

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS DE LA SALUD



MAESTRÍA EN CIENCIAS DE SALUD AMBIENTAL

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS PRESENTA:

**“Evaluación de la contaminación por aflatoxinas en alimentos
para bovinos y aflatoxina M₁ en leche cruda y quesos producidos
en la región de los Altos y Ciénega, Jalisco”**

LIC. ARMANDO MODESTO TORAL FLORES

DRA. RUTH DE CELIS CARRILLO (DIRECTORA)

DR. ALFREDO FERIA VELASCO (ASESOR)

DR. ARTURO FIGUEROA MONTAÑO (ASESOR)

DRA. WALDINA P. REYES VELAZQUEZ (ASESORA EXTERNA)

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jalisco, Enero 2010

INDICE GENERAL

	Página
AGRADECIMIENTOS	i
INDICE DE TABLAS Y FIGURAS	ii
ABREVIATURAS	iii
RESUMEN	iiii
I. INTRODUCCION	1
II. JUSTIFICACION	3
III. OBJETIVOS	4
IV. HIPOTESIS	5
V. MARCO TEÓRICO	6
1. Generalidades de las micotoxinas	6
2. Aflatoxinas	7
2.1. Biotransformación de AFB ₁ a AFM ₁	8
2.2. Mecanismo de acción de las aflatoxinas	10
2.3. Efectos biológicos	12
2.3.1. Efectos en bovinos	12
2.3.2. Efectos en humanos	13
2.3.2.1 Carcinogénesis hepática	14
2.4. Destoxicación y eliminación	15
2.5. Incidencia de Aflatoxinas y AFM ₁ en alimentos	16
2.5.1. Aflatoxinas	16
2.5.2 Aflatoxina M ₁	17
2.6. Normatividad y Regulaciones para Aflatoxinas	19
2.7. Medidas de control y prevención para aflatoxinas	21
2.7.1 Uso de agentes adsorbentes	24

	Página
VI. METODOLOGIA	25
1. Caracterización del tipo de estudio	25
2. Determinación de Aflatoxinas totales en raciones de bovinos	28
2.1. Muestreo	28
2.2. Detección y cuantificación de aflatoxinas mediante ELISA	29
3. Determinación de AFM ₁ en leche cruda	30
3.1. Muestreo	30
3.2. Detección y cuantificación de AFM ₁ mediante ELISA	30
4. Determinación de AFM ₁ en quesos	32
4.1. Muestreo	32
4.2. Detección y cuantificación de AFM ₁ mediante ELISA	32
4.3. Confirmación de los niveles AFM ₁ mediante HPLC	33
4.4. Análisis estadístico de los resultados	33
4.5. Financiamiento del proyecto	34
VII. DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO	35
VIII. RESULTADOS Y DISCUSION	37
1. Detección de AFT en raciones de bovinos	37
2. Detección de AFM ₁ en leche	41
3. Detección de AFM ₁ en quesos	47
IX. CONCLUSIONES	56
IX. BIBLIOGRAFÍA	57
ANEXOS	69

AGRADECIMIENTOS

A Dios por todo lo que me ha dado

A la Universidad de Guadalajara por darme estudio y trabajo.

A mi directora Dra. Ruth de Celis Carrillo, a mis asesores Dr. Alfredo Feria Velasco y Dr. Arturo Figueroa Montaña por su valioso apoyo brindado.

En especial a la Dra. Waldina Patricia Reyes Velázquez por su apoyo incondicional, paciencia y consejos que me impulsaron a seguir adelante y no decaer, aún en los momentos más difíciles en mi proceso de formación, por que me supieron guiar hasta el final del camino.

A todos mis amigos que de una u otra forma contribuyeron a que continuara con mi proyecto.

ABREVIATURAS

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
EC	Comunidad Europea
ELISA	Prueba de Inmunoensayo Competitiva
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
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
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 TABLAS

		Página
Tabla 1	Límites máximos permisibles de aflatoxinas en los cereales destinados para el consumo humano y animal según la NOM-188-SSA1-2002	20
Tabla 2	Niveles de aflatoxinas totales (AFT) en raciones de bovinos productores de leche en 8 municipios del Estado de Jalisco.	38
Tabla 3	Niveles de aflatoxina M1 en leche (AFM ₁) en 8 municipios del Estado de Jalisco.	42
Tabla 4	Niveles de AFM ₁ detectados en quesos artesanales elaborados en la región de los Altos, Jalisco.	48

INDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Estructura química de las aflatoxinas	8
Figura 2	Estructura química de la AFB ₁ Y AFM ₁	10
Figura 3	Mecanismo de acción y vías metabólicas involucradas en la biotransformación y detoxificación de aflatoxinas	11
Figura 4	Curva de calibración para la cuantificación de aflatoxinas totales (AFT) en ración.	30
Figura 5	Curva de calibración para la detección y cuantificación de AFM ₁ en leche.	31
Figura 6	Ubicación de los municipios en la región de los Altos de Jalisco y Ciénega (México) examinados durante Septiembre-Octubre de 2007.	36
Figura 7	Niveles de aflatoxina totales (AFT) (ppb) en raciones de 8 municipios del Estado de Jalisco.	39

RESUMEN

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios producidos principalmente por *A. flavus* y *A. parasiticus* y son causantes de 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 I (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 aflatoxinas totales (AFT) en raciones integrales de bovinos y de AFM₁ en leche cruda y quesos tipo fresco, adobera y asadero de producción artesanal en la región de los Altos, Jalisco. Para la realización del estudio se establecieron dos etapas de muestreo en septiembre y octubre de 2007 se obtuvieron muestras de leche cruda y ración integral de bovinos provenientes de 40 establos localizados en los municipios de Acatic, Jalostitlán, Ocotlán, San Juan de los Lagos, Tepatitlán, Tototlán, Valle de Guadalupe y Zapotlanejo y de enero a marzo de 2009 se recolectaron 64 muestras de queso artesanal todas las determinaciones analíticas se efectuaron mediante la técnica de Inmunoensayo de tipo competitivo (Inmunolab GmbH). Los resultados fueron contrastados mediante el análisis de varianza y se aplicó la prueba de Holm Sidak para comparar las diferencias entre municipios se utilizó el programa Sigma STAT V3.1 PARA Windows la prueba de Holm Sidak a un nivel de significancia de 95% aplicando el programa Sigma STAT v3.1 para Windows. Las raciones integrales de bovinos presentaron contaminación por AFT en el 92.5% de las muestras analizadas. Los niveles variaron de 4.82 a 24.90 µg kg⁻¹, mostrando diferencia estadística entre municipios ($P < 0.05$). Destacando mayor contaminación en el municipio de Tepatitlan, 9.3% de las raciones presentaron niveles superiores a los permitidos por la normatividad. AFM₁ se detectó en el 80% de las muestras de leche con un rango de 0.006 a 0.065 µg L⁻¹. Sin observarse diferencias estadísticas entre municipio ($P < 0.05$). Todas las muestras de leche evaluadas se encontraron dentro del límite establecido por la NOM. El 89% de las muestras de quesos artesanales fueron positivas a AFM₁, los niveles promedio en los quesos fresco, adobera y asadero fueron de 0.283 µg kg⁻¹, 0.313 µg kg⁻¹ y 0.246 µg kg⁻¹, sin que se observara diferencia estadística ($P > 0.05$) entre tipos de queso. El 22% de las muestras de queso el nivel máximo permitido de AFM₁ en leche establecido por la regulación mexicana. Se concluye que existe contaminación con AFT en las raciones de bovinos, así como AFM₁ en leche cruda y quesos artesanales elaborados en la región de los Altos, Jalisco, sin embargo se requieren mayores estudios que incluyan un mayor número de muestras que permitan estimar los riesgos de exposición a la salud de la población.

I. INTRODUCCIÓN

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por diferentes especies de hongos, biológicamente activos y causantes de intoxicaciones agudas y crónicas, con efectos mutagénicos, teratogénicos y carcinogénicos (Creppy, 2002). La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) estima que las micotoxinas afectan el 25% de la producción agrícola anual (Peraica, 1999).

Entre las principales micotoxinas destacan las aflatoxinas, las cuales poseen actividad mutagénica y carcinogénica y, por tanto, su presencia en los alimentos para el consumo humano y de animales representa un riesgo potencial para la salud de los mismos. La Agencia Internacional de Investigaciones contra 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 Estados Unidos de Norte América ha establecido que el nivel máximo tolerable de aflatoxinas en alimentos destinados a humanos y 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 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (FAO, 2004).

La contaminación de alimentos por aflatoxinas ha sido documentada ampliamente en diversos países, entre los que destacan maíz, cacahuate, cebada, pistachos, soya, especies y leche, substratos que han mostrado la mayor contaminación por estas toxinas. Si bien los reportes de intoxicaciones agudas en humanos han sido esporádicos, la tasa de mortalidad es de aproximadamente el 25% a causa de niveles altos de exposición a aflatoxinas (Cullen y Newberne, 1993). La frecuencia de presentación de intoxicaciones agudas son influenciadas por la escasez de alimentos o bajo condiciones de pobreza.

Los estudios sobre la exposición crónica a aflatoxinas involucra primeramente el análisis de alimentos preparados e ingredientes provistos comercialmente y en segundo lugar el estudio de biomarcadores de exposición obtenidos a partir de sangre, leche o muestras de orina de humanos, como los aductos de aflatoxinas-albumina que tienen vida media de 30 a 60 días, permitiendo integrar la exposición a periodos largos. Los reportes

paralelos de la contaminación de alimentos por aflatoxinas sugieren que la tasa de exposición biológica puede ser extrapolada de los datos encontrados en países desarrollados, a países en desarrollo en donde no existen estudios de biomarcadores de exposición (Williams *et al.*, 2004).

La información disponible de los efectos de las aflatoxinas en humanos y animales ha permitido demostrar las consecuencias que trae consigo esta exposición, en función del nivel de exposición, entre los que destacan: a) riesgo de cáncer, b) efectos graves en la nutrición infantil (interferencia con el aprovechamiento de minerales y vitaminas), c) inmunosupresión, y d) modulación de enfermedades infecciosas y títulos de anticuerpos en la vacunación de animales. Existen evidencias que sugieren que las aflatoxinas pueden ser un factor importante en las epidemias de HIV y en la incidencia de malaria (Williams *et al.*, 2004).

Los estudios muestran que la presencia de aflatoxinas es un factor de alto impacto que influye sobre 6 de los 10 riesgos a la salud más importantes identificados por la OMS en países en desarrollo, en donde el periodo de vida prevalente es corto, por lo tanto es de gran relevancia las mediciones sobre los niveles de contaminación en los alimentos destinados a consumo humano para mejorar la salud mundial

II. JUSTIFICACION

En México existen pocos estudios relacionados con los niveles de contaminación en leche y productos derivados como quesos, y dado que estos alimentos son para el consumo básico de la población, particularmente por el consumo de leche en niños, es necesario conocer los niveles de exposición a través de monitoreos periódicos que permitan establecer las estrategias para reducir los riesgos toxicológicos a la salud pública.

El presente estudio permitirá realizar un diagnóstico de la situación actual sobre la contaminación por aflatoxinas en las raciones de bovinos productores de leche, así como los niveles de aflatoxina M₁ en la leche cruda y queso tipo fresco, adobera y asadero que se producen en la región de los Altos y Ciénega, Jalisco.

Si bien existen Normas Oficiales sobre la regulación de los niveles de aflatoxinas en alimentos para bovinos productores de leche (NOM-188-SSA1-2002) y de AFM₁ en leche (NOM-184-SSA1-2002), no existe un programa de vigilancia para evitar que existan niveles de riesgo a la salud tanto de los animales como de humanos, particularmente de la población infantil, principales consumidores de leche.

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN:

¿ Existe contaminación por aflatoxinas en el alimento de bovinos productores de leche de la región de los Altos y Ciénega, Jalisco?

¿ Existe contaminación por aflatoxina M₁ en leche cruda y queso tipo adobera producidos en la región de los Altos, Jalisco ?

III. OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar la contaminación de aflatoxinas en alimentos de bovinos y aflatoxina M₁ en leche cruda y quesos que producen en la región de los Altos y Ciénega, Jalisco.

Objetivos particulares:

1. Detectar los niveles de contaminación de aflatoxinas en la ración totalmente mezclada (RTM) de bovinos en establos productores de leche de la región de los Altos y Ciénega Jalisco.
2. Cuantificar los niveles de aflatoxina M₁ en leche cruda de bovinos producida en establos de la región de los Altos y Ciénega, Jalisco.
3. Evaluar los niveles de aflatoxina M₁ en quesos fresco, adobera y asadero elaborados en forma artesanal en la región de los Altos, Jalisco.

IV. HIPÓTESIS

Puesto que la contaminación con aflatoxinas se presenta con frecuencia en alimentos de bovinos productores de leche, en la leche y quesos se encontrarán niveles de aflatoxina M_1 que representan riesgo a la salud pública.

V. MARCO TEÓRICO

1. Generalidades de las micotoxinas

Las micotoxinas son aquellos compuestos producidos por el metabolismo secundario de los hongos, tienen estructuras químicas muy diversas y son causantes de intoxicaciones agudas, crónicas y/o desencadenantes de patologías asociadas a la disminución de la respuesta inmune en humanos y animales. En la actualidad, se conocen cerca de 300 micotoxinas producidas por más de 100 especies de hongos (Yiannikouris y Jouany, 2002).

La exposición a micotoxinas en animales y humanos puede ocurrir a través de diversas vías de entrada, y se denomina “micotoxicosis” a los trastornos 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, pérdidas económicas importantes 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: temperatura, disponibilidad de agua, oxígeno, daño mecánico, interacciones microbianas, insectos, concentración de inóculo y capacidad toxigénica de/los hongos (Alfred y Magan, 2004).

