asquith., J.W.Dickens. Eds. Opelika. Alabama.
- 18a. Egan, H., Stoloff, L., Categnaro, M., Scott, P., K, O'neill, I., Bartsch, H. Environmental Carcinogens Selected Methods of Analisis, Vol.5 some mycotoxins. pag.183-202.
19. ESPINAL José Raúl. 1987 . Comparación del método tradicional y el método mejorado para almacenar maíz a nivel de finca en Honduras. Memorias, Encuentro latinoamericano sobre almacenamiento y conservación de granos básicos. México, D.F.
20. FONSECA, H., Domingues, C., Neto, M.L. and Zambello, I.V. 1992. Influence of bag materials on the moisture loss and final aflatoxins content of unshelled peanuts stored with high moisture. Preliminary studies. VIII International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. México D.F.

21. FURLONG, B.E., Valente, S.M., Lasca, C.C. and Kohara, Y.E. 1992. Mycotoxins and fungi in Wheat stored in elevators in the state of rio grande do sul, Brazil. Vlll International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. México, D.F.
22. FORTNUM, B.A. 1987. Effects of environment on toxin development in preharvest maize. In Zuber, M.S., Lillehoj, and B.L. Renfro. Eds. Aflatoxine in maize. A proceedings of the workshop. CIMMYT, MEXICO, D.F.
23. FRIESEN, M., Bosch, F.X., Montesano, R. 1987. Métodos actuales para determinar la exposición humana a las micotoxinas. Segunda Conferencia Internacional Mixta. FAO/OMS/PNUMA sobre micotoxinas tema 9. Bangkok, Tailandia.
24. FROBISH, R.A., Bradley, D.D., Wagner, D.D., Long-Bradley, P.E. and Hairston, H. 1986. Aflatoxin residues in milk of dairy cows after ingestion of naturally contaminated grain. Journal of Food Protection, Vol. 49(10);781-785
25. GUEVARA, B.E., Martinez, F.H., Lopez, G.I. 1992. Study of **Fusarium spp** and its toxins which produce leucoencephalomalacia and equidae brain edema in the México state. Vlll International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. México D.F.
26. GOLDBLATT, L.A. 1969. Aflatoxin scientific background control, and implications. Ed. Goldblatt, L.A. Academic press, New York and London. Pag;100-101.
27. GONZALEZ, A.P. 1987. The use of urea as a control of aflatoxin in maize. In Zuber, M.S., Lillehoj and B.L. Renfro.



Eds. Aflatox in In maize; Aprocceeding of workshop. CIMMYT, México, D.F.

28. GUTHIER, R.K. 1983. Food Sanitation. Ed. The saubrook Press, Inc. USA. cap.5 pag. 95-107.
29. GUZMAN DE P.D., Anguiano, R.G., Medina, A.J. 1988. Modification of the method 1 AOAC (CB-method) for the detection of aflatoxins. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 49:485-489.
30. GUZMAN, DE P D., L. Mathieu y J.J. Peña Cabriales. 1985. Presencia de aflatoxinas en maíz recién cosechado. CINVESTAV IPN. Irapuato, Gto.. México. Rev. Lat-Amer. Microbiol. 27; 249- 252.
31. HAMILTON, P.B. 1987. Aflatoxicosis in farm animals. In Zuber, M.S., Lillehoj and B.L. Renfro. Eds. Aflatoxin in México; Aprocceeding on workshop. CIMMYT, México, D.F.
32. HARRIS, T.M., Stone, M.P., Gopalakrishnan, S., Baertschi, S.W., Raney, K.D. and Byrd, S. 1989. Aflat5oxin B1 epoxide, the ultimate carcinogenic form of aflatoxin B1: synthesis and reaction with DNA. J. Toxicol.-Toxin Reviews, 8; 111-120.
33. HEATHCOTE, J.G., Hibbert, J.R. 1987. Aflatoxin; Chemical biological aspects. Ed. Heathcote, J.G. and Hibber, J.R. Elsevier Scientific Publishing Company. Amsterdam Oxford-New York.
34. HELFERICH, W.G., Garrett, W.N., Hsieh, and Baldwin, R.L. 1986. Feedlot performance and tissue residues of cattle

