

T
926

~~83571~~
83571

3571

MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE AFLATOXINA B₁
EN ALIMENTO PARA CABRAS Y AFLATOXINA
M₁ EN LECHE CRUDA Y QUESO DE CABRA

T E S I S
(Idónea Comunicación de Resultados)

Que para obtener el grado de
Maestra en Ciencias Agropecuarias

PRESENTA

M. V. Z. Fátima Itzel Martínez Solís

COMITÉ TUTORAL

Director:

Dr. Rey Gutiérrez Tolentino

Asesor:

Dr. Salvador Vega y León

Asesor:

Dr. Gilberto Díaz González

México, D. F. Diciembre de 2009

AGRADECIMIENTOS

Antes que nada, quiero agradecer a dios por darme las fuerzas y los ánimos para seguir y sacar adelante la Maestría.

A mis padres y hermanos por todo su apoyo, amor y palabras de aliento. A ti señora, por estar siempre con tus hijos en los momentos más difíciles, haciendo hasta lo imposible por sacarnos adelante. A mis hermanas, por los momentos difíciles en que tuvieron que dejar de lado de cierta forma una etapa de su vida por ayudar a mi madre a sacarnos adelante a mi hermano y a mí. Los quiero mucho a todos y agradezco a dios por la familia que tengo, sobre todo porque después de todo lo vivido actualmente estamos juntos como lo que somos, una familia.

Al Dr. Gilberto Díaz González, por todo el apoyo brindado. Al Dr. Salvador Vega y León, porque se que detrás de todo lo que pasa el esta ahí. Pero sobre todo, al Dr. Rey Gutiérrez Tolentino por haber creído en mí desde que llegue al laboratorio a hacer mi servicio social y por todo el apoyo brindado desde entonces, muchas gracias Dr. Rey.

A la M. Bety, Rutifo, Lufú y Dr. Arturo Escobar, por todo su apoyo académico y moral. A mi gran amigo Jesús, por ser mi compañero de trabajo desde que llegue al laboratorio; por apoyarme y por aguantarme. A todos los que tuvieron que ver para que esta tesis se realizara, gracias.

Por último, y no por eso menos importantes sino todo lo contrario, pichínlo y píxte, por dejarlos solos tanto tiempo y por recibir a cambio tanto amor incondicional de su parte. A ti mi Richie, por todo tu amor, apoyo y palabras de aliento en los momentos más difíciles para no caermé y seguir adelante. Por ser mi compañero, por soportarme en esos momentos de histeria y porque el sueño que un día empezamos no se termine, sino todo lo contrario que se mayor cada día, Te Amo Mucho.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	3
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN	5
I. PRODUCCIÓN CAPRINA	7
1.1 Población caprina	8
1.2 Producción de leche de cabra	9
1.3 Sistemas de producción caprina	10
1.3.1 Sistema extensivo	11
1.3.2 Sistema semiintensivo	11
1.3.3 Sistema de estabulación total o intensivo	11
1.3.4 Otros sistemas	11
1.4 Alimentación del ganado caprino	12
1.4.1 Cereales	12
1.4.2 Concentrados	12
1.4.3 Ensilados	12
II. ANTECEDENTES DE LAS AFLATOXINAS	13
2.1 Problemática a resolver	16
2.1.1 Ubicación del problema	16
2.2 Hipótesis	16
2.3 Objetivos	17
2.3.1 Objetivo general	17
2.3.2 Objetivos específicos	17
III. MICOTOXINAS	18
3.1 Aflatoxinas	19
3.1.1 Aflatoxina B ₁	20
3.1.2 Aflatoxina M ₁	21
3.1.3 Toxicocinética	21
3.1.4 Toxicodinámica	22
3.1.5 Efectos tóxicos de las aflatoxinas	23
3.1.6 Aflatoxina B ₁ en alimentos	25
3.1.7 Aflatoxina M ₁ en leche y derivados lácteos	26
3.1.8 Prevención y control de las micotoxinas	27
3.1.9 Aspectos legislativos de las aflatoxinas y Normativa vigente	28
3.2 Métodos de análisis de las aflatoxinas	29
3.2.1 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)	30
IV. METODOLOGÍA	32
4.1 Zonas de estudio	32
4.1.1 Apaseo el Grande, Guanajuato	32
4.1.2 Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA) de la FMVZ de la UNAM	33
4.2 Muestreo	34
4.2.1 Alimentos	34
4.2.2 Leche	34
4.2.3 Quesos	34
4.3 Métodos de determinación	34
4.3.1 Determinación de aflatoxina B ₁ en alimentos	34
4.3.2 Determinación de aflatoxina M ₁ en leche	38

4.3.3 Determinación de aflatoxina M ₁ en quesos	42
4.4 Análisis estadístico	46
4.5 Validación de los métodos bajo las directrices del Centro Nacional de Metrología (CENAM)	46
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
VI. CONCLUSIONES	57
VII. RECOMENDACIONES	58
BIBLIOGRAFÍA	59

ÍNDICE DE CUADROS

1	Población de cabras por Estados de la Republica Mexicana	9
2	Producción de leche de cabra por Estados de la Republica Mexicana	10
3	Resultados de algunas investigaciones en el Mundo sobre la presencia de AFM ₁ en leche	13
4	Tipos de hongos productores de micotoxinas	18
5	Incidencia de aflatoxinas en alimentos de diferentes países	26
6	Limites Máximos Permisibles (LMP) de AFB ₁ y AFM ₁ establecidos en diferentes países	29
7	Frecuencias de ocurrencia de AFB ₁ en concentrados por intervalos de concentración	50
8	Frecuencias de ocurrencia de AFB ₁ en ensilados por intervalos de concentración	50
9	Frecuencias de ocurrencia de AFM ₁ en leches por intervalos de concentración	54
10	Frecuencias de ocurrencia de AFM ₁ en quesos por intervalos de concentración	54

ÍNDICE DE FIGURAS

1	Estructura química de las aflatoxinas	20
2	Estructura química de la aflatoxina B ₁	21
3	Estructura química de la aflatoxina M ₁	21
4	Transformación de AFB ₁ a AFM ₁	22
5	Formación aducto aflatoxina-DNA	22
6	Ubicación geográfica de Apaseo el Grande, Guanajuato	32
7	Ubicación geográfica del CEPIPSA	33
8	Perfil cromatográfico de las aflatoxinas B ₁ y M ₁ derivatizadas	48
9	Concentraciones de AFB ₁ en concentrados	51
10	Concentraciones de AFB ₁ en ensilados	51
11	Concentraciones de AFB ₁ en concentrados por mes	53
12	Concentraciones de AFB ₁ en ensilados por mes	53
13	Concentraciones de AFM ₁ en leches	55
14	Concentraciones de AFM ₁ en quesos	55

RESUMEN

Se colectaron muestras del alimento (concentrado y ensilado) proporcionado a las cabras para determinar el contenido de AFB₁, y muestras de leche cruda y queso de cabra para determinar el contenido de AFM₁, procedentes de cuatro unidades de producción caprina (Unidad 1, Unidad 2, Unidad 3 y Unidad 4) pertenecientes a la Asociación de Caprinocultores Unidos de Apaseo el Grande, Guanajuato, y del Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA) de la FMVZ de la UNAM. Las muestras fueron tomadas simultáneamente cada mes durante el periodo comprendido de junio del 2008 a agosto del 2009, de acuerdo a la metodología propuesta por la Norma NOM-188-SSA1-2002 para el caso de los alimentos y por la Norma NMX-F-718-COFOCALEC-2006 para el caso de la leche y el queso. Se obtuvieron un total de 50 muestras de concentrados, 30 muestras de ensilados, 49 muestras de leche y 30 muestras de queso. Fueron analizadas para determinar la presencia de aflatoxina B₁ y M₁ mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución, empleando una columna de fase reversa y detección por fluorescencia previa derivatización de la toxina con ácido trifluoroacético. El 28.85 % de las muestras de concentrados presentaron niveles de AFB₁ superiores al Límite Máximo Permisible establecido en México por la NOM-188-SSA1-2002 (20 µg/kg); y un 7.69 % presentaron niveles de AFB₁ superiores al valor establecido por la UE (5 µg/kg). El valor de concentración más elevado fue de 974.01 µg/kg. El 20 % de las muestras de ensilados presentaron niveles de AFB₁ superiores al Límite Máximo Permisible establecido por la UE; y un 10 % presentaron niveles de AFB₁ superiores al valor establecido en México por la NOM-188-SSA1-2002. El valor de concentración más elevado fue de 123.08 µg/kg. El 16.33 % de las muestras de leche presentaron niveles de AFM₁ superiores al Límite Máximo Permisible establecido por la UE (0.05 µg/L); y un 12.24 % presentaron niveles de AFM₁ superiores al valor establecido en México por la NMX-F-728-COFOCALEC-2007 (0.5 µg/kg). El valor de concentración más elevado fue de 8.11 µg/L. El 3.33 % de las muestras de quesos presentaron niveles de AFM₁ superiores al Límite Máximo Permisible establecido por la UE (0.2 µg/kg); y un 13.33 % presentaron niveles de AFM₁ superiores al valor establecido por el CODEX ALIMENTARIUS (0.25 µg/kg). El valor de concentración más elevado fue de 2.08 µg/kg.

ABSTRACT

Food samples were collected (concentrate and silage) provided to the goats to determine the content of AFB₁, and samples of raw milk and goat cheese to determine the content of AFM₁ from four goat production units (Unit 1, Unit 2, Unit 3 and Unit 4) belonging to the Association of United Caprinocultores Apaseo el Grande, Guanajuato, and the Center for Teaching Practice and Research in Animal Production and Health (CEPIPSA) of the UNAM FMVZ. The samples were taken simultaneously every month during the period June 2008 to August 2009, according to the methodology proposed by the NOM-188-SSA1-2002 for the case of foods and the Standard NMX-F-718-COFOCALEC-2006 for the case of milk and cheese. We obtained a total of 50 samples of concentrate, silage 30 samples, 49 samples of milk and 30 samples of cheese. Were analyzed for the presence of aflatoxin B₁ and M₁ by high resolution liquid chromatography, using a reverse phase column and fluorescence detection after derivatization with trifluoroacetic acid toxin. The 28.85 % of samples had levels of AFB₁ concentrated above maximum permissible limit set in Mexico NOM-188-SSA1-2002 (20 µg/kg) and 7.69 % presented AFB₁ levels higher than the value established by the EU (5 µg/kg). The highest concentration value was 974.01 µg/kg. 20 % of silage samples had levels of AFB₁ above maximum permissible limit set by the EU, and 10 % had higher levels of AFB₁ in Mexico at the value established by NOM-188-SSA1-2002. The highest concentration value was 123.08 µg/kg. The 16.33 % of milk samples submitted AFM₁ levels above maximum permissible limit set by the EU (0.05 µg/L), and 12.24 % had levels higher than the value of AFM₁ established in Mexico by the NMX-F-728-COFOCALEC-2007 (0.5 µg/kg). The highest concentration value was of 8.11 µg/L. The 3.33 % of cheese samples showed higher levels AFM₁ the maximum permissible limit set by the EU (0.2 µg/kg), and 13.33 % had levels higher than the value AFM₁ established by the Codex Alimentarius (0.25 µg/kg). The highest concentration value was 2.08 µg/kg.

INTRODUCCIÓN

Hoy día, en el sistema de producción de los alimentos es muy importante asegurar la calidad e inocuidad alimentaria, factores que se han vuelto relevantes para muchos países (FAO, 2005).

Dentro de los alimentos, la leche es considerada sin lugar a dudas como el alimento más completo que existe en la naturaleza después del huevo; su importancia se basa en su alto valor nutritivo, ya que contiene Ca, P, vitamina B₂, grasa y proteínas de alta calidad para el humano (Trujillo, 2002). Por lo cual forma parte de las estrategias de la seguridad alimentaria (FAO, 2005).

En el sistema de producción de leche hay un atributo particular de calidad que es indispensable: la inocuidad. La necesidad de asegurar la inocuidad de la leche, es considerar todos los niveles de la cadena alimentaria, donde cada elemento tiene potencial de influir sobre la inocuidad del producto. Debido a lo anterior, existe una serie de lineamientos bien documentados y fundamentados que el ganadero debe cuidar para asegurar la salud del consumidor, y en general, la producción pecuaria. Algunos de estos lineamientos son las buenas prácticas pecuarias, las cuales son procedimientos recomendados y aprobados que integran los principios de seguridad y calidad de un alimento. La implementación de las buenas prácticas pecuarias en el establo lechero, tiene como objetivo primordial prevenir problemas de contaminación de la leche destinada al consumo humano (Trujillo, 2002).

Existen numerosos peligros asociados a la falta de inocuidad de la leche, principalmente por infecciones bacterianas causantes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs). Hoy en día se han logrado disminuir considerablemente los riesgos de infecciones humanas mediante los tratamientos térmicos de pasteurización y ultrapasteurización; sin embargo estos tratamientos no eliminan otros peligros como los residuos tóxicos, dentro de los cuales se encuentran las aflatoxinas (Ortega, 1998; Gimeno y Martins, 2003).

Las aflatoxinas son sustancias tóxicas producidas en el metabolismo secundario de los hongos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y *Penicillium puberulum*; los cuales aparecen como contaminantes naturales en casi la totalidad de las materias primas utilizadas en la alimentación de los animales cuando las condiciones climáticas son propicias para su desarrollo (Alonso Díez *et al*; 2002). Las aflatoxinas se pueden encontrar en cualquier punto de la cadena alimentaria, desde la siembra y cosecha, hasta la carne, leche y derivados lácteos que se consumen originando un grupo de enfermedades y trastornos denominados micotoxicosis, afectando a el humano y a los animales (Bolet y Socarrás, 2005).

Se han identificado 18 tipos de aflatoxinas, de las cuales sólo seis tienen significación como contaminantes de los alimentos: B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ y M₂; de ellas la aflatoxina B₁ (AFB₁) es la más carcinogénica y tóxica (Vega y León, 1998). Las aflatoxinas se pueden encontrar dentro del organismo animal, con su original estructura química, transformadas o ambas. El organismo de los animales tiene la capacidad para transformar las aflatoxinas originales en derivados de éstas, los cuales pueden ser también tóxicos, este es el caso de la aflatoxina M₁ (AFM₁); la

cual es secretada en la leche de los animales que consumen alimentos contaminados con AFB₁ (Gimeno y Martins, 2001).

El objetivo de este trabajo fue determinar el contenido de Aflatoxina B₁ en alimento para cabras y Aflatoxina M₁ en leche cruda y queso de cabra en muestras procedentes de cuatro unidades de producción caprina del Altiplano Mexicano (APM) en dos épocas del año.

I. PRODUCCIÓN CAPRINA

Desde la época prehistórica el hombre utilizaba las cabras. Hasta donde se sabe, fueron los primeros animales domesticados después del perro (Koeslag, 2007). La cabra fue una de las primeras especies animales introducidas por los españoles en México en el siglo XVI, y se continuaron importando hasta el siglo pasado, con el propósito de sostener e incrementar sus inventarios (Vega *et al.*, 2005).

La cabra es un animal que posee su propio sitio ecológico dentro de la producción pecuaria. El número de estos animales en el mundo y su importancia económica son considerables. Sin embargo, su atención ha sido relegada a lugares secundarios (Koeslag, 2007).

La adaptabilidad a climas variados y condiciones de manejo, aunado a su docilidad, facilidad para el manejo y la factibilidad de obtener leche diariamente, hacen de la cabra un animal de gran valor actual y futuro para mejorar el nivel de vida de los productores (Sánchez, 2004).

Las características y cualidades de explotación y producción que presenta el ganado caprino, es lo que motiva el creciente incremento de su censo en amplias zonas del mundo. De acuerdo a diferentes autores ofrecen ventajas sobre el ganado ovino y bovino, como:

- ❖ Es mucho más económico criar cabras que vacas u ovejas ya que los costos de compra, cuidado, manejo y alimentación son más bajos y la producción es proporcionalmente mayor. Además su tamaño las hace mucho más fáciles de manejar (Lesur, 2004).
- ❖ Capacidad para efectuar desplazamientos ágiles y rápidos, pudiendo afrontar zonas de pendientes y difícil tránsito, llegando a lugares inaccesibles para otro tipo de ganado (Arbiza y De Lucas, 2001).
- ❖ En tierras áridas y montañosas, la cabra es el único animal que económicamente proporciona leche, aparte de que la leche de estos animales es útil para fines terapéuticos, por ser dulce, nutritiva y medicinal (Lesur, 2004).
- ❖ Se combina bien con otras especies animales, permitiendo el pastoreo combinado con ovinos, bovinos o equinos, completando más que compitiendo por el pasto debido a su capacidad de utilizar una amplia variedad de plantas, ya que digiere mejor la fibra que la oveja aprovechando mejor las vegetaciones pobres y matorrales espinosos; además, y en contra de la creencia popular, es menos dañina que la oveja en caso de pastoreo abusivo. La oveja, a causa de su labio superior bífido, arranca hasta las raíces de las hierbas, cosa que la cabra no puede hacer (Capote, 2002; Lebbie, 2004).
- ❖ Después de períodos alimenticios difíciles, se recupera mejor y más rápidamente que los ovinos y los bovinos (Iñiguez, 2004).
- ❖ En lo que a enfermedades se refiere, el ganado caprino es más resistente que el ovino o el bovino. Las cabras son más resistentes a la mastitis clínica debido a su mecanismo de regulación de la migración de neutrófilos al interior del tejido mamario (Amorena *et al.*, 2000).
- ❖ Tienen una gran capacidad reproductora. El período que necesita una cabra para poder reproducirse es menor que el de otro tipo de ganado, debido a que

la edad de maduración sexual es más temprana; un año en los machos y siete meses en las hembras. Las hembras pueden parir dos veces al año, y dan dos o más crías en cada parto (Lesur, 2004).

- ❖ Es una de las especies domésticas que presenta más aptitudes. Produce leche, idónea tanto para su consumo directo como para su transformación en queso, yogur, crema, mantequilla, dulces o como ingrediente cosmético; también produce carne, piel, pelo, estiércol e inclusive sirve como animal de carga (Fernández, 2006).
- ❖ Es un animal conformado para la producción láctea de modo superior que el resto de los mamíferos. Según Agraz (1981), las cabras son más eficaces como productoras de leche, por unidad de peso vivo, que la oveja e incluso que la vaca. No obstante su tamaño, son excelentes productoras de leche, que en promedio varía de 600 a 800 litros al año, con 3.7 a 4.5 % de grasa. Una vaca miniaturizada al tamaño de una cabra produciría apenas la mitad de la leche de una cabra (Lesur, 2004).
- ❖ El ganado caprino es hoy una de las alternativas más interesantes para el desarrollo de determinadas regiones del planeta y con ventajas desde el punto de vista ecológico, ya que combate la propagación de malezas, clarifica los chaparrales permitiendo que se desarrollen gramíneas en el suelo y actúa como regeneradora de la vegetación, dispersando las semillas en el estiércol (Arbiza y De Lucas, 2001; Capote, 2002).

Las desventajas del ganado caprino en comparación con el bovino, son:

- ❖ Su menor tamaño lo hace susceptible al robo y depredación.
- ❖ La estacionalidad de la reproducción impide algunas veces la adaptación del manejo a las condiciones del mercado.
- ❖ La cabra siempre ha sido un animal de controversia por su hábito de pastoreo. Como a menudo se le encuentra en terrenos sobrepastoreados, se dice que ella ha acabado con la vegetación y, que por tanto, es culpable de la erosión. Sin embargo, con frecuencia el hombre es quien ha ocasionado el deterioro de la vegetación, por un manejo inadecuado y el sobrepastoreo de los terrenos. Esto sucede a menudo, a grado tal, que en estos lugares sólo las cabras pueden sobrevivir.
- ❖ Es portadora de la brucella, ocasionando en el humano la fiebre de malta.
- ❖ Los terrenos húmedos les provocan infección en las pezuñas.
- ❖ La cabra soporta menos aislamiento que la vaca (Cantu, 2004).