La naturaleza de los efectos tóxicos observados en animales y humanos a causa del consumo ó exposición a micotoxinas pueden ser atribuidos a la constitución química de las mismas. Algunas ocasionan efectos agudos o 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).

2. 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, B₁, B₂ G₁, G₂, M₁ y M₂ (Figura 1). La AFB₁ es la forma más común y potente de estas toxinas (Klich *et al.*, 2000).

Las condiciones ambientales bajo las cuales los productos agrícolas son cultivados, cosechados, el transporte, manejo y almacenamiento pueden determinar la extensión de la contaminación en estos productos. Las temperaturas mínima, óptima y máxima para el crecimiento del *Aspergillus flavus* son: 6 - 8 °C, 36 - 38 °C y 44 - 46 °C respectivamente. Se requiere de una humedad relativa mínima de 80-90 por ciento para su crecimiento y para la esporulación una mínima de 85 por ciento pero los requerimientos de humedad dependen de la temperatura así como de los nutrientes (Salunkhe *et al.*, 1979).

La AFB₁ es biotransformada a través de diferentes vías, particularmente por el sistema microsomal hepático (citocromo P450), y genera por lo menos siete metabolitos, cada uno con diferente actividad biológica. 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 con el ADN y proteínas (Osweiler, 1996).

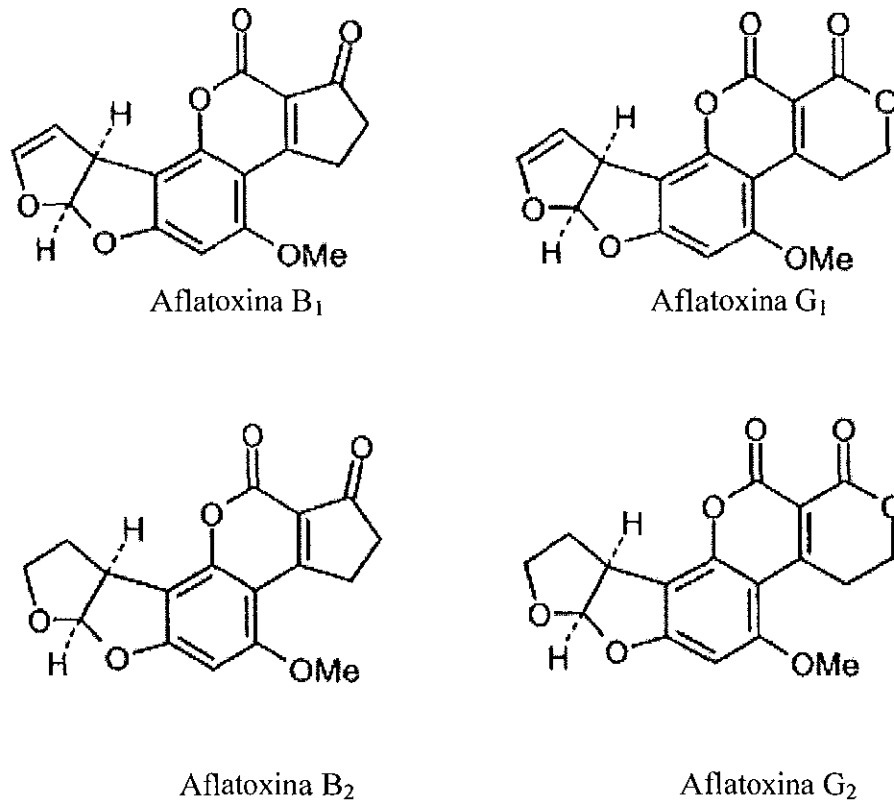


Figura 1. Estructura química de las aflatoxinas.

2.1. Biotransformación de AFB₁ a AFM₁

En ganado bovino la transferencia de aflatoxinas del alimento a la leche es de gran importancia cuando se consumen raciones contaminadas con AFB₁, la mayor parte se degrada en rumen, y una porción menor se absorbe para ser metabolizada rápidamente en el hígado a aflatoxina M₁ (Pettersson, 1997). Los metabolitos aparecen en la leche dentro de las primeras horas posteriores al consumo y alcanzan la máxima concentración a las 48 horas y regresan a niveles basales dentro de los 2-3 días posteriores al retiro de la toxina en la dieta (Ferbisch *et al.*, 1986 AFB₁; van Egmond, 1989; Whitlow *et al.*, 2000; Díaz *et al.*, 2004). Otros estudios realizados en cabras demuestran que AFM₁ puede ser encontrada 12 h después de la ingestión de AFB₁ y permanecer hasta 3 días después de la última ingestión de AFB₁ (Battacone *et al.*, 2003).

También se ha descrito absorción de aflatoxinas en la mucosa olfatoria (Larsson *et al.*, 1989), que podría resultar en un aumento en la presencia de AFM₁, posteriormente 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 media de transferencia para AFM₁ es de un rango de 0.32 a 6.2 %, con un promedio de 1.8 % y una desviación estándar de 1.22. El grado de biotransformación que ocurrirá en el hígado de las vacas que hayan consumido AFB₁ a través de la alimentación dependerá 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; Munskgaard *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. 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 ordeña 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 (Figura 2). 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).

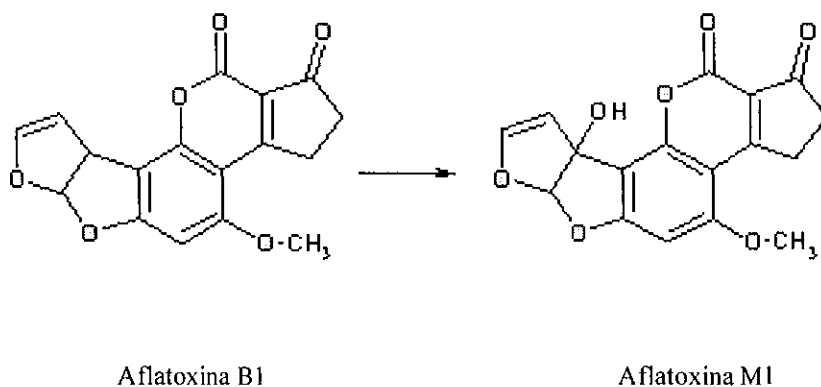


Figura 2. Estructura química de la AFB₁ y AFM₁

2.2. Mecanismo de acción de las aflatoxinas

Las aflatoxinas son metabolitos altamente tóxicos, con efectos mutagénicos, genotóxicos, carcinogénicos, teratogénicos y de inmunosupresión. La Agencia Internacional de Investigaciones contra 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 (Figura 3) 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 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).

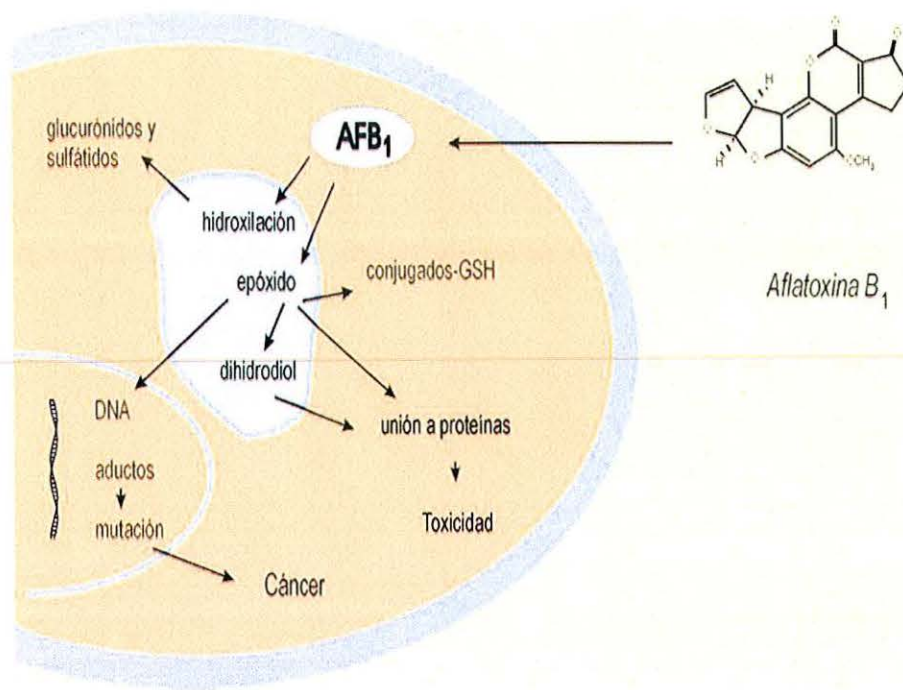


Figura 3. Mecanismo de acción y vías metabólicas involucradas en la biotransformación y detoxificación de aflatoxinas

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) han observado la peroxidación de lípidos y el consecuente daño oxidativo en los hepatocitos. El hígado es el órgano blanco de las aflatoxinas. 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 (Bennet 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 ó 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, y demostró 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 se demostró 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 del 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 AFM₁ puede ser asociada con la alta incidencia de tumores intestinales. No obstante, van Egmond (1989) concluyó que la toxicidad de AFM₁ es similar ó ligeramente menor que la AFB₁ en ratas y patos y, que la carcinogenicidad de AFM₁ es probablemente 1-2 veces menor que la AFB₁.

2.3. Efectos Biológicos

2.3.1. 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 rumiantes la intoxicación aguda por aflatoxinas se caracteriza por inapetencia, letargia, ataxia, pelo hirsuto y opaco, el animal puede morir en pocas horas ó 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).

Las aflatoxinas son pobremente degradadas en el rumen (< 10%) con formación de aflatoxicol, un potente tóxico derivado de AFB₁ (Auerbach *et al.*, 1998). Algunas bacterias son inhibidas por concentraciones menores de 10 ppm 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).

La aflatoxicosis crónica es sin embargo 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, con el consumo de 120 µg kg⁻¹ de aflatoxinas, cuando las vacas recibieron alimentación libre de aflatoxinas la producción de leche se incrementó 25% (Guthrie, 1979).

2.3.2. Efectos en humanos

El contacto 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 ó almacenamiento. La exposición secundaria ó micotoxiosis secundaria ocurre por el consumo de productos derivados de animales alimentados con raciones contaminadas con micotoxinas (Williams *et al.*, 2004).

El grado de exposición humana a las aflatoxinas por origen dietético que depende de los alimentos disponibles y de los hábitos alimentarios variará según los países, las condiciones locales (incluidas las tradiciones de los diferentes grupos étnicos) y las personas. En lugares donde el cacahuete o el maíz contaminados constituyen un elemento significativo de la dieta, la exposición será relativamente más alta que en los lugares donde se utilicen como alimentos básicos otros productos comúnmente menos

contaminados; o donde la leche sea el único elemento de la dieta que contenga aflatoxina. A este respecto, se cree importante identificar al lactante como sujeto potencialmente expuesto, a causa de que:

a) Los alimentos para bebés se pueden elaborar con leche desecada o incluso maíz, que como se sabe pueden fácilmente estar contaminados por aflatoxinas.

b) En términos de mayores cantidades de alimentos consumidos por kilogramo de peso corporal, cualquier cantidad de aflatoxina contaminante será más significativa en el niño que en el adulto.

Otro grupo de personas que está altamente expuesto son las personas que manejan cereales, raciones, cacahuete contaminados; y las que trabajan con toxinas puras como patrones para análisis.

2.3.2.1. Carcinogénesis hepática

Se ha observado una relación positiva entre ingestión de aflatoxinas y cáncer hepático en el hombre, en estudios de población en los cuales se han formulado de manera concurrente cálculos de la ingesta de aflatoxinas y la incidencia de cáncer hepático primario.

En un estudio en diferentes regiones de Uganda se observó que las mayores frecuencias de contaminación por aflatoxinas detectable en las muestras, se vinculaban con una mayor incidencia de cáncer hepático primario (de 1.4 - 15 casos por 100,000 habitantes de la población total por año).

La hepatotoxicidad de las aflatoxinas se ha confirmado en experimentos con animales y se han obtenido relaciones dosis-respuestas para diferentes especies. Aunque rara vez se han notificado casos de aflatoxicosis aguda en el hombre; es posible que esos casos no siempre hayan sido reconocidos. El caso más seguro de relación de las aflatoxinas con la enfermedad hepática aguda fue una epidemia de hepatitis tóxica en el noroeste de la

India en 1974. En esta epidemia varios centenares de aldeanos que habían consumido maíz, presumiblemente contaminado con cantidades de hasta 15 mg/kg de aflatoxinas exhibieron signos y síntomas de intoxicación, y más de un centenar de personas perdieron la vida (OPS, 1983).

La exposición a AFB₁ 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 podrían 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. 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)

2.4. 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 Glutation (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 una de las 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 torrente 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.

2.5. Incidencia de Aflatoxinas y AFM₁ en alimentos

2.5.1 Aflatoxinas

La presencia de aflatoxinas en algunos productos representan un 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, 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).

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. Reyes-

Velázquez *et al.* (2005) reportaron la presencia de aflatoxinas en harina de nixtamal en un rango de 2.7 a 17 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

2.5.2. Aflatoxina M₁

En Francia e Italia de 1991 a 1995 se efectuaron estudios en quesos para AFM₁ en 311 muestras, encontrándose niveles de 0.005 y 0.25 $\mu\text{g L}^{-1}$, el mayor porcentaje (65%) presentaba contaminaciones entre 0.005 y 0.10 $\mu\text{g L}^{-1}$. En Holanda durante 1994, 15 muestras de derivados de leche presentaron contaminaciones inferiores a 0.02 y 19 $\mu\text{g L}^{-1}$; muestras de alimentos para niños a base de leche mostraron niveles de AFM₁ entre 0.02 y 0.06 $\mu\text{g L}^{-1}$. En Alemania en 1996 se analizaron para AFM₁ 284 muestras de leche líquida encontrándose niveles inferiores a 0.01 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Jonker *et al.*, 1999).

