



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA

**“EVALUACIÓN DE LA INCIDENCIA DE AFLATOXINAS EN
ALIMENTO PARA GANADO (CONCENTRADO Y ZACATE DE
MAÍZ) Y LECHE PROVENIENTE DE CUENCAS LECHERAS
DEL VALLE DE TULANCINGO Y VALLE DEL MEZQUITAL,
HGO.”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADOS DE QUÍMICA EN ALIMENTOS

P R E S E N T A N

HUGO AVILES CABRAL
MARBEL SARAI LOZADA CALLEJA

DIRECTORAS:

DRA. ARACELI CASTAÑEDA OVANDO
DRA. JUDITH JAIMEZ ORDAZ

CO-DIRECTORA:

DRA. GABRIELA M. RODRÍGUEZ SERRANO



MINERAL DE LA REFORMA, HIDALGO, 2018



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería
Institute of Basic Sciences and Engineering
Dirección
 Dean

Mineral de la Reforma, Hgo., a 7 de agosto de 2018

Número de control: ICBI-D/680/2018
 Asunto: Autorización de impresión.

M. EN C. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO
 DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR

Por este medio le comunico que el Jurado asignado a los Pasantes de Licenciatura en Química en Alimentos **Hugo Aviles Cabral** y **Marbel Sarai Lozada Calleja**, quienes presentan el trabajo de titulación **"Evaluación de la incidencia de aflatoxinas en alimento para ganado (concentrado y zacate de maíz) y leche proveniente de cuencas lecheras del Valle de Tulancingo y Valle del Mezquital, Hgo."** después de revisar el trabajo en reunión de Sinodales ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación firman de conformidad los integrantes del Jurado:

PRESIDENTE:	Dr. Javier Añorve Morga	
PRIMER VOCAL:	Dra. Araceli Castañeda Ovando	
SEGUNDO VOCAL:	Dra. Gabriela Mariana Rodríguez Serrano	
TERCER VOCAL:	Dra. Judith Jaimez Ordaz	
SECRETARIO:	Dra. Elizabeth Contreras López	
PRIMER SUPLENTE:	Dr. Ernesto Alanís García	
SEGUNDO SUPLENTE:	Dr. Luis Guillermo González Olivares	

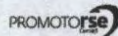
Sin otro particular, reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.

Atentamente
 "Amor, Orden y Progreso"

Dr. Óscar Rodolfo Suárez Castiño
 Director del ICBI



ORSC/SEPC



Ciudad del Conocimiento
 Carretera Pachuca - Tulancingo km. 4.5
 Colonia Carboneras
 Mineral de la Reforma, Hidalgo, México, C.P. 42184
 Tel. +52 771 7172000 exts 2231, Fax 2109
 direccion_icbi@uaeh.edu.mx

www.uaeh.edu.mx



El presente trabajo, se realizó en los laboratorios de Físicoquímica 2 y Biotecnología 2 en el edificio de Química de Alimentos de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.



Este trabajo se realizó gracias al financiamiento Programa para el Desarrollo Profesional Docente (PRODEP) en su modalidad de Redes de Colaboración (Convocatoria 2015) y como parte del proyecto “Aflatoxinas en leche: prevalencia, interacción con los componentes de la leche y estabilidad ante agentes físicos y biológicos”.

Dedicatoria

Marbel Sarai Lozada Calleja

Quiero dedicar este trabajo a **DIOS**, porque sin él no hubiera llegado hasta donde me encuentro, ya que por su amor, su gracia y sabiduría, me ha permitido lograr lo que más he anhelado, terminar una carrera profesional. Sin temor a expresarlo y con la convicción de que el pilar más fuerte en mi vida es y siempre será Dios.

<< Josué 1:9: Mira que te mando que te esfuerces y seas valiente, no temas ni desmayes que Jehová tu Dios estará contigo dondequiera que vayas >>

Así mismo, quiero dedicárselo a mis padres, quienes han estado conmigo en las buenas, las malas y las peores. A pesar de toda circunstancia, me han transmitido fortaleza y confianza. Por su preocupación, constancia, amor y esfuerzos puedo decir que este logro también es de ustedes.

Agradecimientos

Marbel Sarai Lozada Calleja

Principalmente quiero agradecer a Dios por todas las bendiciones que ha traído a mi vida y por siempre estar conmigo en todo momento.

A mi mamá por ser la mujer más amorosa, comprensiva y divertida, por darme su apoyo incondicional, por consolarme cuando ya no podía más, por su preocupación, y por cada palabra de aliento y motivación. Gracias mamá por siempre estar pendiente de mí, por desvelarte para que pudiera llevarme algún alimento a la escuela, por siempre tenerme en tus oraciones y por escucharme atentamente cada que te hablaba sobre mis clases. Gracias por tu paciencia ante mis enojos y frustraciones, por las presiones constantes para que pudiera superarme día a día. Pero por sobre toda las cosas, gracias por ser la mejor mamá del mundo. Te amo mamá.

A mi papá por haberme otorgado la mejor de las herencias, una educación. Gracias por tu esfuerzo, tu fuerza, valentía y dedicación, que a pesar de las circunstancias, te mantuviste al pie del cañón, por eso y muchas cosas más te admiro. Gracias por tus consejos, por enseñarme a enfrentar los problemas y por siempre estar para mí. Gracias por inculcarme valores y el sentido de la responsabilidad y el compromiso. Es para mí un orgullo decir que eres mi papá, te amo.

A mi hermano David, pesar de que a veces discutimos, te quiero mucho. Gracias por ser tú quien me insistiera en acabar este trabajo y no dejar nada medias. Por hacerme reír y por compartir conmigo mis éxitos, así como también estar ahí en mis fracasos. Siempre estaré ahí en los momentos que me necesites.

A toda mi familia quien siempre estuvo pendiente de mí, que me apoyó en todo momento. Gracias por siempre tener una palabra de aliento o de motivación y sobre todo por creer en mí siempre. Doy gracias a Dios por haberme dado esta maravillosa familia.

A mis amigos, que son mi familia de otra sangre. Gracias por las risas, las aventuras, los momentos inolvidables y los tiempos compartidos. Gracias por el apoyo incondicional, por los consejos y por cada anécdota que guardaré por siempre en mi corazón.