1.1 Población caprina

En el contexto de la ganadería mundial y desde una perspectiva puramente cuantitativa, el ganado caprino tiene una importancia discreta; no obstante en ciertas zonas geográficas la cabra juega un importante papel económico y social cuya trascendencia cualitativa es muy superior de la que podría deducirse de las cifras estadísticas (Fernández, 2006). Si bien se puede pensar que las cabras no son importantes en el contexto productivo nacional, éstas constituyen la única riqueza y fuente de subsistencia en muchos sectores marginales, ya que la cabra es el principal suministrador de productos lácteos y cármicos para la sociedad rural, y su demanda para uso doméstico se está incrementando por el aumento de la población (Arbiza y De Lucas, 2001).

Las cabras pueden subsistir en medios extremadamente difíciles, la mayoría de ellas se encuentran en los países menos desarrollados y ubicados principalmente en los trópicos, regiones áridas y semiáridas (Tejón, 1985).

Se calcula que la población mundial de cabras es aproximadamente 700 millones de cabezas, el 64 % se sitúa en el continente asiático (China e India), el 29 % en el africano (destacando Sudán), el 5 % en el americano (Brasil y México a la cabeza) y Europa representa el 2 %, siendo los países mediterráneos los cuales concentran la mayoría del ganado caprino (FAO, 2004; FAOSTAT, 2005).

En México, la población caprina se sitúa en 8, 952,144 cabezas (SIAP, 2008). Casi la tercera parte de esta población se concentra en los estados de Puebla y Oaxaca, con el 16.06 % y 13.25 % del censo total (Cuadro 1).

Cuadro 1. Población de cabras por Estados de la Republica Mexicana		
Estado	Número de cabezas	Porcentaje
Puebla	1, 438, 577	16.06
Oaxaca	1, 186,789	13.25
Guerrero	676, 613	7.55
Coahuila	656, 555	7.33
San Luis Potosí	610, 334	6.81
Zacatecas	562,744	6.28
Guanajuato	559,239	6.24
Michoacán	482, 717	5.39
Nuevo León	344,962	3.85
Durango	333,614	3.72
Resto de los Estados con censo inferior al 3 %	2, 100, 000	23.52
Total Nacional	8, 952, 144	100

Fuente: SIAP, 2008

Las principales razas caprinas en producción en México son Saanen, Alpina, Toggenburg, Nubia y Murciana, concentradas para la producción de leche en el Altiplano Mexicano y Norte del País (Gurria, 2004). También se encuentran las cabras nativas Criolla y Cimarrona (caracterizada por producir pelo fino) de la Isla de Guadalupe, Baja California, Angora para producción de pelo y la Boer para carne (Hernández, 2000).

1.2 Producción de leche de cabra

Desde un punto de vista de biotipo, la cabra es una especie estrictamente productora de leche, idónea tanto para su consumo directo como para su transformación en queso, yogur, crema, mantequilla o dulces (Fernández, 2006).

Se define como leche de cabra a la secreción natural posparto de la glándula mamaria de la cabra después del calostro, sin sustracción alguna de sus componentes y sin tratamiento térmico (Norma Mexicana NMX-F-728-COFOCALEC-2007). Presenta una composición general similar a la leche de vaca, pero tiene mayores contenidos de sales minerales como: calcio, potasio, magnesio, manganeso y de vitaminas como A y D. La leche de cabra es más digerible que la

de vaca para la especie humana, debido a que el tamaño del glóbulo de grasa es más pequeño (Fevrier *et al.*, 1993).

La producción mundial de leche de cabra en 2005 fue de 12, 435, 175 toneladas. Asia (India y Bangladesh a la cabeza), con el 54 % de la producción, es el continente más destacado seguido de África (Sudán en primer lugar) con el 23 % y Europa (Francia, Grecia y España) con el 21 %. América representa el 3 % de la producción mundial de leche de cabra (FAOSTAT, 2005).

Actualmente, la leche de cabra y sus derivados han recibido en los últimos años mayor atención mundial. Su producción se ha incrementado en las últimas dos décadas contribuyendo a mejorar la economía de productores, industriales e incrementando el aporte nutricional en varios sectores de consumidores (Vega y León, 2005). Haenlein (2001), utilizando datos de la FAO (1985), demostró que de 1979 a 1998, la producción de leche de cabra en el mundo aumentó en un 69 %, muy por arriba de la leche de vaca y de oveja con 10 y 2 % respectivamente.

En México, la producción de leche de cabra, que representa el 1.56 % de la cantidad de leche de vaca producida, los datos oficiales registraron en el año 2008 un total de 164, 974 toneladas (SIAP, 2008), siendo Coahuila, Durango y Guanajuato los estados con mayor producción con el 35.02, 23.02 y el 14.86 % del total nacional, respectivamente (Cuadro 2).

Cuadro 2. Producción de leche de cabra por Estados de la Republica Mexicana		
Estado	Toneladas	Porcentaje
Coahuila	57, 786	35.02
Durango	37,990	23.02
Guanajuato	24, 517	14.86
Chihuahua	9, 704	5.88
Jalisco	6, 325	3.83
Zacatecas	5, 131	3.11
Resto de los Estados con censo inferior al 3 %	23, 521	14.28
Total Nacional	164, 974	100

Fuente: SIAP, 2008

En México, la demanda de derivados de leche de cabra se ha incrementado a través del consumo de algunas variedades de quesos, cajetas y dulces similares. De la producción total anual de la leche de cabra, el 70 % se consume cruda o se utiliza para elaborar quesos artesanales y su comercialización es local. El 30 % se utiliza en la industria, de este porcentaje, alrededor del 20 % se transforma industrialmente en queso y el 10 % restante en cajeta y dulces (Trujillo y Almudena, 2004).

1.3 Sistemas de producción caprina

El sistema de producción caprina depende de factores como el clima, el tipo y cantidad de terreno disponible, número de cabras en el rebaño y la finalidad de la producción, ya sea leche, carne, pieles y lana (Koeslag, 2007).

1.3.1 Sistema extensivo

Se practica en la mayor parte del territorio nacional, principalmente en las regiones áridas y semiáridas y representa el 85 % del total de los sistemas de producción empleados. La estructura base principal es la tenencia de la tierra de tipo ejidal. Sus características son:

- ❖ El objetivo de este tipo de producción es la carne del animal para el consumo familiar.
- ❖ Basa la alimentación en el ramoneo y pastoreo de agostaderos, en los cerros y a las orillas de los caminos y canales de riego. El pastoreo es diurno con refugio nocturno y pueden tener ya sea rutas fijas (sedentario) o migratorias (nómadas o trashumantes). La suplementación es escasa y en ocasiones se limita a rastrojo de maíz o maguey picado.
- ❖ La mano de obra es de tipo familiar empleándose principalmente para el pastoreo del ganado (6 a 10 horas de duración).
- ❖ Los apareamientos son continuos, permaneciendo juntos durante todo el año los machos y las hembras y el destete es natural.
- ❖ El manejo sanitario es deficiente y tiende a ser curativo más que preventivo, dirigiéndose a los problemas clínicos más comunes como los de tipo respiratorio, parasitario y digestivo (diarreas).
- ❖ Para la comercialización de los productos no se tienen canales oficiales ni específicos y es frecuente la aparición de intermediarios por los que los precios son erráticos o variables.
- ❖ La asistencia técnica y asignación de créditos son difíciles dada la solvencia del productor (que no lo hace sujeto de crédito). Pero también son irregulares las iniciativas de formación de cooperativas o de organizaciones de caprinocultores, agravando la posibilidad de establecer programas de desarrollo caprino.

1.3.2 Sistema semiintensivo

Se caracteriza por la combinación del pastoreo en praderas, ramoneo en matorrales y utilización de fuentes alimenticias de regular calidad nutritiva (trigo, algodón, etc); así como de la posibilidad de suplementar con granos y forrajes. Aún se tienen construcciones rústicas pero que brindan un mayor bienestar a los animales. Los productos principales son la leche, cabras para cría y sementales para venta.

1.3.3 Sistema de estabulación total o intensivo

Se practica en las unidades lecheras de alta producción, con alto rendimiento biológico y donde los animales están confinados permanentemente, suministrándoseles el alimento en el corral (forrajes de corte, granos y esquilmos). Los productos principales son la leche y la venta de reproductores. Este tipo de sistema representa el 15 % del total de los sistemas de producción empleados.

1.3.4 Otros sistemas

Toma como base a la función objetivo y se consideran los siguientes:

- ❖ Sistema de producción leche-cabrino. Se practica en las regiones donde se dispone de recursos alimenticios (vegetación natural y residuos de la cosecha

de regadío) y animales especializados para la producción de leche (Saanen, Anglonubia, Alpino Francés y Toggenburg).

- ❖ Sistema de producción carne-adulto. Localizado en las zonas semiáridas y donde los animales comercializados tienen entre seis y doce meses de edad, además de todos los adultos de descarte.
- ❖ Sistema de producción de cabrito. Se ejerce en las regiones más secas induciéndose por la escasez de recursos alimenticios para el ganado y obligando a la venta de los cabritos (Arbiza, 1986, 1988; Fuente *et al.*, 1989).

1.4 Alimentación del ganado caprino

Alimento, es cualquier sustancia o producto sólido, semisólido o líquido, con o sin transformación, destinado al consumo que proporciona al organismo elementos para su nutrición por vía oral (Norma Oficial Mexicana NOM-155-SCFI-2003).

1.4.1 Cereales

Granos o semillas comestibles de las plantas de las gramíneas, entre los que se incluyen: arroz, avena, cebada, centeno, maíz, sorgo, triticale y trigo (Norma Oficial Mexicana NOM-188-SSA1-2002).

1.4.2 Concentrados

Granos ya sean enteros o molidos, principalmente de maíz, sorgo, soya, que proporcionan raciones extras de proteínas para la producción de leche (Lesur, 2004).

1.4.3 Ensilado

Forraje sujeto a un proceso de fermentación que no sólo preserva y enaltece sus cualidades nutritivas, sino que lo hace más digestible y permite conservarlo durante toda la temporada de seca cuando no hay forrajes verdes (Lesur, 2004).

II. ANTECEDENTES DE LAS AFLATOXINAS

El episodio que dio inicio al estudio de las micotoxinas como factores tóxicos de los alimentos, fue en Inglaterra, en el año de 1960, cuando la AFB₁ causó la muerte de más de 100 000 pavos debido al consumo de un lote de cacahuete contaminado importado de Brasil. Desde entonces se han realizado investigaciones sobre las micotoxinas (Noa *et al.*, 2001). En el Cuadro 3, se encuentran algunos resultados de investigaciones sobre la presencia de AFM₁ en leche.

Cuadro 3. Resultados de algunas investigaciones en el Mundo sobre la presencia de AFM ₁ en leche	
País y Año	Niveles encontrados (ng/L)
Alemania, 1995	30 a 400
Bélgica, 1995	8 a 80
Brasil, 1997	100 a 1000
China, 1994	102.8
Ecuador, 1997	120
España, 1995	<10 a 40
Estados Unidos, 1994	95.5
Grecia, 1997	0.5 a 5
India, 1997	6 a 282; 100 a 1000
Polonia, 1994, 1997	85, 3.6 a 50
Tailandia, 1997	<0.1
Taiwán, 1996	80 a 330

Fuente: Noa *et al.*, 2001.

En América Latina, cuatro países han informado estudios vinculados a la presencia de AFM₁ en leche (Argentina, Brasil, Uruguay y México) y solo Brasil muestra un estudio sistemático en esta temática. Los valores obtenidos dan una positividad alta de esta toxina en la leche cuando se comparan con el Límite Máximo Permisible establecido por la Unión Europea (0.05 µg/L) pudiendo llegar hasta un 40%.

La problemática que existe hoy es que los estudios, a excepción de Brasil, son puntuales y no reflejan la realidad de América Latina. Esto se agrava si se observa que existió un incremento de la producción lechera en la región de 4.2% hasta el 2003, que a su vez está acompañado con un incremento en la producción agrícola que se ve afectada en más de un 25% con la presencia de algún tipo de micotoxinas. Por tanto, es de esperarse que se encuentren niveles violatorios del Límite Máximo Permisible de AFM₁ en leche y productos lácteos destinados al consumo humano (Escobar *et al.*, 2005).

En México, los primeros estudios sobre la determinación de AFM₁ fueron realizados en el año de 1995 en el estado de Sonora por Esqueda y su grupo de investigadores en muestras de leche ultrapasteurizada y comercializada en dicho estado. En el periodo de 1996-1998, Carvajal *et al.*, (2003), posteriormente Córdova *et al.*, (2005) hacen otras investigaciones. En el periodo de 2006-2007, Pérez *et al.*, (2007), determinaron la presencia de AFM₁ en queso y leche cruda, ultrapasteurizada y orgánica que se comercializan en la Ciudad de México; encontrando que el 20, 50 y 60 % de las muestras de leche orgánica, cruda y ultrapasteurizada respectivamente presentaron AFM₁ y todos los casos se encontraron por encima del Límite Máximo

Permisible establecido por la Unión Europea (0.05 µg/L). Para el caso de los quesos, el 69 % de las muestras analizadas fueron positivas a la presencia de AFM₁, pero ninguna se encontró por encima del Límite Máximo Permisible establecido por la Unión Europea.

Cabe destacar que toda la información dada anteriormente es referente a leche de vaca y sus derivados, para el caso de la leche de cabra y sus derivados las investigaciones realizadas y la información existente son menores a nivel internacional y prácticamente nula a nivel nacional. Haciendo una comparación entre la información existente en México para ambos casos se obtiene la siguiente relación: AFB₁ en alimentos 92 % en vacas y 8 % en cabras, AFM₁ en leche 90.76 % en vacas y 9.24 % en cabras, AFM₁ en queso 90.47 % en vacas y 9.53 % en cabras. Se puede observar que la diferencia es mucha entre ambos casos, teniendo mayor información en leche de vaca. El hecho de que haya más información sobre leche de vaca se puede deber a que hay una mayor producción (la producción total de leche en el 2008 fue de 164, 974 toneladas, del cual el 1.56 % representa la producción de leche de cabra. FUENTE: SIAP, 2008) y consumo (85 % de leche de vaca y el resto corresponde a otras especies, entre ellas 2 % leche de cabra. Fuente: SAGARPA, 2005) de la leche de vaca y sus derivados dándole mayor importancia a su estudio en comparación con la leche de cabra.

Sin embargo, la leche de cabra y sus derivados son recursos alimentarios que empiezan a recibir mayor atención mundial, debido a que su producción y consumo se han ido incrementando como consecuencia de la demanda de la población a través de tres grandes aspectos:

- ❖ Alimenta en el mundo subdesarrollado a mayor cantidad de personas desnutridas que la leche de vaca, siendo la leche de cabra su principal suministrador de productos lácteos.
- ❖ Existe una demanda terapéutica por parte de aquellas personas que sufren alergias u otros padecimientos gastrointestinales cuando consumen leche de vaca y para los que la leche de cabra se ha convertido en una alternativa benéfica.
- ❖ Es demandada por los gourmet de los productos caprinos, especialmente de quesos y yogures, llenando necesidades gastronómicas de consumidores del mundo desarrollado (Haenlein, 2004).

Los autores que han investigado sobre AFB₁ en alimentos para cabra y AFM₁ en leche y queso de cabra son:

- ❖ Alimentos

En Egipto, Helferich, 1984, determinó la recuperación de las aflatoxinas contenidas en los alimentos a la leche, observando que se recupera entre un 52.3-65 %.

En Egipto, Mashaly *et al.*, 1984, determinaron el efecto de los alimentos contaminados con aflatoxinas (50,100 y 200 µg/kg) sobre la producción de la leche, observando una disminución de la producción proporcional a la cantidad de aflatoxinas.

En Cuba, Acosta *et al.*, 1989, determinaron el porcentaje de conversión de la AFB₁ en AFM₁, obteniendo un porcentaje de 2.09-3.67 %.

En Italia, Battacone *et al.*, 2002, determinaron la transferencia de la aflatoxina de los alimentos a la leche y queso, observando que la concentración de AFM₁ aumenta conforme aumenta la dosis de AFB₁; encontrando que se pierde aproximadamente un 40 % de la AFM₁ durante el proceso de la leche.

En Turquía, Bingol *et al.*, 2007, investigaron la influencia de las aflatoxinas presentes en los concentrados sobre la leche, encontrando correlaciones positivas entre la alimentación y el contenido de AFM₁ en la leche.

❖ Leche

En Portugal, Bento *et al.*, 1990, detectaron los niveles de AFM₁ en leche, obteniendo resultados negativos.

En Brasil, Oliveira y Ferraz, 2007, evaluaron el contenido de AFM₁ en leche pasteurizada y ultrapasteurizada, encontrando un 69 % de muestras positivas con niveles de 0.01-0.1 µg/L, los cuales son inferiores al Límite Máximo Permissible establecido por EUA (0.5 µg/L), pero superiores a el Límite establecido por la UE (0.05 µg/L).

En Turquía, Ozdemir, 2007, evaluó el contenido de AFM₁ en leche, encontrando un 84 % de muestras positivas con niveles de 0.0051-0.1167 µg/L, dentro de las cuales, el 6.36 % resultaron ser superiores al Límite Máximo Permissible por la UE.

❖ Queso

En España, Barrios *et al.*, 1996, determinaron el contenido de AFM₁ en quesos, encontrando un 45 % de muestras positivas en concentraciones de 20-200 ng/kg, los cuales son inferiores al Límite Máximo Permissible establecido por la UE (0.2 µg/kg).

En Italia, Finoli y Vecchio, 1997, determinaron el contenido de AFM₁ en leche y queso, obteniendo un 30 % de las muestras positivas en concentraciones de 3-37 ng/L en leche, los cuales son inferiores a los Límites Máximos Permisibles; y 18-200 ng/kg en queso, los cuales son inferiores al Límite Máximo Permissible establecido por la UE.

En Italia, Minervini *et al.*, 2001, determinaron el contenido de AFM₁ en quesos, encontrando un 19 % de muestras positivas con niveles de 50-250 ng/kg, los cuales son superiores al Límite Máximo Permissible establecido por la UE.

En Italia, Viridis, 2008, determinó el contenido de AFM₁ en leche y queso, encontrando un 10 % de muestras positivas con niveles de 79.5-389 ng/kg, los cuales son superiores al Límite Máximo Permissible establecido por la UE.

Como se puede observar las investigaciones referentes al contenido de aflatoxinas en alimentos, leche y queso de cabra son muy pocas, y la mayoría son recientes y a nivel internacional. Por lo tanto, es importante llevar a cabo esta investigación, ya que en México se desconoce el estado actual de la presencia de AFB₁ en alimento para cabras y AFM₁ en leche cruda y queso de cabra, generando así información

que es prácticamente nula a nivel nacional. Tomando mayor importancia si se considera que la leche de cabra y sus derivados son recursos alimentarios que empiezan a recibir mayor atención mundial, debido a que su producción y consumo se han ido incrementando, y a que como ya se había mencionado anteriormente el 25 % de la producción de las materias primas utilizadas en la alimentación de los animales esta contaminada con algún tipo de micotoxinas.

2.1 Problemática a resolver

- ❖ ¿Cuál es el estado actual de la presencia de aflatoxina B₁ en alimento para cabras?
- ❖ ¿Cuál es el estado actual de la presencia de aflatoxina M₁ en leche cruda y queso de cabra?
- ❖ ¿En que época (lluvia o seca) hay mayor presencia y concentración de aflatoxina B₁ en alimento para cabras y aflatoxina M₁ en leche cruda y queso de cabra?