En Portugal se evaluó la presencia de AFM₁ en muestras de leche líquida durante el año 1999. La incidencia de contaminación con AFM₁ fue de 80.6% para leche cruda con rangos <0.005 $\mu\text{g L}^{-1}$ (19.4%), 0.005-0.01 $\mu\text{g L}^{-1}$ (54.8%), 0.011-0.020 ppb (6,5%) y entre 0.021 y 0.05 $\mu\text{g L}^{-1}$ (19.3%) (Martins y Martins, 2000). Así mismo, se realizó la evaluación de muestras de yogurt detectando la presencia de AFM₁ en rangos de 0.019 a 0.098 $\mu\text{g L}^{-1}$ (18.8% de muestras positivas). Sólo el 4.2% de las muestras presentaron niveles entre 0.043 y 0.045 $\mu\text{g L}^{-1}$ de AFM₁ (Martins y Martins, 2004).

En Argentina, sobre un total de 77 muestras de leche analizadas sólo el 23% de las mismas presentaron niveles entre 0.01-0.03 $\mu\text{g L}^{-1}$. Por lo tanto, los resultados indicaron que las mismas se encontraron por debajo de nivel máximo permitido. Sin embargo, los autores destacan que AFM₁ fue detectada de manera más frecuente en leche en polvo (López *et al.*, 2003).

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 0.065-1.012 $\mu\text{g L}^{-1}$ resultando altamente superior al resto de la leche fluida (0.028-0.164 ppb).

Del total de muestras positivas, el 99% excedió el límite máximo permitido por la Comunidad Europea ($0.05 \mu\text{g L}^{-1}$) y el 9% el límite establecido para EUA ($0.5 \mu\text{g L}^{-1}$). 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 ($0.5 \mu\text{g L}^{-1}$).

En México existen pocas publicaciones de la contaminación con aflatoxinas en los productos lácteos y la mayoría se han realizado particularmente en la leche. Destaca el estudio realizado por Carvajal *et al.* (2003), quienes analizaron 290 muestras de leche pasteurizada y ultrapasteurizada de 1996 a 1997. La leche fue recolectada de los estados de Aguascalientes, Chihuahua, Coahuila, Durango, Hidalgo, Jalisco y Querétaro. Los resultados mostraron que el 40% de muestras analizadas tuvieron contaminación con AFM₁ en niveles $\geq 0.05 \mu\text{g L}^{-1}$, y 10% fueron $\geq 0.5 \mu\text{g L}^{-1}$. No se encontró relación entre el contenido de grasa de la leche y los niveles de AFM₁, además de no apreciarse reducción en la concentración de esta toxina por efecto de la pasteurización o ultrapasteurización. Se observó diferencia estadística entre los niveles promedio de AFM₁ en las marcas analizadas y los valores mayores se encontraron en las estaciones templadas y calurosas.

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 aprobados por la AOAC. Córdova-Izquierdo *et al.* (2007) determinaron directamente del tanque colector la presencia de AFM₁. Un total de 5 muestras recolectadas de acuerdo a los lineamientos de la NOM-091-SSA1-1994 fueron analizadas con la detección y cuantificación de AFM₁ por HPLC. 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.

2.6. Normatividad y regulaciones para Aflatoxinas

Según FAO (2004), al menos en 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, 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 µg día⁻¹ posee de 14-23 ng de los aductos lisina-aflatoxina (AFB₁ – lisina) en sangre (Liang *et al.*, 1988). Sabbioni *et al.* (1987) indican que la exposición crónica a AFB₁, resulta en niveles de AFB₁-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 (Tabla 1). Según la norma citada, los cereales con una concentración mayor de $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ de aflatoxinas no deben ser destinados a consumo humano, animales lactantes y productores de leche.

Puesto que la contaminación con aflatoxinas en alimentos es inevitable, ya que no pueden ser prevenidas ó 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 $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$ de aflatoxina M_1 en la leche, niveles considerados aptos para consumo humano por la FDA y la legislación Mexicana descrita en la NOM-184-SSA-1994. Sin embargo la Comunidad Europea y otros países consideran como nivel máximo permitido $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$ AFM_1 en leche y productos derivados (Commission Regulation (EC) N. 466/2001).

Tabla 1. 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

2.7. 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 (1988), 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%).

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; Mendez-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 fluoranthenvivorans* 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 (Gratz, 2007; Axelsson, 2004). 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).

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).

2.7.1. 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. 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*”.

VI. METODOLOGIA

El presente estudio se realizó en el periodo comprendido de Septiembre de 2007 a Junio de 2009. La etapa de muestreo se efectuó en la región de los Altos y Ciénega, Jalisco y las determinaciones analíticas en el área de Micotoxicología del Laboratorio de Residuos Tóxicos II del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) de la Universidad de Guadalajara. Se contó con la colaboración de una de las principales empresas lecheras de la región, la cual permitió el acceso a los establos en producción activa.

1. Caracterización del tipo de estudio

a) Monitoreo de aflatoxinas totales en raciones de bovinos y AFM₁ en leche cruda:

Estudio prospectivo, comparativo, observacional y transversal.

PROSPECTIVO: La información fue obtenida de establos lecheros en una etapa de muestreo comprendida entre los meses de septiembre y octubre del año 2007.

COMPARATIVO: Se compararon los niveles de aflatoxinas en 8 municipios del estado de Jalisco.

OBSERVACIONAL: Se analizaron los niveles de aflatoxinas en los alimentos de bovinos y la AFM₁ en la leche procedente de 40 establos (5 establos/municipio) sin manipular ninguna variable en campo.

TRANSVERSAL: Se realizó el muestreo en un solo período.

b) Detección de AFM₁ en quesos adobera en tres épocas del año:

Estudio prospectivo, comparativo, observacional y longitudinal

PROSPECTIVO: La obtención de muestras se realizó en establecimientos procesadores de quesos artesanales localizados en la región de los Altos, Jalisco. La recolección fue de Enero a Marzo 2009.

COMPARATIVO: Se compararon los niveles de AFM₁ en 3 diferentes tipos de quesos (fresco, adobera y asadero) en tres épocas del año.

OBSERVACIONAL: Se analizaron los niveles de AFM₁ en los quesos sin manipular el proceso.

LONGITUDINAL: Se realizó el muestreo en un periodo determinado.

Criterios de inclusión y exclusión

a. Estudio de aflatoxinas en alimentos de bovinos y AFM₁ en leche cruda

Inclusión:

- ❖ Establos lecheros con producción mínima de 700 litros por día de la región de los Altos y Ciénega.
- ❖ Bovinos de la raza Holstein
- ❖ Establos con ordeñadora mecánica
- ❖ Establos con tanque enfriador
- ❖ Leche cruda obtenida del día
- ❖ Establos que autoricen el muestreo

Exclusión:

- ❖ Establos lecheros con producción menos a 700 litros.
- ❖ Establos lecheros de otras regiones del estado de Jalisco.
- ❖ Bovinos de otras razas
- ❖ Establos que ordeñen manualmente

- ❖ Establos que carezcan de tanque enfriador
- ❖ Establos que no autoricen el muestreo

b. Estudio de la contaminación por AFM₁ en quesos de establecimientos de tipo artesanal

Inclusión:

- ❖ Quesos artesanales de tipo: fresco, adobera y asadero.
- ❖ Establecimientos productores de la región de los Altos, Jalisco
- ❖ Quesos elaborados con leche de la región
- ❖ Quesos producidos el mismo día del muestreo
- ❖ Que el establecimiento produzca los tres tipos de queso

Exclusión:

- ❖ Quesos elaborados con procedimientos tecnológicos
- ❖ Otros tipos de quesos
- ❖ Establecimientos productores de otras regiones del estado de Jalisco
- ❖ Quesos elaborados con leche de otras regiones
- ❖ Quesos producidos antes del día de muestreo

Variables

Por el tipo de estudio solo se tomaron en cuenta las variables cuantificables (niveles de aflatoxinas en el alimento de bovinos y AFM₁ en leche y quesos). No es posible considerar Variables Dependientes e Independientes, ya que no es posible relacionar los niveles de aflatoxinas en el alimento de bovinos con los niveles de AFM₁ en leche. Puesto que se ha documentado ampliamente que la biotransformación de aflatoxina B₁ a AFM₁ alcanza su pico a las 72 horas posteriores a la ingesta, no puede considerarse que los niveles detectados de dicha micotoxina se atribuyan a los presentes en el alimento del mismo día. Por otra parte, existen diversas variables entre los establos que impiden

correlacionar el alimento, entre estas que algunos integran a la ración concentrados comerciales, los forrajes pueden ser ensilado o rastrojo de maíz y en algunos establos además incluían avena y subproductos de destilería.

Principios éticos:

Por tratarse de un estudio importante para la salud humana, la evaluación de contaminación de aflatoxinas en alimentos de bovinos y AFM₁ en leche cruda, para poder realizarlo se requirió contar con la autorización de una importante empresa lechera de la localidad, por lo que se adquirió un compromiso de confidencialidad entre ambas partes para omitir los nombres de los establos en donde se obtuvieron las muestras de alimento para bovino y leche cruda. En el estudio de contaminación de AFM₁ en quesos no se requirió de ningún compromiso puesto que se compraran los quesos en diferentes lugares.

Financiamiento del Proyecto

El estudio del alimento a bovinos y leche cruda forma parte de los proyectos de investigación financiado por las empresas Süd Chemie S.A. de C.V., Bayer de México S.A. de C.V. y Técnica Mineral S.A. de C.V. con presupuesto de \$ 180,000.00 y para el de quesos fue financiado por el Departamento de Salud Pública con el número de proyecto P3e 84117.

2. Determinación de Aflatoxinas totales en raciones de bovinos

2.1. Muestreo

Un total de 8 municipios fueron seleccionados para el estudio: Acatic, Jalostotitlán, Ocotlán, San Juan de los Lagos, Tepatitlán, Tototlán, Valle de Guadalupe y Zapotlanejo. De cada municipio se seleccionaron 5 establos que tenían como criterios de selección una producción mínima de 700 L/día, caracterizados por disponer de ordeñadora mecánica y tanque enfriador. Se calculó el tamaño de muestra, para determinar el número

de establos representativos de la población en estudio, empleando el programa Open Epi Info (calculadora SSpropor) y la siguiente ecuación de cálculo:

$$n = [DEFF * Np(1-p)] / [(d^2 / Z^2_{1-\alpha/2} * (N-1) + p * (1-p)]$$

El tamaño de muestra fue calculado para un nivel de confianza del 95%, considerando un límite de confidencia (d) del 15%, una población activa (N) de 590 establos y una frecuencia anticipada del 50% (p). El valor DEFF (variable del tipo de muestreo) fue de uno correspondiente para muestras aleatorias. Los establos activos considerados para este estudio ($n= 40$), corresponden a los registrados por una de las principales empresas lecheras de la zona bajo estudio. Dicha empresa facilitó la recolección de las muestras de alimento y leche.

En cada establo se recolectaron muestras (3 kg) de las raciones (RTM) de los bovinos para determinar la contaminación por aflatoxinas totales AFT (AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂), las cuales fueron obtenidas directamente del comedero y trasladadas en bolsa de papel estraza al laboratorio de Micotoxicología. Fueron procesadas en un lapso no mayor a 48 horas.

2.2. Detección y cuantificación de aflatoxinas mediante ELISA

Las muestras globales de alimento fueron reducidas de manera representativa por la técnica de cuarteo. A partir de 20 g de muestra se realizó la extracción de AFT con 100 mL de metanol:agua (70:30 v v⁻¹). De manera independiente, se tomaron 200 µL del conjugado a cada pocillo conteniendo los estándares y las muestras (100 µL) previamente filtradas. Luego de mezclar, se transfirieron 100 µL a los pocillos con los anticuerpos y se incubaron durante 15 minutos. Luego de eliminar el contenido, los pocillos se lavaron con agua desionizada (5 veces). Se descartó el exceso de agua y se secaron los pocillos. Se adicionaron 100 µL de sustrato a cada pocillo y luego de incubar durante 5 minutos, se detuvo la reacción por adición de 100 µL de la solución stop. Los resultados de densidad óptica (DO) se obtuvieron en un lector de Elisa (Biotek 800) utilizando el filtro de 450 nm. Las concentraciones se calcularon por extrapolación de la

DO con la respectiva curva de calibración (Figura 5). El coeficiente de regresión lineal ($R=0.97$) permitió determinar el desempeño de la técnica en un rango de cuantificación entre 4-40 ppb ($\mu\text{g kg}^{-1}$).

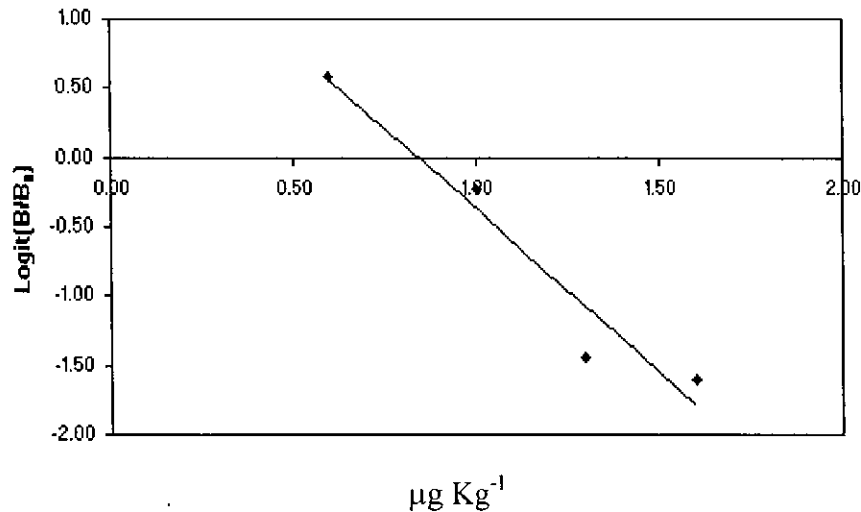


Figura 4. Curva de calibración para la cuantificación de aflatoxinas totales (AFT) en ración.