A la Dra. Araceli por su dedicación, compromiso y apoyo para que esta investigación pudiera realizarse. Gracias por su asesoramiento y por atender cada una de mis dudas.

Por los conocimientos transmitidos, por su paciencia y por el tiempo que me dedicó. La mejor asesora que pude tener.

A la Dra. Judith, por ayudarme con la redacción y ortografía de este trabajo, así como por el tiempo invertido en esta investigación.

A mis sinodales por las correcciones y observaciones realizadas a este trabajo, con el fin de crear mejoras.

A mi Alma Máter (Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo) donde logré desarrollarme académicamente, donde pude crear un pensamiento crítico, así como hacer crecer mis actitudes, aptitudes y fortalecer mi carácter.

Esto es poco de lo mucho que me gustaría expresar, solo puedo decir ¡GRACIAS!

CONTENIDO

Índice de tablas.....	iv
Índice de figuras	v
Abreviaturas	vii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	2
2.1 Hongos	2
2.1.1 Micotoxinas	2
2.1.2 Clasificación de mohos.....	3
2.2 Mohos toxigénicos	4
2.2.1 Principales géneros micotoxigénicos	4
2.2.1.1 <i>Alternaria</i> spp.....	4
2.2.1.2 <i>Fusarium</i> spp.	6
2.2.1.3 <i>Penicillium</i> spp.....	8
2.2.1.4 <i>Aspergillus</i> spp.	10
2.2.2 Prevención y control de mohos toxigénicos en granos	12
2.3 Aflatoxinas	13
2.3.1 Generalidades	13
2.3.2 Condiciones para el desarrollo de aflatoxinas en cultivos y alimentos	16
2.3.3 Aflatoxinas en alimentos	17
2.3.3.1 Alimento para ganado.....	17
2.3.3.2 Alimentos para consumo humano.....	18
2.3.4 Toxicidad de aflatoxinas	21
2.3.5 Métodos de determinación de aflatoxinas	22
2.3.5.1 Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)	22
2.3.5.2 Columnas de inmunoafinidad.....	23

2.3.5.3	Inmunoensayo de polarización de fluorescencia (FP)	23
3.	OBJETIVOS	25
3.1	Objetivo general	25
3.2	Objetivos específicos	25
4.	METODOLOGÍA	26
4.1	Muestras	26
4.2	Análisis microbiológico	27
4.2.1	Recuento de mohos	28
4.2.2	Identificación de colonias fúngicas	29
4.2.3	Aislamiento de colonias fúngicas potencialmente micotoxigénicas	30
4.3	Extracción y determinación de aflatoxinas totales	31
4.3.1	Fundamento	31
4.3.2	Preparación de las muestras	31
4.3.3	Análisis	32
4.4	Análisis proximal	32
4.4.1	Determinación de humedad	33
4.4.2	Determinación de cenizas	33
4.4.3	Determinación de grasa cruda	33
4.4.4	Determinación de fibra bruta	34
4.4.5	Determinación de proteína	35
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
5.1	Análisis microbiológico	37
5.1.1	Alimento concentrado	37
5.1.2	Alimento de zacate de maíz	43
5.2	Análisis de aflatoxinas totales	49
5.2.1	Alimento para ganado	49

5.2.2 Leche	54
5.3 Análisis proximal.....	58
5.4 Relación entre la composición química del alimento para ganado y la incidencia de mohos aflatoxigénicos.....	59
6. CONCLUSIONES.....	61
REFERENCIAS	62

Índice de tablas

Tabla 1. Toxinas producidas por <i>Alternaria</i> spp.....	6
Tabla 2. Toxinas producidas por <i>Fusarium</i> spp.	8
Tabla 3. Toxinas producidas por <i>Penicillium</i> spp.	10
Tabla 4. Toxinas producidas <i>Aspergillus</i> spp.....	12
Tabla 5. Incidencia de aflatoxinas totales en diferentes alimentos.....	15
Tabla 6. Porcentaje de incidencia de géneros fúngicos identificados en 13 muestras de alimento concentrado, proveniente del Valle del Mezquital.	38
Tabla 7. Porcentaje de incidencia de géneros fúngicos identificados en 5 muestras de alimento concentrado, proveniente del Valle de Tulancingo.	41
Tabla 8. Porcentaje de incidencia de géneros fúngicos identificados en 10 muestras de alimento zacate de maíz, proveniente del Valle del Mezquital.	43
Tabla 9. Porcentaje de incidencia de géneros fúngicos identificados en 2 muestras de alimento zacate de maíz, proveniente del Valle de Tulancingo.	46
Tabla 10. Características morfológicas macroscópicas y microscópicas de los principales géneros fúngicos productores de micotoxinas identificadas en las muestras analizadas.	48
Tabla 11. Porcentajes mínimos y máximos de la composición química de las muestras de alimento para ganado (concentrado y zacate de maíz).....	58

Índice de figuras

Figura 1. Estructura microscópica de <i>Alternaria</i> spp.	5
Figura 2. Estructura microscópica de <i>Fusarium</i> spp.	7
Figura 3. Estructura microscópica de <i>Penicillium</i> spp.....	9
Figura 4. Estructura microscópica de <i>Aspergillus</i> spp.	11
Figura 5. Estructura de las principales aflatoxinas.	14
Figura 6. Mapa de las zonas de muestreo.	26
Figura 7. Metodología seguida para análisis microbiológico.....	28
Figura 8. Depósito del inóculo de esporas sobre la superficie del medio.....	30
Figura 9. Incidencia de los principales mohos toxigénicos en muestras de alimento concentrado provenientes del Valle del Mezquital (CM). (A) <i>Aspergillus</i> , (B) <i>Penicillium</i> , (C) <i>Fusarium</i> , (D) <i>Alternaria</i>	39
Figura 10. Incidencia de los principales mohos toxigénicos en muestras de alimento concentrado provenientes del Valle de Tulancingo (CT). (A) <i>Penicillium</i> y (B) <i>Alternaria</i>	42
Figura 11. Incidencia de los principales mohos toxigénicos en muestras de alimento zacate de maíz provenientes del Valle del Mezquital (ZM). (A) <i>Penicillium</i> , (B) <i>Aspergillus</i> , (C) <i>Fusarium</i> , (D) <i>Alternaria</i>	45
Figura 12. Incidencia de <i>Fusarium</i> en muestras de alimento zacate de maíz provenientes del Valle del Tulancingo (ZT).	46
Figura 13. Concentración de aflatoxinas totales de las 13 muestras de alimento concentrado proveniente del Valle del Mezquital (CM). Nivel de confianza ($p=0.05$). 49	
Figura 14. Concentración de aflatoxinas totales de las 5 muestras de alimento concentrado proveniente del Valle de Tulancingo (CT). Nivel de confianza ($p=0.05$)	50
Figura 15. Concentración de aflatoxinas totales de las 10 muestras de alimento zacate de maíz, provenientes del Valle del Mezquital (ZM). Nivel de confianza ($p=0.05$).	51
Figura 16. Concentración de aflatoxinas totales de las 2 muestras de alimento zacate de maíz, provenientes del Valle de Tulancingo (ZT). Nivel de confianza ($p=0.05$).	52