- consuming diets containing aflatoxins. *J. Anim. Sci.* 62:691-696.
35. HOERR, J.F. and D'Andrea, H.G. 1983. Biological effects of aflatoxin in swine. Aflatoxin and *Aspergillus flavus* in corn. In U.L. Diner., R.L.Asquith., J.W.Dickens. Eds. Opelika, Alabama.
36. HOWES, A.W., Dutton, M.F. and Chuturgoon, A.A. 1991. Metabolism of aflatoxin B1 by *Petroselinum crispum* (parsley). *Mycopathologia* 113; 25-29.
37. JELINEK, CH.F. 1987. Distribución de las micotoxinas; Análisis de datos mundiales sobre productos básicos, incluidos los datos del programa conjunto internacional FAO/OMS/PNUMA sobre vigilancia de la contaminación de los alimentos. Segunda conferencia internacional mixta. Bangkok, Tailandia.
38. JEREMIJA , Lj.R., Skrinjar, M. and Markov, S. 1991. Decrease of aflatoxin B1 in yoghurt and acidified milks. *Mycopathologia*. 113; 117-119.
39. JONES, R.K. 1987. The influence of cultural practices on minimizing the development of aflatoxin in field maize. In Zuber, M.S., Lillihøj and B.L.Renfro. Eds. Aflatoxin in maize; A proceeding of workshop. CIMMYT, México, D.F.
40. KIESSLING, K.H., Pettersson,H., Sandholm, K. and Olsen, M. 1984. Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, Zearalenone, and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa,

- and rumen bacteria. Applied and environmental microbiology. 47(5) 1070-1073.
41. LILLEHOJ, E.B. 1983. Effects of environmental and cultural factores on aflatoxin contamination of developing corn kernels. Aflatoxin and *Aspergillus flavus* in corn . U.L. Diner., R.L.Asquith., J.W.Dickens. Eds. Opelika, Alabama.
  42. LILLEHOJ, E.B. and Wall, J.H. 1987. Decontamination of aflatoxin-contaminated maize grain. In Zuber,M.S., Lillihøj and Renfro, B.L.Eds. Aflatoxin in maize; Aprocedin of workshop: CIMMYT, México, D.F.
  43. LYNCH, P.J., Smith, F.D., Covey, C.F. and Gordon, H.C. 1974. Aflatoxin and nitrogen balance in the young calf. Journal of Dairy Science vol.56. No.9. 1154-1158.
  44. LYNCH, P.G., Shalkop, T.W., Jacoby, M.N., Smith, F.D. and Miller, R.W.1972. Journal of Dairy Science Vol. 54, No.11.
  45. Manuales para el control de calidad de los alimentos., 1991. Capacitación en análisis de micotoxinas. estudio FAO alimentación y nutrición. 14/10 Roma.
  46. MANN, D.D., DVM, PhD, Buening, G.M., Hook, B., Osweiler, G.D. 1983. Effects of T-2 mycotoxin on bovine serum proteins. Am J Vet Res, 44 (9) 1757-1759
  47. MARQUEZ, M.R., Tejada, C.I. and Madrigal, E. 1992. Genotoxicity of aflatoxin B1 And its amonium derivaties. Vlll International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. México,D.F.