3. Determinación de AFM_1 en leche cruda

3.1. Muestreo

A partir de los 40 establos seleccionados se recolectaron dos litros de leche/establo directamente de la válvula principal del tanque enfriador. Las muestras se mantuvieron refrigeradas hasta su análisis, siendo el mismo en un plazo no mayor a 48 h.

3.2. Detección y cuantificación de AFM_1 mediante ELISA

La leche se homogenizó a $37\text{ }^\circ\text{C}$ en baño María, posteriormente se centrifugaron 50 mL durante 10 min a $3000 \times g$ previo enfriamiento de la muestra a $4\text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 min. Se procedió a filtrar la leche para separar la grasa y $100\text{ }\mu\text{L}$ de los estándares y de las muestras de leche se adicionaron a los pocillos e incubaron en agitación a 100 rpm durante 60 min a temperatura ambiente. Después de lavar (3 veces), se adicionó $50\text{ }\mu\text{L}$ del conjugado a cada pocillo e incubó en agitación a 100 rpm durante 30 min a

temperatura ambiente. Luego de descartar el contenido, se lavaron los pocillos (3 veces). Se agregaron 100 μL de solución de sustrato en cada pocillo e incubaron en oscuridad durante 40 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 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 fueron calculadas por extrapolación de la DO con la respectiva curva de calibración (Figura 6). El coeficiente de regresión lineal ($R=0.94$) permitió determinar el desempeño de la técnica en un rango de cuantificación entre 5-100 ppt (0.005-0.1 ppb, $\mu\text{g L}^{-1}$).

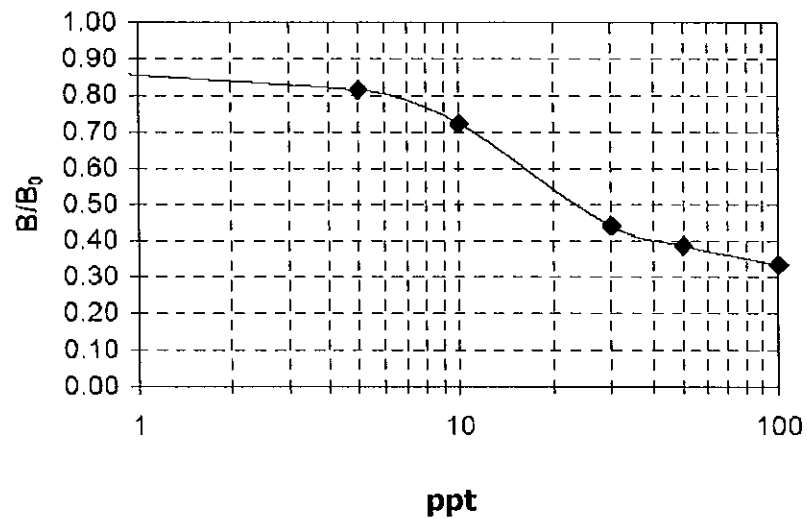


Figura 5. Curva de calibración para la detección y cuantificación de AFM_1 en leche

4. Determinación de AFM₁ en quesos

4.1. Muestreo

Se obtuvieron muestras de queso fresco, adobera y asadero (500g/muestra) de 11 establecimientos de tipo artesanal de la región de los Altos, Jalisco durante los meses de enero a marzo de 2009 (n= 64 muestras), y se conservaron a 4°C para su traslado al laboratorio y posterior análisis en un lapso no mayor a 48 h.

4.2. Detección y cuantificación de AFM₁ mediante ELISA

La muestra de queso se homogenizó manualmente y por cuarteo se obtuvo una submuestra de 2 g y mezcló con 10 mL de una solución de hexano, metanol y agua destilada (50:30:20). Para la extracción se mantuvo en agitación orbital durante 30 min a 125 rpm. El líquido fue decantado y centrifugado por 5 min a 3000g. La fase acuosa metanólica fue removida mediante pipeta Pasteur, y se adicionó el diluyente de la muestra en una proporción 1:10.

Procedimiento: Se agregaron 100µL de los estándares diluidos (1:10) o de las muestras previamente preparadas por duplicado en los pocillos de la placa. Inmediatamente se añadieron 50µL de anticuerpo AFM₁ en cada pocillo. Se cubrió la placa con una cubierta de plástico e incubó por 60 min. a temperatura ambiente sobre una parrilla de agitación orbital. Posteriormente se lavaron los pocillos de la siguiente manera: se agregaron 300µL en cada pocillo de solución de lavado diluida, descartó el contenido de los pocillos rápidamente y golpeando vigorosamente sobre una toalla de papel, este procedimiento se repitió 3 veces. Posteriormente se agregaron 100µL de conjugado a cada pocillo y se colocó la cubierta de plástico para incubar nuevamente por 60 min. a temperatura ambiente y en agitación. Se lavó nuevamente la placa de pocillos como previamente fue descrito. Posteriormente se agregó 100µL de substrato en cada pocillo para permitir que la reacción fuera desarrollada en la oscuridad durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se detuvo la reacción enzimática mediante la adición de 100 µl de solución stop (0.5 M H₂SO₄) en cada pocillo. Después se homogenizó la mezcla y

cuantificó la absorbencia a 450nm (referencia longitud de onda de 620nm) utilizando un lector de ELISA.

4.3. Confirmación de los niveles de AFM₁ mediante HPLC

Cuando los niveles sobrepasaron los límites permitidos se procedió a la confirmación mediante la técnica de cromatografía de líquidos de alta precisión (HPLC). La extracción, detección y cuantificación de AFM₁ se realizó de acuerdo al protocolo AOAC2000.08.

Procedimiento: 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 inmutioafinidad (STARLINE, Romer Labs). La columna se lavó con agua y secó bajo flujo de nitrógeno. La AFM₁ se recuperó con acetonitrilo (4mL) y secó con flujo de nitrógeno a 45 °C. El residuo fue resuspendido 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 consiste 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 son 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.

4.4. Análisis estadístico de los resultados

Los resultados de los niveles de aflatoxinas totales detectados en las raciones de bovinos productores de leche y de los niveles de AFM₁ en leche y quesos fueron contrastados mediante el análisis de varianza para comparación de medias entre municipios y/o tipo de queso y la determinación de diferencias se realizó mediante la prueba de Holm Sidak

a un nivel de significancia de 95% aplicando el programa Sigma STAT v3.1 para Windows (Anexo 1 y 2).

Los resultados de AFM₁ en los tres tipos de queso se compararon mediante el análisis de varianza utilizando el programa Sigma STAT v3.1 para Windows.

4.5. Financiamiento del Proyecto

El estudio forma parte de los proyectos de investigación: “Evaluación de adsorbentes comerciales para aflatoxina B₁ en raciones de bovinos y su correlación con la presencia de AFM₁ en leche” financiado por las empresas Süd Chemie S.A. de C.V., Bayer de México S.A. de C.V. y Técnica Mineral S.A. de C.V. con presupuesto de \$ 180,000.00 y “Evaluación de contaminación con AFM₁ en queso tipo adobera elaborado en la región de los Altos, Jalisco” financiado por el Departamento de Salud Pública con el número de proyecto P3e 84117.

VII. DESCRIPCION DEL ÁREA DE ESTUDIO

La región de los Altos y Ciénega se encuentran ubicados geográficamente al noreste del estado de Jalisco, México. Ambas regiones comprenden una superficie total de 20.441 km².

Se seleccionaron 8 municipios que cuentan con establos activos registrados por una empresa lechera de esta región y se encuentran establecidos la mayoría de productores artesanales de queso en el estado, los cuales son los siguientes:

Acatic

Jalostotitlán

Ocotlán

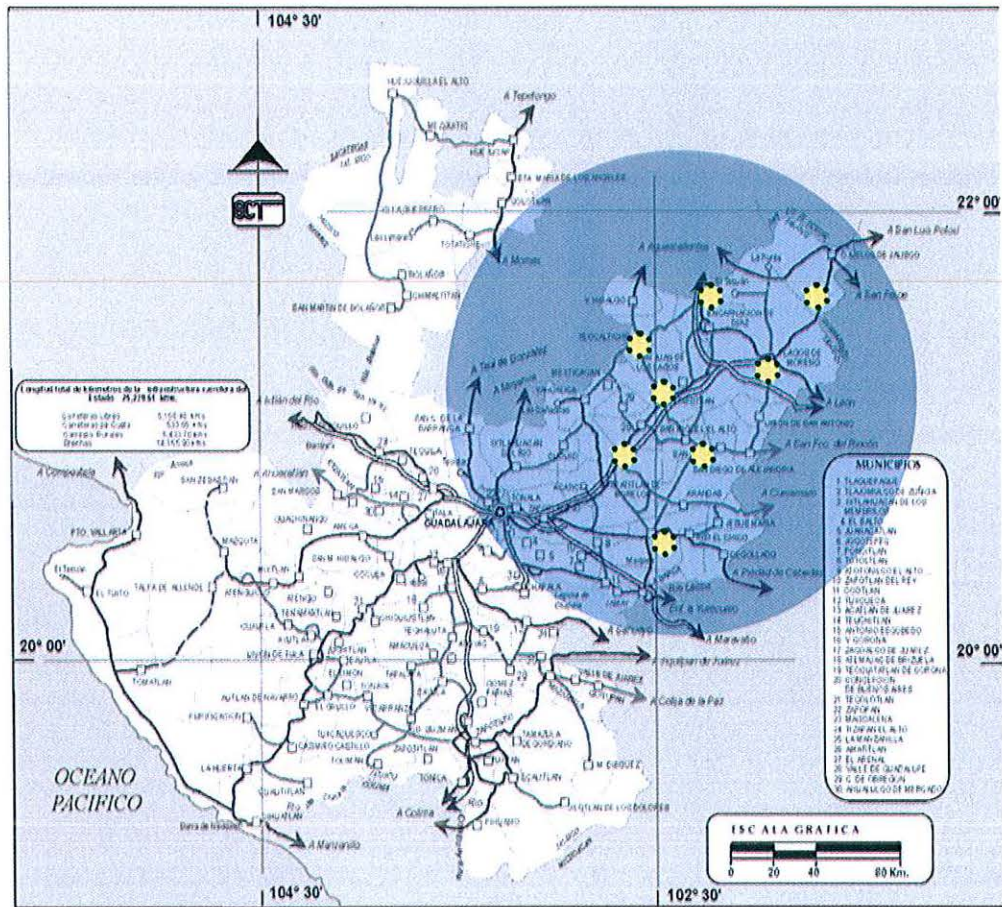
San Juan de los Lagos

Tepatitlán

Tototlán

Valle de Guadalupe

Zapotlanejo



Referencia: (☼) municipios

Figura 6. Ubicación de los municipios en la región de los Altos de Jalisco y Ciénega (México) examinados durante Septiembre-October de 2007

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el 100% de los establos productores de leche estudiados se destaca el uso de concentrados lecheros a base de maíz o sorgo y pasta de soya, que incluyen premezclas de vitaminas y minerales provistas por cooperativas regionales. El forraje en las raciones estaba representado principalmente por ensilaje y rastrojos de maíz, alfalfa deshidratada y avena. La proporción de inclusión de los forrajes en la dieta fluctuó del 40 al 60% dependiendo de la disponibilidad del propietario. El 50% de los establos se caracterizó por generar su forraje y producir ensilado a partir de este, o en todo caso obtener rastrojo. Los establos restantes se proveían de rastrojo a partir de la compra de este. Todos los establos de los municipios evaluados a excepción de Ocotlán y Tototlán utilizaban además de los otros forrajes, alfalfa deshidratada en una proporción que varió del 20 al 100%

Es necesario mencionar que un porcentaje menor de productores (40%), principalmente del municipio de Zapotlanejo, utilizó granos secos de destilería (cebada) además de ensilado o rastrojo de maíz.

1. Detección de AFT en raciones de bovinos

El análisis del alimento (ración totalmente integrada) 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 municipios de Jalostotitlán y San Juan mostraron los menores porcentajes de muestras positivas (tabla 2, figura 7). Los niveles de AFT fluctuaron de 4.815 a 24.895 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (media = $10.841 \pm 5.84 \mu\text{g kg}^{-1}$). El análisis estadístico demostró diferencia significativa 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 9.3% presentaron niveles superiores a los permitidos por las Normas Oficiales ($20 \mu\text{g kg}^{-1}$) provenientes todas del municipio de Tepatitlán.

Tabla 2. Niveles de aflatoxinas totales (AFT) en raciones de bovinos productores de leche en 8 municipios del Estado de Jalisco

Municipios	Afs Totales ppb ($\mu\text{g kg}^{-1}$)				
	Positivos (%)	Rango	Promedio	\pm DE	SEM
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

Referencias. n = número de establos por municipio. Las literales indican diferencias estadísticas entre municipios ($P < 0.05$). DE= Desviación Estándar. SEM = Error Estándar de la Media

La contaminación por aflatoxinas (AFT) en las raciones de bovinos en todos los municipios, excepto en Tepatitlán, mostró niveles promedio menores a los establecidos por la Norma Oficial Mexicana ($20 \mu\text{g kg}^{-1}$). Estos resultados concuerdan con los reportados por otros investigadores a nivel mundial. Aún cuando Tepatitlán presentó niveles de AFT superiores a la legislación, este nivel de exposición no ha sido relacionado con efectos en los parámetros productivos de bovinos productores de leche. Guthie (1979) determinó efectos sobre la eficiencia reproductiva y producción de leche cuando el consumo fue de 120 ppb 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 (1.7%) en rumiantes productores de leche y el potencial riesgo a la salud del consumidor por la presencia de residuos de AFM₁ en niveles superiores a 0.5 µg L⁻¹.