Figura 17. Concentración de aflatoxinas totales de 10 muestras de leche, provenientes del Valle del Mezquital (LM). Nivel de confianza ($p=0.05$).	55
Figura 18. Concentración de aflatoxinas totales de 4 muestras de leche, provenientes del Valle de Tulancingo (LT). Nivel de confianza ($p=0.05$).	56

Abreviaturas

$\mu\text{g kg}^{-1}$	Microgramo por cada kilogramo
$\mu\text{g L}^{-1}$	Microgramo por cada litro
μL	Microlitro
AFLA	Aflatoxinas
AME	Alternariol monometil éter
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i> (Asociación Oficial de Químicos Analíticos)
AOH	Alternariol
APD	Agar papa dextrosa
ATX	Altertoxina
A_w	Actividad de agua
FUM	Fumonisina
g	Gramo
Min	Minuto
mL	Mililitro
OTA	Ocratoxina A
TeA	Ácido tenuazónico
ZEA	Zearalenona

1. INTRODUCCIÓN

Las aflatoxinas son las micotoxinas de mayor riesgo, producidas principalmente por *Aspergillus flavus*, y *Aspergillus parasiticus*; estos compuestos se encuentran en diversos sustratos, siendo de interés los alimentos (consumo humano y animal), ya que representan un problema grave de salud pública tanto a nivel nacional, como mundial.

La incidencia de aflatoxinas ha sido objeto de diversos estudios, debido a la importancia de disminuir los riesgos de contaminación. Entre las muestras más estudiadas se encuentran los cereales, ya que por las condiciones en las que se almacenan son susceptibles de contener estas micotoxinas. En México, se ha estudiado principalmente su presencia en maíz, productos de éste y alimento para ganado bovino.

La presencia de aflatoxinas en alimento para animales se relaciona directamente con las condiciones de almacenamiento que tiene éste, lo que lo convierte en una fuente de contaminación de productos de origen animal, entre los que destacan la leche y productos lácteos.

En el estado de Hidalgo existen tres cuencas lecheras, Tizayuca, Valle del Mezquital y Valle de Tulancingo. Sin embargo, a pesar de la importancia que tiene el sector lácteo en este estado, no se cuenta con un registro de la incidencia de aflatoxinas en la línea de producción de leche y sus derivados. Por lo que, el objetivo del presente proyecto fue evaluar la presencia de mohos toxigénicos y de aflatoxinas en alimento para ganado (concentrado y zacate de maíz) y leche obtenidos de los principales centros de acopio de las cuencas lecheras del Valle del Mezquital y Valle de Tulancingo.

Es importante destacar que para este estudio no se contempló la cuenca lechera de Tizayuca, ya que parte de ésta es perteneciente del Valle de México. Los resultados obtenidos proporcionarán información acerca de la incidencia de mohos toxigénicos y de aflatoxinas en la línea de producción de leche en el estado de Hidalgo.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Hongos

Los hongos están formados por células eucariotas y pueden ser unicelulares o pluricelulares. Los primeros están formados por células aisladas redondas u ovaladas y se les denomina levaduras; mientras que los pluricelulares están constituidos por células alargadas que crecen por extensión de sus extremos, formando largos filamentos denominados hifas que se ramifican con frecuencia. Estos hongos, denominados mohos, al crecer forman matas de filamentos entrelazados, el cual se denomina micelio (Prats, 2006).

Los hongos filamentosos pueden clasificarse en superiores e inferiores. En los superiores, las hifas son delgadas (2-5 μm) y forman esporas (conidias) directamente en las hifas o en estructuras específicas llamadas conidióforos, constituyendo esporas externas. Los hongos inferiores poseen hifas más anchas (10-15 μm), sus esporas, denominadas esporangioesporas, se forman en el interior de estructuras saculares, llamadas esporangios (esporas internas) (Prats, 2006).

Sin embargo, existen algunas levaduras que pueden formar hifas verdaderas. En los medios de cultivo sólidos, las levaduras crecen dando lugar a colonias compactas, visibles macroscópicamente en un periodo de 24-48 horas de incubación y son muy similares a las bacterianas (Prats, 2006).

2.1.1 Micotoxinas

La palabra micotoxina deriva de las palabras griegas *mikes* y *toxina*, que significan hongo y veneno respectivamente. Son compuestos que tienen lugar cuando la fase de crecimiento fúngico llega a su etapa final y durante la fase estacionaria, siendo a menudo asociado con la diferenciación y la esporulación. La mayor parte de estos metabolitos secundarios se originan en la ruta policetónica (Soriano del Castillo, 2007).

En años recientes, las micotoxinas han sido uno de los grupos dominantes de toxinas biogénicas que contaminan los alimentos (Gavrilova *et al.*, 2014). Estas toxinas son relativamente de bajo peso molecular y generalmente son térmicamente

estables, demostrando niveles elevados de bioacumulación. Más de 400 tipos de micotoxinas han sido identificadas y sólo un bajo porcentaje de éstas son de interés para la salud pública (2.5-3.75%), entre las que destacan: aflatoxinas, deoxinivalenol, fumonisinas, ocratoxina A, patulina, zearalenona y tricotecenos (T-2 y HT-2) (Pizzolato *et al.*, 2018).