48. MARQUEZ, M.R., and Tejada, C.I. 1992. Aflatoxin adsorbent capacity of two mexican aluminosilicates in chick's diets experimentally contaminated. VIII International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. México, D.F.
49. MAXWELL, S.M., Apeagyei, F. Vries, H.R., Mwanmut, D.D. and Hendrickse, R.G. 1989., Aflatoxins in breast milk, neonatal cord blood and sera of pregnant women. J. Toxicol.-Toxin Reviews; 8(2) 19-29.
50. Mc MILLIAN, W.W., 1987. Relation of insects to aflatoxin contamination in maize grown in the southeastern USA. In Zuber, M.S., Lillehoj and B.L. Renfro. Eds. Aflatoxin in maize: A proceeding of Workshop. CIMMYT, México, D.F.
51. MOERCK, K.E., McElfresh, P., Wohlman, A. and Hilton, W.B. 1980. Aflatoxin destruction in corn using sodium bisulfite, sodium hydroxide and aqueous ammonia. Journal of food protection; 43 (8) 571-574.
52. MOUNDIPA, P. and Domngang, M.f. 1991. Effect of the leafy vegetable *Solanum nigrum* on the activities of some liver drug-metabolizing enzymes after aflatoxin B1 treatment in female rats. Journal of nutrition; 65, 81-91.
53. NICHOLS, T.E. 1987. Aflatoxin in the southeastern USA. In Zuber, M.S., Lillehoj and B.L. Renfro. Eds. Aflatoxin Maize; A proceeding of workshop. CIMMYT, México, D.F.
54. NUGUIB, K., Ashry, E., Abd-ELGALIL, M. 1992. Detoxification of aflatoxin- contaminated corn by ammoniation. VIII

International Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins.

México,D.F.

55. NYHOLM, N., Settergren, P., Kusk, O.K. 1992. Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. Environmental Toxicology and Chemistry; 11, 157-167.
56. PAYNE, G.A. 1987. **Aspergillus flavus** infection of maize: silks and kernels. In Zuber, M.S., Lillehoj and B.L. Renfro. Eds. Aflatoxin in maize; A procceding of workshop. CIMMYT, D.F. 25.
57. PEDUGSORN, S.C., Promma, P. Ratanachot and Rietschel, W. 1980. Chronic aflatoxicosis in cattle on an animal breeding station in north Thailand. Animal Research and Development. vol; 11.
58. PETTERSSON, H., Holmberg, T., Larsson, K. and Kaspersson, A. 1989. Aflatoxins in acid-treated grain in sweden and occurrence of aflatoxin M1 in milk. J Sci Food Agric. 48; 411-420.
59. PIER, A.C. 1987. Aflatoxicosis and immunosuppression in mammalians animals. In Zuber, M.S., Lillehoj and Renfro, B.L. Eds. Aflatoxin in maize; Aprocceeding of worshop; CIMMYT, México,D.F.
60. PRADO, G., Leite, B. and Nicácio, M. 1992 . Comparative study of analytical methods for aflatoxin quantification in animal feed. Vlll, International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. México,D.F.
61. RAY, A.C., Abbitt, B., Cotter, R.S., Murphy, J.N., Reagor, C.J, Robinson, M. R., West, J.E. and Whitford, W.H. 1986. Bovine

- abortion and death associated with consumption of aflatoxin-contaminated peanuts. JAVMA, Vol 188, No. 10. May 15.
62. RICHARD, J.L., Pier, A.C., Subblefield, R.D., Shotwell, O.L., Lyon, R. L. and Cutlip, R.C. 1983. Effect of feeding corn naturally contaminated with aflatoxin on feed efficiency, on physiologic, immunologic, and pathologic changes, and on tissue residues in steers. Amer. J. Vet. Res. 44(7) 1294-1299.
  63. ROSILES, M.R. 1987. Micotoxicosis in farm animals. In Zuber, M.S., Lillehoj and B.L. Renfro. Eds. Aflatoxin in maize; A proceeding of workshop. CIMMYT, México, D.F.
  64. ROGER, B. Harvey, DVM, MS; Timothy D. Phillips, PhD; Jeffrey A. Ellis, BS; Leon F. Kubena, PhD; William E. Huff, PhD; H.D. Petersen, PhD. 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, Vol 52, pag 1556-1559
  65. SABINO, M, Purchio, A., Milanez, V.T., 1992. Aflatoxins B1, M1 and aflatoxicol in tissues and urine of calves receiving aflatoxin. VIII International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phicotoxinas.
  66. SARH. 1985. Anuario Estadístico. Ed. Secretaría de Programación y Presupuesto (SPP) México, D.F.
  67. SAMARAJEWA, U., Sen, A.C., Ahmed, E.M. and Wei, C.I. 1991. Inactivation of aflatoxin B1 in corn meal, copra meal and peanuts by chlorine gas treatment. Fd. Chem. 29(1) 41-47.