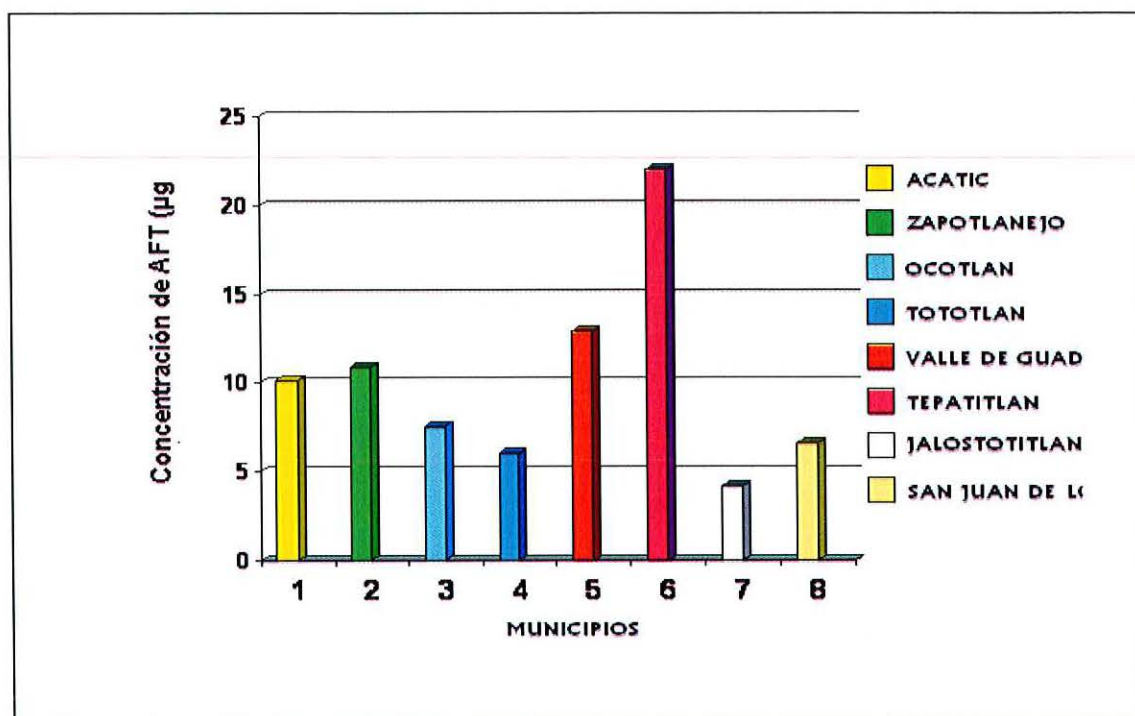


Figura 7. Niveles de aflatoxina totales (AFT) (ppb) en raciones de 8 municipios del Estado de Jalisco

Los niveles detectados de aflatoxinas en las raciones de bovinos son comparables a los documentados en otras investigaciones, si bien en algunos estudios las determinaciones fueron particularmente respecto a los niveles de AFB₁. Binder *et al.* (2007) reportan la contaminación por aflatoxinas en diversos países de Asia, Oceanía y Europa. El estudio fue realizado durante dos años para evaluar la contaminación por micotoxinas 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 AFB₁ en el 3%, 34% y 63% en las muestras del Norte, Sureste y Sur siendo los niveles promedio de 35, 38 y 52 µg kg⁻¹ respectivamente. En Europa se encontró un porcentaje de contaminación de 33%, 29% y 28% en las regiones Norte, Centro y Sur, respectivamente. La contaminación fluctuó de 10 µg kg⁻¹ (Norte de

Europa) a $67 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Sur de Europa). En Oceanía se observó 22% de contaminación 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 forrajes como ensilados y rastrojos de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$.

En América existen diversas publicaciones que concentran lo reportado por otros investigadores. Word G.E. en 1992 realizó un estudio en diferentes áreas de Estados Unidos durante 1989 a 1991, especialmente en el cinturón maicero, sureste y algunos Estados como Arkansas, Texas, Oklahoma, Virginia y Maryland. En dicha investigación se observó alta contaminación por micotoxinas en maíz y cacahuete. Los niveles de AFT en el maíz destinado a consumo animal se incrementaron durante 1991, destacando el mayor porcentaje de muestras positivas a los estados de Arkansas, Texas y Oklahoma. En otro estudio realizado en el estado de Georgia durante 1991, Chamberlain *et al.* (1993) determinaron la presencia de aflatoxinas en muestras de maíz. De las 28 muestras analizadas, 27 presentaron niveles promedio de $73 \mu\text{g kg}^{-1}$.

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 cacahuete 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 del Sur y Amazonas, los niveles presentes fueron de 10, 4.0 y $130 \mu\text{g kg}^{-1}$ respectivamente.

Por otra parte, en Colombia se ha reportado la presencia de AFB₁ en alimentos tanto de consumo animal como humano. En un total de 200 muestras de materias primas y alimentos terminados empleados en nutrición animal se encontró una incidencia del 29.0% con niveles en muestras positivas que oscilaron entre 1.0 y $66.1 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Céspedes y Díaz, 1997).

En relación a los niveles detectados de AFB₁ en raciones destinadas para la alimentación de los animales en México, Ortiz *et al.* (2006) determinaron 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 µg kg⁻¹ (rango 5 – 61 µg kg⁻¹) en ración completa, 31.4 µg kg⁻¹ (rango 8 – 77 µg kg⁻¹) en gluten de maíz, 5.78 µg kg⁻¹ (rango 3 – 10 µg kg⁻¹) en maíz, y 9.55 µg kg⁻¹ (rango 2 – 35 µg kg⁻¹) en sorgo. Así mismo, el porcentaje de muestras positivas con valores superiores a los máximos permitidos fueron 18.7, 60, 0 y 3.1%, respectivamente.

Así mismo, Reyes *et al.* (2008) evaluaron la presentación natural de diferentes micotoxinas durante la etapa de conservación del ensilado de maíz. Los resultados mostraron una 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 µg kg⁻¹. El análisis estadístico no determinó diferencias significativas entre los meses en estudio por lo que los resultados indicaron que las concentraciones detectadas de AFT podrían haber sido producidas durante la etapa de cultivo y cosecha del maíz.

2. Detección de AFM₁ en leche

La tabla 3 permite observar la contaminación por AFM₁ en el 80% (32/40) de las muestras de leche de los establos analizados. En los municipios, los establos presentaron muestras positivas en un rango de 40 al 100%. Se consideraron muestras positivas aquellas en que los niveles fueron > a 0.005 µg kg⁻¹. Los niveles detectados fluctuaron de 0.006 – 0.065 µg kg⁻¹ de leche (media 0.023 ± 0.016 µg kg⁻¹). Los municipios de Acatic y San Juan de los Lagos se destacaron por presentar los mayores niveles promedio de AFM₁ en leche, siendo de 0.035 y 0.031 µg kg⁻¹ respectivamente. No se observaron diferencias estadísticas (p> 0.05) entre municipios. 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 (0.05 µg L⁻¹)

Tabla 3. Niveles de aflatoxina M₁ en leche (AFM₁) en 8 municipios del Estado de Jalisco

Municipios	AFM ₁ ppb (µg L ⁻¹)				
	Positivos (%)	Rango	Promedio	±DE	SEM
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

n = número de establos por municipio. DE= Desviación Estándar. SEM = Error Estándar de la Media

Existen numerosos reportes a nivel mundial sobre los niveles de contaminación por AFM₁ en leche. Destacan los estudios realizados en Irán y Turquía, entre estos los desarrollados por Oruc *et al.* (2005), quienes encontraron 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 a 0.212 µg L⁻¹ (media de 0.078 ± 0.006 µg L⁻¹) en muestras recolectadas de las regiones de valles, y de 0.012 a 0.164 µg L⁻¹ (media de 0.072 ± 0.005 µg L⁻¹) en zonas montañosas. No se observó diferencia significativa entre regiones, además se encontró que el 60% de las muestras estudiadas excedían los límites establecidos por la Unión Europea (0.05 µg L⁻¹).

En Irán, Abolfazl-Kamkar *et al.* (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 aflatoxina M₁ en 98 muestras de leche recolectadas de tanques enfriadores en 5 regiones de Irán por HPLC. Las muestras presentaron niveles entre 0.05 – 0.10 µg L⁻¹, (media 0.039 µg L⁻¹), ninguna superó los límites establecidos por la FDA (0.5 µg L⁻¹). En Turquía, se detectó la presencia de aflatoxina M₁ en quesos reportándose un rango de 0.006 a 0.6 µg L⁻¹, las determinaciones fueron realizadas por ELISA (Yaroglu *et al.*, 2005).

En la India, Rastogi *et al.* (2003) 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 (0.05 µg L⁻¹). Sólo el 9% de las muestras superaron los límites máximos permitidos por la FDA (0.5 µg L⁻¹). Previamente, Vasanthi y Bath (1988) reportaron niveles de 0.05 a 0.3 µg L⁻¹ AFM₁ en leche.

Investigaciones realizadas en España por Rodríguez *et al.* (2003) reportaron 3.3% de incidencia de AFM₁ en leche recolectada de establos de la provincia de León, España, con niveles promedio de 0.020 ± 0.005 µg L⁻¹ (ELISA) y 0.017 ± 0.003 µg L⁻¹ (HPLC).

Con respecto a Latinoamérica, López *et al.* (2003) reportaron la presencia de AFM₁ en 18 de 77 (23%) muestras de leche obtenidas en Argentina. El período de recolección se realizó de marzo a septiembre de 2002, encontrándose 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 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.

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).

Es necesario analizar las condiciones de producción, manejo y almacenamiento del alimento practicadas por la mayor parte de los productores de los Altos y Ciénega, Jalisco de manera que permitan estimar las variaciones en cuanto los niveles de contaminación por aflatoxinas en las raciones de los bovinos, así como en la eliminación de AFM₁ en leche. La caracterización socio-cultural de los productores obtenida de reportes emitidos por SIAP-SAGARPA (2007), fue utilizada como base para considerar como necesario realizar un análisis que indicara la situación actual. Si bien no se pudo acceder a la totalidad de la información solicitada en cuanto a la producción del alimento, manejo y almacenamiento del mismo en los establos estudiados, se realizó un análisis exploratorio de la información proporcionada por trabajadores y productores.

Estos antecedentes permitieron suponer que en la región de los Altos de Jalisco, las prácticas de manejo, producción y/o almacenamiento de los alimentos destinadas 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.

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 post-cosecha. Se destacan las altas temperaturas y períodos de sequía durante el desarrollo del cultivo. Así mismo, durante el almacenamiento se destaca el daño causado por roedores e insectos que afectan la integridad de los granos y/o tejidos favoreciendo la colonización y/o desarrollo de estos por especies potencialmente productoras de aflatoxinas. Bajo condiciones deficientes de almacenamiento que incluyen temperatura, humedad y tensión de gases, la síntesis y acumulación de aflatoxinas pudiera ocurrir. Aún cuando en México se tiene reglamentado la importación de maíz tipo 2 ($<20 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFT), en ocasiones es posible que existan deficiencias en el control y vigilancia de los organismos gubernamentales e ingrese maíz amarillo de baja calidad que no cubre los estándares para el consumo interno del mismo país productor. Esto puede incrementar el riesgo de exposición a aflatoxinas en las explotaciones pecuarias.

Como resultado de esta etapa fue posible identificar la variabilidad en las prácticas y/o manejo del alimento en los productores de la región de Jalisco. Entre ellos, algunos productores utilizaban raciones totalmente mezcladas (RTM) mientras que otros administraban el concentrado lechero al momento de la ordeña o encima del ensilaje. Estos factores condicionaron el muestreo, atribuyéndose la variabilidad de los niveles de AFT y AFM₁ principalmente en el municipio de Tepatitlán.

El grado de tecnificación y aspectos relacionados con la higiene de la sala de ordeña fueron igualmente heterogéneos. 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).

Reportes sobre los niveles de AFM₁ detectados en otros países muestran amplias diferencias 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).

En México, 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 en nuestro país. Debido a que los sistemas productivos hacen uso de diversas fuentes o materias primas que pudieran incluir los granos de destilería de maíz desecados (DDG,) obtenidos de la producción de alcoholes (conocidos por la característica de concentrar las micotoxinas) se destaca como necesario documentar los niveles de contaminación con aflatoxinas, entre otras. Esta acción permitirá establecer posibles estrategias de control que tendrá como finalidad no sólo proteger la salud animal sino también la humana. Es necesario considerar que dentro de las posibles estrategias, factibles económicamente, se destaca el uso de adsorbentes o secuestrantes de micotoxinas. Este trabajo permitió observar que la totalidad de los productores de Acatic incluyen este aditivo en la ración a diferencia de municipios de Jalostotitlán, Tepatitlán, Valle de Guadalupe, San Juan de los Lagos, Ocotlán, Tototlán y Zapotlanejo.

En la actualidad, la oferta de estos productos en el mercado se ha extendido siendo necesario realizar pruebas en bovinos leche a fin de determinar la real eficiencia *in vivo* de los mismos. La mayoría de los adsorbentes comerciales obtienen aprobación para su venta con sólo pruebas realizadas *in vitro* o por el empleo de otra especie animal diferente a los animales poligástricos. Si bien otros métodos han demostrado la capacidad de destoxificar el alimento, como el proceso de amoniación (Park *et al.*, 1988), el costo asociado con esta práctica parece no facilitar su implementación.