Los riesgos para la salud humana son generalmente asociados con la ingesta directa de productos alimenticios contaminados con micotoxinas (frutas, maíz, cereales, etc.) o el consumo indirecto de productos de origen animal, obtenidos de animales alimentados con productos contaminados. En la ingestión de una sobredosis aguda, los principales efectos tóxicos son la hepatotoxicidad, la nefrotoxicidad o incluso la muerte; por otro lado, para el consumo crónico, los efectos tóxicos se manifiestan en genotoxicidad, carcinogenicidad y trastornos reproductivos (Luo, Liu & Li, 2018).

En general, las micotoxinas son conocidas por dañar el sistema inmunológico al inhibir la proliferación celular y la síntesis de proteínas (Luo, Liu, & Li, 2018), por lo que los problemas de control de contaminación por estas toxinas son particularmente relevantes y se solucionan a nivel internacional bajo las regulaciones de la FAO y la OMS (Gavrilova *et al.*, 2014).

2.1.2 Clasificación de mohos

Los mohos pueden clasificarse tomando en consideración distintos criterios. El tipo de reproducción, los requerimientos y factores limitantes para su crecimiento suelen ser los criterios más utilizados.

De acuerdo con el tipo de reproducción, se dividen en: *Zygomycota*, *Ascomycota* y *Basidiomycota* (Prats, 2006), mientras que considerando los diferentes requerimientos y factores limitantes (principalmente actividad de agua o contenido de humedad en los productos) para el crecimiento de mohos, la flora fúngica se clasifica en categorías como mohos de campo y mohos de almacenamiento (Soriano del Castillo, 2007).

Los mohos de campo incluyen especies que pertenecen a los géneros *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium* y *Drechslera*, que requieren un alto contenido de humedad para crecer (22-25%), e invaden los granos de las plantas antes de la recolección; a menudo presentan propiedades parasíticas o saprofitas. Los mohos de almacenamiento comprenden un pequeño número de especies pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Eurotium* y *Penicillium*; su característica común es que son capaces de crecer con contenidos de humedad bajos y alta presión osmótica (Soriano del Castillo, 2007).

La clasificación de los mohos considerando los requerimientos y factores limitantes para su crecimiento se utiliza ampliamente para el estudio de la incidencia de mohos en muestras que son cosechadas y/o almacenadas en condiciones de humedad relativa alta (Gimeno, 2002; Ocampo, 2006; Hernández-Delgado *et al.*, 2007; Alpizar, 2015; Castellari *et al.*, 2015; Fleurat-Lessard; 2017) incluyendo alimento destinado al consumo animal (Santibáñez *et al.*, 2011).

2.2 Mohos toxigénicos

Existen diversos géneros que producen micotoxinas, entre los que destacan *Alternaria*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Aspergillus*, siendo los tres últimos los de mayor interés en cuanto a producción de toxinas. El desarrollo de estos mohos en los alimentos conlleva al riesgo de la producción de micotoxinas (Ocampo, 2006).

2.2.1 Principales géneros micotoxigénicos

2.2.1.1 *Alternaria* spp.

Es un hongo filamentoso, saprofito, perteneciente al filo *Ascomycota* y al grupo de los dematiáceos, caracterizados por presentar una coloración oscura (INSHT, 2014). Macroscópicamente, presentan al principio de su crecimiento, una superficie blanco-grisácea y lanuda, que luego se vuelve negro-verdoso o marrón con bordes claros. Eventualmente puede quedar cubierto por hifas cortas, grisáceas y aéreas. El reverso es color negro (Larone, 1987).

Microscópicamente, se observan conidióforos simples, tabicados, de forma alargada u ovoide. En el extremo del conidióforo se forman unos conidios de color

pardo, con septos transversales y verticales (muriformes) de disposición irregular (Figura 1). La reproducción es por gemación de la célula apical, a partir de la cual se genera un nuevo conidio, formándose así largas cadenas de conidios (INSHT, 2014).

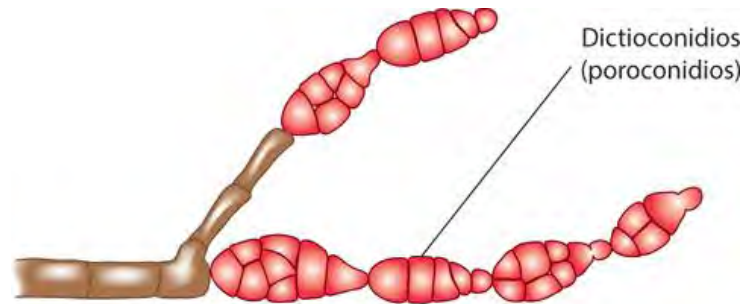


Figura 1. Estructura microscópica de *Alternaria* spp.

Fuente: Bonifaz, 2012.

Las colonias crecen alrededor de tres o cuatro días. Macroscópicamente presentan un aspecto veloso, al principio de color gris, después adquieren tonos negros oliváceos en el centro y reverso y con un borde gris blanquecino que rodea la colonia (INSHT, 2014).

Este tipo de moho puede mantenerse sobre frutas y hortalizas causando lesiones que alteran su aspecto. También persisten en granos de cereales almacenados, si están suficientemente secos para impedir el crecimiento de *Aspergillus* y *Penicillium*. Después del género *Cladosporium*, es el moho cuyas esporas se encuentran suspendidas en el aire con mayor frecuencia (Ocampo, 2006).

El género *Alternaria* compite especialmente con los otros hongos sobre la superficie vegetal y es antagonista de *Cladosporium* y *Fusarium*. La esporulación de *Alternaria* es óptima a 27°C pero es inhibida por debajo de los 15°C o por encima de 33°C, aunque el rango de crecimiento está entre 0 y 35°C. La actividad de agua mínima de desarrollo es de 0.8 y la óptima casi 1 (Ocampo, 2006).

Alternaria puede llegar a producir ácido tenuazónico, alternariol y alternariol monometiléter (Ocampo, 2006). Se han identificado muchas toxinas no específicas del huésped, aunque la acción precisa de sólo unas pocas ha sido estudiada ampliamente. *A. alternata* es la especie más importante del género; produce la

tentoxina, que actúa como un inhibidor de la fotofosforilación a través de la unión específica a la ATP sintasa del cloroplasto, causando la inhibición de la síntesis de ATP, debido a que estas toxinas afectan a menudo procesos celulares básicos (Thomma, 2003). En la Tabla 1 se muestran algunas toxinas producidas por especies de *Alternaria*.

Tabla 1. Toxinas producidas por *Alternaria* spp.