68. SCRIBAN, R. 1985. Biotecnología. Ed. el manual moderno. cap. 3. Biquímica microbiana . 61-129.
69. SCOTT, M.P. 1992. Mycotoxin Methodology. Vlll International IUPC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. Mexico, D.F.
70. SAUER, D.B. 1987. Conditions that affect growth of *Aspergillus flavus* and production of aflatoxin in stored maize. In Zuber, M.S., Lillehoj, and B.L., Renfro. Eds. Aflatoxin in maize; Aprocedings of the workshop. CIMMYT, México, D.F.
71. SHIMADA, A.S. 1984. Fundamentos de nutrición animal comparativa. cap.1.
72. SAYED, O.H. and Fadl-Allah, E.M. 1982. Influence of aflatoxin B1 on growth, photosynthetic oxygen evolution and regreening of *Chlorella fusca* (Chorococcales, Chlorophyta). Cryptogamie, Algol.13 (1) 45-48
73. STACK, E.M., Gay, C.L., Fernández, C. And Pohland, B. Albert. 1992. Occerrence and confirmation of the identity of fumonisin B1 and B2 in corn-based food. Vlll International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. México, D.F.
74. SISSON, P.F. 1987. The effect of climatic conditions on the incidence and severity of aflatoxin in the USA. In Zuber, M.S., Lillehoj and B.L. Renfro. Eds. Aflatoxin in maize; Aprocceeding og workshop. CIMMYT, Mexico, D.F.
75. STUBBLEFIELD, R.D., Pier, A.C., Richard, J.L. and Shotwell, O.L. 1983. Fate of aflatoxins in tissues, fluids, and

- excrements from cows dosed orally with aflatoxin B1. *Am J. Res*, Vol 44, No.9. 1750-1752.
76. SURYNARAYANA, A.M., Rama Rao, P., Mahender, M. 1984. A study of biochemical and haematological changes in experimental aflatoxicosis in cattle and buffalo calves. *Indian Vet. J.* 61; 911-917.
77. TANTAQUI- ELARAKI, A., Khaddor, M., Saidi, B. 1992. Elimination of aflatoxin M1 by mesophilic lact acid bacteria. VIII International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. Mexico, D.F.
78. THIEL, P.G., Marasas, W.F.O., Shephard, G.S. and Sydenham, E.W. 1992. Exposure of humans and animals to fumonisins, carcinogenic metabolites of *fusarium moniliforme*. VIII International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. México, D.F.
79. TEJADA, C.I. 1985. Manual de laboratorio para análisis de ingredientes utilizados en la alimentación animal. Palo alto, D.F.
80. THURSTON, R.J. Cook, W., Driftmier, K., Richard, L.J. and Sacks, M.J. 1986. Decreased complement and bacteriostatic activities in the sera of cattle given single or multiple doses of aflatoxin. *Am J Vet Res*, vol 47, No.4. 846-849
81. TRUCKSESS, W.M., Richard, L.J., Stoloff, L., McDonald, S.J., Brumley, C.W. 1982. Absorption and distribution patterns of aflatoxicol and aflatoxins B1 and M1 in blood and milk of cows given aflatoxin B1. *Am J Vet Res*, Vol 44 (9) 1753-1756.