2.1.1 Ubicación del problema

La problemática a resolver es de tipo social, económico y biológico.

- ❖ Social
Porque la contaminación de la leche y derivados lácteos por micotoxinas afecta la calidad e inocuidad de éstos a nivel mundial (Escobar *et al.*, 2005).
- ❖ Económico
Porque la presencia de aflatoxinas en los alimentos repercute de manera directa en la economía de un país, ya que afecta al productor con pérdidas absolutas de los alimentos, en menos ingresos a su causa de productos rechazados, decomisados o vendidos con descuentos y pérdidas potenciales de mercado, considerando que en la mayoría de los países existe el sistema de pago por calidad. Con esto, el industrial al detectar AFM₁ en la leche castiga el precio al productor (Noa *et al.*, 2001).
- ❖ Biológico
Porque las aflatoxinas pueden causar manifestaciones agudas, crónicas o subcrónicas en seres humanos y en animales, dependiendo de factores como: biodisponibilidad, potencial toxicológico, sinergismo, frecuencia de consumo del alimento contaminado, así como la edad y estado nutricional del individuo. Los efectos que causan son: mutagénico, carcinogénico y teratogénico; produciendo una elevada mortalidad en animales cuando se ingieren altas concentraciones (Ortega, 1998).

2.2 Hipótesis

En la época de lluvia hay mayor presencia y concentración de Aflatoxina B₁ en los alimentos y como consecuencia de Aflatoxina M₁ en leche cruda y queso de cabra, debido a las condiciones ambientales propias de la época, principalmente de humedad relativa ambiente del 70 % o más, condición que facilita el crecimiento de los hongos y síntesis de las aflatoxinas en los alimentos.

2.3 Objetivos

2.3.1 Objetivo general

Determinar el contenido de Aflatoxina B₁ en alimento para cabras y Aflatoxina M₁ en leche cruda y queso de cabra en muestras procedentes de cuatro unidades de producción caprina del Altiplano Mexicano (APM) en dos épocas del año.

2.3.2 Objetivos específicos

1. Determinar el contenido de Aflatoxina B₁ en alimento para cabras
2. Determinar el contenido de Aflatoxina M₁ en leche cruda y queso de cabra
3. Determinar en que época (lluvia (Mayo-Octubre) y seca (Noviembre-Abril)) hay mayor presencia y concentración de Aflatoxina B₁ en alimento para cabras y como consecuencia de Aflatoxina M₁ en leche cruda y queso de cabra

III. MICOTOXINAS

El término *micotoxina*, deriva de las palabras griegas *mikes* y *toxina*, que significan hongo y veneno respectivamente (Goldblatt, 1972). Son sustancias tóxicas originadas por el crecimiento de cinco tipos de hongos (Cuadro 4), los cuales aparecen como contaminantes naturales en casi la totalidad de las materias primas utilizadas en la alimentación de los animales cuando las condiciones climáticas son propicias para su desarrollo (Alonso Díez *et al.*, 2002). Se pueden encontrar en cualquier punto de la cadena alimentaria, desde la siembra y cosecha, hasta la carne y leche que se consumen originando un grupo de enfermedades y trastornos denominados micotoxicosis, afectando a el hombre y a los animales (Bolet y Socarrás, 2005).

Cuadro 4. Tipos de hongos productores de micotoxinas	
Hongo	Toxina
<i>Aspergillus</i>	<i>Aflatoxinas</i> <i>Sterigmatocistina</i> <i>Ocratoxina A</i>
<i>Fusarium</i>	<i>Tricotecenos</i> <i>Zearalenonas</i> <i>Fumonisinias</i> <i>Fusarina</i> <i>Moniliformina</i>
<i>Penicillium</i>	<i>Patulina</i> <i>Citrinina</i> <i>Ocratoxina A</i>
<i>Alternaria</i>	<i>Alternariol</i> <i>Acido tennazónico</i>
<i>Claviceps</i>	<i>Alcaloides</i>

Fuente: Alonso Díez *et al.*, 2002

Los hongos utilizan para su crecimiento una serie de sustancias químicas denominadas metabolitos primarios, como ácidos nucleicos, proteínas, hidratos de carbono y lípidos mayoritariamente. Cuando la fase de crecimiento llega a su etapa final y durante la fase estacionaria, los procesos de síntesis del hongo se encaminan hacia la producción de metabolitos secundarios como pigmentos, antibióticos y micotoxinas (Díaz, 1996).

La formación de las micotoxinas depende de la composición del sustrato, la capacidad genética de los hongos para producirlas y de factores ecológicos. Las condiciones que hacen posible su producción son:

- ❖ Agua disponible
- ❖ Composición del sustrato (hidratos de carbono)
- ❖ Condiciones climáticas. Las zonas tropicales favorecen la formación de micotoxinas, sin embargo, también pueden producirse en zonas templadas.
- ❖ Humedad en los granos del 10-18 %
- ❖ Humedad relativa ambiente del 70 % o más
- ❖ pH. La acidez es un elemento negativo para el desarrollo micótico y formación de esporas. Es necesario un pH alcalino.

- ❖ Presencia de invertebrados. Los insectos alteran los granos y abren el camino para el desarrollo fúngico.
- ❖ Suficiente oxígeno (no indispensable) y CO₂
- ❖ Tamaño pequeño de los hongos, pudiéndose dispersar por el aire muy fácilmente y establecerse en sustratos diferentes donde pueden crecer.
- ❖ Temperatura. Crecimiento del hongo: mínima de 6-8 °C, óptima de 36-38 °C, y 44-46 °C como máxima. Producción de las micotoxinas: mínima: 12 °C, óptima de 27-30 °C, y 40-42 °C como máxima.
- ❖ Tiempo de almacenamiento. A mayor tiempo se tiene mayor posibilidad de condiciones favorables para su desarrollo (Perusia y Rodríguez, 2001).

Se conocen cientos de micotoxinas, pero sólo una veintena aparecen como contaminantes en los alimentos. De ellas, las aflatoxinas, la citrinina, las fumonisinas, la ocratoxina A, la patulina, los tricotecenos y la zearalenona se consideran entre las micotoxinas más importantes. De las familias antes mencionadas, las aflatoxinas son las más importantes, y en particular dentro de ellas, la AFB₁ debido a su alta toxicidad (Noa *et al.*, 2001).

3.1 Aflatoxinas

El nombre de las aflatoxinas hace referencia al hecho de ser biosintetizadas por el hongo *Aspergillus flavus* y fue propuesto en 1962. La primera letra A, hace referencia al género *Aspergillus*, las tres siguientes FLA, proceden de la especie *flavus* y el término TOXINA se refiere a su efecto tóxico (Ellis *et al.*, 1991).

Las dos principales especies de *Aspergillus* que producen aflatoxinas son *Aspergillus flavus* que origina a las aflatoxinas B₁ y B₂; y *Aspergillus parasiticus* que produce las aflatoxinas G y A (Alonso Díez *et al.*, 2002).

Las aflatoxinas son sustancias biogénicas y están estructuralmente relacionadas. Son cumarinas sustituidas, conteniendo anillos de bifurano y configuración tipo lactona. Se clasifican en dos grandes grupos de acuerdo a su estructura química (Figura 1); la serie 1 difuro-cumaro-ciclo-pentanonas (AFB₁, AFB₂, AFB₂A, AFM₁, AFM₂, AFM₂A y aflatoxicol) y la serie 2 difuro-cumaro-lactonas (AFG₁, AFG₂, AFG₂A, AFGM₁, AFGM₂, AFGM₂A y AFB₃) (Redy *et al.*, 2003).

Todas las aflatoxinas son muy fluorescentes, sus pesos moleculares oscilan entre 312 y 350, y la mayoría son poco solubles en agua, pudiéndose extraer con disolventes orgánicos moderadamente polares, tales como el cloroformo o el metanol. Son bastante termorresistentes, estables a un rango de pH entre 3 y 10, sus puntos de fusión son superiores a los 250 °C (Vega y León, 1998).

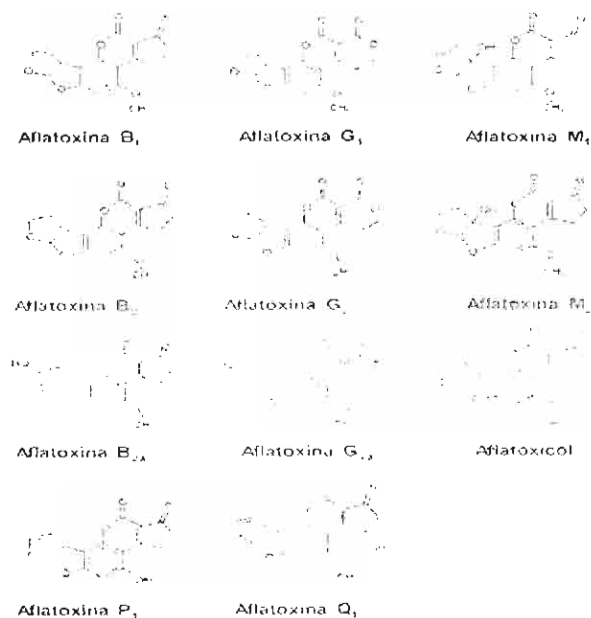


Figura 1. Estructura química de las aflatoxinas

Fuente: Soriano *et al.*, 2007

Se han identificado 18 tipos de aflatoxinas caracterizados con las letras B y G, distinguidos por su color fluorescente bajo la luz ultravioleta (B: "blue", azul y G: "green", verde); y los subíndices 1 y 2 para cada molécula química relativa a su movilidad cromatográfica. De esos 18 tipos de aflatoxinas, sólo seis tienen significación como contaminantes de los alimentos: B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ y M₂ (Vega y León, 1998).

Las aflatoxinas se pueden encontrar dentro del organismo animal, con su original estructura química, transformadas o bien ambas. El organismo de los animales tiene la capacidad para transformar las aflatoxinas originales en derivados de éstas, los cuales pueden ser también tóxicos, este es el caso de la AFM₁ y el aflatoxicol que son derivados metabólicos de la AFB₁ (Gimeno y Martins, 2001).

3.1.1 Aflatoxina B₁ (AFB₁)

Es la más carcinógena y tóxica: es procarcinógena, es decir, la molécula original en sí no es cancerígena sino su metabolito.

Fórmula estructural: C₁₇ H₁₂ O₆ (Figura 2). Peso molecular: 312. Punto de fusión: 268-269 °C. Tiene forma cristalina y fluorescencia azul. Propiedades del espectro: absorción máxima (etanol) a 223, 262 y 365 nm. Emisión de fluorescencia máxima de 425 nm (Redy *et al.*, 2003).

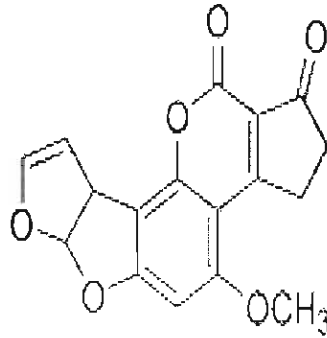


Figura 2. Estructura química de la aflatoxina B₁

Fuente: Alonso Díez *et al.*, 2002

3.1.2 Aflatoxina M₁ (AFM₁)

Es un metabolito hidroxilado de la AFB₁, secretada en la leche (de aquí, que se utiliza la letra M de "Milk Aflatoxin", aflatoxina aislada de la leche) de los animales que consumen alimentos contaminados con AFB₁. La cantidad de AFM₁ secretada es proporcional a la cantidad de AFB₁ ingerida. La tasa de conversión de AFB₁ en AFM₁ oscila entre 0.4 % y 3 %.

Fórmula estructural: C₁₇ H₁₂ O₇ (Figura 3). Peso molecular: 328. Punto de fusión: 299 °C. Presenta fluorescencia azul-violeta. Propiedades del espectro: absorción máxima (metanol) a 350 nm. Emisión de fluorescencia máxima 450 nm (Redy *et al.*, 2003).

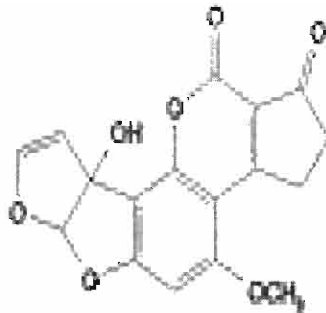


Figura 3. Estructura química de la aflatoxina M₁

Fuente: Alonso Díez *et al.*, 2002

3.1.3 Toxicocinética

Las aflatoxinas son absorbidas en el tracto gastrointestinal debido a su alta liposolubilidad, son biotransformadas en el hígado por enzimas microsomiales de la superfamilia del citocromo P450 entre las que se encuentran CYP1A2, 3A4, 3A5 y 3A7. Las dos enzimas más importantes son representadas por la CYP3A4 que interviene en la formación de la forma exo-epóxido y el metabolito AFQ₁. La CYP1A2 forma en su mayoría la forma endo-epóxido y la AFM₁ (Figura 4). En humanos adicionalmente se producen otros metabolitos como son el aflatoxicol, AFP₁, AFB₂a

y AFB_{1,2}, 2 dihidrodiol, el tiempo de vida media plasmática para la AFB₁ es de 36.5 minutos, su volumen de distribución 14 % del peso corporal. Aproximadamente el 80 % de la dosis total de AFB₁ se excreta en una semana. La AFM₁ se excreta en las 48 h siguientes a la ingestión y representa entre el 1-4 % de la AFB₁ ingerida (International Agency for Research on Cancer, 2002).

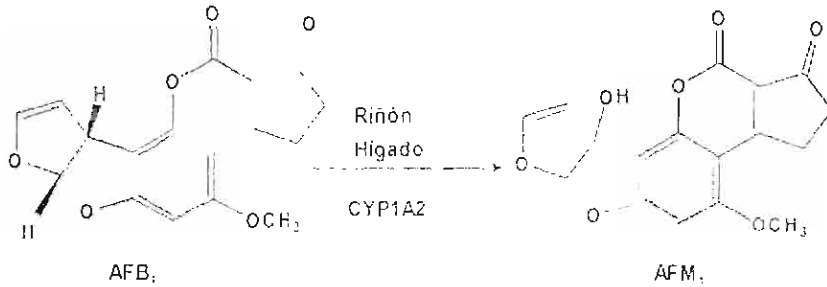


Figura 4. Transformación de AFB₁ a AFM₁

Fuente: Soriano *et al.*, 2007

3.1.4 Toxicodinámica

La AFB₁ requiere una activación para producir mutaciones. La ruta de activación es la conversión de AFB₁ en el metabolito electrofílico AFB₁-8,9-epóxido (Figura 5) (Fernández *et al.*, 1997).

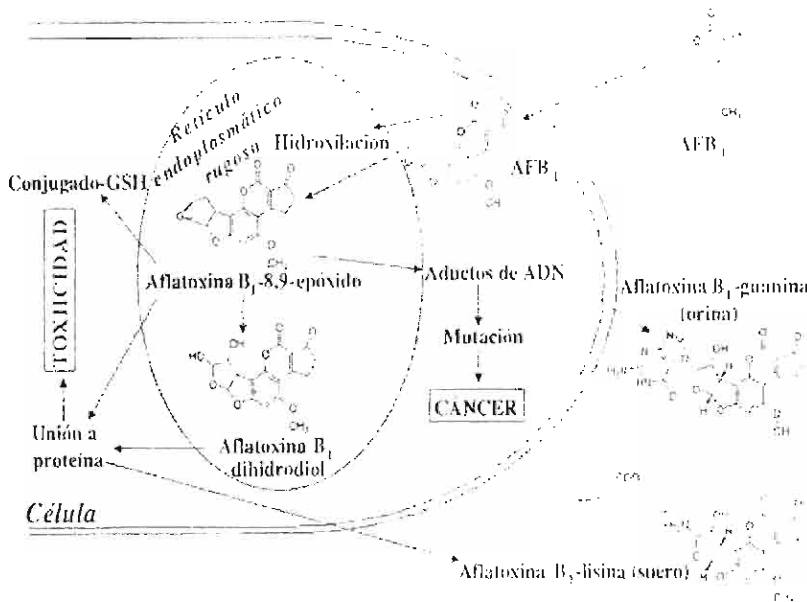


Figura 5. Formación aducto aflatoxina-DNA

Fuente: Soriano *et al.*, 2007

La formación del epóxido requiere de la presencia de un doble enlace entre los carbonos C₈-C₉. La AFM₁, aunque presenta el doble enlace entre los carbonos C₈ y C₉, es dos ordenes de magnitud menos tóxica que la AFB₁, en cuanto a carcinogenicidad se refiere (Díaz, 1996).

La AFB₁-epóxido presenta dos conformaciones: una endo y una exo. La forma endo posee aproximadamente 500 veces más poder mutagénico que la forma exo (Steyn *et al.*, 1999) El fenómeno de mutagenicidad puede explicarse mediante la formación de un compuesto estable por la unión covalente con el nitrógeno N₇ de los residuos guanil del DNA (o RNA) mediante la inducción de depuración y escisión de la hebra lo que puede inducir mutación en células somáticas. Esta formación de ligandos o aductos persistentes se lleva a cabo en regiones del DNA ricas en guanina. En el proceso de replicación del DNA, el complejo formado se intercala causando mutación: la guanina sufre transversión a timina; esto ocurre en el codón 249 del gen p53 (gen implicado como punto de chequeo durante la síntesis y reparación del DNA; si el daño no se repara, esta misma proteína induce apoptosis) (Internacional Agency for Research on Cancer, 2002).

La AFB₁-epóxido puede también reaccionar con glutatión mediante un mecanismo mediado por una glutatión-S-transferasa; esta conjugación de tipo competitivo representa el paso de detoxificación más importante con respecto a otros tipos de biotransformación en la obtención de metabolitos menos tóxicos de AFB₁, incluyendo entre ellos aflatoxicol y otros derivados como la AFM₁ (Ross *et al.*, 1992).

La CYP3A4 tiene una menor afinidad por la AFB₁ y en cambio la enzima CYP1A2 posee una alta afinidad. La CYP1A2 se conoce por su capacidad para bioactivar muchos procarcinógenos a su forma carcinogénica activa (Klaassen *et al.*, 2001). Esto implica que las concentraciones de AFB₁ presentes en los alimentos pueden ser activadas por vía metabólica de CYP1A2 mientras que la CYP3A4 participa en procesos de biotransformación en donde predomina la detoxificación de los metabolitos de la AFB₁.

3.1.5 Efectos tóxicos de las aflatoxinas

Actualmente, se considera que las aflatoxinas son las micotoxinas de mayor riesgo para la salud, en especial porque poseen actividad mutágena y carcinogénica; y por tanto, su presencia en los alimentos ha de reducirse al mínimo. Entre ellas, la AFB₁ es la considerada como de mayor riesgo porque es la que presenta mayor poder hepatotóxico y cancerígeno de las cuatro aflatoxinas comúnmente encontradas de manera natural en los alimentos. La aflatoxina G₁ de toxicidad menor que la AFB₁, la aflatoxina G₂ no es cancerígena y la aflatoxina B₂ es poco tóxica (Vega y León, 1998).

La AFM₁ y la AFB₁ tienen una TD₅₀ (Dosis de micotoxina con la cual el 50 % de los individuos pueden desarrollar tumores malignos) de 10,38 y 1,15 µg/kg pc/día, respectivamente, por lo que se considera que la potencia carcinogénica de la AFM₁ es aproximadamente diez veces inferior a la de la AFB₁ (Cullen *et al.*, 1987).

La Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC), clasifica a las aflatoxinas como carcinógenas o posiblemente carcinógenas para el hombre, de acuerdo a los siguientes grupos:

- ❖ Grupo 1: agente carcinógeno en humanos. En este grupo se encuentra la AFB₁.
- ❖ Grupo 2B: agente posiblemente carcinógeno; la evidencia en humanos es limitada y tampoco hay suficiente evidencia con animales de experimentación. En este grupo se encuentra la AFM₁ (International Agency for Research on Cancer, 2002).

