UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

DETERMINACIÓN DE AFLATOXINAS TOTALES EN ALIMENTOS DESTINADOS AL CONSUMO DE VACAS LECHERAS Y AFLATOXINA M_1 EN LECHE

por

María Alejandra, CAPELLI MICHELTORENA

TESIS DE GRADO presentada como uno de los requisitos para obtener el título de Doctor en Ciencias Veterinarias
Orientación: Tecnología de los alimentos

MODALIDAD: Ensayo Experimental

MONTEVIDEO
URUGUAY
2014

PAGINA DE APROBACIÓN

Presidente de Mesa: .....
Dr. Alejandro Britos

Segundo Miembro (Tutor): .....
Dra. Carmen García y Santos

Tercer Miembro: .....
Prof. William Pérez

Cuarto Miembro: ……
Dr. Gonzalo Suárez

Fecha: 14 de noviembre de 2014

Autor: .....
María Alejandra Capelli Micheltorena

A mi padre, que desde algún lado me está acompañando.
A mi madre Elena, porque a ella le debo todo lo que soy.
A mi compañero de vida Ariel, por brindarme su apoyo y motivación incondicional.
A Lucas por prestarme un ratito de su tiempo.

AGRADECIMIENTOS

- ✓ A mi tutora, Dra. Carmen García y Santos por su dedicación, enseñanzas y apoyo brindados en este trabajo y durante el trascurso de mi carrera.

- ✓ A mi co-tutor Dr. Gonzalo Suarez por su tiempo y dedicación para que este trabajo saliera adelante.

- ✓ A mis compañeros del Área de Toxicología por todo su apoyo y especialmente a Santiago Sosa.

- ✓ A la Dra. Sulamita Collazo y al Sr. Aldo Taibo por brindarme sus conocimientos de manera desinteresada.

- ✓ A los Dres. Gustavo Moratorio y Daniel Carrera por ser el vínculo con el medio en el cual ejercen su profesión.

- ✓ A los Sres. Productores por permitirme acceder al material que hoy hacen posible este trabajo.

- ✓ A los funcionarios de biblioteca por su colaboración en la búsqueda bibliográfica.

- ✓ Al programa CIDEC por brindarme el apoyo económico para la elaboración de este proyecto.

- ✓ A la Facultad de Veterinaria por darme la oportunidad de formarme en su casa.

- ✓ A mi familia, compañeros y amigos por acompañarme en éste trayecto tan importante de mi vida.

TABLA DE CONTENIDO

Páginas

PÁGINA DE APROBACIÓN……..... 2
AGRADECIMIENTOS…… 3
TABLA DE CONTENIDO……..……..... 4
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS…….…….... 5
Resumen.…… 6
Summary…….……..... 7
Introducción…….. 8
Revisión bibliográfica…….. 10
Lechería y suplementación……. 10
Hongos toxicogénicos……. 10
Micotoxinas……..... 11
Aflatoxinas……..... 12
Metabolismo y acción de las aflatoxinas…….. 13
Aflatoxicosis…….. 13
Importancia de las aflatoxinas en la salud pública……. 14
Métodos analíticos para la determinación de las aflatoxinas…..…….…. 14
Marco normativo de las aflatoxinas ……..... 15
Hipótesis…….. 17
Objetivos…….. 17
Objetivos generales……. 17
Objetivos específicos……... 17
Materiales y métodos…… 18
Diseño experimental…… 18
Toma de muestras……... 18
Alimentos ……..…….. 18
Leche ……..…….. 19
Determinaciones y procedimientos……..…. 19
Aflatoxinas……..….. 19
pH……..…….. 20
Materia seca/Humedad…… 20
Análisis estadísticos…….. 20
Resultados y Discusión……..…… 21
Conclusiones……. 26
Bibliografía……. 27
Anexos
Anexo 1…… 31
Anexo 2…… 32
Anexo 3……... 33

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Página

Tablas

Tabla 1: Presencia natural de aflatoxinas totales, discriminadas por región geográfica y sustratos alimenticios…….…….. 21
Tabla 2: Presencia natural de aflatoxina M_1, discriminadas por región geográfica, en leche cruda de tambo……. 22
Tabla 3: Valores de pH, en los sustratos alimenticios, discriminados por región geográfica…….. 24
Tabla 4: Valores de humedad, en los sustratos alimenticios, discriminados por región geográfica…….. 24

Figuras

Figura 1: Estructura química de las principales aflatoxinas…….. 12
Figura 2: Silo de sorgo planta entera muestreado para análisis…..…… 18
Figura 3: Toma de muestra en bolsa ración…….……. 18
Figura 4: Muestreo de leche en tanque de frío…… 19
Figura 5: Muestra de leche para análisis…….…… 19
Figura 6: Correlación entre los niveles de aflatoxina M_1 en leche cruda de tambo y los niveles de aflatoxinas totales en alimentos utilizados en vacas en producción……..... 23

RESUMEN

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios producidas por hongos toxicogénicos, principalmente *Asperguillus flavus* y *A. parasiticus*. Pueden estar contaminando alimentos destinados tanto al consumo humano, como al animal. Son toxinas muy potentes, con efectos carcinogénicos y mutagénicos, representando riesgo potencial para la salud pública y animal. La más tóxica es la aflatoxina B_1, que al ser ingerida, se biotrasnforma para posteriormente ser excretada a través de la leche como aflatoxina M_1. Por éste motivo la leche puede ser una fuente importante de aflatoxinas para los humanos. Si bien en nuestro país se realizan monitoreos sistemáticos de niveles de estas toxinas en leche, no existen trabajos comunicando los mismos. Por este motivo, el objetivo de este trabajo fue evaluar la prevalencia de aflatoxinas totales en alimentos destinados al consumo de vacas lecheras y aflatoxina M_1 en la leche cruda de esos animales. Se monitorearon 18 establecimientos lecheros comerciales, colectando los alimentos que estaban consumiendo (n=37) y leche (n=18). Los niveles de aflatoxinas se determinaron mediante la técnica de inmunoensayo enzimático competitivo (ELISA). Se midieron pH, materia seca y humedad de todos los alimentos. En 34 de las 37 muestras de alimentos se encontraron niveles entre 2.17 a 44.1 µg/kg de aflatoxinas totales. Del total de las muestras contaminadas, 5.8% tuvieron valores superiores a los recomendados para nuestro país (20 µg/kg). En las 18 muestras de leche se encontraron niveles entre 0.005 a 0.08 µg/L de aflatoxina M_1, ninguna supero los niveles permitidos para nuestro país (0.5 µg/L). De éstas muestras, dos superaron los valores permitidos para la exportación a la Comunidad Económica Europea (0.05 µg/L). Se puede concluir que en la mayoría de los alimentos muestreados se encontraron niveles de aflatoxinas totales. En todas las muestras de leche se encontraron niveles de aflatoxina M_1 bajos, que no causarían daños en la salud humana. Si bien los niveles de contaminación son bajos, mostrarían la importancia de realizar monitoreos de estas micotoxinas y comunicar los resultados.