Especie	Toxina	Especie	Toxina
<i>A. alternata</i>	Alternariol (AOH), Alternariol monometil éter (AME), Altenueno (ALT), Alertoxina (ATX), Tentoxina	<i>A. citri</i>	AOH, AME, ALT, TeA
<i>A. arborescens</i>	AOH, AME, ALT, ATX-I y Ácido tenuazónico (TeA)	<i>A. cucumerina</i>	AOH, AME, Macrosporina
<i>A. brassicae</i>	AOH, AME, TeA	<i>A. dauci</i>	AOH, AME, Macrosporina y Zinniol

Fuente: Pavón *et al.*, 2012.

2.2.1.2 *Fusarium* spp.

Las colonias de esta especie suelen ser, en un principio, blancas y algodonosas, pero a menudo desarrolla rápidamente un centro rosado o violeta con una periferia más clara. Algunas especies permanecen blancas o cambian de color. El reverso de estas colonias es de color claro (Larone, 1987). Las especies de *Fusarium* típicamente producen macro y microconidios a partir de finas fiálides. Los macroconidios son hialinos, de dos a varios celulares, fusiformes a hoz, en su mayoría con una célula apical alargada y una célula basal pedicelada. Las microconidias son de una o dos células, hialinas, más pequeñas que las macroconidias, piriformes, fusiformes a ovals, rectas o curvadas. Las

clamidosporas pueden estar presentes o ausentes (Figura 2) (The University of Adelaide, 2016).

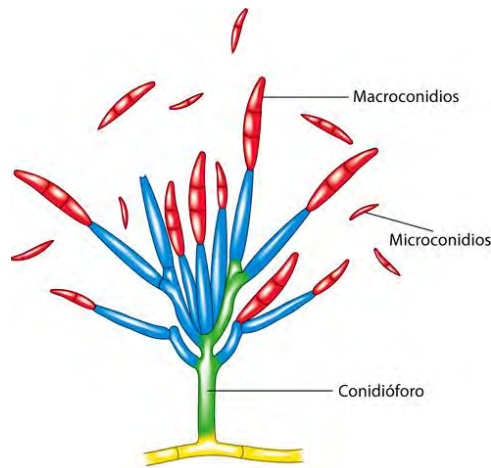


Figura 2. Estructura microscópica de *Fusarium* spp.

Fuente: Bonifaz, 2012

Las especies de *Fusarium* se encuentran en vegetales antes de la cosecha y persisten en productos almacenados; si se encuentran en condiciones de actividad de agua óptima, crecerán causando alteraciones y a veces produciendo toxinas, pero no compite con *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. (Carrillo, 2003).

Algunos *Fusarium* son patógenos de cereales y pueden formar micotoxinas en los granos, aún antes de la cosecha, otros pueden crecer en refrigeración. La velocidad de crecimiento suele variar a la temperatura óptima, pero no la respuesta al pH (Carrillo, 2003). En la Tabla 2 se muestran algunas toxinas producidas por especies de *Fusarium*.

Tabla 2. Toxinas producidas por *Fusarium* spp.

Especie	Toxina	Especie	Toxina
<i>F. avenaceum</i> ^a	Moniliformina (MON) ^b Zearalenona (ZEA)	<i>F. graminearum</i> ^a	DON ^a ZEA ^b NIV ^a
<i>F. culmorum</i> ^a	Deoxinivalenol (DON) ^a Nivalenol (NIV) ^a ZEA ^b	<i>F. langsethiae</i>	Toxina HT-2 ^a Toxina T-2 ^a ENN
<i>F. poae</i>	NIV ^a Eniانتinas (ENN) ^b	<i>F. oxysporum</i>	MON ^b ZEA ^b

^a Tricoteceno
^b No tricoteceno

Fuente: Caro, 2015.

2.2.1.3 *Penicillium* spp.

Las colonias de *Penicillium* presentan un crecimiento rápido, con colonias en tonos verdes y usualmente blancos, la mayoría consiste en una densa capa de conidiosporas. Microscópicamente, puede formar cadenas únicas de conidios y son producidas en sucesión basípeta por un conidióforo especializado llamado fiálide. Las fiálides pueden ser sencillas, en grupos o de una métula ramificada, dando una apariencia de pincel. Todas las células entre las métulas y la cima del conidióforo son referidas como ramificaciones, las cuales pueden ser simples (no ramificadas o monoverticilio), con una ramificación (biverticiliadas-asimétricas) y de tres a más ramificaciones. Los conidióforos pueden ser hiliados y con pared rugosa o lisa. Las fiálides son usualmente en forma de frasco con una parte basal clínica. Los conidios son globosos, elipsoidales y cilíndricos (Figura 3) (Ocampo, 2006).

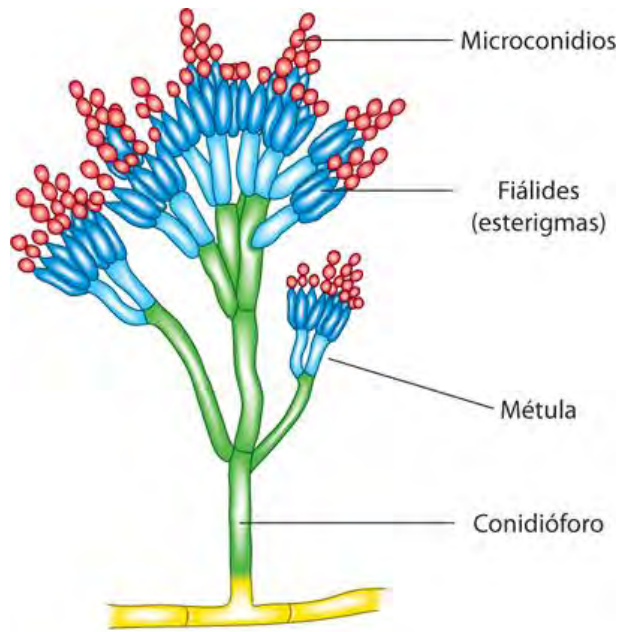


Figura 3. Estructura microscópica de *Penicillium* spp.