Los principales factores que determinan la severidad de los efectos de las aflatoxinas en los humanos son:

- ❖ Biodisponibilidad y toxicidad de la aflatoxina
- ❖ Sinergismos entre micotoxinas
- ❖ Cantidad de aflatoxina ingerida diariamente en función de su concentración y de la cantidad de alimento ingerido
- ❖ Continuidad de ingestión del alimento contaminado
- ❖ Peso, estado nutricional y de salud (patologías propias) del individuo
- ❖ Edad del individuo. Los niños y los jóvenes son más susceptibles a la toxicidad de las aflatoxinas debido a una mayor variación del metabolismo basal. Ellos pueden no tener suficientes mecanismos bioquímicos para la detoxificación (Kuiper, 1994).

De acuerdo con los factores antes mencionados, las aflatoxinas originan dos tipos de toxicidad:

- ❖ Aguda

Asociada con el consumo de elevadas concentraciones de aflatoxinas y que pueden acabar con la vida.

- ❖ Crónica

Asociada con el consumo de bajas concentraciones de aflatoxinas durante periodos prolongados (Wood, 1992).

Los efectos que pueden causar las aflatoxinas son:

- ❖ Disminución de defensas y por consiguiente, aumento de susceptibilidad a enfermedades infecciosas. La inmunosupresión producida por las aflatoxinas se manifiesta como una disminución de los linfocitos T o B, supresión de los anticuerpos y retraso en la actividad de los macrófagos y neutrófilos.
- ❖ Cáncer de colon
- ❖ Cáncer de pulmón
- ❖ Carcinoma hepatocelular
- ❖ Cirrosis
- ❖ Congestión pulmonar
- ❖ Disturbios reproductivos: descenso de la fertilidad, abortos, partos prematuros
- ❖ Efectos demonecróticos con ulceración
- ❖ Fibrosis hepática
- ❖ Hematomas
- ❖ Hemorragias gastroentéricas
- ❖ Hepatitis aguda
- ❖ Mutagenicidad

- ❖ Sistema Nervioso Central (incoordinación, temblores, convulsiones)
- ❖ Teratogenicidad
- ❖ Muerte (Martínez y Anadón, 2006).

En el caso de los animales, además de los efectos antes mencionados, la toxicidad crónica es la que más importancia tiene en la economía de los animales de granja; ya que puede haber reducción del consumo de alimentos, disminución en la ganancia de peso, menor índice de conversión, disminución de la producción de leche, depresión y mayor susceptibilidad a enfermedades infecciosas. (Yiannikouris y Jouany, 2002).

La AFM₁ se detecta en la leche del animal de 12 a 24 horas después de la ingestión de AFB₁, alcanzando los niveles más elevados a los dos o tres días, y disminuyendo hasta desaparecer totalmente cuatro o cinco días después de su consumo (Soriano *et al.*, 2007).

3.1.6 Aflatoxina B₁ en alimentos

La salud y productividad de un animal, junto con la calidad e inocuidad de su leche producida, dependen de la calidad y el manejo del alimento que consumen. Ningún alimento destinado a la nutrición de los animales productores de leche deben presentar algún riesgo de contaminación: física, química o microbiológica.

Tanto el alimento comercial, como el producido en la granja, deben considerarse como potencial de riesgo para la salud. Todo el alimento, incluyendo forrajes, deberá ser examinado cuidadosamente antes de proporcionarlo a las cabras, para cerciorarse de que no exista presencia de contaminantes (tierra, cuerpos extraños, alambre, hongos, entre otros) (Trujillo, 2002), ya que si éstos están contaminados con AFB₁ en consecuencia la leche y sus derivados estarán contaminados con AFM₁.

La contaminación de alimentos por hongos es un fenómeno muy frecuente, debido a que sus esporas se encuentran ampliamente distribuidas en el medio ambiente (aire, agua, suelo); de tal modo, que la producción agrícola se ve afectada en más de un 25% con la presencia de algún tipo de micotoxinas (Escobar *et al.*, 2005).

Los hongos son capaces de desarrollarse en cualquier punto de la cadena alimentaria, pudiendo contaminar los alimentos cuando éstos son cultivados, transportados, procesados, transformados o almacenados en condiciones adecuadas (pH, humedad relativa, humedad del grano, viabilidad, tiempo de almacenamiento y la presencia de microflora) que favorezcan su desarrollo.

Los granos tienen en el momento de almacenarse cantidades variables de esporas de hongos que son adquiridos naturalmente en el campo, en donde se cosecharon, a estos hongos se les llama "hongos de campo", mientras que aquellos que invaden el grano durante el transporte y almacenamiento se les conoce como "hongos de almacén".

El desarrollo del hongo de almacén en los granos causa daños como: pérdida de germinación de las semillas, oscurecimiento o manchado del grano, calentamiento,

producción de toxinas y la dementación en la calidad; y en ocasiones, la destrucción completa del producto (Vega y León, 1998).

Uno de los factores que condiciona el nivel y la síntesis de aflatoxinas es el sustrato. De esta manera, alimentos con elevadas concentraciones de hidratos de carbono y de ácidos grasos favorecen la producción de toxinas. Sustratos ricos en proteínas y bajos en hidratos de carbono no incrementan la producción de aflatoxinas (Moss, 2002).

Los alimentos considerados más susceptibles a la contaminación fúngica y la consiguiente producción de aflatoxinas son: cacahuete, maíz, sorgo, trigo, cebada, avena, arroz, frijoles, semillas de algodón, oleaginosas como el girasol y la soja, coco, frutos secos (almendras, avellanas, nueces), frutas deshidratadas (higos, pasas), hierbas, especias (pimentón y pimienta), café, cacao, piensos, ensilados, aceites vegetales sin refinar, cerveza, leche, queso y otros derivados lácteos (Bolet y Socarrás, 2005). En el Cuadro 5, se muestra la incidencia de las aflatoxinas en algunos alimentos de diferentes países.

Cuadro 5. Incidencia de aflatoxinas en alimentos de diferentes países				
Alimento	País	Incidencia (%)	Aflatoxina	Concentración (µg/kg)
Cacahuete	Brasil	90	B/G	30-5000
	EE UU	90	B/G	24
	Egipto	82	B ₁	Positiva
	Brasil	67	B ₁	43-1099
	Filipinas	57	B/G	3-2888
	Chipre	56	B ₁	>10
	Ghana	12-32,7	B ₁	Positiva
	Uganda	12	B ₁	>100
Maíz	EE UU	90	B/G	10-700
	México	89	B/G	2,5-30
	Costa Rica	80	B ₁	>20
	China	76	B ₁	>20
	Bangladesh	67	B ₁	33
	Nigeria	45	B ₁	25-770
	Brasil	38,3	B ₁	0,2-129
	Uganda	29	B ₁	1-100
	India	26	B ₁	>30
	Nigeria	25	B ₁	19
Arroz	Corea	12	B ₁	26
	India	100	B ₁	20
	China	13	B ₁	5-50

Fuente: Moss, 2002

3.1.7 Aflatoxina M₁ en leche y derivados lácteos

Entre las propiedades de las aflatoxinas destaca su gran termorresistencia, ya que su punto de fusión está por arriba de los 200 °C (Vega y León, 1998). Debido a esto, la AFM₁ resiste a la pasteurización y ultrapasteurización, encontrándose en la leche y derivados lácteos obtenidos de animales que consumen alimentos contaminados con AFB₁ (Stoloff *et al.*, 1975).

Numerosos estudios se han realizado para intentar conocer el nivel de contaminación por AFM₁ en leche y productos lácteos. En muchos de ellos, sobre todo en los países en vías de desarrollo, se observa que la presencia de AFM₁ está relacionada con determinadas condiciones ambientales de humedad y temperatura que facilitan el crecimiento de los hongos en los alimentos. Además, durante el buen tiempo, en muchas zonas el ganado se alimenta de los pastos, pero en época de frío y/o sequías existe el riesgo de que los piensos que se utilizan para alimentarlos estén almacenados durante un largo periodo y por lo tanto contaminados.

La mayoría de los estudios publicados sobre leche analizan leche de vaca, pero la AFM₁ puede aparecer en leche de oveja, cabra, búfala y camella. En dietas de determinadas poblaciones estas leches son más habituales que la leche de vaca, por lo que es importante extender los análisis a leches de otros animales (Soriano *et al.*, 2007).

Desafortunadamente, en muy pocos países existen programas de supervisión constante de aflatoxinas en la leche, por lo que pueden estarse ingiriendo micotoxinas a través de la leche y de sus derivados sin que exista control alguno de su contenido en dichos productos (Ortega, 1998).

La distribución de la AFM₁ en algunos alimentos elaborados con leche contaminada es aproximadamente la siguiente: 40-60% en quesos (López *et al.*, 2001), 10% en crema y mayor del 2% en mantequilla (Gimeno y Martins, 2001). En la fabricación de yogur se observa una disminución de la concentración de AFM₁ en función del pH y de las condiciones de almacenamiento (Govañs *et al.*, 2001).

3.1.8 Prevención y control de las micotoxinas

La prevención y control de las micotoxinas en los alimentos, radica en la rastreabilidad de todas las etapas de producción, transformación y distribución de un alimento, es lo que se conoce como la ruta "desde la granja a la mesa" (López *et al.*, 1999); y está formada por tres elementos:

❖ Buenas prácticas agrícolas

Es una herramienta que identifica los principios esenciales de higiene y manejo del cultivo para productos frescos en la producción primaria desde el campo hasta la cosecha, reduciendo la contaminación de micotoxinas del cultivo que pueda poner en riesgo la inocuidad del producto en etapas posteriores de la cadena alimentaria. Entre las buenas prácticas agrícolas cabe destacar:

1. Control de los insectos y parásitos, porque su presencia puede causar daños en la planta que favorezca el crecimiento de hongos micotoxigénicos
2. Control de la infección fúngica, mediante el empleo de fungicidas de acuerdo a unas correctas prácticas de aplicación
3. El uso de variedades resistentes a hongos y plagas
4. La separación física de granos dañados, inmaduros o infestados por hongos

5. Una de las características habituales en la contaminación de micotoxinas en cereales es que la mayor concentración de ellas se encuentra en el pericarpio de los granos y en el polvo del cereal; por esta razón, se deben separar mecánicamente la cáscara y el polvo del resto del cereal (Munkvold *et al.*, 1999).

❖ Buenas prácticas de almacenaje y manufactura

Se centralizan en la higiene y forma de manipulación durante el empaquetamiento, almacenamiento, transporte y su industrialización en caso de así requerirlo. Es importante mantener unas correctas condiciones de almacenamiento y manufactura, mediante la vigilancia de varios parámetros como:

1. Los almacenes deben estar secos y que no permitan la entrada de agua
2. Humedad, no superior a 12%
3. Actividad de agua inferior a 0.7
4. Temperatura de 20 a 22 °C
5. Ventilación
6. Medidas de desinfección, desinsectación y desratización que eviten proliferar hongos micotoxigénicos
7. Cumplir las especificaciones sanitarias de almacenamiento de las normas (estibas, no deben estar en el suelo los granos)
8. Inspección periódica del producto almacenado
9. En la elaboración de ensilados, debido a las excelentes condiciones de humedad y actividad de agua que la materia prima tiene de una forma natural y que son ideales para el crecimiento fúngico; se debe asegurar que la materia prima este bien empacada, con la menor cámara de aire posible y que el silo este bien cerrado para conseguir una atmosfera anaerobia. Además se debe tener un sistema de inyección de aire frío y seco (Gimeno y Martins, 2001).

❖ Sistema de Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos (APPCC)

Se identifican los puntos donde aparecerán los peligros más importantes para la seguridad del alimento (biológicos, físicos o químicos) en las diferentes etapas del procesado, con un objetivo claro: adoptar medidas precisas y evitar que se desencadenen los riesgos de presentación de los peligros. Esta metodología permite, a partir de los fallos, hacer un análisis de las causas que los han motivado y adoptar medidas que permitan reducir o eliminar los riesgos asociados a esos fallos (Brera *et al.*, 1998).

3.1.9 Aspectos legislativos de las aflatoxinas y Normativa vigente

Desde el descubrimiento de las aflatoxinas en los años sesenta, los gobiernos de la mayoría de los países del mundo han ido fijando límites máximos aceptables para distintas micotoxinas en los alimentos, mediante la promulgación de una reglamentación particular. Lo que ha ocasionado la aparición de una amplia

legislación en el ámbito internacional que, para una misma micotoxina, difiere en los niveles de aceptación según el país considerado. Así por ejemplo, a finales de 2003 aproximadamente 100 países contaban ya con límites específicos para las micotoxinas, y este número continúa incrementándose poco a poco (FAO, 2004).

Las aflatoxinas son las micotoxinas más frecuentemente legisladas. Los reglamentos son con frecuencia detallados y específicos para los alimentos y productos lácteos. De este modo, los Límites Máximos Permisibles (LMP) establecidos en distintos países para AFB₁ y AFM₁ se detallan en el cuadro 6.

Cuadro 6. Límites Máximos Permisibles (LMP) de AFB₁ y AFM₁ establecidos en diferentes países			
Aflatoxina	Producto	País	LMP
B ₁	Alimentos	UE (Official Journal of the European Union, 2003)	5 µg/kg
		México (NOM-188-SSA1-2002), América Latina	20 µg/kg
M ₁	Leche	UE (Official Journal of the European Union, 2003a)	0.05 µg/L
		México (NMX-F-728-COFOCALEC-2007), Estados Unidos (FDA, 2000), 21 países de África, Asia/ Oceanía, América Latina y Europa	0.5 µg/L
M ₁	Queso	Holanda	0.2 µg/kg
		Austria, CODEX ALIMENTARIUS (2001)	0.25 µg/kg

3.2 Métodos de análisis de las aflatoxinas

La importancia del análisis de micotoxinas en los alimentos, reside en el cumplimiento de las reglamentaciones y en la verificación de los sistemas de control de seguridad alimentaria. Los métodos normalizados de análisis para diferentes micotoxinas han sido recomendados por parte de la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC) y el Comité Europeo de Normalización (Soriano *et al.*, 2007).

Los métodos para determinar la presencia de las aflatoxinas en diversos sustratos se clasifican en:

- ❖ Físico-químicos

Requieren de un elevado consumo de reactivos para la extracción y purificación de las aflatoxinas presentes en la muestra, y en algunos casos, el costo del

equipamiento es elevado. En esta categoría se encuentran: Cromatografía en capa fina, Cromatografía gas-líquido y Cromatografía líquida de alta resolución.

❖ Biológicos

Son métodos inespecíficos y su realización consume mucho tiempo. En esta categoría se encuentran: pruebas de bioensayos con embriones de pollo y microorganismos y los ensayos inmunológicos (Radioinmunoensayo y ELISA).

1. Cromatografía en capa fina (CCF)

El éxito de su aplicación depende del tipo de adsorbente (silica gel G60 y F 254), del sistema de solventes (cloroformo, metanol, benceno, acetona y éter etílico) y del método de detección (fluorescencia). La sensibilidad, exactitud y resolución del análisis de este método se vieron mejoradas con la introducción de la Cromatografía de capa fina de alta resolución (HPTLC).

2. Cromatografía gas-líquido (CGL)

La alta polaridad, baja volatilidad e inestabilidad térmica de las moléculas de aflatoxinas ha limitado el uso de CGL para la determinación de estas sustancias. Sin embargo, el uso de columnas capilares de sílice fundida y detectores como Espectrometría de Masas ha permitido detectar AFB₁ en maíz y crema de cacahuate por este método, no así en leche (Noa *et al.*, 2001).

3. Análisis inmunoenzimáticos

Superan las dificultades de las técnicas cromatográficas convencionales y de los bioensayos, ya que tienen mejor sensibilidad y especificidad, unido a un menor tiempo de ejecución. Por estos motivos, en 1990 la AOAC incluyó la prueba de ELISA como método oficial para el análisis de aflatoxinas en alimentos, cuando la concentración de estas sea mayor a 20 µg/kg (AOAC, 1990). Sin embargo, la aplicación sistemática de estos procesos es limitada, y se tienen que reconfirmar los resultados positivos, ya que ELISA puede dar "falsos positivos" (Gimeno y Martins, 2001).

4. Radioinmunoensayo (RIA)

Presentan la desventaja que los juegos de reactivos tienen una vida limitada en dependencia del isótopo, y además, el costo del equipamiento es alto y se requiere de regulaciones especiales para el personal que trabaja con isótopos radioactivos (Noa *et al.*, 2001).

3.2.1 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

La cromatografía se define como la separación de los componentes de una muestra, distribuyéndose en dos fases: estacionaria y móvil (Quattrocchi *et al.*, 1992). Es uno de los métodos físico-químicos de separación de más amplia utilización en el mundo, ya que cubre prácticamente todos los campos de análisis en las ciencias. La separación se puede aplicar en el análisis químico o la detección cualitativa y/o cuantitativa de los componentes separados a partir de una mezcla, siendo esta la "cromatografía analítica". Mientras que si se colectan las fracciones por separado con otro fin se le denomina "cromatografía preparativa" (Noa *et al.*, 2005).

La cromatografía líquida de alta resolución, conocida hoy día como HPLC, se desarrolló a mediados de los años 70's y rápidamente adquirió un gran número de

aplicaciones gracias a la generación de nuevas fases estacionarias. Hacia finales de los años 70's apareció la cromatografía líquida de fase reversa, que permitió la separación de compuestos muy similares entre sí (Noa *et al.*, 2005).

La cromatografía líquida de alta resolución, es el método más habitual para el análisis de micotoxinas, acoplada a distintos detectores. Entre las ventajas más importantes que presenta se encuentra la posibilidad de separar sustancias termolábiles, no volátiles, polares y apolares con aceptable resolución entre sustancias químicamente similares, de manera rápida y reproducible.

El análisis de las micotoxinas por este método, observa una clara preferencia de la fase reversa (fases estacionarias hidrocarbonadas y fases móviles acuoorgánicas). La interacción entre las moléculas del soluto y la fase estacionaria depende de las fuerzas de dispersión (interacciones hidrófobas) separándose los compuestos según su hidrofobicidad, los componentes más polares se eluyen primero. La retención de las sustancias está controlada principalmente por la fase móvil, jugando en un segundo plano la fase estacionaria; el óptimo en la selectividad se alcanza combinando correctamente los componentes de la fase móvil. Los solventes orgánicos más empleados son el metanol y acetonitrilo en diferentes combinaciones con agua destilada. Los detectores utilizados son: UV, que es universal pero poco selectivo ya que muchas moléculas absorben a la misma longitud de onda que las micotoxinas; y fluorescencia, que por el contrario es muy selectivo (Soriano *et al.*, 2007).

IV. METODOLOGÍA

4.1 Zonas de estudio

El criterio para seleccionar la zona de estudio fue por selección a juicio (Cochran, 1976), en función del convenio institucional que tiene la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco con una de las principales zonas caprinocultoras del país: Apaseo el Grande, Guanajuato. Por otro lado, se seleccionó otra zona de estudio para obtener una aproximación de la presencia de aflatoxina B₁ y M₁ en otra área como referencia comparativa; y así poder contrastar y discutir lo encontrado en Apaseo el Grande, Guanajuato.

4.1.1 Apaseo el Grande, Guanajuato

Está situado a los 100° 41' 12" de longitud al oeste del Meridiano de Greenwich y a los 20° 32' 49" latitud norte. Su altura sobre el nivel del mar es de 1 770 m. Limita al norte con los municipios de Comonfort y San Miguel de Allende, hacia el este con el estado de Querétaro de Arteaga, al sur con el municipio de Apaseo el Alto y hacia el oeste con el municipio de Celaya (Figura 6). Su clima es templado, con una temperatura máxima de 37 °C y una mínima de 9 °C. La precipitación pluvial anual es de 606.1 milímetros.