SUMMARY

The aflatoxinas are secondary metabolites produced by toxigenic fungi, specially *Asperguillus flavus* y *A. parasiticus*. They may be contaminating foods for human as well as animal consumption. They are very powerful toxins, with carcinogenic and mutagenic effects, representing a powerful risk for public and animal. The most toxic is aflatoxins B_1, when ingested it is biotransformed and excreted later thought milk like aflatoxins M_1. For this reason milk can be an important source of aflatoxins for humans. Although systematic monitoring of levels of these toxins in milk are made in our country, there are no studies communicating the findings. For this reason, the objective of this research was to evaluate the prevalence of total aflatoxins in food intended for dairy cows consumption and aflatoxinas M_1 in raw milk from these animals.18 commercial dairy farms were monitored, collecting the food they were consuming(n=37) and milk (n=18). Aflatoxins levels were determinate by competitive enzyme immunoassay technique (ELISA). Ph, dry matter and moisture from all foods were measured. We found total aflatoxins levels between 2.17 and 44.1 µg/kg in 34 out of 37 samples of food. From the total of contaminated samples, 5.8% had higher values than those recommended for our country (20 µg/kg). In the 18 milk samples were found levels from 0.005 to 0.08 µg/L of aflatoxins M_1 none exceeded permitted levels for our country (0.5 µg/L). Of these samples, two exceeded the allowed values for export to the European Economic Community (0.05 µg/L). It can be concluded that in the majority of food sampled total aflatoxins levels were found. In all milk samples we found low levels of aflatoxinas M_1, that would not harm human health. While contamination levels are low, it would show the importance of monitoring these mycotoxins and communicate results.

INTRODUCCIÓN

La lechería en Uruguay constituye un importante rubro agroindustrial, las exportaciones en el año 2012 fueron de U$S 800 millones y la producción en predios con actividad comercial alcanzó niveles históricos (2.174 millones de litros) según DIEA (2013). No obstante, en la última década los productores registrados han sufrido una disminución del 12% según DICOSE, pero en contraposición a ello, los niveles de producción en ese mismo período de tiempo, han aumentado en un 62% (DIEA, 2013). Esto se explica por una intensificación de la producción, dada por un incremento tecnológico, de la cantidad de animales y del mejoramiento genético de los mismos.

Siguiendo esta tendencia, para mantener y aumentar los niveles de producción, ha sido necesario modificar la alimentación, en base al uso de concentrados, principalmente en años de inclemencias climáticas (DIEA, 2013). La suplementación energética en las dietas animales, tiene como objetivo aumentar o mantener la producción. Es así que el control de la energía en la ingesta, nos permite manejar cualquier sistema de producción animal (Acosta, 2010).

Uno de los problemas en la materia prima de alimentos destinados al consumo de vacas lecheras, es la contaminación fúngica, que puede ocurrir durante la cosecha, transporte o almacenamiento del alimento. Son la temperatura y humedad de la cosecha o del almacenamiento de los granos, los principales factores que intervienen en el crecimiento de las cepas toxicogénicas (Coulombe, 1993).

En la actualidad, se estima que el 25 % de las cosechas del mundo, se encuentran contaminadas anualmente con micotoxinas (Iqbal y col., 2013). Estas toxinas son metabolitos secundarios de origen natural, producidas por diferentes especies de hongos toxicogénicos. Estos hongos pueden presentarse en una amplia gama de productos básicos como especias, frutos secos, cereales y materia prima para los piensos. Es en sustratos, principalmente de origen vegetal, que los hongos colonizadores encuentran los nutrientes esenciales para su crecimiento (Ellis y col., 1991; Jouany, 2002).

Entre los géneros de hongos toxicogénicos más importantes están *Aspergillus, Penicillium* y *Fusarium* (Hollinger y Ekperigin, 1999; Osweiler, 2000; Yiannikouris y Jouany, 2002). *Aspergillus* spp., produce diferentes micotoxinas, entre las que se destacan las aflatoxinas B_1, B_2, G_1, G_2, M_1 y M_2, siendo M_1 el derivado metabólico de la B_1, excretado por leche y el de mayor significado toxicológico. Las aflatoxinas B_1 y M_1 están clasificadas como carcinógenos grado 1 por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC, 1993).

Las aflatoxinas son de las micotoxinas más relevantes, ya que pueden tener graves consecuencias en la salud humana y animal (Richard y col., 2007). Estos metabolitos llegan a través de alimentos contaminados al animal, se absorben a nivel intestinal, se hidrolizan en hígado y son excretados por glándula mamaria como aflatoxina M_1 (Fink-Gremmels, 2008). La leche y sus derivados son una importante fuente de contaminación para el hombre (Galvano y col., 1998).

En nuestro país, al igual que en el resto del mundo, los avances tecnológicos

para intensificar los sistemas de producción de leche, han conducido a un aumento en las reservas alimenticias para animales, estos alimentos suelen ser sustratos importantes para el desarrollo de hongos toxicogénicos. El objetivo del trabajo fue estudiar la incidencia de aflatoxinas totales en alimentos destinados a vacas lecheras en producción y de aflatoxina M_1 en la leche de estos animales, en establecimientos de las zonas de influencia de los Campos Experimentales de Facultad de Veterinaria.

REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

LECHERÍA Y SUPLEMENTACIÓN

En Uruguay la lechería es uno de los principales rubros agroindustriales, en el año 2012 la producción total de leche ascendió a 2.249 millones de litros, marcando un incremento del 53% en la última década (DIEA, 2013). En contraposición en éste período los productores lecheros han disminuido en un 12% según DICOSE. Este aumento significativo de la producción, habiendo menos productores, se explicaría por una intensificación en la tecnología utilizada en los establecimientos, el aumento de la población animal y el mejoramiento genético impartido (DIEA, 2013).

En los predios lecheros de nuestro país, existe una tendencia creciente a la utilización de ensilado de grano húmedo junto con otros suplementos. Estos ensilados son utilizados en otoño e invierno cuando la disponibilidad de pasturas suele ser limitadas debido a la menor tasa de crecimiento que presentan (Acosta, 2008).

Otro problema que presentan los silos de grano húmedo es el crecimiento de hongos, levaduras y bacterias que se producen a expensas de los carbohidratos y ácidos de la fermentación. Esto hace aumentar la temperatura y el pH, disminuye los nutrientes y aumenta los porcentajes de fibra neutro y ácido detergente (FDN y FDA) en el alimento. El desarrollo de hongos puede ser controlado minimizando el ingreso de aire al momento del ensilado, a través de una buena compactación y cierre hermético de la reserva. Pueden usarse también, aditivos que inhiben el deterioro aeróbico y limitan el desarrollo de éstos mohos (Oude Elferink y col., 2001).

HONGOS TOXICOGÉNICOS

Los hongos productores de micotoxinas son contaminantes comunes de los alimentos destinado al consumo de los animales. Los géneros de hongos toxicogénicos que aparecen con mayor frecuencia en los alimentos son *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Alternaria* (Pittet, 1998). Los dos primeros, contaminan los alimentos en el almacenamiento. En cambio cepas de *Alternaria* y *Fusarium* suelen aparecer como contaminantes de campo (Logrieco y col., 2003). Esto se debe comúnmente a que los forrajes y cereales toman contacto con las esporas fúngicas en toda la cadena productiva, desde la cosecha hasta el transporte y almacenamiento de los mismos (Nelson, 1993).

Los principales factores ambientales que favorecen la proliferación de hongos toxicogénicos según Coulombe (1993) son humedad y temperatura. También son importantes las condiciones de pH encontradas en los sustratos (Nelson, 1993). En el caso de los silos el contenido de humedad del material a ensilar guarda relación con el pH de la reserva, siendo uno de los principales parámetros responsables de la calidad y longevidad del silo (Acosta, 2010). Es el pH un factor limitante para el desarrollo de hongos contaminantes en los ensilajes (Whitlow y Hagler Jr., 2002).