Se destaca que el presente estudio no determinó una posible correlación entre el consumo de AFT a través del alimento de vacas productoras de leche y los niveles de eliminación de AFM₁ en leche así como el uso de adsorbentes de micotoxinas. En cada Municipio, durante el periodo de recolección de muestras fue posible determinar que los establos empleaban diferentes técnicas para el manejo del alimento, lo cual representa una variable que 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, como categorizar los mismos de acuerdo al manejo empleado durante la alimentación.

Finalmente, se destaca la necesidad de continuar realizando estudios en los Altos y Ciénega, Jalisco debido al elevado potencial de producción de esta región. Es necesario considerar la realización de estudios de la contaminación con aflatoxinas en diferentes épocas del año y caracterizar el sistema de alimentación que pudiera estar cambiando según la disponibilidad de materias primas. Así mismo, sería adecuado incluir en el estudio no solamente la ración totalmente mezclada (RTM) sino también la materia prima y los ingredientes empleados en la formulación de la ración. Por otra parte, es necesario implementar programas de vigilancia de la contaminación por AFM₁ en leche considerando que en los últimos años las estadísticas demuestran un aumento considerable en el número de personas que han desarrollado diferentes tipos de cáncer, entre ellos, en la población infantil.

3. Detección de AFM₁ en quesos

La tabla 4 presenta los niveles de contaminación por AFM₁ en los quesos artesanales evaluados en la región de los Altos, Jalisco durante el periodo comprendido de enero a marzo de 2009. Del total de muestras estudiadas 89% (57/64) fueron positivas a la presencia de AFM₁, los niveles promedio en los quesos fresco, adobera y asadero fueron de 0.283 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 0.313 $\mu\text{g kg}^{-1}$ y 0.246 $\mu\text{g kg}^{-1}$ respectivamente, sin que se observara diferencia estadística ($P > 0.05$) entre los tipos de queso.

Los quesos tipo fresco y asadero mostraron el mayor número de muestras positivas a AFM₁ (90%) con niveles que fluctuaron de 0.0 a 0.965 $\mu\text{g kg}^{-1}$, mientras que el queso adobera con 86% de contaminación presentó el nivel máximo de AFM₁ en una de las muestras analizadas (1.025 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Debe destacarse que el 22% de las muestras de queso (14/64) superaron el nivel máximo permitido de AFM₁ en leche establecido por la NOM-184-SSA-1994 (0.5 $\mu\text{g kg}^{-1}$). El porcentaje de muestras que presentaron niveles de AFM₁ superiores a los permitidos por la regulación fue en el asadero de 13.6%, fresco 25% y adobera 27.3%.

Tabla 4. Niveles de AFM₁ detectados en quesos artesanales elaborados en la región de Los Altos, Jalisco.

TIPO DE QUESO ($\mu\text{g kg}^{-1}$)			
	FRESCO	ADOBERA	ASADERO
Promedio	0.283	0.313	0.246
Desviación Estándar	0.255	0.289	0.245
Mínimo	0.0	0.0	0.0
Máximo	0.965	1.025	0.935

Un gran número de investigaciones y programas de monitoreo han sido desarrolladas en diferentes países para obtener un patrón general de la contaminación por AFM₁ en los alimentos (Aycicek *et al.*, 2002; Galvano *et al.*, 1996; Rostogi *et al.*, 2004) y de esta manera poder establecer medidas preventivas que reduzcan el riesgo a la salud. Es importante mencionar que el nivel establecido por la regulación Mexicana fue descrito para la leche y no se especifica otro valor para los productos lácteos como quesos, yogurt o crema, lo cual requiere ser analizado y modificado como ha sido en otros países.

La contaminación de aflatoxinas en quesos puede ser debido a dos posibles causas: la transferencia de AFM₁ a la leche cuando los animales consumieron alimento contaminado (van Egmond, 1989) y por la presencia de esta toxina en la leche en polvo usada para enriquecer la leche utilizada en la elaboración del queso (Blanco *et al.*, 1998).

Los resultados observados en el presente estudio respecto a la contaminación con AFM₁ en quesos, son comparables con los encontrados en Turquía por varios investigadores. Aycicek *et al.* (2005) encuentran 89.8 % de muestras positivas a AFM₁ en queso crema (44/49); 91.49% en quesos blancos tipo salmuera (86/94) y 88.68% en queso kashar (47/53). De los productos lácteos evaluados el 8.52% presentaron niveles mayores que el límite máximo permitido por el Codex Alimentario de Turquía (250 ng kg⁻¹), mientras que en otro estudio realizado en Turquía por Yapar *et al.* (2008) el análisis en diferentes

tipos de quesos frescos y madurados mostraron el 71.42% (75/105) de muestras contaminadas con AFM₁, excediendo el límite máximo permitido el 38.08%. Posteriormente Ardic *et al.* (2009) encontraron 82.4% de muestras positivas a AFM₁ en queso tipo salmuera recolectadas en Erzurum, provincia de Turquía, con niveles de 52 a 860 µg kg⁻¹, 26.4% de las muestras excedieron el límite permitido. Todos los estudios realizados en Turquía fueron desarrollados mediante la técnica de ELISA.

El estudio realizado al Norte de África por Elgerbi *et al.* (2004) permitió evaluar 49 muestras de leche y 20 muestras de queso fresco en una región de Libia, mediante la técnica de cromatografía de líquidos de alta precisión (HPLC). Se observó 71.4% de muestras de leche positivas a AFM₁ con niveles de 0.03 a 3.13 ng ml⁻¹ (= µg L⁻¹), mientras que el 75% de los quesos mostraron niveles de 0.11 a 0.52 ng g⁻¹.

Por otra parte; los estudios realizados en Italia por Pietri *et al.* (1997) demostraron la contaminación de AFM₁ en quesos Grana Padano procesados de 1991 a 1994, las muestras de queso madurado (4-36 meses) presentaron contaminación con AFM₁ en el 98.2% (219/223) de las muestras analizadas, 91% presentaron niveles de 5 a 100 ng kg⁻¹, y solo una muestra excedió el límite permitido. Las determinaciones analíticas fueron realizadas mediante HPLC. En otro estudio al Sur de Italia se evaluaron 265 quesos a partir de leche de vaca, búfalo, borrego y cabra, incluyendo quesos frescos y madurados a medio y largo término. AFM₁ se encontró en el 16.6 % de las muestras, destacando el mayor número de muestras positivas en los quesos madurados, especialmente elaborados a partir de leche de cabra y borrego mientras que los quesos de leche de búfalo fueron negativos (Montagna *et al.*, 2008).

En Europa el nivel máximo permitido de AFM₁ en leche y productos lácteos actualmente es regulado por la REG 1881/2006 (European Comisión Regulation 2006), de acuerdo con esta norma el producto que va ser analizado es la leche la cual no debe presentar niveles de AFM₁ que excedan 0.05 µg kg⁻¹, mientras que los productos lácteos deberán ser procesados utilizando leche que cumpla dicho límite. No ha sido posible establecer los niveles permisibles para los productos lácteos como los quesos debido a la dificultad de identificar el factor de conversión estandarizado para productos derivados

de la leche. Existen pocos datos disponibles de literatura nacional e internacional relacionados con factores de la concentración en los diferentes productos lácteos y esos datos son pobremente aplicables a los procesos de manufactura nacional de quesos (Oruc *et al.*, 2006).

En Italia después del brote reportado de la contaminación por AFB₁ en el maíz ocurrida en 2003 y la consecuente presentación de AFM₁ en la leche, el Ministerio de Salud estableció como máximo permisible el valor de 0.45 µg kg⁻¹ para quesos duros y madurados (Giorni *et al.*, 2007). Este nivel aunque fue considerado de manera temporal para enfrentar la crisis aún no ha sido modificado, sin embargo, es mucho mayor que el adoptado por Suiza, Irán y Turquía (0.25 µg kg⁻¹) y en Holanda (0.20 µg kg⁻¹) (Creppi, 2002). Hasta el momento no se tiene una norma común aplicable en todos los países miembros de la Comunidad Europea.

Además los métodos analíticos para ser utilizados en investigaciones sobre AFM₁ en quesos establecidos por las leyes italianas consideran a la técnica de ELISA para ser utilizada como prueba tamiz y HPLC para confirmación. Si bien debe mencionarse que numerosos autores han considerado a la técnica de ELISA como una prueba valida para investigar aflatoxinas (Stroka *et al.*, 2002; Tihumala-Devi *et al.*, 2002; Sarimehmetoglu *et al.*, 2004; Magliulo *et al.*, 2005; Anfossi *et al.*, 2008; Tekinsen *et al.*, 2008).

En Terán provincia de Irán, Kamkar (2006) analizó 80 muestras de queso para detectar AFM₁ mediante cromatografía de capa fina. Se encontró el 82.5 % de muestras positivas a la contaminación con AFM₁, el nivel mayor se observó en el mes de febrero con 0.52 µg kg⁻¹. Del total de las muestras 60.6% excedieron el máximo aceptable en países como Turquía. En otro estudio realizado posteriormente por Kamkar *et al.* (2008) se determinó mediante HPLC la distribución de AFM₁ durante la elaboración del queso procesado por el método tradicional Iraní, encontrando su recuperación a partir del suero, cuajo y queso en una proporción de 3.12 y 3.65 veces mayor en el cuajo y queso que la encontrada en el suero, lo cual demuestra la afinidad de la AFM₁ a la acción proteica de la leche (López *et al.*, 2001).

No existen evidencias claras del efecto de los procesos que involucran enfriamiento, calor o deshidratación sobre el contenido de AFM₁ en la leche. Esta micotoxina no es degradada cuando la leche contaminada es utilizada para elaborar quesos, crema y mantequilla, pero se ha observado que se distribuye en los productos de diferente manera. El queso retiene a la AFM₁ en una proporción del 40-60%; la crema 10% y la mantequilla 2% (van Egmond, 1994).

Además la variabilidad de la distribución de la AFM₁ ha sido asociada al tipo de queso, al proceso utilizado en su elaboración, al tipo y grado de contaminación de la leche con AFM₁ y al método analítico utilizado para su determinación (Blanco *et al.*, 1988). Algunos autores han reportado que la concentración de AFM₁ en quesos Cheddar (Applebaum y Marth, 1992), Brick y Limburger (Brackett *et al.*, 1982), Camembert y Tilsit (Kiermeir y Buchner, 1977) incrementaron su concentración en las etapas tempranas de la maduración y disminuyeron posteriormente, mientras que el queso Gouda (van Egmond *et al.*, 1977) o Mozzarella (Brackett y Marth, 1982) no mostraron cambios apreciables.

El queso blanco salmuera es ampliamente consumido en Turquía, y es elaborado tanto en instalaciones modernas a partir de leche calentada con inóculo de bacterias como *Lactococcus casei* ssp. *lactis* y *L. casei* o bien en pequeñas industrias artesanales utilizando técnicas tradicionales que incluyen procesos de fermentación con bacterias indígenas. Estos métodos son comparables a los empleados para la elaboración del queso fresco y adobera en México. Si bien el queso asadero es de tipo fresco es importante lograr la plastificación para su posterior hilación mediante el calentamiento del cuájo previamente acidificado en un poco de suero a fuego directo. Ninguno de los quesos estudiados requiere de maduración para su venta.

La composición bromatológica de los quesos frescos puede variar por múltiples factores como el grado de descremado de la leche, la acidez original y la maduración de ésta, la variación estacional de sus componentes (caseína y grasa), entre otros. El queso fresco se caracteriza por el alto contenido de humedad (aprox. 50%); pH de 5.1 a 5.3; acidez de 32-35°D; proteína 25-27%; grasa 17-22%; minerales 3.5-3.7% (Villegas, 2003).

En este estudio no se encontró diferencia significativa en los niveles promedio de AFM₁ detectados en los tres quesos estudiados, lo cual posiblemente es atribuido al procesamiento similar de su elaboración.

Oruc *et al.*, (2006) evaluaron la distribución y estabilidad de la AFM₁ durante el procesamiento y maduración del queso fresco salmuera elaborado en Turquía de acuerdo al método tradicional. La leche fue contaminada artificialmente a tres concentraciones (50, 250 y 750 ng L⁻¹) y madurado por tres meses. Todas las determinaciones analíticas fueron desarrolladas por HPLC con detección de fluorescencia y limpieza con columna de inmunoafinidad. Durante la sinéresis (salida del suero) del queso una proporción alta de AFM₁ permaneció en el cuajo y para los niveles evaluados la proporción fue de 3.6, 3.8 y 4 veces mayor que el nivel presente en la leche. Después de la maduración la distribución de la AFM₁ indicó que cerca del 50% permaneció en el queso y solo 2-4% de dicha toxina fue transferida a la solución de salmuera. Durante el periodo de almacenamiento los niveles de AFM₁ permanecieron constantes sugiriendo que la toxina es estable durante la manufactura y maduración.

El efecto de los procesos a los que se somete la leche sobre los niveles de AFM₁ fue también reportado por Yousef y Marth (1989) y JECFA (2001). En los procesos que no separan los componentes de la leche que incluyen calor como la pasteurización y esterilización, así como el almacenamiento de la leche y otros productos lácteos a temperaturas bajas y por congelación durante pocos meses no afecta el contenido de AFM₁. Además la manufactura de productos lácteos fermentados como kefir y yogurt no ocasionan disminución significativa de AFM₁.