Figura 6. Ubicación geográfica de Apaseo el Grande, Guanajuato

Fuente: http://www.emexico.gob.mx/work/EMM_8/guanajuato/municipios/11005a.htm

La Asociación de Caprinocultores Unidos de Guanajuato inicia el 10 de marzo del 2001 y se constituye el 12 de octubre del mismo año. Esta integrada por un total de 13 granjas ubicadas en Apaseo el Grande, Celaya y Juventino Rosas, Guanajuato. Cuentan con 3737 cabezas (0.6 % del número total de cabezas del estado de Guanajuato); de las razas Saanen (80 %), Alpina Francesa (15 %) y Toggenburg (5 %). Tienen una producción anual de leche de aproximadamente 2, 340, 000 L (9.5 %) del total de la producción de leche de cabra del estado de Guanajuato), los cuales se comercializan de la siguiente forma:

- ❖ El 75 % se utiliza para la producción de quesos "Productos Alimenticios Oly". Los tipos de quesos que producen son: Amarillo, Boursin, Crotte, Feta, Light, Manchego, Panela, Ranchero, Requesón y Sainte Maure en diferentes variedades (ajo, ajonjolí, cebolla, ceniza, chile jalapeño, chipotle, hierbas finas, natural, nuez, pimienta); y son distribuidos en Guadalajara y México.
- ❖ El 10 % se distribuye a ranchos pequeños de la localidad. El precio de la leche producida por la asociación es de \$4.67/L.
- ❖ El 15 % restante se distribuye en Querétaro y el Rancho Vista Alegre, S.A de C.V.

El sistema de producción empleado por las 13 granjas es intensivo, y el 46 % utiliza mano de obra familiar. Las cabras son alimentadas con alfalfa achicalada, rastrojo (maíz y avena), ensilado de maíz y alimento balanceado (compuesto principalmente por maíz, sorgo y soya) que les distribuye la Unión Ganadera del Estado.

4.1.2 Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEIPSA) de la FMVZ de la UNAM

Pertenece al pueblo de San Miguel Topilejo, Delegación Tlalpan, México, D.F. Está ubicado en el kilómetro 28.5 de la Carretera Federal México-Cuernavaca, a 19° 12' 33" latitud norte y 99° 9' 12" longitud oeste, a una altura de 2760 m sobre el nivel del mar (Figura 7). El clima de la región es semifrío semihúmedo con lluvias en verano y con una temperatura promedio de 19° C. La precipitación pluvial anual es de 800 a 1200 milímetros.



Figura 7. Ubicación geográfica del CEIPSA

Fuente: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/centros/cepipsa/localizacion.htm>

El centro tiene un total de 250 cabezas de las razas Alpina Francesa, Saanen, Anglo Nubia, Toggenburg, Boer y sus cruza. Cuenta con una sala de procesamiento de lácteos donde la leche obtenida es transformada en algunos de sus derivados más importantes como el queso en diferentes modalidades, la cajeta y otro tipo de dulces.

4.2 Muestreo

La toma de muestras corresponde a un muestreo no probabilístico, dado que fueron obtenidas de una parte de la población que es accesible (Cochran, 1976). Se colectaron muestras del alimento (concentrado y ensilado) proporcionado a las cabras para determinar el contenido de AFB₁, y muestras de leche cruda y queso de cabra para determinar el contenido de AFM₁, procedentes de cuatro unidades de producción caprina (Unidad 1, Unidad 2, Unidad 3 y Unidad 4) pertenecientes a la Asociación de Caprinocultores Unidos de Apaseo el Grande, Guanajuato, y del Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA) de la FMVZ de la UNAM. Las muestras fueron tomadas simultáneamente cada mes durante el periodo comprendido de junio del 2008 a agosto del 2009, de acuerdo a la metodología propuesta por la Norma NOM-188-SSA1-2002 para el caso de los alimentos y por la Norma NMX-F-718-COFOCALEC-2006 para el caso de la leche y el queso.

4.2.1 Alimentos

Se obtuvieron un total de 52 muestras de concentrados y 30 muestras de ensilados. La cantidad mínima para cada una de las muestras fue de un kilogramo, tomándose de distintos puntos del lote. Las muestras se transportaron al laboratorio en recipientes limpios, etiquetados, y protegidos contra la contaminación y deterioro del transporte.

4.2.2 Leche

Se obtuvieron un total de 49 muestras. El volumen mínimo para cada una de las muestras fue de un litro, tomándose de los tanques de almacenamiento previa homogenización. Las muestras se guardaron en envases plásticos, se transportaron al laboratorio en caja isotérmica y fueron almacenadas a 4 °C hasta su análisis, 24 horas después de su colección (Pinto *et al.*, 1996).

4.2.3 Quesos

Se obtuvieron un total de 30 muestras. La cantidad mínima para cada una de las muestras fue de 250 g. Las muestras se transportaron al laboratorio en caja isotérmica y fueron almacenadas a 4 °C hasta su análisis, 24 horas después de su colección (Pinto *et al.*, 1996).

4.3 Métodos de determinación

4.3.1 Determinación de aflatoxina B₁ en alimentos

Principio

La AFB₁ es extraída de los piensos con cloroformo y purificada en una columna de sílica gel. La separación final y determinación cuantitativa es realizada por Cromatografía Líquida de Alta Resolución empleando una columna de fase reversa y detección por fluorescencia previa derivatización de la toxina con ácido trifluoroacético.

Reactivos

Reactivos	Calidad	Marca
Aflatoxina B ₁	CR	Sigma-Aldrich
Benceno	CR	J. T. Baker
Hexano	CR	J. T. Baker
Ácido trifluoroacético	CR	J. T. Baker
Sulfato de sodio anhidro	CR	J. T. Baker
Metanol	HPLC	J. T. Baker
Acetonitrilo	HPLC	J. T. Baker
Cloroformo	CR	J. T. Baker
Éter dietílico	CR	J. T. Baker
Nitrógeno (gas)	Comercial	Infra
Hipoclorito de sodio	Comercial	
Ceilita 545 (Tierra de diatomeas)	CR	
Agua destilada	Comercial	
Silica gel 60 de 72-230 mallas (0.063-0.2 mm)	CR	E. Merck

Equipos

Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución (HPLC)	Merck Hitachi L6200 A Intelligent pump No. 885-5945
Detector de fluorescencia	Merck Hitachi LaChrom L-7480
Espectrofotómetro UV Visible	Beckman Coulter Modelo DV650
Balanza analítica	Mettler H31AR
Baño ultrasónico	Cavicator Modelo 2.1
Rotoevaporador	Buchi
Recirculador de agua	Polystar Cole parmer Modelo 12104-00
Bomba de vacío	Edwards Modelo E-Lab 2
Horno	Felisa
Vortex	Craft
Agitador mecánico	Eberbach con control de ciclos
Molino	Thomas – Wiloy Laboratory Mill Modelo 4

Materiales

Papel filtro	Whatman 541 o equivalente
Columnas cromatográficas de vidrio (30 x 2.2 cm diámetro)	
Probetas graduadas 50, 100, 250 y 1000 mL	
Jeringa para HPLC 100 µL	Hamilton No. catalogo 80665
Micropipetas automáticas	Labsystems
Filtro de membrana de PTFE (solventes)	Whatman C073W diámetro 47 mm tamaño de poro 0.2
Filtro de membrana de acetato de celulosa (agua)	Sartorius tipo 11325 diámetro 47 mm, tamaño de poro 0.3
Filtro de membrana con embudo de 500 mL	Scheichr & Schuell
Fibra de vidrio	

Matraces bola para rotoevaporador
de 25 ó 50 mL
Tubos de ensayo con tapa
Erlenmeyer con tapa
Vasos de precipitado
Cápsulas de porcelana
Desecador
Termómetro
Matraces aforados de 500 y 1000 mL

Preparación de soluciones

Fase Móvil. Se filtran y se mezclan 200 mL de metanol, 200 mL de acetonitrilo y 600 mL de agua. Posteriormente, se desgasifica durante 30 minutos en un baño ultrasónico antes de emplearse en el HPLC.

Benceno–Acetonitrilo (98:2 v/v). Se toman 98 mL de Benceno y se le adicionan 2 mL de Acetonitrilo, agitando fuertemente para lograr una completa homogenización.

Cloroformo–Metanol (97:3 v/v). Se toman 194 mL de cloroformo y se le adicionan 6 mL de metanol, agitando fuertemente para lograr una completa homogenización.

Activación de la Sílica gel 60 de 72 - 230 mallas

Se colocan 100 g de sílica gel en una cápsula de porcelana y se activa durante una hora a 105 °C. Posteriormente, se coloca en un recipiente con tapa y se pasa a un desecador. Cuando se enfría se le adiciona 1 mL de agua, se agita y se deja toda la noche equilibrándose.

Preparación de los estándares

Al estándar de AFB₁ se le adiciona una mezcla de Benceno–Acetonitrilo (98:2 v/v) en el mismo frasco para lograr una concentración final entre 0.5–1 mg mL⁻¹ (solución madre). La solución de trabajo se prepara a partir de la solución madre, de tal manera que la concentración de AFB₁ se encuentre entre 8–10 µg mL⁻¹. El frasco con la mezcla Benceno–Acetonitrilo en ambos casos se agita durante 1 minuto en el vortex para lograr una disolución completa de la toxina.

La concentración de la AFB₁ en la solución de trabajo se corrige por espectrofotometría, midiendo la densidad óptica a 360 nm y empleando como blanco la mezcla Benceno–Acetonitrilo.

$$\text{Aflatoxina B}_1 \text{ } \mu\text{g/mL} = \frac{\text{DO}_{360 \text{ nm}} \times \text{PM}}{\epsilon} \quad \dots \text{ ecuación 1}$$

Donde ϵ es el coeficiente de extinción molar de la AFB₁ en la mezcla Benceno–Acetonitrilo que es de 19 800 mol L⁻¹ y PM es el peso molecular de la AFB₁ que es igual a 312 Da. A partir de esta concentración corregida se preparan los estándares de 0,1; 0,25; 0,5 y 1 ng mL⁻¹.

Procesamiento de la muestra

Se muelen 500 g de muestra en un molino y se pasa por un tamiz con una abertura de 1 mm. Posteriormente, se divide la muestra por el procedimiento de cuarteo, tomando la muestra en forma diagonal, se mezcla y se almacena en una bolsa de nylon o frasco bien cerrado.

Extracción

Se pesan 50 g de muestra previamente molida y tamizada con exactitud de 0,1 g, se coloca en un matraz Erlenmeyer con tapa y se le adicionan 25 g de Celita 545, 25 mL de agua y 250 mL de cloroformo. Se asegura el tapón y se agita mecánicamente durante 30 minutos. Posteriormente, se decanta la solución pasándola por un papel filtro estriado o un filtro buchner con vacío si la filtración es muy lenta. Se colectan los primeros 50 mL del filtrado y se almacenan en un frasco de color ámbar a 4 °C hasta su análisis.

Preparación de la columna de sílica gel 60 de 72 - 230 mallas

Se rellena el fondo de una columna cromatográfica con lana de vidrio, se adicionan 5 g de sulfato de sodio anhidro y una cantidad suficiente de cloroformo hasta la mitad de la columna. Seguidamente se adicionan 10 g de sílica disuelta en cloroformo deslizándola sobre las paredes de la columna. Se lavan las paredes de la columna con 20 mL de cloroformo dejando drenar, cuando queden entre 5 a 7 cm de cloroformo por encima de la sílica, se adicionan 15 g de sulfato de sodio anhidro dejando entre 1 a 2 cm de cloroformo por encima del tope del sulfato.

Purificación de la muestra

Se drena el cloroformo hasta el tope del sulfato y se adicionan 50 mL del extracto clorofórmico, se drena hasta que la muestra haya llegado al tope de la columna. Se lava la misma con 150 mL de Hexano y 150 mL de éter dietílico, ambos lavados se descartan y se eluyen las aflatoxinas con 150 mL de una mezcla de cloroformo: metanol (97:3 v/v).

El eluato clorofórmico:metanol se rotoevapora a casi sequedad bajo presión reducida a una temperatura de 30 °C. El residuo obtenido se transfiere a un vial recuperándolo con 500 a 1000 µL de cloroformo, se evapora a sequedad bajo nitrógeno y se guarda tapado y protegido de la luz en congelación (-20 °C). El producto no debe guardarse por un periodo mayor de 44 h.

Derivatización de las aflatoxinas

Al residuo seco se le adicionan 100 µL de hexano y se agita con el vortex por 1 minuto. Posteriormente, se agregan 50 µL de ácido trifluoroacético (TFA), se tapa y se mezcla con el vortex por 1 minuto y se coloca en baño María a 40 °C por 30 minutos. Una vez transcurrido este lapso de tiempo se evapora bajo nitrógeno y se deja reposar por toda la noche en el congelador. El residuo se resuspende en 500 µL de la fase móvil antes de someterlo a la cromatografía. Para derivatizar el estándar se toman 50 µL de la concentración conocida del estándar, se lleva a sequedad bajo nitrógeno y se procede de la misma forma anteriormente descrita.

Condiciones del equipamiento HPLC

Se utiliza una columna C₁₈, con un detector de fluorescencia. La λ de excitación es de 350 nm y la λ de emisión es de 450 nm. Se comprueba que no existan escapes

en las conexiones y se eliminan todas las burbujas de aire que se encuentren en el sistema. Se deja funcionando el equipo a flujo de 0.5 mL por minuto durante 10 minutos para estabilizarlo y eliminar las posibles impurezas absorbidas en la columna. Seguidamente se aumenta el flujo a 1 mL por minuto y se deja estabilizar por 15 minutos.

Primero se aplica fase móvil seguida del estándar para comprobar los tiempos de retención. Posteriormente, se aplican 50 µL del eluato de las muestras. Después de cada aplicación la jeringa se lava con metanol, acetona y con fase móvil; todos los lavados tienen al menos 10 repeticiones.

Cálculo e interpretación de los resultados

La identificación de los picos se lleva a cabo a través del sistema TOTALCHROM (Procesador de datos); y la cuantificación se realiza haciendo una comparación entre los tiempos de retención del estándar con los tiempos de retención de las muestras, y aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración AFB}_1 \text{ (ng/g)} = \frac{H \times C' \times VI' \times V}{H' \times VI \times W} \quad \dots \text{ ecuación 2}$$

Donde:

H es la altura del pico de la muestra

H' es la altura del pico del estándar

C' es la concentración del estándar (ng/µL)

VI' es el volumen inyectado del estándar

VI es el volumen inyectado de la muestra

V es el volumen total de la muestra (µL)

W es el peso del alimento representado por el extracto final (50 g)

Referencias

❖ AOAC, 1995. Método oficial 968.22. Aflatoxinas en los cacahuates

a) Extracción

b) Columna cromatográfica

❖ AOAC, 1995. Método Oficial 971.22. Estándares para aflatoxinas

a) Preparación de soluciones

b) Determinación de concentración de aflatoxinas

❖ AOAC, 1995. Método Oficial 990.33. Aflatoxinas en el maíz

a) Derivatización

❖ ISO 14718. Determinación del contenido de Aflatoxina B₁ en productos de alimentación animal

a) Método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

4.3.2 Determinación de aflatoxina M₁ en leche

Principio

La AFM₁ es extraída de la leche sobre una columna de fase sólida C₁₈ y eluida con éter dietílico y con diclorometano. La separación final y determinación cuantitativa es

realizada por Cromatografía Líquida de Alta Resolución empleando una columna de fase reversa y detección por fluorescencia previa derivatización de la toxina con ácido trifluoroacético.

Reactivos

Reactivos	Calidad	Marca
Aflatoxina M ₁	CR	Sigma Aldrich
Éter dietílico	CR	J. T. Baker
Hexano	CR	J. T. Baker
Ácido trifluoroacético	CR	J. T. Baker
Sulfato de sodio anhidro	CR	J. T. Baker
Metanol	HPLC	J. T. Baker
Acetonitrilo	HPLC	J. T. Baker
Diclorometano	CR	J. T. Baker
Nitrógeno (gas)	Comercial	Infra
Hipoclorito de sodio	Comercial	
Agua destilada	Comercial	
Silica gel 60 de 230 – 400 mallas (0.040 – 0.063mm)	CR	E. Merck

Equipos

Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución	Merck Hitachi L6200 A Intelligent pump No. 885-5945
Detector de fluorescencia	Merck Hitachi LaChrom L-7480
Espectrofotómetro UV Visible	Beckman Coulter Modelo DV650
Balanza analítica	Mettler H31AR
Baño ultrasónico	Cavitator Modelo 2.1
Rotoevaporador	Buchi
Recirculador de agua	Polystar Cole parmer Modelo 12104-00
Bomba de vacío	Edwards Modelo E-Lab 2
Horno	Felisa
Vortex	Craft
Cámara de extracción de fase sólida	Bio-Rad

Materiales

Columna de Fase Sólida C ₁₈ Columnas	C ₁₈ Sep-Pac Waters Associates, Inc.
Probetas graduadas 50, 100, 250 y 1000 mL	
Jeringa para HPLC 100 µL	Hamilton No. catalogo 80665
Micropipetas automáticas	Labsystems
Filtro de membrana de PTFE (solventes)	Whatman C073W diámetro 47 mm tamaño de poro 0.2
Filtro de membrana de acetato de celulosa (agua)	Sartorius tipo 11325 diámetro 47 mm, tamaño de poro 0.3
Filtro de membrana con embudo de 500 mL	Scheichr & Schuell
Fibra de vidrio	
Matraces bola para rotoevaporador	

de 25 ó 50 mL
Tubos de ensayo con tapa
Cápsulas de porcelana
Desecador
Termómetro
Matraces aforados de 500 y 1000 mL

Preparación de soluciones

Fase Móvil. Se filtran y se mezclan 200 mL de metanol, 200 mL de acetonitrilo y 600 mL de agua. Posteriormente, se desgasifica durante 30 minutos en un baño ultrasónico antes de emplearse en el HPLC.

Diclorometano–Metanol (95:5 v/v). Se mezclan 190 mL de diclorometano y 10 mL de metanol, asegurar una correcta homogenización.

Agua–Acetonitrilo (95:5 v/v). Se mezclan 190 mL de agua y 10 mL de acetonitrilo, asegurar una correcta homogenización.

Activación de la Sílica gel 60 230 – 400 mallas

Se colocan 100 g de sílica gel en una cápsula de porcelana y se activa durante una hora a 105 °C. Posteriormente, se coloca en un recipiente con tapa y se pasa a un desecador. Cuando se enfría se le adiciona 1 mL de agua, se agita y se deja toda la noche equilibrándose.

Preparación de la columna de sílica gel 60 230 – 400 mallas

Se coloca en la columna un filtro, posteriormente se adiciona 1 g de sílica gel seguido de 1 g de sulfato de sodio, sobre el cual se coloca otro filtro.

Preparación de los estándares

Al estándar de AFM₁ se le adiciona una mezcla de Benceno–Acetonitrilo (9:1 v/v) en el mismo frasco de manera que la concentración de AFM₁ se encuentre entre 8–10 µg mL⁻¹ (solución madre). El frasco con la mezcla de Benceno–Acetonitrilo se agita durante 1 minuto con el vortex para lograr una completa disolución de la toxina.

La concentración de la AFM₁ en la solución de trabajo se corrige por espectrofotometría, midiendo la densidad óptica a 350 nm y empleando como blanco la mezcla de Benceno–Acetonitrilo.

$$\text{Aflatoxina } M_1 \text{ } \mu\text{g/mL} = \frac{\text{DO}_{350 \text{ nm}} \times \text{PM}}{\epsilon} \quad \dots \text{ ecuación 3}$$

Donde ϵ es el coeficiente de extinción molar de la AFM₁ en la mezcla Benceno–Acetonitrilo que es de 18 815 mol L⁻¹ y PM es el peso molecular de la AFM₁ que es igual a 328 Da. A partir de esta concentración se preparan los estándares de 0,1; 0,25; 0,5 y 1 ng mL⁻¹.