METABOLISMO Y ACCIÓN DE LAS AFLATOXINAS

Las aflatoxinas llegan al organismo animal con el alimento, una vez ingeridas comienzan su absorción en la boca. La mayoría son absorbidas en intestino y transportadas vía porta hasta el hígado, su órgano blanco. En sangre, se unen reversiblemente a la albúmina, la que no se une, ejerce su efecto tóxico sobre los tejidos, acumulándose en éstos cuando es ingerida por mucho tiempo. Atraviesan membrana placentaria causando efectos tóxicos en fetos de animales gestantes. En hígado es donde se produce la mayor biotransformación, dando origen a distintas sustancias tóxicas. En riñón e intestino, en menor medida también se puede dar éste proceso (Mostrom y Jacobsen, 2011; Coppock y col., 2012).

Los metabolitos más importantes originados por la biotransformación son: aflatoxina B_1-8,9-epóxido, aflatoxina M_1, M_2 y aflatoxicol. De éstas la más tóxica, es la aflatoxina B_1-8,9-epóxido. Este metabolito forma aductos al unirse al ADN, ARN y proteínas, alterando síntesis y procesos celulares, resultando en mutagénesis, carcinogénesis e inmunosupresión (Mostrom y Jacobsen, 2011). Por otro lado, el aflatoxicol, es un potente carcinogénico para animales. Ha sido detectado en huevos, tejidos, leche y diferentes derivados lácteos (Carvajal, 2003).

Luego que los animales consumen alimentos contaminados con aflatoxinas éstas se metabolizan, la aflatoxina B_1 dará origen a la aflatoxina M_1 que es detectada en leche y orina a las pocas horas de su ingestión. Brown y col. (1981) administraron experimentalmente aflatoxina B_1 a vacas en lactancia, detectando la presencia del metabolito M_1 en leche, 3 a 6 horas posteriores al consumo de la ración. Así mismo, detectaron aflatoxina B_1 y M_1, 6 horas después del consumo en orina, persistiendo durante 72 a 120 horas luego de retirada la ración. En otro experimento, Battacone y col. (2012) suministraron aflatoxinas en raciones de cabras, a la hora de su administración y hasta 72 horas después detectaron aflatoxina M_1 en la leche de éstos animales. Después de 96 horas de retirado el alimento contaminado, la cantidad de aflatoxina M_1 excretada a través de la leche fue imperceptible.

AFLATOXICOSIS

La aflatoxicosis es la enfermedad producida por el consumo de aflatoxinas. Estas micotoxinas afectan los animales variando su toxicidad según especie y edad. Las aves son las más sensibles y los animales jóvenes más que los adultos, ya que los jóvenes absorben más eficientemente las aflatoxinas que los mayores. Los monogástricos suelen ser más sensibles que los rumiantes, pues éstos realizan una degradación de las aflatoxinas en el rumen (Mostrom y Jacobsen, 2011).

En la aflatoxicosis podemos ver diferentes cuadros dependiendo de factores como el estado de salud, tiempo de exposición a la micotoxina, cantidad de ésta en el alimento y del sinergismo que pueda aparecer con otras micotoxinas (Aranguren y Argüelles, 2009). Se clasifican de acuerdo a la cantidad de micotoxina y al período de tiempo consumido, en aflatoxicosis aguda y crónica. Cuando los animales se exponen a grandes concentraciones de aflatoxina en cortos períodos de tiempo (5 a 10 días) hablamos de toxicidad aguda. El órgano blanco, es el hígado donde originan infiltración lipídica y/o necrosis hepática. Los signos que pueden presentar

los animales son diarrea, anorexia, depresión, ictericia y muerte (Soriano del Castillo, 2007).

La toxicidad crónica se presenta con mayor frecuencia. Aparece cuando los animales se exponen a bajas concentraciones por períodos prolongados de tiempo, que varía de semanas a meses. Hay pérdidas importantes que muchas veces pasan desapercibidas y se ven reflejadas en baja producción, disminución del consumo de alimento, mayor susceptibilidad a enfermedades secundarias e incluso se manifiesta con fallas reproductivas (Soriano del Castillo, 2007).

IMPORTANCIA DE LAS AFLATOXINAS EN LA SALUD PÚBLICA

Las fuentes de intoxicación para el hombre, son los alimentos de origen vegetal y animal. La agencia internacional de investigación sobre cáncer incluyó a la aflatoxina B_1 en el grupo 1 de los carcinogénicos humanos, asociada al carcinoma hepático. Dentro del grupo 1 se incluyen todas aquellas sustancias de las cuales hay pruebas suficientes para catalogarlas como Carcinogénicos para humanos (IARC, 1993).

La leche y sus derivados son un importante vehículo de aflatoxina M_1. En las poblaciones humanas los niños son los más afectados por ser grandes consumidores de leche (Shundo y col., 2009). Aflatoxina M_1 fue inicialmente categorizada en el grupo 2 por la Agencia de investigación sobre cáncer, la cual incluye en este grupo a sustancias para las cuales existen pruebas limitadas de carcinogénesis en humanos y pruebas suficientes de carcinogenicidad en animales. Posteriormente se demostró sus efectos carcinogénicos por lo que se incluyó en el grupo 1 (IARC, 2002).

Las aflatoxinas en el hombre actúan igual que en los animales, ligándose al ADN, ARN y proteínas, alterando sus síntesis. Cuando se ingieren en grandes cantidades producen vómitos, diarrea, hemorragias, abortos y muerte. Cuando son ingeridas en bajas concentraciones por tiempo prolongado ocasionan inmunosupresión, mutagénesis, teratogénesis y diferentes carcinomas siendo el hepático el más común (Carvajal, 2013).

MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LAS AFLATOXINAS

Debido a que las micotoxinas, se encuentran en pequeñas cantidades y no tienen una distribución homogénea, tanto el muestreo como el análisis de los diferentes sustratos son claves a la hora de su control. Las legislaciones son estrictas pues es necesario detectar niveles más bajos con métodos cada vez más sensibles. Es por esto que existen distintos métodos diagnósticos para su identificación. Los más utilizados son cromatografía en capa fina (del inglés Thin Layer Chromatography [TLC]), cromatografía líquida de alta resolución (del inglés High Performance Liquid Chromatography [HPLC]), cromatografía de gases (del inglés Gas Chromatography [GC]) e inmunoensayo enzimático (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay [ELISA]) (Turner, y col. 2009).

Históricamente las técnicas más utilizadas son las cromatográficas, siendo en la actualidad los inmunoensayos competitivos los de mayor relevancia diagnóstica. Rosi y col. (2007) realizaron una comparación entre la performance de la técnica de ELISA y la de HPLC concluyendo que el ELISA es un método analítico fiable. Ésta técnica tiene un costo relativamente bajo, es de fácil aplicación, rápida y altamente especifica. Las desventajas que presenta son los pocillos descartables encareciendo los costos cuando el número de muestras es elevado. Por otro lado el rango de detección es limitado pues, el anticuerpo necesita una molécula portadora, generalmente una proteína, para lograr la inmunogenicidad (Turner y col., 2009).

El fundamento de la técnica de ELISA está basado en la unión antígeno-anticuerpo. Para las micotoxinas se usa una variante que es el ELISA competitivo. Se utilizan pocillos de poliestireno recubiertos con antígenos. Se coloca la muestra que tiene el anticuerpo problema junto con un antígeno marcado con una enzima, la cual va a competir por los sitios de unión de los anticuerpos. La cantidad de antígeno que se unirá a los pocillos es inversamente proporcional a la cantidad de anticuerpo que presenta la muestra problema (Tizard, 2009).