82. TORRES, E., Nacha, R.L., Acuña, K, Montoya, R. and Castrellón, J.P. 1992. Quantification of aflatoxins in corn distributed in the city of Monterrey, N.L. VIII International IUPAC Mycotoxins and Phycotoxins. México, D.F.
83. TUTELYAN, V.A., Sobolev, V.S., Rrybakova, N.V. and Eller, K.I. 1989. A survey using normal phase hplc of aflatoxin in domestic and imported foods dairy products in the USSR. J.Toxicol.-Toxin Reviews, 8 (1) 375-387.
84. TYCZKOWSKA, K. 1987 Hutchins, E.J., and Hagler, W.M., 1984. Liquid chromatographic determination of aflatoxin M1 in milk. J.Assoc. off Anal. Chem. 67 (4) 739- 741.
85. VAN DIJK, H.J., O'Dell, G.D. and Bodine, A.B. 1984. Effects of aflatoxin M1 intake at physiologic levels on newborn dairy calves. Am J Vet Res, Vol 45, No.10.1994-1984.
86. VAN EGMON, H.P. 1987. Situación actual de la reglamentación relativa a las micotoxinas; panorámica sobre tolerancias y estado de los métodos normalizados de toma de muestras y análisis. Segunda conferencia Internacional mixta FAO/OMS/PNUMA sobre micotoxinas. Tema No 9 Bangkok, Tailandia.
87. Van Egmond, H.P. 1992. Mycotoxins, quality assurance materials and control. VIII International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. México, D.F.
88. VAZQUEZ Márquez Juan, Aguilera Amezcua Augusto, Fu Chang José, Velázquez Ezequiel Fernando. 1987. Importancia del almacenamiento y conservación de los granos en la

- fabricación de alimentos balanceados pecuarios en albamex. Memorias, Encuentro latinoamericano sobre el almacenamiento y conservación de granos básicos. México,D.F.
89. VAZQUEZ, T.E., Peña, V.B. 1992. Effect of aflatoxins in electron transport chain of **Zea mays** chloroplasts.VIII International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. México,D.F.
  90. VIEIRA, M. JD., Da Cruz, H.L. and Da Cunha, O.P. 1992. Toxigenic fungi in chese. VIII International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins.México,D.F.
  91. VIEIRA, M.JD. and Da Cruz , H.L. 1992. Diffusion of aflatoxin and citrinin in cheese.VIII International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. México,D.F.
  92. WALTER, W.A., Edds,T.G.and Asquith, R.l. 1981. Effects of aflatoxins in young ponies.Am J Res, 42 (12) 2162-2164.
  93. WALLACE, H.A. 1981. Micotoxin teratogenicity and mutagenicity Ed. Wallace H.A. CRC Press Inc. Boca raton, Florida.
  94. WALLIN, J.R. 1987. Maize yields and the incidence and leveles of aflatoxin in preharvest maize. In Zuber, M.S., Lillehoj and B. L. Renfro. Eds. Aflatoxin in maize; Aproceeding of the workshop. CIMMYT, México, D.F.
  95. WIDSTROM, N.W. 1987. Breeding strategies to control aflatoxin contamination of maize through host plant resistance. In Zuber, M.S., Lillehoj and B.L. Renfro. Eds. Aflatoxin in maize:Aproceeding of the workshop. CIMMYT, México, D.F.

96. WILSON, D.M. 1987. Detection and determination of aflatoxins in maize. In Zuber, M.S., Lillehoj and B.L. Renfro. Eds. Aflatoxin in maize; A proceeding of workshop. CIMMYT, México, D.F.
97. WOGAN, N. Gerald. 1992. Experimental and epidemiological evidence associating aflatoxin exposure, liver cancer risk and the involvement of oncogenes and tumor suppressor genes in liver carcinogenesis in humans. VIII International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. México, D.F.
98. WYATT, R.D., Neathery, W.M., Moos, H.W., Miller, J.W., Gentry, P.R. and Ware G.O. 1985. Effects of dietary aflatoxin and zinc on enzymes and other blood constituents in dairy calves. Journal of Dairy Science vol. 68. No. 2
99. ZEBER, M.S. 1987. International Survey on Natural aflatoxin occurrence in maize. In Zuber, M.S. Lillehoj and B.L. Renfro. Eds. Aflatoxin in Mexico, D.F.

## APÉNDICE

PRODUCCIÓN DE LECHE Y TIPO DE ALIMENTACIÓN UTILIZADA EN LAS  
DIFERENTES GRANJAS MUESTREADAS.