Procedimiento

Preparación de la muestra

Se miden 25 mL de leche previamente homogenizada a temperatura ambiente y se transfiere a un recipiente que contenga 30 mL de agua destilada caliente (80°C) mezclando correctamente (se recomienda mantenerse tibia).

Extracción

La columna de Fase sólida C₁₈ se acondiciona agregándole 20 mL de metanol, el cual se deja drenar. Posteriormente, se le adiciona 20 mL de agua destilada, la cual igualmente se drena. Sin dejar secar la columna se le adiciona la muestra de leche, la cual ha sido agitada para lograr una homogenización de la grasa. El paso de la muestra a través de la columna se realiza a una velocidad de 2 o 3 mL por minuto, para garantizar que las aflatoxinas queden pegadas a ella. Los drenados se descartan. Los volúmenes de las soluciones de acondicionamiento pueden variar dependiendo de la carga de la columna en razón de 1 a 5 g (por cada g de fase sólida se adiciona 5 mL de solvente).

La columna C₁₈ se lava con 30 mL de la fase móvil (agua:acetonitrilo 95:5 v/v) y se deja drenar totalmente aumentando el vacío (secar), con el objeto de remover lo más posible la solución de lavado.

De forma independiente la columna de sílica gel se activa con 7 mL de éter dietílico.

Una vez seca la columna de fase sólida C₁₈ se le adiciona 750 µL de acetonitrilo dejándola reposar de 30 s a un minuto.

Se acopla la columna C₁₈ sobre la columna de sílica gel activada y se agregan 8 mL de éter dietílico, esto se realiza con flujo lento 2 a 3 mL por minuto. Esta fracción de lavado se descarta.

Se coloca bajo las columnas el tubo colector limpio y se eluyen las aflatoxinas con 20 mL de diclorometano-metanol (95:5 v/v).

El eluato obtenido se rotoevapora a casi sequedad bajo presión reducida a una temperatura de 30 °C. El residuo obtenido se transfiere a un vial recuperándolo con 500 a 1000 µL de diclorometano, se evapora a sequedad bajo nitrógeno y se guarda tapado y protegido de la luz en congelación (-20 °C). El producto no debe guardarse por un periodo mayor de 44 h.

Derivatización de las aflatoxinas

Al residuo seco se le adicionan 100 µL de hexano y se agita con el vortex por 1 minuto. Posteriormente, se agregan 50 µL de ácido trifluoroacético (TFA), se tapa y se mezcla con el vortex por 1 minuto y se coloca en baño María a 40 °C por 30 minutos. Una vez transcurrido este lapso de tiempo se evapora bajo nitrógeno y se deja reposar por toda la noche en el congelador. El residuo se resuspende en 500 µL de la fase móvil antes de someterlo a la cromatografía. Para derivatizar el estándar se toman 50 µL de la concentración conocida del estándar, se lleva a sequedad bajo nitrógeno y se procede de la misma forma anteriormente descrita.

Condiciones del equipamiento HPLC

Se utiliza una columna C₁₈, con un detector de fluorescencia. La λ de excitación es de 365 nm y la λ de emisión es de 425 nm. Se comprueba que no existan escapes en las conexiones y se eliminan todas las burbujas de aire que se encuentren en el sistema. Se deja funcionando el equipo a flujo de 0.5 mL por minuto durante 10 minutos para estabilizarlo y eliminar las posibles impurezas absorbidas en la columna. Seguidamente se aumenta el flujo a 1 mL por minuto y se deja estabilizar por 15 minutos.

Primero se aplica fase móvil seguida del estándar para comprobar los tiempos de retención. Posteriormente, se aplican 50 μ L del eluato de las muestras. Después de cada aplicación la jeringa se lava con metanol, acetona y con fase móvil; todos los lavados tienen al menos 10 repeticiones.

Cálculo e interpretación de los resultados

La identificación de los picos se lleva a cabo a través del sistema TOTALCHROM (Procesador de datos); y la cuantificación se realiza haciendo una comparación entre los tiempos de retención del estándar con los tiempos de retención de las muestras, y aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración AFM}_1 \text{ (ng/g)} = \frac{H \times C' \times V_I' \times V}{H' \times V_I \times W} \quad \dots \text{ ecuación 4}$$

Donde:

H es la altura del pico de la muestra

H' es la altura del pico del estándar

C' es la concentración del estándar (ng/ μ L)

V_I' es el volumen inyectado del estándar

V_I es el volumen inyectado de la muestra

V es el volumen total de la muestra (μ L)

W es el volumen de leche representada por el extracto final (25 mL)

Referencias

❖ AOAC, 1995. Método Oficial 971.22. Estándares para aflatoxinas

a) Preparación de soluciones

b) Determinación de concentración de aflatoxinas

❖ AOAC, 1995. Método Oficial 986.16. Aflatoxina M₁ y M₂ en leche líquida

a) Método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

4.3.3 Determinación de Aflatoxina M₁ en queso

Principio

La AFM₁ es extraída del queso con cloroformo y purificada en una columna de sílica gel. La separación final y determinación cuantitativa es realizada por Cromatografía Líquida de Alta Resolución empleando una columna de fase reversa y detección por fluorescencia previa derivatización de la toxina con ácido trifluoroacético.

Reactivos

Reactivos	Calidad	Marca
Aflatoxina M ₁	CR	Sigma Aldrich
Cloruro de Sodio	CR	J. T. Baker
Cloroformo	CR	J. T. Baker
Triclorometano (cloroformo)	CR	J. T. Baker
Tolueno	CR	J. T. Baker
Ácido Acético	CR	J. T. Baker
Hexano	CR	J. T. Baker
Éter dietílico	CR	J. T. Baker
Acetonitrilo	HPLC	J. T. Baker
Sulfato de Sodio anhidro	CR	J. T. Baker
Acetona	CR	J. T. Baker
Ácido Trifluoroacético	CR	J. T. Baker
Metanol	HPLC	J. T. Baker
Hipoclorito de sodio	Comercial	
Nitrógeno (gas)	Comercial	Infra
Silica gel 60 de 72-230 mallas (0.063-0.2 mm)	CR	E. Merck (No. 7734)

Equipo

Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución	Merck Hitachi L6200 A Intelligent pump No. 885-5945
Detector de fluorescencia	Merck Hitachi LaChrom L-7480
Espectrofotómetro UV Visible	Beckman Coulter Modelo DV650
Balanza Analítica	Mettler H31AR
Vortex	Craft
Baño ultrasónico	Cavicator Modelo 2.1
Rotoevaporador	Buchi
Recirculador de agua	Polystar Cole parmer Modelo 12104-00
Bomba de vacío	Edwards Modelo E-Lab 2
Horno	Felisa
Licuadaora	Osterizer

Materiales

Columnas Cromatográficas con llave de paso de nylon	Columnas de vidrio de 30 x 1 cm.
Micropipetas automáticas	Labsystems
Jeringa para HPLC 100 µL	Hamilton No. catalogo 80665
Filtro de membrana, con embudo de 500 mL	Scheichr & Schuell
Embudos de vidrio	
Matraz Erlenmeyer 125 y 250 mL	
Fibra de vidrio	
Gradilla de alambre	Artes 14011 Modelo AE 018
Kitazato de vidrio 1000 mL	
Filtro de membrana de PTFE (solventes)	Whatman C073W diámetro 47 mm tamaño de poro 0.2
Filtro de membrana de acetato de	Sartorius tipo 11325 diámetro 47 mm.

celulosa (agua)	tamaño de poro 0.3
Papel filtro	Whatman No. 5 No. catalogo 1005 125
Vasos de precipitado 250 y 500 mL	
Probetas graduadas 50, 100, 1000 mL	
Matraces bola para rotoevaporador	
Termómetro	
Desecador	
Matraz de 1000 mL	
Matraces de 500 y 1000 mL	
Tubos de ensayo con tapa	
Cápsulas de porcelana	

Preparación de soluciones

Fase móvil. Se filtran y se mezclan 200 mL de metanol, 200 mL de acetonitrilo y 600 mL de agua. Posteriormente, se desgasifica durante 30 minutos en un baño ultrasónico antes de emplearse en el HPLC.

Ácido Trifluoroacético. Almacenar a temperatura de $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$, si tiene color amarillo descartar el producto. De lo contrario se debe destilar (Punto de ebullición $72,4\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Tolueno-Ácido Acético (9:1 v/v). Se mezclan 180 mL de tolueno y 20 mL de ácido acético, agitar hasta lograr una correcta homogenización.

Hexano-Éter-Acetonitrilo (50:30:20). Se mezclan 100 mL de hexano, 60 mL de éter etílico y 40 mL de acetonitrilo, agitar hasta lograr una correcta homogenización.

Cloroformo-Acetona (8:2 v/v). Se mezclan 160 mL de cloroformo y 40 mL de acetona, agitar hasta lograr una correcta homogenización.

Solución salina. Se disuelven 40 g de NaCl en 100 mL de agua destilada

Activación de la Sílica gel 72-230 mallas

Se colocan 100 g de sílica gel en una cápsula de porcelana y se activa durante una hora a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, se coloca en un recipiente con tapa y se pasa a un desecador. Cuando se enfría se le adiciona 1 mL de agua, se agita y se deja toda la noche equilibrándose.

Preparación de los estándares

Al estándar de AFM₁ se le adiciona una mezcla de Benceno-Acetonitrilo (9:1 v/v) en el mismo frasco de manera que la concentración de AFM₁ se encuentre entre $8\text{--}10\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ (solución madre). El frasco con la mezcla de Benceno-Acetonitrilo se agita durante 1 minuto con el vortex para lograr una completa disolución de la toxina.

La concentración de la AFM₁ en la solución de trabajo se corrige por espectrofotometría, midiendo la densidad óptica a 350 nm y empleando como blanco la mezcla de Benceno-Acetonitrilo.

$$\text{Aflatoxina M}_1 \mu\text{g/mL} = \frac{\text{DO}_{350\text{ nm}} \times \text{PM}}{\epsilon} \dots \text{ecuación 3}$$

Donde ϵ es el coeficiente de extinción molar de la AFM₁ en la mezcla Benceno-Acetonitrilo que es de 18 815 mol L⁻¹ y PM es el peso molecular de la AFM₁ que es igual a 328 Da. A partir de esta concentración se preparan los estándares de 0,1; 0,25; 0,5 y 1 ng mL⁻¹.

Procesamiento de la muestra

Se pesan 15 g de queso, se pica finamente y se coloca en un vaso de licuadora. Se le adiciona 1 mL de solución salina, 100 mL de cloroformo y se agita durante 60 segundos.

Se filtra la mezcla a través de papel filtro lento y se colecta el filtrado en un Erlenmeyer de 125 mL.

Preparación de la columna de sílica gel 72-230 mallas

Se coloca en la columna cromatográfica (30 cm x 22 mm) el filtro (lana de vidrio) y se adiciona cloroformo hasta la mitad (15 mL aproximadamente). Posteriormente, se adicionan 2 g de sílica gel seguidos de 2 g de sulfato de sodio anhidro, dejando uno o dos cm de cloroformo por encima del tope del sulfato.

Purificación del extracto de la muestra

Se drena el cloroformo hasta el tope del sulfato. Se adiciona la muestra y una vez que esta haya llegado al tope de la columna, se lava la misma con 25 mL de tolueno-ácido acético (9:1), 25 mL de hexano y 25 mL de hexano-éter-acetonitrilo (50:30:20); dichos lavados se descartan. Se eluyen las aflatoxinas con 40 mL de la mezcla de cloroformo-acetona (8:2). El eluato obtenido se rotoevapora a casi sequedad bajo presión reducida a una temperatura de 30 °C. El residuo obtenido se transfiere a un vial recuperándolo con 500 a 1000 µL de cloroformo, se evapora a sequedad bajo nitrógeno y se guarda tapado y protegido de la luz en congelación (-20 °C). El producto no debe guardarse por un periodo mayor de 44 h.

Derivatización de las aflatoxinas

Al residuo seco se le adicionan 100 µL de hexano y se agita con el vortex por 1 minuto. Posteriormente, se agregan 50 µL de ácido trifluoroacético (TFA), se tapa y se mezcla con el vortex por 1 minuto y se coloca en baño María a 40 °C por 30 minutos. Una vez transcurrido este lapso de tiempo se evapora bajo nitrógeno y se deja reposar por toda la noche en el congelador. El residuo se resuspende en 500 µL de la fase móvil antes de someterlo a la cromatografía. Para derivatizar el estándar se toman 50 µL de la concentración conocida del estándar, se lleva a sequedad bajo nitrógeno y se procede de la misma forma anteriormente descrita.

Condiciones del equipamiento HPLC

Se utiliza una columna C₁₈, con un detector de fluorescencia. La λ de excitación es de 365 nm y la λ de emisión es de 425 nm. Se comprueba que no existan escapes en las conexiones y se eliminan todas las burbujas de aire que se encuentren en el sistema. Se deja funcionando el equipo a flujo de 0.5 mL por minuto durante 10 minutos para estabilizarlo y eliminar las posibles impurezas absorbidas en la columna. Seguidamente se aumenta el flujo a 1 mL por minuto y se deja estabilizar por 15 minutos.

Primero se aplica fase móvil seguida del estándar para comprobar los tiempos de retención. Posteriormente, se aplican 50 µL del eluato de las muestras. Después de cada aplicación la jeringa se lava con metanol, acetona y con fase móvil; todos los lavados tienen al menos 10 repeticiones.

Cálculo e interpretación de los resultados

La identificación de los picos se lleva a cabo a través del sistema TOTALCHROM (Procesador de datos); y la cuantificación se realiza haciendo una comparación entre los tiempos de retención del estándar con los tiempos de retención de las muestras, y aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración AFM}_1 \text{ (ng/g)} = \frac{H \times C' \times VI' \times V}{H' \times VI \times W} \quad \dots \text{ ecuación 5}$$

Donde:

H es la altura del pico de la muestra

H' es la altura del pico del estándar

C' es la concentración del estándar (ng/µL)

VI' es el volumen inyectado del estándar

VI es el volumen inyectado de la muestra

V es el volumen total de la muestra (µL)

W es el volumen de leche representada por el extracto final (15 g)

Referencias

- ❖ AOAC, 1995. Método Oficial 971.22. Estándares para aflatoxinas
 - a) Preparación de soluciones
 - b) Determinación de concentración de aflatoxinas

- ❖ AOAC, 1995. Método oficial 980.21. Aflatoxina M₁ en leche y queso
 - a) Extracción
 - b) Purificación

- ❖ AOAC, 1995. Método Oficial 986.16. Aflatoxina M₁ y M₂ en leche líquida
 - a) Método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

4.4 Análisis Estadístico

1. Con los datos obtenidos se realizó una base de datos
2. Regresión lineal simple para validar los métodos de determinación de AFB₁ y AFM₁
3. Estadística descriptiva. Estadísticos de resumen univariados (media aritmética, desviación estándar, mínimo y máximo) para las variables utilizadas (AFB₁ y AFM₁)
4. Análisis de medianas, percentiles y cuartiles con gráficas de caja y bigote
5. Se uso el paquete estadístico SPSS™ Versión 15.0 para Windows

4.5 Validación de los métodos bajo las directrices del Centro Nacional de Metrología (CENAM, 2005)

Con el objeto de establecer la linealidad, límite de detección, límite de cuantificación y exactitud de los métodos; se realizó un ensayo para cada uno de los estándares de aflatoxina B₁ y M₁. Se preparo una curva patrón con concentraciones conocidas

de 0,1; 0,25; 0,5; y 1 µg/mL, con siete repeticiones de cada una, con el objeto de calcular la intercepción en Y, pendiente, coeficiente de correlación y desviación estándar.

❖ Límite de detección

Corresponde a la menor concentración del analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse en una muestra en las condiciones establecidas.

El límite de detección se estableció mediante la ecuación:

$$Ld = b + 3S$$

Donde:

Ld=límite de detección

b=valor de intersección de la recta en Y

S=desviación estándar

❖ Límite de cuantificación

Corresponde a la menor concentración del analito que puede determinarse con precisión y exactitud razonable en las condiciones establecidas.

El límite de cuantificación se estableció mediante la siguiente ecuación

$$Lc = Ld + 10 + S$$

Donde:

Lc=límite de cuantificación

Ld=límite de detección

S=desviación estándar

❖ Exactitud

Es también conocida como error sistemático, corresponde a la diferencia entre el valor obtenido (media) y el valor verdadero.

La exactitud se estableció mediante la siguiente ecuación

$$R = (\dots/MD) 100$$

Donde:

R=coeficiente de regresión

...=valor medio

MD=valor verdadero

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 8 se presenta el perfil cromatográfico de las aflatoxinas B₁ y M₁ cuando la muestra es derivatizada con ácido trifluoroacético, con tiempos de retención de 5.21±0.10 y 3.08±0.10 respectivamente.



Figura 8. Perfil cromatográfico de las aflatoxinas B₁ y M₁ derivatizadas

5.1 Validación del método para determinar aflatoxina B₁ en alimentos

La curva de calibración ($y=3128699.71x+218056.30$) mostró una linealidad significativa ($p<0.05$) en un intervalo de 0.10; 0.25; 0.5; y 1 $\mu\text{g/mL}$ con un coeficiente de regresión de 0.99. Los límites de detección y cuantificación fueron 0.241 y 0.43 $\mu\text{g/Kg}$ respectivamente. El recobrado (exactitud) fue de 87%. Los resultados obtenidos fueron satisfactorios según los criterios propuestos en la Guía de Laboratorio para la Validación de Métodos (CENAM, 2005) y muestran que el método fue eficiente para evaluar la presencia de AFB₁ en los niveles que exige la UE y la NOM-188-SSA1-2002 para 5 y 20 $\mu\text{g/kg}$ respectivamente.

5.2 Validación del método para determinar aflatoxina M₁ en leche

La curva de calibración ($y= 10328x+5948.7$) mostró una linealidad significativa ($p<0.05$) en un intervalo de 0.10; 0.25; 0.5; y 1 $\mu\text{g/mL}$ con un coeficiente de regresión de 0.9982. Los límites de detección y cuantificación fueron 26.5 y 30.1 $\text{ng}/\mu\text{L}$ respectivamente. El recobrado (exactitud) fue de 91 % para un nivel de 40 $\mu\text{g/Kg}$ con una precisión del 5%. Los resultados obtenidos fueron satisfactorios según los criterios propuestos en la Guía de Laboratorio para la Validación de

Métodos (CENAM, 2005) y muestran que el método fue eficiente para evaluar la presencia de AFM₁ en los niveles que exige la UE y la NMX-F-728-COFOCALEC-2007 para 0.05 y 0.5 µg/L respectivamente.

Trabajos similares donde se ha empleado este método oficial para la determinación de AFM₁ en leche muestran valores de recobrados por encima del 90%, valores de precisión entre 7-9% y límite de detección de 15 ng/Kg (Dragacci y Grosso 2001). Las mayores diferencias encontradas fueron en los tiempos de retención debido a cambios en la composición de la mezcla de la fase móvil, las características de la fase reversa empleada en la columna y el flujo empleado. Otros trabajos realizados para validar la metodología empleada para la determinación de AFM₁ en leche tuvieron diferentes resultados, tal fue el caso de Esqueda *et al.*, (1995) que informaron una precisión de 97% y un límite de detección de 0.05 µg/kg, lo cual fue como consecuencia de emplear una técnica diferente a la que se empleó en este trabajo.