Respecto a los procesos que separan los componentes de la leche se ha descrito que la leche evaporada, concentrada o en polvo, resultantes de una remoción parcial o completa del agua con o sin calor tienden a concentrar los sólidos de la leche y contaminantes como la AFM₁, esto puede hacer la toxina más susceptible al O₂, luz y otros factores desestabilizantes. Algunos estudios han reportado grandes pérdidas de AFM₁, mientras que otros la concentración de la leche no afectó el contenido de dicha toxina. La AFM₁ es principalmente soluble en la fase acuosa de la leche o es adsorbida a partículas de

caseína, si bien algunos estudios muestran que una pequeña cantidad de AFM₁ de la leche es transferida a la crema y menor proporción a la mantequilla. Puesto que la AFM₁ se asocia predominantemente con la caseína se observa mayor concentración en el cuajo que en el suero durante la elaboración de quesos, esta asociación puede ser expresada como un factor de enriquecimiento (FE). Los estudios mostraron que la concentración de AFM₁ es de 3 veces mayor en quesos frescos y de cinco veces en quesos duros respecto a la concentración en la leche. Algunos estudios demostraron que la maduración del queso y la proteólisis de la caseína incrementan la recuperación de AFM₁ a partir de leche contaminada naturalmente (Prandini *et al.*, 2008).

Durante las estaciones de frío se ha observado mayor incidencia de la contaminación de la leche con AFM₁ debido a que en invierno las vacas se alimentan con un mayor número de ingredientes que exceden los niveles de AFB₁ (López *et al.*, 2003). También la contaminación promedio de AFM₁ en otoño fue reportada con niveles significativamente mayores que la observada en primavera y verano (Kamkar, 2005; López *et al.*, 2003). Se ha documentado ampliamente que la contaminación del alimento con AFB₁ varía de acuerdo al área geográfica, humedad, condiciones climáticas y temperatura (Sassahara *et al.*, 2005). Bakirsi (2001) también encontró que los niveles de AFM₁ difieren según las estaciones del año, así como en los productos lácteos. Además de observar que el proceso de pasteurización no afecta drásticamente la concentración de AFM₁ debido a su estabilidad al calor.

Yousef y Marth (1989) reportaron que la concentración de AFM₁ en quesos se incrementó debido a su afinidad a la fracción caseína en la leche y también debido a la solubilidad de la toxina en el agua. Bajos niveles de AFM₁ se encontraron en la crema y en la mantequilla menores a los presentes en la leche del tanque enfriador, mientras que la concentración en el queso fresco fue de 2.5 a 3.3 veces mayor y en queso duro de 3.9 a 5.8 veces mayor que la leche de la cual fueron procesadas.

Por otra parte, se han realizado investigaciones sobre la presencia de levaduras, hongos y AFM₁ en leche cruda y queso en Slovenia (Torkar y Vengust, 2008). Los resultados del estudio mostraron la presencia de levaduras en el 95% de las muestras de leche con una

concentración promedio de $1.7 \log_{10}$ Unidades formadoras de colonias (UFC) ml^{-1} , mientras que el crecimiento de hongos se observó en el 63.3 % de las muestras de leche, la concentración fue de $0.6 \log_{10}$ UFC ml^{-1} , los géneros aislados fueron *Geotrichum* (51.5%), *Aspergillus* (33.8%), *Mucor* (5.9%), *Fusarium* (2.9%), y *Penicillium* (2.9%). Respecto a los quesos analizados fueron aislados tanto levaduras como hongos en el 60% de las muestras, la concentración promedio fue de 2.5 y $2.1 \log_{10}$ UFC g^{-1} respectivamente. Los géneros aislados con mayor frecuencia fueron *Geotrichum* (91.9%), *Moniliella* (5.4%), y *Aspergillus* (2.7%). Los niveles de contaminación de AFM₁ fueron mayores de 50 ng kg^{-1} en el 10% de las muestras de queso.

El crecimiento de levaduras y hongos en algunos tipos de quesos pueden ocasionar problemas de tipo económico y sensorial. Si bien estos microorganismos presentes en leche cruda no sobreviven a la pasteurización, su presencia en leche pasteurizada y otros productos lácteos es causada por la contaminación durante la manufactura (Jodral *et al.*, 1993).

La contaminación de productos lácteos particularmente quesos es causada por levaduras y hongos presentes en el ambiente de las fábricas, tanto en paredes y estantes del cuarto de maduración, en el aire, equipos, agua, leche, salmuera, etc. (Chapman y Sharpe 1990). Las levaduras por sí mismas comúnmente no causan defectos en los productos lácteos a menos que fermenten la lactosa, sin embargo algunas cepas específicas juegan un papel importante en la maduración y en la formación de aroma de algunas variedades de queso. Además la muerte de las levaduras libera vitaminas y aminoácidos lo cual estimula a las bacterias y provee precursores de sabor, así como otros metabolitos (ejem ácidos grasos de cadena corta) que poseen efectos tóxicos contra organismos indeseables en el tracto intestinal (Jacobsen y Narvius 1996).

Aunque los hongos tienen poca importancia en la leche cruda, son significativos en la leche pasteurizada particularmente cuando es utilizada para la elaboración de quesos y otros productos lácteos. La presencia de algunos hongos ambientales es indeseable ya que ellos pueden influir en las características organolépticas de los quesos, producir micotoxinas y representar un riesgo a la salud (Jodral *et al.*, 1993)

Actualmente el consumo diario tolerable para AFM₁ fue calculado en 0.2 ng/kg/p.v. (Kuiper-Goodman, 1990) y esta toxina ha sido clasificada por la Agencia Internacional de Investigaciones contra el Cáncer como toxina clase 1, carcinógeno en humanos (IARC, 2002). En la medición del riesgo de cáncer, la población infantil son considerados los de mayor riesgo de exposición debido a que la leche es el principal componente de su dieta, por lo tanto la presencia de AFM₁ en leche y productos lácteos es indeseable (Galvano *et al.*, 1996; IARC 2002).

La presencia de AFM₁ tiene que ser considerada un riesgo y nunca debe ser subestimado debido a las imprevisibles condiciones ambientales y climáticas, así como por la incapacidad de ciertos sistemas de producción agrícola (caracterizados por pobres condiciones económicas y/o escaso conocimiento) para encarar y manejar la prevención y/o contaminación de micotoxinas.

IX. CONCLUSIONES

1. 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 al máximo permitido por la Norma Oficial Mexicana NOM-188-SSA1-2002.
2. Se detectó contaminación con aflatoxina M_1 en el tanque enfriador del 80% de los establos analizados (rango 0.006 – 0.065 $\mu\text{g L}^{-1}$). Los niveles de AFM_1 en leche se encontraron por debajo del nivel especificado por la regulación en México (NOM-184-SAA1-2002).
3. Se observó contaminación con AFM_1 en el 89% de los quesos artesanales elaborados en la región de los Altos, Jalisco. Los niveles promedio detectados en el queso fresco, adobera y asadero fueron de 0.283 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 0.313 $\mu\text{g kg}^{-1}$ y 0.246 $\mu\text{g kg}^{-1}$ respectivamente. Del total de muestras analizadas el 22% superaron el nivel permitido por la Norma Oficial Mexicana.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Alfred, D., Magan, N. 2004. Prevention strategies for trichothecenes. *Toxicology letter*. 153(1): 165-171.
- Anfossi, L.; Calderara, M.; Baggiani, C., Giovannoli, C.; Arletti, Giraudi, G. Development and application of solvent-free extraction for the detection of aflatoxin M₁ in dairy products by enzyme immune assay. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 1852-1857.
- Applebaum, R. S., & Marth E. H. (1982). Fate of aflatoxin M₁ in cottage cheese. *Journal of Food Protection*, 45, 903-904.
- Ardic, Yakup Karakaya, Meryem Atasever, Gulsah Adiguzel. Aflatoxin M₁ levels of Turkish white brined cheese. *Food Control* 20 (2009) 196-199.
- Auerbach, H., Olderburg, E., Weissbach, F. 1998. Incidence of *Penicillium roqueforti* and roquefortine C in silage. *J Sci Food Agric* 76:565-572.
- Axelsson, L. 2004. Lactic acid bacteria: clasification 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.
- Hasan Aycicek, Abdurrahman Aksoy, Sahan Saygi. Determination of aflatoxin levels in some dairy and food products which consumed in Ankara, Turkey. *Food Control* 16 (2005) 263-266.
- Bakirci I. (2001) A study on the occurrence of aflatoxina M₁ in milk and milk products produced in Van province of Turkey, *Food Control*, 12, 47-51.
- 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.
- Bennett, J. W., Klich, M. 2003. Mycotoxins. *Rev Clin Microbiol* 16:497-516.
- Binder, E. M., Tan, L. M., Chin, L. J., Richard, J. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities feeds and feed ingredients. 2007. *Anim Feed Sci Technol* 137:265-282.

- Blanco, J. L. Domingues, L., Gomez-lucia, E., Garayzabal, J-F-F., Goyache, J., & Suarez, G (1988), Behavior of aflatoxin during the manufacture, ripening and storage of Manchego-type cheese. *Journal of Food Science*, 53, 1373-1376.
- Brackett, R. E.; Marth, E.H. Fate of Aflatoxin M₁ in Parmesan and Mozzarella Cheese. *J. Food Protect* 1982, 45, 597-600.
- 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. y Peña Cabrales J.J. 2001. Aflatoxin sintesis 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.
- Magda Carvajal, Adolfo Bolaños, Francisco Rojo, Ignacio Mendez. 2003, Aflatoxin M₁ Pasteurized and Ultrapasteurized Milk with Different Fat Content in Mexico. *Journal of Food Protection*, Vol. 66, No. 19, Pages 1885-1892.
- Céspedes, A.E., G. J. Díaz. 1997. Analisis of aflatoxins in poultry and pig feed and feedstuffs used in Colombia. *J AOAC 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.
- Chapman. H. R. & Sharpe, M. E (1990) Microbiology of cheese, In R. K. Robinson (Ed) *Dairy Microbiology* (pp 203-290). London and New Jersey, Applied Science Publishers.
- Chiara M. A, Giammarco. M., Giuseppe L., Fusaro I., Gramenzi A., Formigoni A., Vignola. G., Lambertini. L., (2009) Distribution of aflatoxin M₁ during Grana Padano cheese production from naturally contaminated milk, *Food Chemistry* 113, 595-599.
- 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., Perez-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.
- Creppy, E.E. Update of survey, regulation and toxic effects of micotoxins in Europe. *Toxicol. Lett.* 2002, 127, 19-28.
- Cullen, J.M., Newberne P.M. 1993. Acute hepatotoxicity of aflatoxins. In: Eaton D.L. Groopman J.D. eds. The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary and agricultural significance. London: Academic Press, 1993: 1-26.
- 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.
- Díaz, 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 .
- Díaz GJ, Espitia E. 2006. Ocurrence 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.
- Elías-Orozco, R., Castellanos-Nava, A., Gaytan-Martinez, M. Figueroa-Cardenas, J.D., Loarca-Piña, G. 2002. Comparison of nixtamalization and extrusion processes for a reduction in aflatoxina content. *Food Add Cont* 19:878:885.

- Elgerbi AM, Aidoo KE, Candlish AA, Tester RF. 2004, Occurrence of aflatoxin M₁ in randomly selected North African milk and cheese samples. *Food Addit Contam.*;21 (6): 592-7.
- 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: 321326.
- FAO. 2004. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. En: FAO Food and Nutrition Papers 81, 2004; ISBN: 9251051623.
- 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.
- 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., D. D. Bradley, D. D. Wagner, P. E. Long-Bradley, and H. Hairston. 1986. Aflatoxin residues in milk of dairy cows after ingestion of naturally contaminated grain. *J. Food Prot* 49:781-785.
- 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.
- 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 VOL 18* (7): 644-6.
- Garrido, N.S., M.H. Iha, M.R. Santos Ortolani and R.M. Duarte Favaro. 2003. Occurrence of aflatoxins M(1) and M(2) in milk commercialized in Ribeirao Preto- SP., Brazil. *Food Addit. Contam.* 20: 70-73.
- Giomi, P.; Magan, N.; Pietri, A.; Bertuzzi, T.; Battilani, P. Studies on *Aspergillus* section Flavi isolated from maize in northern Italy, *Int J. Food Microbiol.* 2007, 113, 330-338.
- Godic T. K., Vengust.A., (2008) The presence of yeasts, moulds and aflatoxin M₁ in raw milk and cheese in Slovenia, *Food Control* 19, 570-577.

- 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 CJJ (Eds). Talleres Gráficos de la Dirección de Publicaciones y Materiales Educativos del Instituto Politécnico Nacional. México DF.
- 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.
- Hussein, S. H., Brasel, 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.
- Italian Ministry of Health, Italian Ministry of Health Note; "Sampling and analytic methods for Aflatoxin detection in dairy products" 2004; D.G.V.A/IX/25664/f.5.b.b.2/P.
- Jacobsen. N., & Narvhus, J. (1996). Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. *International Dairy Journal*, 6, 755- 768.
- Jodral, M., Liñan, E, Acosta, I., Gallego, C., Rojas, F., & Bentabol, A. (1993). Mycoflora and toxigenic *Aspergillus flavus* in Spanish milk. *International Journal of Food Microbiology*, 18, 171-174.
- Jonker, M. A., van Egmond, H. P., Stephany, R. W. 1999. "Mycotoxins in food of animal origin: a review" En: CRL, document 389002 095 from European Commission, European Union Community Reference Laboratory and National Institute of Public Health and the *Environment* 1-39.
- Kamkar A.: 2005, A study on the occurrence of aflatoxin M₁ in Iranian Feta cheese. *Food Control*, 16, 593-599.
- Kamkar. A., (2006) A study on the occurrence of aflatoxina M₁ in Iranian Feta cheese, *Foud Control* 17, 768-775.
- Kamkar, A.; Karim, G.; Aliabadi, F.S.; Khaksar, R. 2008, Fate of aflatoxin M₁ in Iranian white cheese processing. *Food Chem. Toxicol.* 46, 2236-2238.
- Kiessling, K. H., Petterson, H., Sandholm, K., Olsen, M. 1984. Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenona and three trichotecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria. *J Appl Environ Microbiol* 47:1070–1073.
- Kiermeir F, Weiss G, Behringer G, Miller M.1977, On the presence and the content of aflatoxin M in commercial cheese samples (author's transl). *1:Z Lebensm Unters Forsch.* Apr 28;163 (4): 268-71.
- 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.