MARCO NORMATIVO DE AFLATOXINAS

Debido a que las aflatoxinas son potentes carcinogénico, sus niveles están regulados a nivel mundial, para los alimentos destinados al consumo humano y animal. Un alimento muy utilizado por el hombre es la leche, fuente importante de aflatoxina M_1, por tal motivo está estrictamente reglamentada.

Según la Directiva 2002/32/EC, publicada en el Diario Oficial Europeo la dieta total destinada a ganado lechero, no debe superar los 5 µg/L de aflatoxina B_1. En Brasil está reglamentado la cantidad de aflatoxinas en alimentos para vacas lecheras en 20 µg/L según el Compêndio Brasileiro de Alimentacão Animal (2009).

Actualmente nuestro país no tiene una reglamentación para los niveles máximos de tolerancia para aflatoxina en alimentos destinados al consumo animal. El MERCOSUR reglamenta como niveles máximos de 20 µg/kg para algunos alimentos, como maíz (entero, partido, harina y sémola de maíz) y maní (crudo, tostado, pasta o manteca de maní). Comúnmente el maíz es un cereal utilizado en las dietas animales. La recomendación que realiza la Dirección General de Servicios Ganaderos del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP) sobre los niveles de aflatoxinas totales en alimentos para vacas lecheras es de 20 µg/kg, 200 µg/kg para vacas de cría y 500 µg/kg para ganado de engorde. Para aflatoxina B_1 el límite recomendado es de 5 µg/kg en el total de la dieta (Daniel Cabella, comunicación personal, 2014).

La cantidad de aflatoxina M_1 en leche para consumo humano en nuestro país está regulado por la reglamentación dispuesta por el MERCOSUR, los valores máximos tolerables son de 0.5 µg/L en leche fluida y 5 µg/L en leche en polvo. Para la Unión Europea los niveles son más exigentes, en leche entera y en la utilizada en subproductos es de 0.05 µg/L. Para la leche destinada a lactantes y sus derivados el nivel se reduce a 0.025 µg/L (Diario Oficial de la Unión Europea).

Existen numerosas investigaciones sobre niveles de aflatoxinas presentes en alimentos destinados al ganado y en leche. En Brasil Sassahara y col. (2005) encontraron un 53 % de las muestras de alimentos para vacas en producción láctea contenían aflatoxinas totales y un 24% de las muestras de leche cruda presentaban aflatoxina M_1. Prado y col. (1999) encontraron en leche destinada al consumo humano, un 82% de muestras contaminadas con aflatoxinas. En México, Velázquez y col. (2009) encontraron un 92,5% de las muestras de alimentos contaminadas con aflatoxinas totales y un 80% de la leche contaminada con aflatoxina M_1. En Uruguay existen controles oficiales por el MGAP a través del Plan Nacional de Residuos Biológicos que controla la presencia de aflatoxina M_1 en leches de exportación y consumo interno. Sin embargo, no se encontraron reportes disponibles de niveles de contaminación en estos alimentos para nuestro país.

HIPÓTESIS

El grado de contaminación con aflatoxinas totales varía con el alimento estudiado, existiendo una correlación entre los niveles detectados de aflatoxinas totales en alimentos consumidos por vacas en producción y el nivel de alflatoxina M_1 en leche.

OBJETIVOS

Objetivo

Determinar los niveles de aflatoxinas totales en diferentes sustratos de alimento para vacas lecheras y correlacionar dichos niveles con los determinados para alfatoxina M_1 en leche.

Objetivos específicos

Evaluar los niveles de aflatoxinas totales en alimentos destinados al consumo de vacas en producción láctea.

Cuantificar los niveles de aflatoxina M_1 en leche de las vacas en producción.

Correlacionar la presencia de niveles de aflatoxina M_1 en leche, con los niveles obtenidos de aflatoxina total en los alimentos analizados.

Relacionar la incidencia del tipo de alimento y la presencia de niveles de aflatoxinas totales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental

El ensayo experimental se llevó a cabo en dieciocho establecimientos lecheros comerciales, seleccionados de forma aleatoria, de los departamentos de Canelones (n=6), Lavalleja (n=6) y San José (n=6), circunscriptos al área de influencia de los Campos Experimentales de Facultad de Veterinaria Nº1 de Migues y Nº 2 de Libertad. Los establecimientos fueron agrupados de acuerdo a la región geográfica.

Las determinaciones de pH y aflatoxinas, se realizaron en el Laboratorio de Toxicología de Facultad de Veterinaria-Universidad de la República, mientras que la materia seca y humedad se determinó en el Laboratorio de Análisis Químicos del Departamento de Nutrición Animal, de la Facultad de Veterinaria-UdelaR.

Toma de muestras

Alimentos

Se colectaron un total de 37 muestras de alimentos que estaban consumiendo las vacas en producción, en los diferentes establecimientos. Los alimentos se agruparon en dos categorías, “ensilaje” y “concentrados”. La categoría “ensilaje” incluyó, ensilaje de grano húmedo y de planta entera de sorgo y de maíz. En “concentrados” se incluyeron alimentos con diferentes matrices: afrechillo de arroz, expeller de soja, lex de maíz (harina de germen de maíz), ración totalmente mezclada, cascarilla de soja y de cebada, semitín de trigo y grano de destilería (DDG). Mediante entrevista se confirmó que no utilizaban secuestrantes de micotoxinas en los establecimientos.

Se realizó un muestreo representativo de 1 kg de cada alimento, colocados en bolsas de nylon tipo ziploc. El muestreo de los silos y de los otros alimentos se realizó de la boca de las bolsas (figura 2 y 3) previo a ser administrado a las vacas en producción. Luego de identificarlas se refrigeraron durante el traslado al laboratorio de Toxicología de Facultad de Veterinaria, donde se congelaron a -18C° hasta el momento de su procesamiento realizado en un período menor a 30 días.

Figura 2. Silo de sorgo planta entera muestreado para análisis.

Figura 3. Toma de muestra en bolsa de ración.

Leche

De cada establecimiento se retiraron 250 mL de leche del tanque de frío, en frasco estéril (figura 4 y 5). Se refrigeraron hasta llegar al laboratorio de Toxicología de Facultad de Veterinaria donde se almacenaron a -18C°, hasta el momento del procesamiento, realizado en un período menor a 20 días.

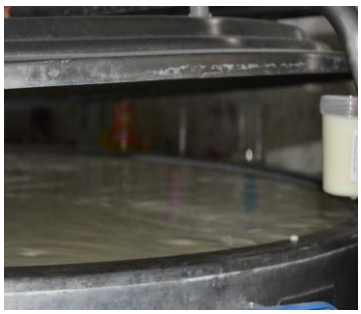

Figura 4. Muestra de leche en tanque de frío.

Figura 5. Muestra de leche para análisis.