MUNICIPIO	GRANJA	PRODUCCIÓN (litros/día)	ALIMENTACIÓN
ACAMBARO			
	Soto	210	alfalfa, trébol y concentrado comercial para vacas lecheras. ( (c.c.v.l.) )
	Presa de Solís	50	alfalfa, avena, <u>maíz</u> , sorgo molido, rastrojo verde y (c.c.v.l.) 2 kilos/vaca/día. (Kg/v/d)
	Guadalupe	30	alfalfa, rastrojo de <u>maíz</u> , avena y concentrado 2 Kg/v/d.
	Tapia Durán	195	alfalfa, avena, pata de sorgo, sorgo molido y salvado.
	Portezuelo	150	alfalfa, avena, pata de sorgo y (c.c.v.l.).

Núñez	8	alfalfa, rastrojo de <u>maíz</u> , sorgo molido y (c.c.v.l.) 2 Kg/v/d (a veces)
Los Fresnos	40	alfalfa, avena, <u>maíz molido</u> y rastrojo de maíz.
Hacienda Nueva	250	alfalfa, avena, <u>rastrojo de maíz</u> y (c.c.v.l.)

## SAN MIGUEL ALLENDE

Santa Rosa	13 800	alfalfa picada y secada 48 h al sol, alfalfa deshidratada, avena, trigo, cebada, <u>semilla de algodón desperdicios de Kellog's</u> (*) y (c.c.v.l.) 10.5 (Kg/v/d).
Santa Cruz	300	alfalfa, <u>silo de maíz</u> y (c.c.v.l.) 3 Kg/v/d
El Fraile	50	alfalfa fresca, avena, nopal y <u>maíz molido</u> cada 3 días.

Santa Teresita	300	alfalfa, <u>silo de maíz</u> y (c.c.v.l.) 5 Kg/v/d
San José de Jesús	40	alfalfa y avena.
Teposanes	80	alfalfa, avena, <u>rastrojo de maíz</u> y sorgo.
San Margarito	300	alfalfa, <u>silo de maíz</u> , avena y (c.c.v.l.) 6Kg/v/d
Los Rodríguez	50	alfalfa, avena y con- centrado 3 Kg/v/d.

## DOLORES HIDALGO

31 De Marzo	60	alfalfa, rastrojo de <u>maíz</u> y avena.
Ejido del llanito	60	alfalfa, rastrojo de maíz y <u>maíz molido</u> .
El Ejido	20	alfalfa y rastrojo de maíz
Ordóñez	25	alfalfa, <u>maíz molido</u> con <u>pasta de coco</u> y avena
San Pablito	40	zanahoria, <u>silo de maíz</u> y rye grass.

Exhacienda la	17	sorgo y <u>maíz molido</u>
Los Lupes	40	avena, <u>maíz molido</u> y rastrojo
Jesús María	20	alfalfa, avena y rastrojo.
Vázquez	25	alfalfa y rastrojo de maíz
El Tanque	40	alfalfa, rastrojo de maíz y avena
Cerrito de San Pablo	50	alfalfa y rastrojo de maíz.

## IRAPUATO

San Isidro	1300	alfalfa picada, rye grass azul de kentuky, pata de sorgo, (c.c.v.l.) 2.5 Kg/v/d
La Esperanza	4000	pradera artificial con 3 pastos, 3 tréboles y (c.c.v.l.) 1 Kg por cada 3 l de leche producida
San Vicente	2000	alfalfa deshidratada, pata de sorgo, rastrojo de

		maíz , sorgo, alfalfa, <u>se-</u> <u>milla de algodón</u> , hari- na de soya, desperdicio de panadería.
El Progreso	1500	pradera artificial, alfal- fa, sorgo, salvado, harinoli- na, germen de maíz, <u>pasta de</u> <u>coco, desperdicio de Kellogg's</u> (c.c.v.l.) 1 k/2lt de leche
Saurda	300	alfalfa deshidratada, ra- trojo de maíz y sorgo y (c.c.v.l.) 3 k/l de leche
San Miguelito	3000	alfalfa, sorgo, <u>maíz amari-</u> <u>llo</u> , rye grass, melaza y (c.c.v.l.) 6 Kg/v/d
El Milagro	1500	alfalfa deshidratada, <u>ma-</u> <u>íz amarillo</u> y (c.c.v.l.) 12 Kg/v/d
Munguia	300	alfalfa, rastrojo de maíz y (c.c.v.l.).