- 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 T-2 toxin or deoxinivalenol in broiler chicks. *Poult Sci* 76:1239–1247.
- Kuiper-Goodman, T. 1990. Uncertainties in the risk assessment of three mycotoxin: aflatoxin, ochratoxin, and zearalenone. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 68: 1017-1024.
- Larsson P, Pettersson H, Tjälve H. 1989. Metabolism of aflatoxin B₁ in the bovine olfactory mucosa. *Carcinogenesis* 10(6):1113-1118.
- Leszczynska J., Masłowska J., Owczarek A. and Kucharska U., (19) Determination of Aflatoxins in Food Products by ELISA Method, *Food Chemistry* 8-12.
- 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.
- Lopez. C.L Ramos.S., Ramadan L. Bulacio, and J.Perez. 2001, Distribution of aflatoxin M₁ in cheese obtained from milk artificially contaminated. *Int J. Food Microbiol*, 64, 211-215.
- 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.
- López-García, 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.
- Magliulo, M.; Mirasoli, M.; Simoni, P.; Lelli, R.; Portnti, O.; Roda, A. Development and validation o fan ultrasensitive chemiluminescent enzyme immunoassay for aflatoxin M₁ in milk *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53,3300-3305.

- 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.
- Martins, M. L., Martins, H. M. 2000. Aflatoxin M₁ in raw and ultrahigh temperature – treated milk commercialized. *Food Add Cont* 17:871-874.
- Martins, M. L., Martins, H. M. 2004. Aflatoxin M₁ in yoghurts in Portugal. *Int J Food Microbiol* 91:315– 317.
- 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.
- 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.
- Montagna M. T. Napoli C. Giglio O., Iatta R. Y Barbuti G. 2008, Ocurrence of Afltoxin M₁ in Dairy Products in Southern Italy, *Int. J- Mol. Sci.* 9., 2614-2621.
- 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.
- 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.
- 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.

- Organización Panamericana de la Salud, OPS. 1983. Criterios de Salud Ambiental II. Micotoxinas N°. 453 p.
- 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.
- Oruc. H. H., Cibik, R, Yilmaz E., & Kalkanli O. (2006) Distribution and stability of Sflatoxin M₁ during processing and ripening of traditional white pickled cheese, *Food Additives and Contaminants*, 23(2) 190-195.
- Ortiz, C., Portilla, L., Medrano, 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.
- Osweiler, G. D. 1996. Toxicology. Ed. Williams & Wilkins. ISBN 0-683-06664-1. PA 19063. USA.
- Park D.L., Lee L.S., Price R.L., Pohland E.A. 1988. Review of the decontamination of aflatoxins by ammoniation: current status and regulation. *Int J AOAC* 71: 685-702.
- Peraica, M., Radic, B., Lucic, A., Pavlovic, M. 1999. Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bull WHO* 77:754–766.
- 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. 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.
- Pittet A. 1998. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds – an update review. *Rev Med Vet* 149: 479–492.
- Pfohl-Leszkwicz A. 2000. Écologie des moisissures et des mycotoxines. Situation en France, *Cah Nutr Diet* 35: 379–388.
- 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 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.
- Pietri, T. Bertuzzi, P. Bertuzzi and G. Piva. 1997, Aflatoxin M₁ occurrence in samples of Grana Padano cheese. *Food Additives and Contaminants*, Vol. 14, No. 4, 341-344.
- 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.
- Rastogi, S., Dwivedi, P. D., Khanna, S. K., Das, M. 2004. Detection of Aflatoxin M₁ contamination in milk and infant milk products from Indian markets by ELISA. *Food Cont* 15:287-290.
- 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.
- Reyes-Velázquez, W. P., Isaías-Espinoza, V. H., Rojo, F., Jiménez-Plasencia, C., de Lucas-Palacios, E., Hernández-Góbora, J., Ramírez-Álvarez, A. 2008. Occurrence of fungi and mycotoxins in corn silage, Jalisco State, Mexico. *Rev Iberoam Micol.* 25: 182-185.
- Reyes-Velázquez, W.P., Landeros-Ramírez, 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.
- Rodríguez-Amaya, D.B., Sabino. M. 2002. Mycotoxin research in Brazil: The last decade in review. *Brazilian J Microbiol* 33:1-11.

- Rodríguez Velasco, M. L., Calonge Delso, M. M., Ordóñez Escudero, D. 2003. ELISA and HPLC determination of the occurrence of aflatoxin M₁ in raw cow's milk. *Food Addit Contam* 5: 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.
- Salunkhe D.K., Adsule R.N., Padule D.N. 1978. Aflatoxins in Foods and Feeds. Metropolitan Book, India.
- Sarimehmetoglu, B.; Kuplulu, O.; Celik, T.H. Detection of Aflatoxin M₁ in cheese samples by ELISA. *Food Control* 2004, 15,45-49.
- 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.
- Stroka, J., Anklam, E. New strategies for the screening and determination of aflatoxins and the detection of aflatoxin producing moulds in food and feed. *Trends Anal. Chem.* 2002,21,90-95.
- 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.
- 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.
- Tajkarimi, M., Shojaee, F., Aliabadi, M., Salah Nejad, H., Pursoltani, A. A. Motallebi, Mahdavi, H. 2007. Seasonal study of aflatoxin M₁ contamination in milk in five regions in Iran. *Int J Food Microbiol* 116: 346-349.

- Tihumala-Devi, K.; Mayo, M.A.; Hall, A.J.; Craufurd, P.Q., Wheeler, T.R.; Waliyar, F.; Subrahmanyam, A.; Reddy, D.V. Development and application of an indirect competitive enzymelinked immunoassay for aflatoxin M₁ in milk and milk-based confectionary. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 933-937.
- Turner, P. C., Moore, S. E., Hall, A. J., Prentice, A. M., Wild, C. P. 2003. Modification of immune function through exposure to dietary aflatoxin in Gambian children. *Environ Health Perspect* 111:217-220.
- Van Egmon, H. P., Paulsch, W. E., Veringa, H. A., & Schuller, P. L. (1977). The effect of processing on the aflatoxin M₁ content of milk and milk products. *Archive Institue, Pasteur Tunis*, 54, 381-390.
- Van Egmond, H. P. 1989. Introduction, in *Mycotoxins in dairy products*. Eds. Hans P. van Egmond. Elsevier Appl Sci.
- Van Egmond, H. P (ed) 1989 *Micotoxins in Dairy products*. Elsevier Applied Science. London and New York.
- Van Egmond, H. P (1991) *Micotoxins International Dairy Federation Special Issue*. 9101, 131-135.
- Van Egmond, H. P. 1994. Aflatoxins in milk, chap. 17, p. 365-381. In D. L. Eaton and J. D. Groopman (ed.), *The toxicology of aflatoxins. Human health, veterinary and agricultural significance*. Academic Press, Inc., San Diego, Calif.
- Vasanthi, S., Bath, R. V. 1988. Mycotoxins in foods--occurrence, health & 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.
- Whitlow, L.W., Diaz, D.E., Hopkins, B.A., Hagler, W.M.2000, Mycotoxins and milk safety: the potential to block transfer to milk, En: Lyons T.P., Jacques K.A. (Eds.), *Proceedings of Alltech's 16th Annual Symposium*, Nottingham University Press, Nottingham, UK, 391-408.
- 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 Animal Sci* 70: 3941-3949.
- Kursat Yapar, Mehmet Elmali, Asim Kart, Hilmi Yaman.2008, Aflatoxin M1 levels in different type of cheese products produced in Turkey. *Medycyna Wet.* 64(1).
- Yaroglu, T., Oruc, H. H., Tayar, M. 2005. Aflatoxin M₁ levels in chesse 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.
- Yousef, A. E., y Marth. E. H (1989) Stability and degradation of aflotoxin M1, In H. P. Van Egmond (Ed) *Mycotoxins in dairy products* (pp) (127-161) London and New York Elsevier Applied Science.

ANEXO 1. ANOVA Aflatoxinas Totales (AFT)

Prueba Normalidad: Aceptado (P = 0.268)

Prueba Varianza iguales: Aceptado (P = 0.074)

Nombre del grupo	N	Perdidos	Promedio	Std Dev	SEM
Acatic	5	0	10.148	2.879	1.288
Zapotlanejo	5	0	10.846	4.296	1.921
Ocotlán	5	0	7.569	0.679	0.304
Tototlán	5	0	5.999	1.000	0.447
Valle de Guadalupe	5	0	12.894	5.526	2.471
Tepatitlán	5	0	22.043	2.839	1.270
Jalostotitlán	3	0	6.897	2.646	1.528
San Juan	4	0	8.229	4.040	2.020

Fuente de variación	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	7	895.576	127.939	11.237	<0.001
Residual	29	330.168	11.385		
Total	36	1225.744			

Se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos (P = <0.001).

Procedimiento de comparación todos entre todos (Método Holm-Sidak):

Comparación	Diff del Promedio	t	P No ajustado	Nivel Crítico
Tepatitlán vs. Tototlán	16.044	7.518	0.000000275	0.000
Tepatitlán vs. Ocotlán	14.473	6.782	0.000000191	0.000
Tepatitlán vs. Jalostotitlán	15.146	6.147	0.00000107	0.000
Tepatitlán vs. San Juan	13.814	6.103	0.00000120	0.000
Tepatitlán vs. Acatic	11.895	5.574	0.00000516	0.000
Tepatitlán vs. Zapotlanejo	11.196	5.247	0.0000128	0.000
Tepatitlán vs. Valle de Gua	9.149	4.287	0.000183	0.000
Valle de Gua vs. Tototlán	6.895	3.231	0.00307	0.000
Valle de Guadalupe vs. Ocotlán	5.324	2.495	0.0185	0.001
Valle de Gua vs. Jalostotitlá	5.997	2.434	0.0213	0.001
Zapotlanejo vs. Tototlán	4.848	2.272	0.0307	0.001
Valle de Gua vs. San Juan	4.665	2.061	0.0484	0.001
Acatic vs. Tototlán	4.149	1.944	0.0616	0.001
Zapotlanejo vs. Jalostotitlán	3.950	1.603	0.120	0.001
Zapotlanejo vs. Ocotlán	3.277	1.536	0.135	0.001
Acatic vs. Jalostotitlán	3.251	1.320	0.197	0.001
Valle de Guadalupe vs. Acatic	2.746	1.287	0.208	0.001
Acatic vs. Ocotlán	2.579	1.208	0.237	0.001
Zapotlanejo vs. San Juan	2.618	1.157	0.257	0.001
San Juan vs. Tototlán	2.230	0.985	0.333	0.001
Valle de Gua vs. Zapotlanejo	2.047	0.959	0.345	0.001
Acatic vs. San Juan	1.919	0.848	0.403	0.001
Ocotlán vs. Tototlán	1.571	0.736	0.468	0.002
San Juan vs. Jalostotitlán	1.332	0.517	0.609	0.002
Jalostotitlán vs. Tototlán	0.898	0.364	0.718	0.003
Zapotlanejo vs. Acatic	0.698	0.327	0.746	0.003
San Juan vs. Ocotlán	0.659	0.291	0.773	0.005
Ocotlán vs. Jalostotitlán	0.673	0.273	0.787	0.010

Comparación	Significante
Tepatitlán vs. Tototlán	Yes
Tepatitlán vs. Ocotlán	Yes
Tepatitlán vs. Jalostotitlán	Yes
Tepatitlán vs. San Juan	Yes
Tepatitlán vs. Acatic	Yes
Tepatitlán vs. Zapotlanejo	Yes
Tepatitlán vs. Valle de Gua	Yes
Valle de Gua vs. Tototlán	No
Valle de Guadalupe vs. Ocotlán	No
Valle de Gua vs. Jalostotitlá	No
Zapotlanejo vs. Tototlán	No
Valle de Gua vs. San Juan	No
Acatic vs. Tototlán	No
Zapotlanejo vs. Jalostotitlán	No
Zapotlanejo vs. Ocotlán	No
Acatic vs. Jalostotitlán	No
Valle de Guadalupe vs. Acatic	No
Acatic vs. Ocotlán	No
Zapotlanejo vs. San Juan	No
San Juan vs. Tototlán	No
Valle de Gua vs. Zapotlanejo	No
Acatic vs. San Juan	No
Ocotlán vs. Tototlán	No
San Juan vs. Jalostotitlán	No
Jalostotitlán vs. Tototlán	No
Zapotlanejo vs. Acatic	No
San Juan vs. Ocotlán	No
Ocotlán vs. Jalostotitlán	No

ANEXO 2.**ANOVA Aflatoxina M₁ (AFM₁)****Prueba Normalidad:** Aceptado (P = 0.056)**Prueba Varianza iguales:** Aceptado (P = 0.655)

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA

Nombre del grupo	N	Perdidos	Promedio	Std Dev	SEM
Acatic	5	0	34.600	19.743	8.829
Zapotlanejo	5	0	27.400	13.921	6.226
Ocotlán	3	0	16.164	12.552	7.247
Tototlán	3	0	10.169	2.069	1.195
Valle de Guadalupe	5	0	13.932	8.558	3.827
Tepatitlán	2	0	7.687	2.494	1.764
Jalostotitlán	5	0	30.241	16.777	7.503
San Juan	4	0	30.870	20.644	10.322

Fuente de variación	DF	SS	MS	F	P
Entre grupos	7	2788.572	398.367	1.783	0.137
Residual	24	5361.587	223.399		
Total	31	8150.159			

No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos (P = 0.137).