Fuente: Bonifaz, 2012

Estos mohos llegan a crecer sobre alimentos ya preparados o sobre materias primas, tanto de origen animal como vegetal. Para la disminución de la velocidad de deterioro causado por *Penicillium* spp. debe haber una baja temperatura de almacenamiento. Diversas especies de este moho se pueden encontrar antes de la cosecha de los cereales, sobre todo en épocas húmedas, pero la mayor contaminación sucede en almacenes, con esporas de una cosecha anterior. El género *Penicillium*, al igual que el género *Aspergillus* no se ve afectado por la luz y ambos esporulan fácilmente en la oscuridad (Ocampo, 2006). En la Tabla 3 se muestran algunas toxinas producidas por especies de *Penicillium*.

Tabla 3. Toxinas producidas por *Penicillium* spp.

Especie	Toxina
<i>P. puberulum</i>	Ácido penicílico Ocratoxina A (OTA)
<i>P. versicolor</i>	Citrina (CIT)
<i>P. islandicum</i>	Islanditoxina
<i>P. purpurogenum</i> <i>P. rubrum</i>	Rubratoxinas
<i>P. viridicatum</i>	Viridotoxina
<i>P. citreoviride</i>	Citreoviridina

Fuente: Bonifaz, 2012.

2.2.1.4 *Aspergillus* spp.

Es un moho filamentoso hialino, saprofito; se encuentra formado por hifas hialinas septadas (Figura 4). Las diferentes especies se diferencian en tamaño, tasa de crecimiento, textura (aterciopelada, granular, algodonosa) y color de la colonia: verde-amarillento (*A. flavus*), negro (*A. niger*), café (*A. terreus*). La coloración aparece casi siempre en todas las estructuras aéreas, tanto en el micelio como en las cabezas conidiales. *Aspergillus* es uno de los principales mohos productores de micotoxinas (INSHT, 2012).

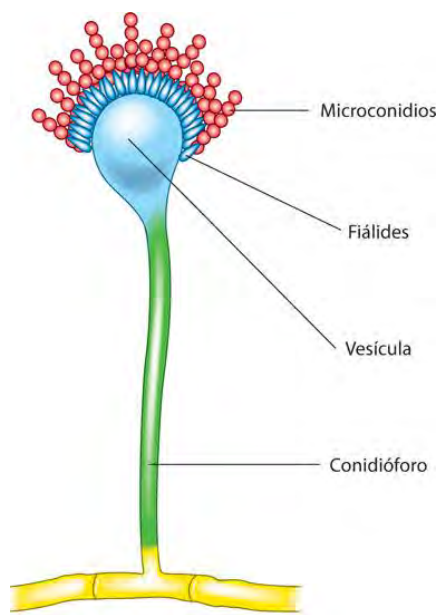


Figura 4. Estructura microscópica de *Aspergillus* spp.

Fuente: Bonifaz, 2012.

Por su capacidad para crecer a diferentes temperaturas y en sustratos con diversos contenidos de humedad, *Aspergillus* es considerado como ubicuo. La colonización de los granos durante el almacenamiento se produce de forma explosiva cuando la humedad relativa ambiente intra-granular se eleva por sobre el 70%, sin que se desencadene la brotación (Carrillo, 2003).

El rango de temperatura para el crecimiento óptimo oscila entre 30-33°C para la mayoría de las especies y si unos granos con un contenido de humedad del 15% no fueron afectados durante un año es porque la temperatura de almacenamiento estuvo por debajo de 5-10°C (Carrillo, 2003). En la Tabla 4 se muestran algunas toxinas producidas por especies de *Aspergillus*.

Tabla 4. Toxinas producidas *Aspergillus* spp.

Especie	Toxina	Especie	Toxina
<i>A. terreus</i> ^b	CIT Patulina Gliotoxina	<i>A. niger</i> ^b	Malformina OTA
<i>A. flavus</i> ^a	Aflatoxina B1, B2	<i>A. ochraceus</i> ^b	OTA Ácido penicílico
<i>A. fumigatus</i> ^b	Fumigatina Gliotoxina Fumagilina	<i>A. parasiticus</i> ^a	Aflatoxina B1, B2, G1 y G2

Fuente: ^aPeromingo *et al.*, 2016; ^bBarkai-Golan, 2008.

2.2.2 Prevención y control de mohos toxigénicos en granos

El deterioro por mohos en los granos depende de una serie de factores que pueden clasificarse como extrínsecos, intrínsecos y de tipo tecnológicos (Castellari *et al.*, 2015).

Los factores extrínsecos se asocian a condiciones ambientales (temperatura, humedad relativa, O₂ y CO₂). Los factores intrínsecos están relacionados con la composición química y propiedades físicas de los granos, mientras que los de tipo tecnológico incluyen la ubicación y estructuras que los contienen (Castellari *et al.*, 2015). Estos parámetros ha conllevado a que se tomen medidas de control y preventivas, para evitar el crecimiento de mohos y a su vez la producción de micotoxinas.

El contenido de humedad y la temperatura son los factores más importantes que determinan la intensidad de la respiración del grano y la tasa de crecimiento de mohos (Fleurat-Lessard, 2017). Por ejemplo, en regiones con clima húmedo y cálido, o húmedo y templado, la cosecha de granos maduros se realiza en niveles de contenido de humedad incompatibles con el almacenamiento seguro. Por lo que, se ha optado por la reducción de la humedad del grano por secado a temperaturas bajas, así como el enfriamiento del grano por aireación forzada para reducir el riesgo

de deterioro por mohos (Fleurat-Lessard, 2017). Además, los granos secados por debajo del 14% de humedad puede detener el crecimiento de mohos y la producción de micotoxinas (Neme & Mohammed, 2017).

La temperatura es otro parámetro importante para prevenir el crecimiento de mohos. Para el caso de granos almacenados, idealmente, este sustrato debe enfriarse después del proceso de secado y mantenerse en un rango de 1 a 4°C durante el tiempo de almacenamiento. A temperaturas bajas o frías, los contaminantes fúngicos no mueren, pero su crecimiento y metabolismo son mínimos. Aunado a esto, evitar los daños mecánicos y el contacto del grano con el suelo en la etapa de cosecha, minimiza la contaminación de la infección por mohos (Neme & Mohammed, 2017).

2.3 Aflatoxinas

2.3.1 Generalidades

Las aflatoxinas son un grupo de metabolitos secundarios tóxicos producidos principalmente por *A. flavus* y *A. parasiticus* (Moreno, 1988). La palabra aflatoxina proviene de la primera letra “A” que denota el género *Aspergillus*, seguida de las tres letras “FLA” correspondiente a la especie *flavus* y el sustantivo “toxina” que significa veneno (Ellis *et al.*, 2009).