Determinaciones y procedimientos

- **Aflatoxinas:**

La detección y cuantificación de aflatoxinas se realizó mediante inmunoensayo enzimático competitivo (ELISA) de uso comercial (Ridascreen® Aflatoxinas totales, Fast, Alemania). El límite de detección para éste test es de 2 µg/kg. El procesamiento de las muestras se comenzó con la molienda de 5 gramos de alimentos, se mezclo con 25 mL de metanol al 70% y se coloco durante 15 minutos en agitador a 200 rpm para realizar la extracción de las aflatoxinas. Luego las muestras se filtraron con papel de filtro Whatman N°1. El extracto obtenido se diluyó en agua destilada en proporción 1:1. Del extracto diluido y del estándar se sembraron 50 µL de cada uno en pocillos para ELISA, a cada pocillo se le incorporaron 50 µL del conjugado y 50 µL del anticuerpo anti-aflatoxina. Los pocillos se incubaron a 22 °C en estufa durante 10 minutos. Se descartó el contenido de los pocillos y se lavo con una solución buffer. Posteriormente se incorporaron 100 µL de una solución cromógena y se incubó durante 5 minutos en estufa. La reacción se detuvo mediante el empleo de 100 µL de una solución de 1N H_2SO_4 y la lectura se realizó en espectofotómetro a 450 nm de longitud de onda. Los resultados obtenidos se analizaron con el software RIDASOFT Win® al que se le ingresaron las absorbancias, obteniendo una curva de calibración expresando los niveles de aflatoxinas en ppb (1 ppb = 1 µg/L).

Para la detección y cuantificación de Aflatoxina M_1 en leche se utilizó un kit comercial (Ridascreen® Afla M_1, Fast, Alemania). El límite de detección para este test es de 0.005 µg/L. Las muestras de leche se centrifugaron durante 10 minutos a 3500g. Luego se desgrasaron para evitar interferencia con el análisis. Se colocaron 100 µL de solución de anticuerpo, en los pocillos para ELISA y se incubaron durante 15 minutos en estufa a 22°C. Se añadió 100 µL de los estándares y de la muestra

por duplicado y se incubo por 30 minutos. Los estándares corresponden a concentraciones de aflatoxinas de 0,5, 10, 20, 40 y 80 ppt, respectivamente. Se retiro el contenido de los pocillos y se lavo con solución buffer (repitió el lavado 3 veces). Se añadió 100 µL del conjugado enzimático a cada pocillo y se incubo durante 15 minutos. Se retiró el contenido y se enjuago con solución buffer. Se añadió 100 µL de una solución cromógena y se incubo por 15 minutos luego se detuvo la reacción con la incorporación de 100 µL de una solución de 1 N H_2SO_4. Transcurridos 5 minutos se leyó la absorbancia en espectrofotómetro a 450 nm. Los datos se ingresaron al software RIDASOFT Win® y se obtuvo una curva de calibración. Los niveles de aflatoxina M_1 se expresaron en partes por trillón (ng/L).

Los parámetros estudiados en los alimentos fueron pH, materia seca y humedad. Estos factores, pueden ser condicionantes para el desarrollo de los principales géneros fúngicos que colonizan alimentos de bovinos. Estos, a su vez, pueden ser determinantes en la producción de micotoxinas, cuando los hongos presentes, son toxicogénicos.

- **pH:**

Para realizar estas mediciones se utilizó un pH-metro digital, marca OAKTON. Se pesaron 10 gramos de muestra y en vaso de Bohemia se cubrió con agua destilada, se agitó suavemente hasta obtener una mezcla homogénea y con el electrodo del pH-metro, se obtuvo el valor de pH de las muestras. Estas lecturas se realizaron por duplicado para cada muestra.

- **Materia seca / humedad:**

La determinación de la materia seca y humedad se realizó mediante secado de las muestras por triplicado en estufa a 105ºC, durante 24 horas.

Análisis estadísticos.

Los datos son reportados como media, ± desvío estándar (DE) y rango. Se aplicó un análisis estadístico descriptivo a los datos, tomando como variables explicativas el sustrato y la región. Para determinar el nivel de correlación entre los niveles de aflatoxinas totales y alfatoxina M_1, se utilizó un análisis de correlación de Pearson. Para establecer las diferencias entre los niveles de aflatoxinas totales, humedad y pH, se aplicó a cada una de las variables ANOVA de dos vías ($y = \mu +$ sustrato + región + *error*), previa log-transformacion de los datos cuando correspondió. El nivel de significancia para los diferentes test fue de un 5%. Los datos fueron analizado utilizando el programa R (R Development Core Team, 2012).

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Aflatoxinas totales en los alimentos:

Los promedios para aflatoxinas totales en µg/kg, según las dos categorías de alimentos estudiadas, se expresan en la tabla 1. En el anexo 1 se presentan los resultados individuales para cada alimento. En el 91.8% (34/37), de los alimentos analizados se detectaron niveles de aflatoxinas totales con rangos de 2.17 a 44.1 µg/kg. Del total de muestras positivas el 5.8% (2/34) tuvieron concentraciones superiores a lo recomendado como máximos admisibles en raciones para ganado lechero, por la Dirección General de Servicios Ganaderos del MGAP. Estas dos muestras con valores elevados de aflatoxinas, se presentan en el mismo tipo de sustrato (silos de granos húmedos de sorgo). Esto sugeriría una mayor contaminación en este tipo de alimento, ya que también se observa una mayor tendencia en los demás silos de grano húmedo evaluados. Aunque en estos últimos los valores, son inferiores a los niveles máximos recomendados (anexo 1).

Como podemos observar en la tabla 1, comparando los promedios de aflatoxinas de la matriz "ensilaje" con los de la categoría "concentrados", únicamente se determinaron diferencias significativas entre las diferentes categorías y no entre zonas. Los resultados, indicarían una mayor predisposición a la contaminación por micotoxinas en la matriz alimentaria "ensilaje". Sin embargo hay autores que sugieren menor contaminación por hongos contaminantes en materiales ensilados, ya que el pH sería un factor limitante para su desarrollo (Whitlow y Hagler Jr., 2002). Estos datos adquieren una pertinencia considerable, dada la gran difusión de la tecnología de ensilaje de granos húmedos que existe en nuestro medio (Acosta, 2008; 2010).

Tabla 1. Presencia natural de aflatoxinas totales, discriminadas por región geográfica y sustratos alimenticios.

Región	Sustratos	n	Media (µg/kg)	±DE
Canelones	Concentrados	5	2.67	1.07
	Ensilaje	5	13.4	16.08
Lavalleja	Concentrados	6	5.13	3.31
	Ensilaje	8	11.7	13.3
San José	Concentrados	4	3.43	1.66
	Ensilajes	9	5.18	3.30
Totales	**Concentrados**	**15**	**3.86**	**2.46**
	Ensilajes	**22**	**9.46***	**11.46**

Los valores se expresan en rango, media aritmética y desvió estándar [DE]; * $p<0.05$, ANOVA.

En Brasil Sassahara y col. (2005), determinaron los niveles de aflatoxinas en diferentes matrices alimenticias, obteniendo 26% (7/27) de las muestras de alimentos comerciales y un 53% (8/15) de muestras de alimentos elaborados con niveles de aflatoxinas. En éste trabajo la cuantificación de las aflatoxinas totales la realizaron por el método de TLC. En otros estudios realizados en México por Velázquez y col. (2009), se reportó que el 92.5% (37/40) de las muestras de ración

para bovinos lecheros analizadas presentaron niveles de aflatoxinas, con un rango de 4.82 – 24.89 µg/kg (media 10.89 ± 5.84 µg/kg). El 9.3% (3/40), presentaron niveles superiores a los permitidos por la legislación de su país (20 µg/kg). En este trabajo se utilizó la técnica de ELISA competitiva-directa mediante un kit comercial de Agraquant – Romer Labs®. En ninguno de los dos estudios se asociaron los valores detectados con problemas de salud en los animales.