## LEON

Rancho la Cruz	850	alfalfa deshidratada, sor- go, <u>maíz molido</u> y (c.c.v.l.) 8 k/v/d.
Santa María de Guadalupe	1200	alfalfa deshidratada <u>silo de maíz</u> , avena y (c.c.v.l.) 9 Kg/v/d
Rancho vaciado de San Antonio	1300	alfalfa deshidratada, <u>si- lo de maíz</u> y (c.c.v.l.) a base de salvado de trigo <u>semilla de algodón</u> , pasta de de soya, sorgo melaza y <u>harina de sangre</u> .
Hacienda de hoconoxtle	80	alfalfa verde, avena, sor- go, trigo, rastrojo y con- centrado 3 Kg/v/d
Santa Rosa	25	alfalfa, <u>maíz</u> , sorgo, ras- trojo molido, pata de trigo suplemento para cerdos y ganado.
Santos Guerra	50	Alfalfa Deshidratada, ras- trojo de maíz y sorgo, <u>silo de maíz</u> y (c.c.v.l.) 2 Kg/v/d.

Plan de Ayala	30	alfalfa fresca, <u>mazorca molida</u> y sorgo molido.
Vega	70	alfalfa deshidratada, <u>silo de maíz</u> , paja de cebada y (c.c.v.l.) a base de sorgo cebada, melaza , harina de pluma y sangre.
Carretera a Santa Rosa	2100	alfalfa, <u>silo de maíz</u> y (c.c.v.l.)
Providencia	1000	alfalfa, <u>silo de maíz</u> y (c.c.v.l.) a base de sorgo, harina de sangre, gluten de maíz, grano seco de cervecería cáscara de soya, <u>semilla de algodón</u> y melaza.
San Peñrto	110	rastrojo de maíz y alfalfa deshidratada.
Guadalupe	7500	alfalfa deshidratada, <u>silo de maíz</u> , (c.c.v.l.) 3 k/l de leche producida, a base de grano seco de cervecería, harina de carne, <u>semilla de</u>

		<u>algodón</u> , desperdicios, citricos y harina de pollo.
Capricho	4000	alfalfa, avena, <u>silo de maíz</u> o sorgo, rye grass, (c.c.v.l.) 1 Kg/2 l de leche a base de grano seco de cervecería, sorgo, <u>semilla de algodón</u> , gluten de maíz, cáscara de soya, salvado de trigo y harina de sangre.
Cementos	1000	alfalfa, rastrojo de maíz o sorgo , paja y (c.c.v.l.).
Cementos	150	rastrojo de maíz, sorgo, alfalfa fresca y (c.c.v.l.).
Don Alfredo	3400	alfalfa, <u>silo de maíz</u> , ray grass, (c.c.v.l.) 1k/2l de leche a base sorgo, <u>maíz</u> <u>amarillo</u> , cáscara de soya, gra- no seco de cervecería, <u>semilla</u> <u>de algodón</u> y melaza.
Carretera a Santa Rosa.	150	alfalfa, <u>silo de maíz</u> , avena fresca y (c.c.v.l.).