Las aflatoxinas contienen en su molécula una mitad dihidrofurano o tetrahydrofurano unido a un anillo cumarina (Sandoval, 2013) y se encuentran dentro de las principales micotoxinas, de las que existen aproximadamente 20 tipos diferentes (Londoño-Cifuentes & Martínez-Miranda, 2017).

Las cuatro principales aflatoxinas han sido subdivididas en los grupos B y G, con base en la fluorescencia azul (*blue*) o verde (*green*) que presentan bajo la luz ultravioleta (Hsieh *et al.*, 1976). Estructuralmente, el grupo B presenta un anillo de ciclopentanona y el grupo G una lactona (Sandoval, 2013). En la Figura 5 se muestran las estructuras de las principales aflatoxinas.

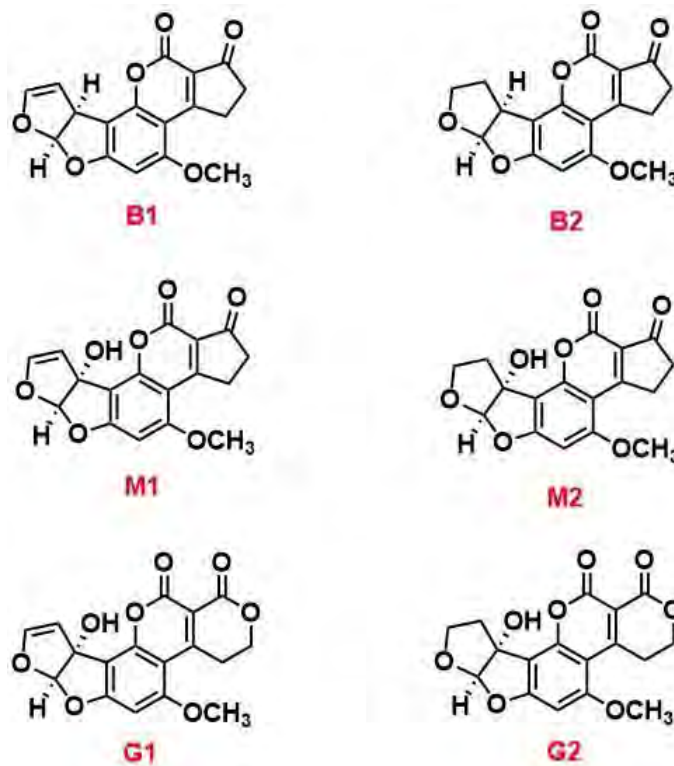


Figura 5. Estructura de las principales aflatoxinas.

Las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 son los que se encuentran comúnmente en alimentos, principalmente en granos y frutos secos, mientras que las aflatoxinas M1 y M2 son derivados metabólicos de las aflatoxinas B1 y B2 respectivamente, que se excretan en orina y leche de quienes han consumido alimentos contaminados (Londoño-Cifuentes & Martínez-Miranda, 2017).

Las aflatoxinas de la serie 1 (B1, M1 y G1) son en general más tóxicas que las de la serie 2 (B2, M2 y G2); de hecho, la aflatoxina B1 ha sido clasificada en el grupo 1 por la Agencia Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC por sus siglas en inglés) como carcinógeno, cuyo blanco es el hígado (Urrego & Díaz, 2006).

La aflatoxina B1 generalmente se encuentra en mayores concentraciones que las otras y es la más potente, siendo carcinógena, teratógena y mutágena. Las aflatoxinas B1 y B2 cuando son ingeridas por animales en lactancia, son excretadas en la leche en formas alteradas, pero aún tóxicas, conocidas como aflatoxinas M1 y M2 (Moreno, 1988).

La presencia de aflatoxinas en alimentos ha sido estudiada desde la década de los 90's. De hecho, ha habido un incremento importante de publicaciones relacionadas con este tema alrededor del mundo, por considerarse que la incidencia es muy alta y que se trata de un grave problema de salud pública que hay que atender. En la Tabla 5 se presentan los países en los que se ha estudiado la incidencia de aflatoxinas en alimentos (Williams *et al.*, 2004; Martínez, Vargas del Río, & Gómez, 2013).

Tabla 5. Incidencia de aflatoxinas totales en diferentes alimentos.

País	Alimento	Concentración ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Argentina	Maíz	Positivo ^a
Brasil	Maíz	0.2-129.0 ^a
	Cacahuete y derivados	43.0-1099.0 ^a
China	Maíz	>20.0 ^a
Portugal	Yogurt	19.0-98.0 ^a
México	Granos de maíz	5.0-465.0^a
Turquía	Queso	Positivo ^a
India	Chile	>30.0 ^a
Venezuela	Maíz amarillo	20 ^b
Chile	Maní, nueces, jengibre, comino, semilla sésamo	23-173.3 ^b
Colombia	Maíz y arroz	9.2 ^b
Perú	Maíz	4.2 ^b

Fuente: ^aWilliams *et al.*, 2004; ^bMartínez, Vargas del Río, & Gómez, 2013.

En México se ha determinado el contenido de aflatoxinas, sobre todo en maíz y productos de éste. Se conoce que alrededor del 40% del maíz que se consume en México es importado de EUA, donde existen regulaciones con respecto a las aflatoxinas, considerando un nivel máximo de $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ para productos de consumo humano (NGFA, 2011). Sin embargo, el 60% de maíz restante es producido en México, en donde la NOM-188-SSA1-2002 señala un límite máximo permisible de aflatoxinas totales en cereales de $20 \mu\text{g kg}^{-1}$, y en caso de que el cereal tenga de 21 a $300 \mu\text{g kg}^{-1}$ será destinado a alimento para ganado.

A pesar de que existe una regulación en México (NOM-188-SSA1-2002), se han presentado casos donde las concentraciones de aflatoxinas en cereales han sobrepasado los límites establecidos, por lo que representan un problema y un riesgo potencial para la salud humana.

Como es bien sabido, el maíz es el cereal más consumido en nuestro país, por lo que, es ampliamente distribuido a nivel nacional. Debido a que los límites permisibles de aflatoxinas establecidos en la NOM-188-SSA1-2002 son altos, en comparación con las normas internacionales, los problemas de contaminación no son ajenos.