Del análisis estadístico de los datos, se constato que el efecto región no afectó significativamente los niveles de aflatoxinas totales, por lo que se consideró para el análisis de los datos una sola región, simplificando el modelo sin el efecto región en el análisis estadístico (criterio de simplificación de modelos estadísticos). Esto se explicaría, porque las muestras provienen de tres regiones diferentes pero en un radio de 200 km aproximadamente, por lo que no deberían existir grandes diferencias climáticas ni en las condiciones del suelo que determinara la aparición diferenciada de niveles de aflatoxinas en una región más que en otra. Si bien pueden aparecer factores individuales que hagan variar de una región a otra. Un ejemplo de ello pueden ser los diferentes manejos y/o alteraciones en el almacenamiento de los alimentos que difiere entre los establecimientos. Pueden aparecer inóculos de hongos por contaminaciones presentes en años anteriores. Mediante las visitas y entrevistas a los establecimientos se pudieron determinar que las condiciones de almacenamiento eran similares y adecuadas para todos los casos y no manifestaron antecedentes de contaminación fúngica en años anteriores.

Muestras de leche

Los resultados para aflatoxina M_1 en leche, según la región geográfica, se presentan en la tabla 2. En el anexo 2 se expresan los valores para cada muestra. De las muestras de leche analizadas, el 100% (18/18), fueron positivas para aflatoxinas M_1, presentado niveles de 0.005 a 0.08 µg/L. Según la reglamentación vigente para el MERCOSUR ninguna superó los niveles de tolerancia para leche fluida (0.5 µg/L). El 11% (2/18) de las muestras mostraron niveles superiores a 0.05 µg/L límite establecido para la exportación de leche entera a la Unión Europea.

Tabla 2. Presencia natural de aflatoxina M_1, discriminadas por región geográfica, en leche cruda de tambo.

Región	n	Media (µg/L)	± DE	Rango (µg/L)
Canelones	6	0.011	0.012	0.005 - 0.037
Lavalleja	6	0.028	0.028	0.005 - 0.08
San José	6	0.018	0.030	0.005 - 0.08

Los valores se expresan en rango, media aritmética y desvió estándar [DE].p>0.05, ANOVA.

En Uruguay no se han difundido reportes de niveles de aflatoxinas M_1 para leche cruda. Los datos aquí presentados contribuyen a la difusión de la importancia que reviste para nuestro país reportar niveles de aflatoxina M_1 en leche.

En la Brasil, Sassahara y col. (2005) reportaron, 24% (10/42) de las muestras analizadas con niveles aflatoxina M_1, de las cuales el 7% (3/42) superaron los 0.5 µg/L establecido como límite por la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (ANVISA), las muestras fueron de establecimientos lecheros del Norte del estado de Paraná, Brasil. En este estudio se utilizó el mismo kit de Elisa comercial que usamos para el análisis de nuestras muestras (Ridascreen® Afla M_1, Fast, Alemania). No obstante, Prado y col. (1999) para el mismo país en Belo Horizonte – Minas Gerais, reportaron 82% (50/61) de muestras positivas para aflatoxinas M_1 en leche consumo, analizadas mediante HPLC; con un rango de 0.006 a 0.077 µg/L. De estas muestras solamente el 5% (3/61), alcanzaron niveles superiores a la normativa Europea (0.05 µg/L). Otros estudios, en leche cruda en México, donde se utilizó como herramienta de medición un kit de Elisa de Romer Labs®, reportaron un 80% (32/40) de muestras procedentes de 40 establecimientos con niveles de aflatoxinas, con un rango de 0.006 a 0.065 µg/L (media 0.023 ± 0.016 µg/L), el 7.5% (3/40) de las muestras estuvieron por encima de los niveles permitidos para la Comunidad Europea (0.05 µg/L) (Velázquez y col., 2009).

La variabilidad de los porcentajes reportados podría deberse en gran medida a que los métodos analíticos utilizados, no son los mismos en todos los ensayos. Para nuestro estudio se utilizó el método de inmunoensayo enzimático (ELISA) el cual ha sido validado para la detección de aflatoxina M_1 en leche por varios autores. Rosi y col., (2007) determinando que éste es un método preciso, sencillo y de alto rendimiento. En algunas ocasiones el método de ELISA puede tener algún tipo de interferencia por lo que recomienda que las muestras positivas sean confirmadas por HPLC. En ese trabajo confirmaron una correlación del orden del 0.789 R^2 entre ambos métodos analíticos. Cabe señalar que la técnica utilizada en la presente tesis, es la utilizada por la Dirección de Laboratorios Veterinarios (DILAVE) de nuestro país para realizar los controles oficiales.

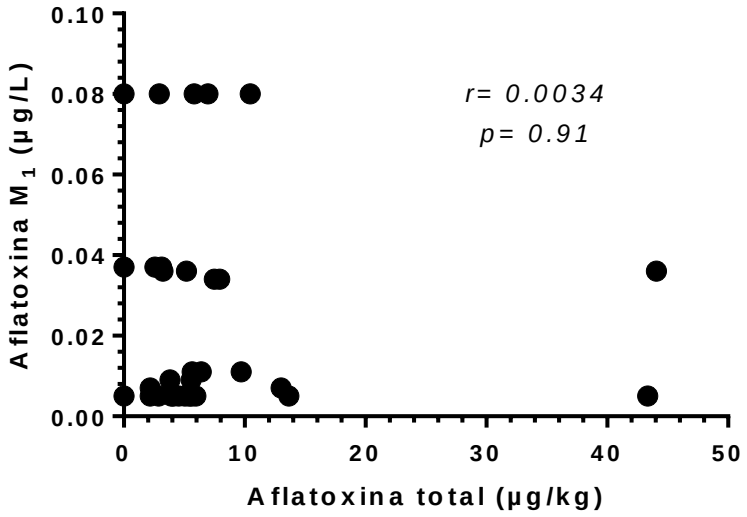

Figura 6. Correlación entre los niveles de aflatoxina M_1 en leche cruda de tambo y los niveles de aflatoxinas totales en alimentos utilizados en vacas en producción.

Los niveles de aflatoxinas totales como se observa en la figura 6 no se correlacionaron con los niveles de aflatoxina M_1, por lo que no hay una marcada asociación entre ambas variables (r=0.003; p=0.91). Esto podría deberse a varios motivos, por un lado Turner y col., (2009) menciona que las micotoxinas en los alimentos no se distribuyen de manera homogénea ni suelen encontrarse en grandes cantidades, lo que podría influir sobre el muestreo. En condiciones naturales no es posible meop=0.91)

Para nuestros resultados, el análisis de pH y humedad de los alimentos consumidos en cada uno de los establecimientos en las diferentes regiones, no presentaron diferencias entre sí. Por lo cual, la potencial variabilidad que aportaron el pH y la humedad a los resultados globales del estudio de los niveles de aflatoxinas totales en los alimentos, no fueron significativamente relevantes para determinar las diferencias alcanzadas entre los mismos.

CONCLUSIONES

La mayoría de los alimentos muestreados en este estudio presentaron contaminación por aflatoxinas totales, observándose los niveles superiores en los silos de grano húmedo.

El total de las muestras de leche analizadas presentaron niveles de aflatoxinas M_1, destacándose que ninguna superó los niveles máximos permitidos para nuestro país, demostrando que son aptas para el consumo humano.

Si bien los niveles de contaminación fueron bajos, indicarían la importancia de realizar monitoreos de estas micotoxinas y comunicar los resultados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acosta, Y. (2008). Utilización de ensilaje de grano húmedo: Alternativas de corrección proteica. Jornada de Actualización Técnica en Lechería. INIA La Estanzuela. Florida, Uruguay, p. 43-49.