## PENJAMO

NU-3		alfalfa deshidratada, pata de sorgo , (c.c.v.l.) 1kg/2l de leche.
La M. de Aguilar	300	pata de sorgo, alfalfa fresca harina de sorgo, caña fresca de maíz y (c.c.v.l.).
La M. de Aguilar	250	alfalfa deshidratada, sorgo molido , pata de sorgo y (c.c.v.l.).
La M. de Aguilar	100	alfalfa deshidratada, rastrojo de maíz, pata de sorgo y (c.c.v.l.).
La M. de Aguilar	150	rastrojo de maíz, sorgo y trigo, alfalfa deshidratada, <u>maíz</u> y sorgo molido más (c.c.v.l.).
La Estrella	15	alfalfa deshidratada, salvado, rastrojo de maíz y sorgo además de (c.c.v.l.) para cerdos.
El Chiflido	20	alfalfa y rastrojo

La Troja	15	alfalfa deshidratada, rastrojo de maíz , sorgo o trigo y <u>maíz</u>
La Troja	10	rastrojo de maíz y pata de sorgo.
La Trinidad	10	alfalfa y rastrojo de maíz
La Trinidad	15	cebada y pata de sorgo
se compro en la calle	3	

## SAN FELIPE

Guadalupe	3500	alfalfa, avena silo de maíz y (c.c.v.l.) 11Kg/v/d a base de semilla de algodón, cascarrilla de soya , sorgo , desperdicio de y Kellogg's y melaza.
La Franca	3500	alfalfa semi- achicalada, ray grass, silo de maíz concentra-

			do , 11Kg/v/d a base de harina de sangre de pluma sorgo, semilla de algodón, maízoro y melaza.
Las Vacas	70		alfalfa y silo de maíz
Ojo de Agua	4600		alfalfa, avena silo de maíz, (c.c.v.l.) 2Kg/v
San José	600	-	alfalfa deshidratada 10Kg/v/d <u>silo de maíz</u> 13Kg/v/d, ray grass fresco 10Kg/v/d (c.c.v.l.) 6Kg
San Martín	2800		alfalfa, avena, (c.c.v.l.) 4Kg/v/d
Santa Cecilia	4000		alfalfa, avena, silo de maíz , rye grass (c.c.v.l.) 7Kg/v/d a base de sorgo, harina de sangre, harina de carne , pollo, cascarilla de soya
Barroso	4000		alfalfa, <u>silo de maíz</u> , ray grass fresco, (c.c.v.l.) 8Kg/v/d
Estación Chirimoya	25		alfalfa deshidratada y <u>silo de maíz.</u>

## SAN LUIS DE LA PAZ

San Isidro	12	rastrojo de maíz, cebada y quelite.
San Rafael de Fatima	10	alfalfa, maguey, rastrojo de maíz y nopal chamuscado.
San Pablo	1040	alfalfa 10Kg/v/d, salvado, (c.c.v.l.) 9Kg/v/d
Tepetate	200	alfalfa, (c.c.v.l.)
Tepetate	100	alfalfa fresca
La Laguna	100	alfalfa fresca
Don Luis	800	alfalfa, avena, rastrojo de maíz
El Trébol	250	alfalfa fresca, avena, rye grass y <u>maíz molido</u>

## SILAO

Coecillo	400	alfalfa, <u>silo de maíz</u> , avena, pata de sorgo y (c.c.v.l.).
----------	-----	---

El 13	3200	alfalfa verde, zanahoria, repollo, papas lechuga, <u>silo de maíz</u> , (c.c.v.l.) a base alfalfa, <u>maíz</u> , salvado, harinolina
Los Alamos	300	alfalfa, rastrojo de maíz y (c.c.v.l.).
Centro de acopio Liconsa (Medranos)	11 000 totales 5 600 a la hora de muestrear	
Fojas novas	7500	alfalfa deshidratada, <u>silo de maíz</u> (c.c.v.l.) 12 Kg/v/d a base de sorgo <u>semilla de algodón</u> , harina de sangre y megalac 1Kg/v/d
El Tigre		
Feva	3500	alfalfa, <u>silo de maíz</u> , concentrado 7 Kg/v/d a base de



Puerto Rico

4000

harina de pollo, semilla de algodón y pasta de soya.

alfalfa, (c.c.v.l.) 8Kg/v/d a base de harina de sangre, sorgo semilla de algodón, gluten de maíz, harinolina y melaza.