5.3 Validación del método para determinar aflatoxina M₁ en quesos

La curva de calibración mostró una linealidad significativa ($p < 0.05$) en un intervalo de 0.10; 0.25; 0.5; y 1 µg/mL con un coeficiente de regresión de 0.99. Los límites de detección y cuantificación fueron 0.221 y 0.560 µg/Kg respectivamente. El recobrado (exactitud) fue de 83.6%. Los resultados obtenidos fueron satisfactorios según los criterios propuestos en la Guía de Laboratorio para la Validación de Métodos (CENAM, 2005) y muestran que el método fue eficiente para evaluar la presencia de AFM₁ en los niveles que exige la UE y el CODEX ALIMENTARIUS para 0.2 y 0.25 µg/kg respectivamente.

5.4 Determinación de AFB₁ en alimentos

En el Cuadro 7 se presenta un resumen del número de muestras de concentrados en diferentes intervalos de contenidos de AFB₁, se observa que el 28.85 % presentaron niveles de AFB₁ superiores al Límite Máximo Permisible establecido en México por la NOM-188-SSA1-2002 (20 µg/kg); y un 7.69 % presentaron niveles de AFB₁ superiores al valor establecido por la UE (5 µg/kg). El valor de concentración más elevado fue de 974.01 µg/kg; valor que difiere con lo informado por Moss, (2002) para alimentos que contienen maíz. Este investigador registra una incidencia de AFB₁ del 45 % y concentraciones de hasta 770 µg/kg. También difiere a lo informado por Sacca *et al.*, (2009), quienes determinaron la presencia de AFB₁ en concentrados suministrados a cabras en explotaciones del noreste de Italia, encontrando valores de hasta 800 µg/kg.

Cuadro 7. Frecuencias de ocurrencia de AFB₁ en concentrados por intervalos de concentración

Unidad de Producción (n)	nd-5 µg/kg	5-20 µg/kg	>20 µg/kg	
Unidad 1 (12)	8		4	
Unidad 2 (12)	7	2	3	
Unidad 3 (11)	6	1	4	
Unidad 4 (12)	8	1	3	
Topilejo (5)	4		1	
Total	33	4	15	52
%	63.46	7.69	28.85	
Valor mín.	0.03			
Valor máx.	974.01			

nd= no detectado

En el Cuadro 8 se presenta un resumen del número de muestras de ensilados en diferentes intervalos de contenidos de AFB₁, se observa que el 20 % presentaron niveles de AFB₁ superiores al Límite Máximo Permissible establecido por la UE (5 µg/kg); y un 10 % presentaron niveles de AFB₁ superiores al valor establecido en México por la NOM-188-SSA1-2002 (20 µg/kg). El valor de concentración más elevado fue de 123.08 µg/kg.

Cuadro 8. Frecuencias de ocurrencia de AFB₁ en ensilados por intervalos de concentración

Unidad de Producción (n)	nd-5 µg/kg	5-20 µg/kg	>20 µg/kg	
Unidad 2 (10)	6	3	1	
Unidad 3 (9)	7	2		
Unidad 4 (10)	7	1	2	
Topilejo (1)	1			
Total	21	6	3	30
%	70	20	10	
Valor mín.	0.01			
Valor máx.	123.08			

nd= no detectado

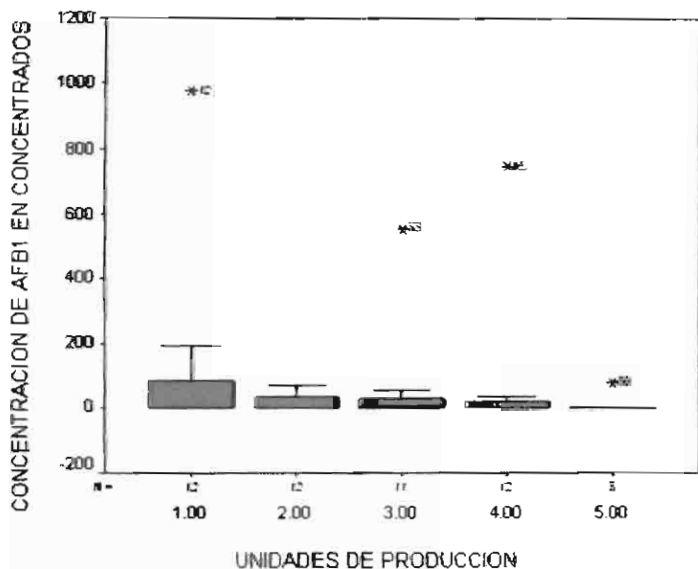


Figura 9. Concentraciones de AFB₁ en concentrados

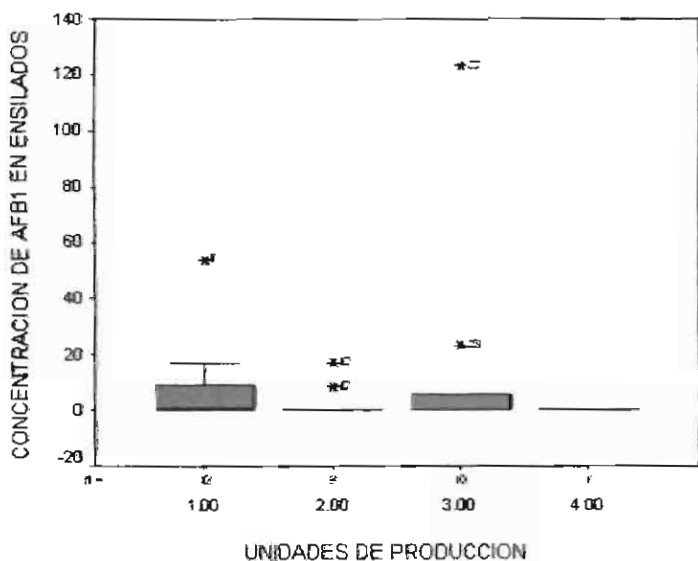


Figura 10. Concentraciones de AFB₁ en ensilados

Al aplicar la exploración de los datos por la técnica de gráficas de caja y bigote (Figuras 9 y 10), se observó que hay mayor incidencia y mayores concentraciones de AFB₁ en las muestras de concentrados en comparación con las muestras de ensilados. Esto se puede deber a que uno de los principales factores que condiciona el nivel y la síntesis de aflatoxinas es el sustrato. De esta manera, alimentos con

elevadas concentraciones de hidratos de carbono favorecen la producción de toxinas (Moss, 2002). Los hidratos de carbono constituyen la parte más importante de los cereales como el maíz, avena, sorgo y soya, utilizados para la elaboración de los concentrados que se proporcionan como alimento a las cabras, por lo cual, son más susceptibles a la contaminación fúngica y la consiguiente síntesis de aflatoxinas.

Este resultado coincide con lo reportado por Sacca et al., (2009), quienes en su investigación encontraron que la mayor concentración de AFB₁ fue en los concentrados elaborados con maíz.

En cuanto a las unidades de producción, la incidencia y concentración fue mayor en la Unidad 1, seguida por las Unidades 2, 3, 4 y Topilejo para el caso de los concentrados. En el caso de los ensilados, la incidencia y concentración fue mayor en la Unidad 2 (no hubo muestras de ensilados en la Unidad 1), seguida por las Unidades 4, 3, y Topilejo. La diferencia de la incidencia y concentración de AFB₁ entre las unidades de Apaseo el Grande, Guanajuato, se puede deber al manejo y almacenado de los alimentos empleados en cada una de las unidades; y en relación con la Unidad de Topilejo, se observó que fue la que menos incidencia y concentraciones de AFB₁ tuvo tanto en concentrados como ensilados, incluso por debajo de los LMP. Esto se puede deber a que el clima (templado) y temperatura (37 °C) de Guanajuato se apegan más a las condiciones óptimas de crecimiento de los hongos y síntesis de las aflatoxinas (clima tropical, templado y °T 36-38 °C) en comparación con Topilejo (clima semifrío semihúmedo y °T 19 °C).

En las figuras 11 y 12, se puede observar que la mayor incidencia y concentración de AFB₁ fue en la época de lluvia (mayo-octubre), esto debido a las condiciones climáticas propias de la época, principalmente la humedad relativa en el ambiente del 70 % o más, condición favorable para el crecimiento de los hongos y síntesis de aflatoxinas en los alimentos. Pero cabe destacar que en la época de seca (noviembre-abril) también hubo incidencia de aflatoxinas, esto puede ser a que en época de frío y/o sequías también existe el riesgo de que los alimentos que se utilizan para alimentar a los animales estén contaminados, debido a que son almacenados durante un largo periodo en condiciones propicias para la síntesis de aflatoxinas, más aún si los alimentos al momento de almacenarlos ya estaban contaminados con algún tipo de hongo.

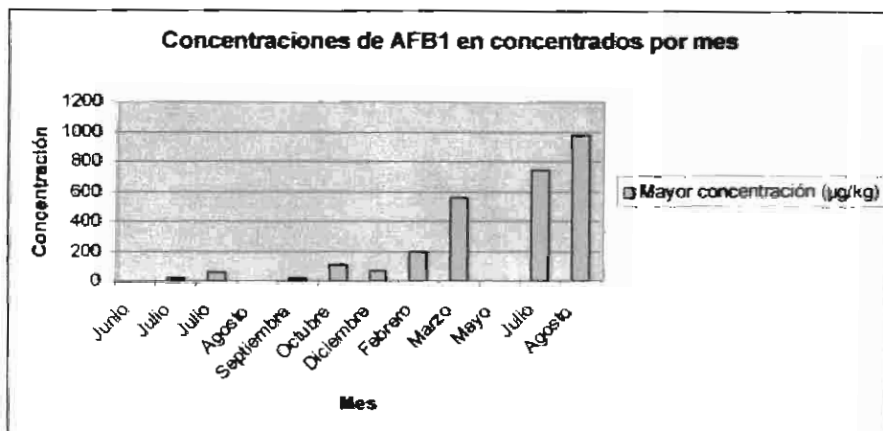


Figura 11. Concentraciones de AFB₁ en concentrados por mes

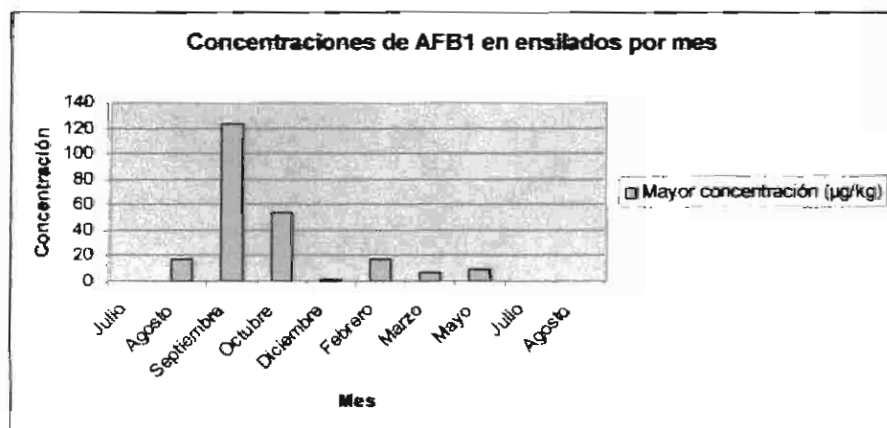


Figura 12. Concentraciones de AFB₁ en ensilados por mes

5.5 Determinación de AFM₁ en leche

En el Cuadro 9 se presenta un resumen del número de muestras de leche en diferentes intervalos de contenidos de AFM₁, se observa que el 16.33 % presentaron niveles de AFM₁ superiores al Límite Máximo Permisible establecido por la UE (0.05 µg/L); y un 12.24 % presentaron niveles de AFM₁ superiores al valor establecido en México por la NMX-F-728-COFOCALEC-2007 (0.5 µg/kg). El valor de concentración más elevado fue de 8.11 µg/L; valor que difiere con lo informado por Rahimi *et al.*, (2009), quienes determinaron la presencia de AFM₁ en leche cruda de vaca, búfalo, camello, oveja y cabra en el suroeste de Irán; encontrando una concentración media de 0.043 µg/L.

El 16.33% de muestras encontrado en este trabajo con niveles de AFM₁ superiores al establecido por la UE, difiere con lo encontrado por Ghanem y Orfi, (2009), quienes reportaron un 14% de muestras de leche de cabra con niveles de AFM₁ superiores al establecido por la UE, con concentraciones de hasta 0.765 µg/L.

Cuadro 9. Frecuencias de ocurrencia de AFM ₁ en leches por intervalos de concentración				
Unidad de Producción (n)	<0.05 µg/L	0.05-0.5 µg/L	>0.5 µg/L	
Unidad 1 (11)	8	1	2	
Unidad 2 (11)	11			
Unidad 3 (11)	8	2	1	
Unidad 4 (11)	4	4	3	
Topilejo (5)	4	1		
Total	35	8	6	49
%	71.43	16.33	12.24	
Valor mín.	0.01			
Valor máx.	8.11			

5.6 Determinación de AFM₁ en quesos

En el Cuadro 10 se presenta un resumen del número de muestras de quesos en diferentes intervalos de contenidos de AFM₁, se observa que el 3.33 % presentaron niveles de AFM₁ superiores al Límite Máximo Permisible establecido por la UE (0.2 µg/kg); y un 13.33 % presentaron niveles de AFM₁ superiores al valor establecido por el CODEX ALIMENTARIUS (0.25 µg/kg). El valor de concentración más elevado fue de 2.08 µg/kg; valor que difiere con lo informado por *Virdis et al.*, (2008), quienes determinaron la presencia de AFM₁ en leche de cabra y queso de cabra duro producido en Italia, encontrando un 9.8 % de muestras con niveles superiores a lo establecido por la UE con concentración de hasta 0.389 µg/kg. *Dashti et al.*, (2009), encontraron un 80 % de muestras de queso comercializados en Kuwait con niveles de AFM₁ superiores a lo establecido por la UE, con concentraciones de hasta 0.452 µg/kg.

Cuadro 10. Frecuencias de ocurrencia de AFM ₁ en quesos por intervalos de concentración				
Muestras	nd-0.2 µg/kg	0.2-0.25 µg/kg	>0.25 µg/kg	
Panela (9)	7		2	
Crotte (8)	8			
Sainte Maure (6)	5	1		
Otros (5)	3		2	
Topilejo (2)	2			
Total	25	1	4	30
%	83.33	3.33	13.33	
Valor mín.	0.02			
Valor máx.	2.08			

nd= no detectado

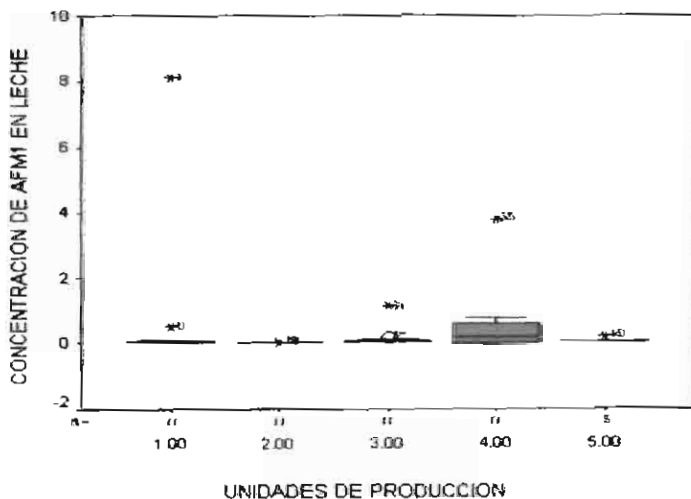


Figura 13. Concentraciones de AFM₁ en leches

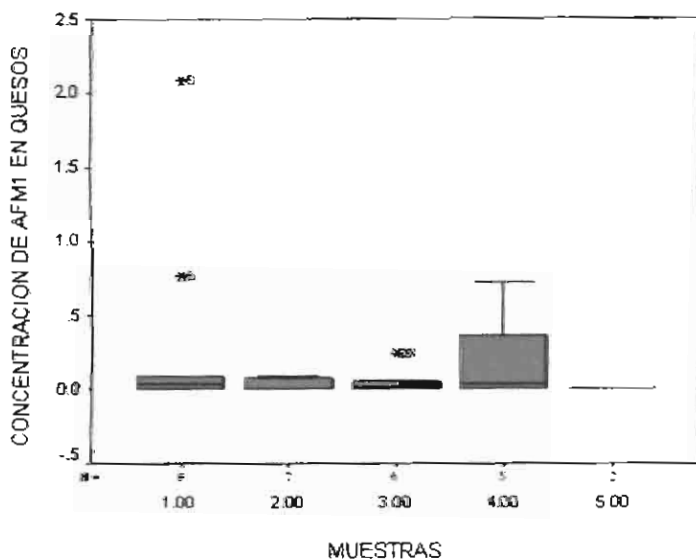


Figura 14. Concentraciones de AFM₁ en quesos

Al aplicar la exploración de los datos por la técnica de gráficas de caja y bigote (Figuras 13 y 14), se observó que la incidencia de AFM₁ en la leche y quesos se debe a que entre las propiedades de las aflatoxinas destaca su gran termostabilidad, ya que su punto de fusión está por arriba de los 200 °C. Debido a esto, la AFM₁ resiste a la pasteurización y ultrapasteurización, encontrándose en la leche y derivados lácteos obtenidos de animales que consumen alimentos

contaminados con AFB₁. Tal es el caso de este estudio, donde los alimentos presentan alta incidencia y concentración de AFB₁, de la cual entre el 1 y 3% es metabolizada hacia la leche en forma de aflatoxina M₁.

La distribución de la AFM₁ en quesos elaborados con leche contaminada es aproximadamente 40-60% (López *et al.*, 2001).

VI. CONCLUSIONES

1. Existe una alta incidencia y concentración de AFB₁ en las cuatro unidades productoras de leche de cabra procedentes de Apaseo, el Grande, Guanajuato, encontrándose por arriba de los LMP establecidos. Lo que afecta la calidad e inocuidad de la leche y derivados lácteos, pudiendo repercutir en la economía del productor, la salud de los animales y el humano.
2. En la unidad de Topilejo, la incidencia y concentración de AFB₁ es menor, encontrándose por debajo de los LMP establecidos.
3. La diferencias registradas entre las unidades estudiadas, se pueden deber al manejo y almacenamiento de los alimentos empleados en cada una de las unidades; y a las diferentes características climatológicas de las zonas de estudio.
4. Hay mayor incidencia y concentraciones de AFB₁ en las muestras de concentrados en comparación con las muestras de ensilados. Esto debido a que los concentrados están elaborados con maíz y otros cereales que tienen elevadas concentraciones de hidratos de carbono, sustrato que favorece la contaminación fúngica y la consiguiente síntesis de aflatoxinas en los alimentos.
5. La mayor incidencia y concentración de AFB₁ y en consecuencia de AFM₁ fue en la época de lluvia (mayo-octubre), esto debido a las condiciones climáticas propias de la época, principalmente la humedad relativa en el ambiente del 70 % o más, condición favorable para el crecimiento de los hongos y síntesis de aflatoxinas en los alimentos. Pero cabe destacar que en la época de seca (noviembre-abril) también hubo incidencia de aflatoxinas, esto puede ser a que en época de frío y/o sequías también existe el riesgo de que los alimentos que se utilizan para alimentar a los animales estén contaminados, debido a que son almacenados durante un largo período en condiciones propicias para la síntesis de aflatoxinas, más aún si los alimentos al momento de almacenarlos ya estaban contaminados con algún tipo de hongo.
6. Existe una alta incidencia de AFM₁ en la leche y quesos, esto se debe a que entre las propiedades de las aflatoxinas destaca su gran termorresistencia, ya que su punto de fusión está por arriba de los 200 °C. Debido a esto, la AFM₁ resiste a la pasteurización y ultrapasteurización, encontrándose en la leche y derivados lácteos obtenidos de animales que consumen alimentos contaminados con AFB₁. Tal es el caso de este estudio, donde los alimentos presentan alta incidencia y concentración de AFB₁, de la cual entre el 1 y 3% es metabolizada hacia la leche en forma de aflatoxina M₁.