2. Acosta, Y. (2010). Ensilaje de grano húmedo de sorgo: detalles de confección y su efecto sobre el valor nutricional. Jornada de Divulgación de Ensilaje de Grano Húmedo de Sorgo. INIA. Treinta y Tres, Uruguay, p. 1-8.

3. Allcroft, R., Carnaghan, R.B.A. (1962). Groundnut toxicity: *Aspergillus flavus* toxin (aflatoxin) in animal products. Veterinary Record 74:863-864.

4. Allcroft, R., Carnaghan, R.B.A. (1963). Groundnut toxicity: an examination for toxin in human products from animals fed toxic groundnut meal. Veterinary Record 75:259-263.

5. Aranguren, E., Argüelles, M. (2009). Detección de aflatoxina M_1 en quesos frescos comercializados en el municipio de Yopal, Casanare, mediante la técnica de Elisa. Tesis Universidad Javeriana, Bogota 25 p.

6. Battacone, G., Nudda, A., Rassu, SPG., Decandia, M., Pulina, G. (2012). Excretion pattern of aflatoxin M_1 in milk of goats fed a single dose of aflatoxin B_1. Journal of Dairy Science 95:2656-2661.

7. Brown, R.W., Pier, A.C., Richard, J.L., Krogstad, R.E. (1981). Effects of dietary aflatoxin on existing bacterial intramammary infections of dairy cows. American Journal of Veterinary Research 42:927-933.

8. Bullerman, I., Draughon, F. (1994). *Fusarium moniliforme* and fumonisin symposium-introduction. Journal of Food Protection 57(6):513.

9. Bullerman, L., Bianchini, A. (2007). Stability of mycotoxins during food processing. International Journal of Food Microbiology 119:140-146.

10. Carrillo, L. (2003). Mohos y micotoxinas. En: Carrillo, L. Los hongos de los alimentos y forrajes. Salta, Universidad Nacional de Salta, p 1-24

11. Carvajal, M. (2013). Transformación de la aflatoxina B1 de alimentos, en el cancerígeno humano, aducto AFB1-ADN. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas.16:109-120. Disponible en: http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43228901004. Fecha de consulta: 19/04/2014.

12. Carvajal, M., Rojo, F., Mendez, I., Bolaños, A. (2003). Aflatoxin B_1 and its intercoverting metabolite afltoxicol in milk: the situation in Mexico. Food Additives and Contaminants 20(11):1077-1086.

13. Chelkowski, J. (1991). Preface. En: Chelkowski J. (ed.) Mycotoxins. Cereal grain, fungi and quality in drying and storage. Amsterdam, Elsevier, p. 77-118.

14. Coppock, R.W., Christian, R.R.G., Jacobsen, B.J. (2012). Aflatoxins. En: Gupta, J. Veterinary Toxicology Basic and Clinical Principles. 2° ed. Amsterdan, Elsevier, p.1181-1199.

15. Coulombe, R.A. Jr. (1993). Symposium: Biological Action of Mycotoxins. Journal of Dairy Science 76:880-891.

16. Diario Oficial de la unión Europea. Disponible en: www.siicex.gob.pe/siicex/resources/calidad/aflatoxina.pdf Fecha de consulta: 28/06/2014.

17. Diekman, M.A., Green, M.L. (1992). Mycotoxins and Reproduction in Domestic Livestock. Journal of Animal Science 70:1615-1627.

18. Ellis, J.W.O., Smith, P., Simpson, B.K. (1991). Aflatoxins in food: occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection and methods of control. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 30:403-439.

19. Fink-Gremmels, J. (2008). Mycotoxins in cattle feed and carry-over to dairy milk: a review. Food Additives and Contaminants 25:172-180.

20. Galvano, F., Galofaro, V., De Angelis, A., Galvano, M., Bognanno, M., Galvano, G. (1998). Survey of the occurrence of aflatoxin M_1 in dairy products marketed in Italy. Journal of Food Protection 61:738-741.

21. Hollinger K., Ekperigin, H.E. (1999). Mycotixicosis in food producing animals. The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice 15 (1): 133-165.

22. IARC, International Agency for Research on Cancer. (2002). Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. Monograph on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Lyon, World Health Organisation. N°82, 590 p.

23. IARC. International Agency for Research on Cancer. (1993). Monograph on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Lyon, World Health Organization N°56, 599 p.

24. Iqbal, S., Asi, M., Jinap, S. (2013). Variation of aflatoxin M_1 contamination in milk and milk products collected during winter and summer seasons. Food Control 34:714-718.

25. Jouany, J.P. (2002). Mycotoxins in feed and their fate in animals. Animal Research 51:81-99.

26. Logrieco, A., Bottalico, A., Mulé, G., Moretti, A., Perrone, G. (2003). Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. European Journal of Plant Pathology 109:645-647.

27. McDonald, P., Henderson, A.R., Heron, S.J.E. (1991).The Biochemistry of Silage. 2a. ed. Marllow. Chalcombe Publications. 33p.

28. MERCOSUR. (2002). Reglamento técnico MERCOSUR sobre límites máximos de aflatoxinas admisibles en leche, maní y maíz. GMC/RES. N° 25/02. Disponible en: http://www.mercosur.int/msweb/Normas/normas_web/Resoluciones/ES/Res_025_002_RTM_Aflatoxinas%20en%20Lech-Man%C3%AD-Ma%C3%ADz_Acta%202_02.PDF. Fecha de consulta: 06/05/2014.

29. MGAP-DIEA. (2013). Estadísticas del sector lácteo 2012. Disponible en: http://www.mgap.gub.uy/portal/agxppdwn.aspx?7,5,208,O,S,0,6980%3BS%3B1%3B116. Fecha de consulta: 04/05/2014.

30. Mostrom, M.S., Jacobsen, B.J. (2011). Ruminant Mycotoxicosis. Veterinary Clinical North America Food Animal Practice 27(2):315-344.

31. Nelson, C.E. (1993). Strategies of mold control in dairy feeds. Journal of Dairy Science. 76:898-902.

32. Osweiler, G.D. (2000). Mycotoxins: Contemporary Issues of Food Animal Health and Productivity. Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice 16(3):511-530.

33. Oude Elferink, S.J.W.H., Driehuis, F., Gottschal, J.C., Sierk, F., Spoelstra. S.F. (2001). Estudio 2.0. 17. FAO. Los procesos de fermentación del ensilaje y su manipulación. Uso del ensilaje en el trópico privilegiando opciones para pequeños campesinos. Disponible en: http://www.fao.org/docrep/005/X8486s/x8486S04.htm Fecha de consulta: 14/05/2014.

34. Pittet, A. (1998). Natural occurrence of mycotoxins in food and feeds-an updated review. Médicine Véterinaire 49:479-492.

35. Prado, G., Oliveira, M.S., Abrantes, F.M., Santos, L.G., Soares, C.R., Veloso, T. (1999). Ocurrencia de aflatoxina M_1 em leite consumida na cidade de Belo Horizonte – Minas Gerais / Brasil – agosto/98 a abril/99. Food Science and Techology (Campinas) 19:420-423.

36. R Development Core Team. (2012). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL http://www.R-project.org/.

37. Richard, E., Heutte, N., Sage, L., Pottier, D., Bouchart, V., Lebilly, P., Garon, D. (2007). Toxigenic fungi and mycotoxins in mature corn silage. Food and Chemical Toxicology 45:2420-2425.

38. Rosi, P., Borsari, A., Lasi, G., Lodi, S., Galanti, A., Fava, A., Girotti, S., Ferri, E. (2007). Aflatoxin M_1 in milk: Reliability of the immunoenzymatic assay. International Dairy Journal 17:429-435.

39. Sargeant, K., Sheridan, A., O'Kelly, J., Carnaghan, R.B.A. (1961). Toxicity associated with certain samples of groundnuts. Nature 192:1096-1097.

40. Sassahara, M., Netto Pontes, D. Yanaka, E.K. (2005). Aflatoxin occurrence in foodstuff supplied to dairy cattle and aflatoxin M_1 in raw milk in the North of Paraná state. Food and Chemical Toxicology 43:981-984.

41. Shundo, L., Navas, S.A., Lamardo, L.C.A., Ruvieri, V., Sabino, M. (2009). Estimate of aflatoxin M_1 exposure in milk and occurrence in Brazil. Food Control 20:655-657.

42. Soriano del Castillo, J.M. (2007). Micotoxinas en alimentos. Barcelona, Díaz de Santos, 393 p.

43. Swanson, B.G. (1987). Mycotoxins on fruits and vegetables. Acta Horticulturae 207:49-61.

44. Tizard, I. (2009). Técnicas de inmunodiagnóstico. En: Tizard, I. Introducción a la inmunología veterinaria. 8a ed. Barcelona, Ed. Elsevier, pp. 509-527.

45. Turner, W.N., Subrahmanyam, S., Piletsky, S.A. (2009). Analytical methods for determination of mycotoxins: A Review. Analytica Chimica Acta 632:168-180.

46. Velázquez, W.R., Martínez, S.P., Espinosa V.H.I., Vera, M.A.N., Palacios, E.D.L., Rojo, F. (2009). Aflatoxinas totales en raciones de bovinos y AFM_1 en leche cruda obtenida en establos del estado de Jalisco, México. Técnica Pecuaria en México. 47(2):223-230.

47. Whitlow, L.W., Hagler Jr., W.M. (2002). Mycotoxins in feeds. Feedstuffs. 74(28):1-10.

48. Yiannikouris, A., Jouany, J.P. (2002). Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. Animal Research 51:81-99.

ANEXOS

Anexo1. Valores individuales de aflatoxinas totales en los alimentos.

Productor	Tipo de muestra	Aflatoxinas totales (µg/kg)
Canelones	S.S.G.H.	43.34
Canelones	S.S.G.H.	3.13
Canelones	Afrechillo de arroz	2.56
Canelones	Cascarilla soja	0
Canelones	Afrechillo de arroz	2.28
Canelones	Semitin	4.55
Canelones	Afrechillo de arroz	0
Canelones	S.S.G.H.	9.70
Canelones	S.M.P.E.	5.66
Canelones	S.S.G.H.	5.46
Lavalleja	S.M.P.E	5.19
Lavalleja	S.S.G.H.	44.1
Lavalleja	D.D.G.	3.24
Lavalleja	S.S.P.E.	7.49
Lavalleja	D.D.G.	7.93
Lavalleja	S.SP.E.	6.4
Lavalleja	S.M.P.E.	13.65
Lavalleja	Cascarilla de Cebada	2.17
Lavalleja	Expeller de soja	2.88
Lavalleja	Cascarilla de soja	4.09
Lavalleja	S.S.G.H.	5.04
Lavalleja	S.S.P.E.	5.40
Lavalleja	Cascarilla de soja	10.4
Lavalleja	S.M.P.E.	6.95
San José	S.M.P.E.	5.09
San José	R.T.M.	2.24
San José	Lex de maíz	5.57
San José	S.S.P.E	3.83
San José	S.M.P.E.	5.83
San José	S.S.G.H.	2.92
San José	R.T.M.	0
San José	R.T.M.	3.94
San José	S.M.P.E.	5.97
San José	S.S.G.H.	13.1
San José	S.M.P.E.	2.17
San José	S.M.G.H.	2.26
San José	S.M.P.E.	5.60

S.S.G.H.: Silo de sorgo grano húmedo. S.G.P.E.: Silo de sorgo planta entera. S.M.P.E.: Silo de maíz planta entera. S.M.G.H.: Silo de maíz grano húmedo. R.T.M. :ración totalmente mezclada.

Anexo 2. Valores individuales de aflatoxina M_1 en las muestras de leche

Productor	Alfatoxina M_1 (µg/L)	
Canelones	0.005	
Canelones	0.037	
Canelones	0.005	
Canelones	0.005	
Canelones	0.011	
Canelones	0.005	
Lavalleja	0.036	
Lavalleja	0.034	
Lavalleja	0.011	
Lavalleja	0.005	
Lavalleja	0.005	
Lavalleja	0.08	
San José	0.005	
San José	0.005	
San José	0.009	
San José		0.08
San José		0.005
San José	0.006	

Anexo 3. Valores individuales de pH, materia seca y humedad en las muestras de alimentos.

Zona	Sustrado	Materia Seca	Humedad (%)	pH
Canelones	S.S.G.H.	72.2	27.7	4.57
Canelones	S.S.G.H.	58.1	41.9	5.77
Canelones	Afrechillo de arroz	84.9	15	6.66
Canelones	Cascarilla Soja	88.1	11.9	6.69
Canelones	Afrechillo de arroz	86.5	13.4	6.25
Canelones	Semitin	86.4	13.5	6.54
Canelones	Afrechillo de arroz	87.4	12.5	6.57
Canelones	S.S.G.H.	57.1	42.9	4.35
Canelones	S.M.P.E.	24.1	75.9	3.91
Canelones	S.S.G.H.	56.8	43.1	4.80
Lavalleja	S.M.P.E.	26.0	73.9	4.01
Lavalleja	S.S.G.H.	65.5	34.4	4.44
Lavalleja	D.D.G.	86.6	13.3	5.13
Lavalleja	S.S.P.E.	28.5	71.4	4.02
Lavalleja	D.D.G	86.7	13.2	5.73
Lavalleja	S.S.P.E.	28.1	71.8	5.12
Lavalleja	S.M.P.E.	23.5	76.5	3.98
Lavalleja	Cascarilla de Cebada	85.8	14.1	5.09
Lavalleja	Expeller de Soja	88.7	11.2	6.80
Lavalleja	Cascarilla de Soja	88.3	11.6	6.21
Lavalleja	S.S.G.H.	69.9	30.3	4.55
Lavalleja	S.S.P.E.	37.4	62.5	7.36
Lavalleja	Cascarilla de Soja	70.2	29.7	5.75
Lavalleja	S.M.P.E.	25.3	74.6	6.81
San José	S.M.P.E.	34.1	65.9	3.98
San José	R.T.M.	88.2	11.8	6.49
San José	Lex de Maíz	85.7	14.2	5.18
San José	S.S.P.E	34.7	65.2	4.23
San José	S.M.P.E.	35.4	64.5	3.94
San José	S.S.G.H.	69.1	30.8	5.08
San José	R.T.M	86.9	13	6.32
San José	R.T.M.	87.7	12.2	6.38
San José	S.M.P.E.	26	74	3.85
San José	S.S.G.H.	69.1	30.8	7.49
San José	S.S.P.E.	35.9	64	3.96
San José	S.M.G.H.	53.5	43.4	4.65
San José	S.M.P.E.	25	74.9	3.99

S.S.G.H.: Silo de sorgo grano húmedo. S.G.P.E.: Silo de sorgo planta entera. S.M.P.E.: Silo de maíz planta entera. S.M.G.H.: Silo de maíz grano húmedo. R.T.M.: ración totalmente mezclada.