VII. RECOMENDACIONES

Debido a la alta incidencia y concentración de AFB₁ encontrada en este estudio, se demuestra que es necesario seguir con las investigaciones y desarrollar un programa de detección permanente en las unidades de estudio para evitar lotes de alimentos contaminados con AFB₁, ya que se debe tener presente que para la industria láctea la ausencia de AFB₁ es muy importante, debido a que cuando un animal ingiere un alimento contaminado con AFB₁, entre el 1 y 3% de ésta es metabolizada hacia la leche en forma de aflatoxina M₁.

Dada la poca información que existe en México sobre la presencia de aflatoxinas desde la determinación de AFB₁ en alimentos para cabra, así como AFM₁ en leche y queso de cabra; es muy importante seguir realizando estudios sobre la leche de cabra, ya que la mayoría de los estudios publicados sobre leche analizan leche de vaca, pero la AFM₁ puede aparecer en leche de oveja, cabra, búfala y camella: mas aun si se considera que la producción y consumo de la leche de cabra van en aumento y que en dietas de determinadas poblaciones estas leches son más habituales que la leche de vaca.

Es muy importante realizar estos estudios en época de lluvia donde se observó una tendencia de incremento de presencia de aflatoxinas, época con más presencia de humedad, condición favorable para el desarrollo de los hongos; pero sin dejar de lado la época de seca, ya que también se observó la presencia de aflatoxinas. Por tanto es importante realizar estudios longitudinales con la intención de entender la presencia de AFB₁ y AFM₁ en la producción caprina, sumando además otras zonas con gran potencial de producción de leche de cabra.

BIBLIOGRAFÍA

Acosta, A., Escobar, A., Margolles, E., y Mella, C. 1989. Dinámica de excreción de aflatoxina M₁ en leche de cabras. *Revista de Salud Animal* 11 (3-4), p 208-211.

Agraz, A. 1981. *Caprinotecnia I*. Universidad de Guadalajara. México. p 142-150.

Alonso Díez, A.J., González Montaña, J.R., y Rejas López, J. 2002. Congreso de la Sociedad Española de Medicina Interna Veterinaria. Universidad de León, p 66-81. ISBN 84-7719-810-1.

Amorena, B., Pérez, M., Luján, L., y Monzón, M. 2000. Defensa inmunológica frente a la mastitis. *Ovis*. 66: 59-72.

Arbiza, A., S. I. 1988. Sistemas de producción caprina en México: características comunes y factores limitantes. Congreso Interamericano de Producción Caprina. Memorias. UAAAN, Torreón, Coah. México. D36-D49.

Arbiza, A., S. I. 1986. Los caprinos en México. En producción de caprinos. Cap. 2. Editor S. I. Arbiza, A., AGT Editor, S. A. México. D. F. p 47-75.

Arbiza, S., y De Lucas, J. 2001. La leche caprina y su producción. Editores Mexicanos Unidos, S. A. México, p 43-69.

Association of Official Analytical Chemists. 1990. *Handbook of Official Methods of Analysis*. 15th Edition. Virginia, U. S. A.

Barrios, M., Gualda, M., Cabanas, J., Medina, L., and Jordano, R. 1996. Occurrence of aflatoxin M₁ in cheeses from the South of Spain. *Journal of Food Protection* 59 (8), p 898-900.

Battacone, G., Nudda, A., Palomba, M., and Pulina, G. 2002. Carry over of aflatoxin from feed to ovine milk and curd/ Transferimento di aflatossina dalla razione al latte ovino e alla cagliata. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia* 53 (4), p 283-293.

Bento, H., Fernandes, A., and Barbosa, M. 1990. Detection of aflatoxin M₁ in goat milk. *Brief Communications of the XXIII International Dairy Congress*, Montreal, October 8-12, Vol. I, p 26.

Bingol, N., Tanritanir, P., Dede, S., and Ceylan, E. 2007. Influence of aflatoxin present in forages and concentrated feedingstuffs on milk and some serum biochemical parameters in goats. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 51 (1), p 65-69.

Bolet, M., y Socarrás, M. 2005. Micotoxinas y cáncer. *Rev Cubana Invest Bioméd* v. 24 n. 1 Ciudad de la Habana.

Brera, C., Miraglia, M., and Onori, R. 1998. HACCP and mycotoxins: what is the point of interaction? En: Miraglia, M., Van, H., Brera, C., and Gilbert, J. *Mycotoxins and phycotoxins developments in chemistry, toxicology and food safety*. p 145-150.

Cantu, J. Zootecnia de Ganado caprino. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Unidad Laguna. División Regional de Ciencia Animal. Torreón, Coahuila, México.

Capote, J. 2002. Sistemas de explotación caprina en zonas áridas. Actas de las XXVII Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovitecnia y Caprinotecnia (SEOC). España. p 95-100.

Carvajal, M., Rojo, F., Méndez, I., and Bolaños, A. 2003a. Aflatoxin B₁ and its interconverting metabolite aflatoxicol in milk: the situation in México. Food Additives and Contaminants. 20(11):1077-86.

Carvajal, M., Bolaños, A., Rojo, F., and Méndez, I. 2003b. Aflatoxin M₁ in pasteurized and ultrapasteurized milk with different fat content in México. Journal of Food Protection. 66(10):1885-92.

Centro Nacional de Metrología (CENAM). 2005. Métodos analíticos adecuados a su propósito. Guía de Laboratorio para la Validación de Métodos y Temas relacionados. Segunda Edición. Eurachem. Publicación Técnica. CNM-MRD-PT-030.

Cochran, W. 1976. Técnicas de muestreo. Compañía Editorial Continental. México. D. F. p 507.

Codex Alimentarius. 2001 (A). Norma colectiva para el queso no madurado incluido el fresco. Vol. 3:460-470. Segunda edición revisada.

Córdova, A., Muñoz, R., Peña, S., Pérez, J., and Saltijeral, J. 2005. Identification of aflatoxin M₁ in milk. Journal Warchaw, Poland. 2:380-383.

Cullen, JM., Ruebner, BH., Hsieh, LS., Hyde, DM., and Hsieh, DPH. 1987. Carcinogenicity of dietary aflatoxin M₁ in male Fisher rats compared to aflatoxin B₁. Cancer Res., 47. p 1913-1917.

Dashli, B., Al-Hamli, S., Alomirah, H., Al-Zenki, S., Abbas, A., and Sawaya, W. 2009. Levels of aflatoxin M₁ in milk, cheese consumed in Kuwait and occurrence of total aflatoxin in local and imported animal feed. Food Control. 20 (2009) 686-690.

Díaz GJ. 1996. Micotoxinas y micotoxicosis en salud humana y animal. Primera parte. Veterinaria al Día. 2: 28-34.

Dragacci, S., and Grosso, F. 2001. Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography for determination of aflatoxin M₁ in liquid milk: collaborative study. Journal of AOAC International. 84(2):437-443.

Ellis, WO., Smith, JP., Simpson, BK., and Oldham, JH. 1991. Aflatoxins in food: occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection and methods of control. CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 30. p 403-439.

Escobar, A., S, Vega., R, Gutiérrez., M, Coronado., y G, Díaz. 2005. Aflatoxina M₁ en leche y derivados lácteos. Actualidad y Perspectivas en América Latina. Carnilac INDUSTRIAL. México.

Esqueda, M., Higuera, I., y Nieblas, J. 1995. Aflatoxina M₁ en leche comercializada en Hermosillo, Sonora. Revista Mexicana de Micología. 11 (30):179-183.

Food and Agriculture Organization. 2004. Reglamentos a nivel mundial par alas micotoxinas en los alimentos y en las raciones en el año 2003. Estudio FAO: Alimentación y Nutrición, N° 81. Roma.

Food and Agriculture Organization. 2004. Statistical database. Disponible via internet en <http://faostat.fao.org>. Consultado 20/05/2008.

Food and Agriculture Organization. 2005. Sistemas Nacionales de Inocuidad de alimentos en las Américas y el Caribe: Análisis de la situación actual. Conferencia Regional FAO/OMS sobre inocuidad de los alimentos para las Américas y el Caribe. San José, Costa Rica, 6-9 de diciembre del 2005. <http://fao.org/docrep/fao/010/j6410s.pdf>

Food and Drug Administration. 2000. Action levels for poisonous or deleterious substances in human food and animal feed. <http://vm.cfsan.fda.gov/~lrd/fdaact.html>. Consultado 20/05/08.

FAOSTAT. 2005. Agricultural Statistics. FAO, Rome, Italy. Disponible via internet en <http://faostat.fao.org/default.aspx>. Consultado 20/05/08.

Fernández, M. 2006. Calidad de la leche de cabra producida en la Asociación Caprinocultores Unidos de Guanajuato. Tesis de Maestría en Ciencias Agropecuarias, UAM-X. México, p 52.

Fernández de Oliveira, CA., y Leal Germano, PM. 1997. Aflatoxinas: conceitos sobre mecanismos de toxicidade e seu envolvimento na etiologia do cancer hepático celular. Re. Saúde Pública. 31: 417-24.

Fevrier, C., Mourot, Y., Jaguelin, A., Mounier, Y., and Lebreton, M. 1993. Utilisations digestives compares des laits UHT de chevre et de vacche. Effects nutritionnels de la gelification. Utilisation du modele porcin. Lait. 73: 581-592.

Finoli, C., and Vecchio, A. 1997. Aflatoxin M₁ in goat dairy products. Microbiologie, Aliments, Nutrition 15 (1), p 47-52.

Fuente, H., Gamiendia, A., González, M., Jiménez, M., y Mascorro, E. 1989. Bonanza y crisis de la ganadería nacional: Una visión integral de la actividad agropecuaria en México. Subdirección de investigación. Departamento de Diagnóstico Externo. Universidad Autónoma de Chapingo, México. p 349.

Ghanem, I., and Orfi, M. 2009. Aflatoxin M₁ in raw, pasteurized and powdered milk available in the Syrian market. Food Control 20 (2009) 603–605.

Gimeno, A., y Martins, M. L. 2001. Residuos de Aflatoxina M₁ y otras micotoxinas en leche y derivados, control y recomendaciones. <http://www.engormix.com>

Gimeno, A., y Martins, M. L. 2003. Micotoxinas y Micotoxicosis en animales y Humanos. Special Nutrients Inc USA Ed. Talleres Gráficos del SRL, Buenos Aires Argentina p 106.

Goldblatt, LA. 1972. Implications of mycotoxins. Clin. Toxicol., 5, p 453.

Govanis, A., Roussi, V., Koidis, P. A., and Botsoglou, N. A. 2001. Distribution and stability of aflatoxin M₁ during processing, ripening and storage of Teleme cheese. Food Addit. Contam. 18(5): 437-43.

Gurria, F. 2004. Situación del sector caprino en México. Revista Cabras. Marzo-Abril. p 27-28.

Haenlein, G. 2001. Past, present, and future perspectives of small ruminant dairy research. J. Dairy Sci. 84:2097-2115.

Haenlein, G. 2004. Goat in human nutrition. Small Rumin. Res. 51:155-163.

Helferich, W. 1984. Aflatoxin in food producing animals: metabolism and transmission. Dissertation Abstracts International, B 44 (12), p 3583.

Hernández, Z. 2000. La caprinocultura en el Marco de la ganadería poblana (México): contribución de la especie caprina y sistemas de producción. Arch. Zootec. 49: 341-352.

International Agency for Research on Cancer. 2002. Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC Expert Comité. Lyon. 82:171.

Iñiguez, L. 2004. Goats in resource-poor systems in the dry environments of West Asia, Central Asia and the Inter-Andean valleys. Small Rumin. Res. 51: 137-144.

Klaassen, CD., Watkins, III JB., and Casarett Doull's. 2001. Essentials of toxicology. New York: MacGraw Hill.

Koeslag, J. 2007. Cabras, Manuales para educación agropecuaria, Producción animal 4. SEP, Trillas. México. p 112.

Kuiper Goodman, T. 1994. Prevention of human mycotoxicoses through risk assessment risk Management. In: Miller, J., and Trenholm, H. Mycotoxins in grain, compounds other than aflatoxin. Eagan press, St. Paul, Minnesota, p 439-469.

Lebbie, S. 2004. Goats under household conditions. Small Rumin. Res. 51: 131-136.

Lesur, L. 2004. Manual del Ganado caprino: una guía paso a paso. Trillas. México. p 80.

López, C., Ramos, L., Ramadan, S., Bulacio, L., and Pérez, J. 2001. Distribution of aflatoxin M₁ in cheese obtained from milk artificially contaminated. *Int J Food Microbiol.* 64 (1-2): 211-215.

López, R., Park, D., and Phillips, T. 1999. Integrated mycotoxin management systems. En: FAO Food and Nutrition Division. Preventing Mycotoxin Contamination. FAO Food and Nutrition Division, FNA/ANA 23. p 38-47.

Martínez Larrañaga, R.M., y Anadón, A. 2006. Micotoxinas. En: Cameán, A.M., Repetto, M. *Toxicología Alimentaria*. Díaz de Santos, Madrid. p 289-309.

Mashaly, R., El-Deeb, S., El-Nouty, F., Hassan. G., and Salem, M. 1984. Effect of feeding aflatoxins to Egyptian Baladi goats on milk yield, composition and physical properties. *Egyptian Journal of Dairy Science* 12 (2), p 135-144.

Minervini, F., Visconti, A., Bottalico, A., and Montagna, M. 2001. On the occurrence of aflatoxin M₁ in cheeses in some southern Italian areas. *Industria Alimentari* 40 (403), p 513-516.

Moss, M.O. 2002. Risk assessment for aflatoxins in foodstuffs. *Int. Biodeter. Biodegr.*, 50. p 137-142.

Munkvold, G., Hellmich, R., and Rice, L. 1999. Comparison of fumonisin concentrations in kernels of transgenic Bt maize hybrids and non-transgenic hybrids. *Plant Disease*, 83. p 130-138.

Noa, M., Pérez, N., Gutiérrez, R., y Escobar, A. 2001. Los Residuos Químicos en la Leche: Importancia y Problemática Actual en México y en el Mundo. UAM-X. México. p 192.

Noa, M., Pérez, N., Díaz, G., y Vega, S. 2005. Cromatografía de gases y de líquidos de alta resolución. Aplicación en el análisis de alimentos. UAM-X. México. p 326.

Norma Mexicana NMX-F-718-COFOCALEC-2006. Sistema producto leche-alimentos-lácteos-Guía para el muestreo de leche y productos lácteos.

Norma Mexicana NMX-F-728-COFOCALEC-2007. Sistema producto leche-alimentos-lácteos-leche cruda de cabra-especificaciones fisicoquímicas, sanitarias y métodos de prueba.

Norma Oficial Mexicana NOM-155-SCFI-2003. Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba.

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

Official Journal of the European Union. 2003. Amending annex I to directive 2002/32/EC of the European parliament and of the council on undesirable

substances in animal feed. 31 october 2003. Commission Directive 2003/100/EC. L285/33.

Official Journal of the European Union. 2003a. Amending regulation (EC) 466/2001 as regards aflatoxins. 12 December 2003. Commission Regulation (EC) No. 2174/2003. L326/12.

Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. 1995. Food Composition; Additives; Natural Contaminants. Chap. 49. Natural Toxins. Vol II. 16th Edition. United States of America.

Oliveira, C., and Ferraz, J. 2007. Occurrence of aflatoxin M₁ in pasteurised, UHT milk and milk powder from goat origin. Food Control 18 (4). p 375-378.

Ortega, M. 1998. Bacterias, Antibióticos, Toxinas y Micotoxinas en Leche de Vaca. Agrociencia. Colegio de Postgraduados. México. Volumen 32. Número 1.

Ozdemir, M. 2007. Determination of aflatoxin M₁ levels in goat milk consumed in Kils province. Ankara Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi 54 (2), p 99-103.

Pérez, J. 2007. Determinación de aflatoxina M₁ en queso y leches cruda, ultrapasteurizada y orgánica que se comercializan en la Ciudad de México. Tesis de Maestria en Ciencias Agropecuarias. UAM-X. México, p 68.

Perusia, O., y Rodriguez, R. 2001. Micotoxicosis. Rev. Investig. Vet. Perú v. 12 n. 2. Lima jul/dic.

Pinto, M., Vega, S., y Pérez, N. 1996. Métodos de análisis de la leche y derivados. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. p 531.

Quattrocchi, O., Abelaira, S., y Laba, R. 1992. Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica. Artes Gráficas Farro SA, Buenos Aires, Argentina. p 405.

Rahimi, E., Bonyadian, M., Rafei, M., and Kazemeini, H. 2009. Occurrence of aflatoxin M₁ in raw milk of five dairy species in Ahvaz, Iran. Food and Chemical Toxicology.

Redy, SV., and Waliyar, F. 2003. Properties of aflatoxin and its producing fungi. *Aspergillus* and Aflatoxin in Groundnut. <http://www.aflatoxin.com>

Ross, RK., Wogan, GN., Groopman, JD., Yuan, JM., Qian, GS., Gao, YT., et al. 1992. Urinary aflatoxin biomarkers and risk of hepatocellular carcinoma. 339: 943-46.

Sacca, E., Boscolo, D., Vallati, A., Ventura, W., Bigarand, F., and Piasentiera, E. 2009. Aflatoxin occurrence in milk and supplied concentrates of goat farms of north-eastern Italy. J Sci Food Agric. 89: 487-493.

Sánchez, M. 2004. Especies menores para pequeños productores: cabras lecheras, en: Memorias de la XIX Reunión Nacional sobre Caprinocultura. Acapulco, Gro.

SAGARPA. 2005. Datos elaborados por el Servicio de Información y estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), con información de las delegaciones de la SAGARPA. Disponible via internet en <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/>. Consultado 20/05/08.

SIAP. 2008. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Disponible via Internet en <http://www.siap.sagarpa.gob.mx>. Consultado 19/11/09.

Soriano, J., et al. 2007. Micotoxinas en alimentos. Ediciones Díaz de Santos. España. p 391.

Steyn, PS., and Stander, MA. 1999. Mycotoxins as causal factors of disease in humans. *J. Toxicol. Toxin Review*; 18: 229-243.

Stoloff, L., M. Trucksess., N, Hardin., O. J. Francis., J. R. Hayes., C. E. Polan., and T. C. Campbell. 1975. Stability of aflatoxin M₁ in milk. *J. Dairy Sci.* 58: 1789-1793.

Tejón, D. 1985. Ganado caprino. Producción animal I, Etnología Zootecnica Torno II. Tebas Flores. Madrid. p 109-122.

Trujillo, J. 2002. Lineamientos para el reconocimiento de las buenas prácticas en producción de leche caprina. Servicio Nacional, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

Trujillo, A., y Almudena, F. 2004. Consumo de queso de cabra en la Ciudad de Tequisquiapan, Qro. México. Memorias de la XIX Reunión Nacional sobre Caprinocultura. Acapulco, Gro.

Vega, S., y J. S. León. 1998. Residuos tóxicos en alimentos. Conceptos y métodos. UAM-X. México.

Vega, S., Gutiérrez, R., Díaz, G., González, M., Ramírez, A., Salas, J., Coronado, M., y González, C. 2005. Leche de Cabra: Producción, Composición y Aptitud Industrial. México. Alfa Editores Técnicos. Octubre-Noviembre. 9-18.

Virdis, S., Corgiolu, G., Scarano, C., Pilo, A., and De Santis, E. 2008. Occurrence of aflatoxin M₁ in tank bulk goat milk and ripened goat cheese. *Food Control* 19. p 44-49.

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

Yiannikouris, A., and Jouany, JP. 2002. Les mycotoxines dans les aliments des ruminants, leur devenir et leurs effets chez l'animal. *INRA Prod. Anim.*, 15. p 3-16.