Tal es el caso del maíz distribuido en Monterrey, en el que se ha encontrado un problema de contaminación por aflatoxina B1 ($5.03\text{-}465.31 \mu\text{g kg}^{-1}$) y aflatoxina G1 ($1.59 \mu\text{g kg}^{-1}$ a $57.1 \mu\text{g kg}^{-1}$). El porcentaje de muestras contaminadas es elevado (87.7%) y preocupante, ya que superan los límites máximos considerados en la normatividad mexicana ($20 \mu\text{g kg}^{-1}$ de aflatoxinas totales) (Martínez *et al.*, 2013).

Se ha estudiado que la nixtamalización conlleva a una degradación de aflatoxinas de hasta el 92% (Méndez-Albores *et al.*, 2004a; Méndez-Albores *et al.*, 2004b); pero, el maíz que no es sometido a este proceso, al igual que los demás cereales, pueden presentar contaminación por aflatoxinas, que al ser destinados a la alimentación del ganado lechero pueden hacer que la presencia de estas sustancias tóxicas en leche y productos lácteos sea de un riesgo potencial.

En el estado de Jalisco, se determinó que muestras de alimento para bovinos lecheros presentaron contaminación con aflatoxinas totales en niveles que excedían el límite permitido por la norma mexicana ($20 \mu\text{g kg}^{-1}$) (Reyes *et al.*, 2009) lo que supone un riesgo para la salud de los animales y de la población.

2.3.2 Condiciones para el desarrollo de aflatoxinas en cultivos y alimentos

Los cultivos en las áreas tropicales y subtropicales son más susceptibles de ser contaminados con micotoxinas que los de zonas templadas, por su elevada humedad y temperatura, ya que la humedad proporciona las condiciones óptimas para la formación de toxinas (Vázquez, 2014). El desarrollo de *A. flavus* y la

producción de aflatoxinas requieren de un rango de humedad relativa entre 80 y 85% (Coppock, Christian & Jacobsen, 2018). Las altas temperaturas y el estrés por sequía afectan fisiológicamente a los cultivos y, por lo tanto, los cultivos estresados pueden ser más susceptibles a la producción de aflatoxinas (Klich, 2007).

La temperatura óptima para la producción de aflatoxinas está entre 24 y 30°C. La mayor producción de aflatoxinas por *A. flavus* es a 30°C y para *A. parasiticus* es de 28°C (Klich, 2007), en un tiempo de incubación de 7 a 11 días (Bennett & Klich, 2003). En cuanto al estrés por sequía, éste induce un gran aumento en la producción de prolina y se ha reportado que este aminoácido mejora la producción de aflatoxinas (Klich, 2007).

Además, las prácticas inadecuadas en los procesos de recolección y almacenamiento, junto con el transporte, comercialización y procesado deficientes, pueden contribuir al crecimiento de mohos e incrementar el riesgo de producir micotoxinas. Se estima que el 25% de los cultivos mundiales de grano, muchos de ellos alimentos básicos, se ven afectados por mohos productores de micotoxinas (Vázquez, 2014).

La incidencia de aflatoxinas en los alimentos depende de varios factores, como el tipo de alimento, la estación del año, la ubicación geográfica, así como el período posterior a la cosecha (Ismail *et al.*, 2018). Adicionalmente, el carbono, nitrógeno, metabolitos secundarios y azúcares en los sustratos, son otros factores que influyen en la producción de aflatoxinas (Coppock, Christian & Jacobsen, 2018).

2.3.3 Aflatoxinas en alimentos

2.3.3.1 Alimento para ganado

Las dietas de vacas productoras de leche se constituyen principalmente de concentrados y forrajes en una proporción de 50-75 %, los cuales son producidos y procesados usualmente en los establos lecheros. Los forrajes se incluyen verdes, secos (pajas, henos y rastrojos) o ensilados, mientras que los concentrados se elaboran con diferentes ingredientes que aportan altos niveles de proteína y energía (Reyes *et al.*, 2015).

El maíz es un ingrediente de algunas formulaciones de alimentos concentrados destinados al consumo animal. Antes de su consumo, este cereal se somete a varios procesos, como la cosecha, el secado, el almacenamiento y el embolsado, los cuales tienen un impacto deteriorante en su calidad, antes de que llegue a su destino, si no se maneja adecuadamente. Lo anterior convierte al maíz en un sustrato altamente susceptible de contaminación por micotoxinas, en especial, aflatoxinas (Kamika, Ngbolua & Tekere, 2016).

En alimentos ensilados se ha logrado establecer una relación entre la naturaleza del ensilaje y la presencia de microorganismos (como mohos), bajo diferentes condiciones en el proceso de elaboración. Por ejemplo, se han logrado aislar mohos toxigénicos como *A. niger* y *F. poae* (ensilaje de trébol); en *A. parasiticus* (ryegrass); *A. flavus* y *F. solani* (mezcla de pastos); y *A. fumigatus*, *F. sporotrichoides*, *P. expansum* y *Trichoderma harzianum* en ensilaje de maíz, ya que factores como composición química y la capacidad amortiguadora de ciertos forrajes son importantes en el crecimiento de estas especies fúngicas (Alpizar, 2015).

La temperatura del ensilaje durante y después de la fermentación es otro factor que también puede influenciar el crecimiento de ciertas cepas de mohos de *A. fumigatus*, lo que se ha asociado directamente con la producción de micotoxinas (Alpizar, 2015).

Durante los ensilados de maíz, la producción de aflatoxinas está influenciada principalmente por: el tiempo de cosecha, fertilización, irrigación, control de plagas, humedad de ensilaje y prácticas de almacenamiento. Los granos cosechados con la humedad más baja posible y la humedad de conservación cercana o inferior al 14% son necesarios para reducir los riesgos de contaminación (Prandini *et al.*, 2009).

2.3.3.2 Alimentos para consumo humano

La leche y productos lácteos son componentes importantes en la dieta humana, y varios países han establecido límites máximos permisibles para la aflatoxina M1 en estas matrices. En la Unión Europea son 0.05 µg kg⁻¹ para leche, yogurt y mantequilla, mientras que para queso se establecen 0.25 µg kg⁻¹. La FDA establece

límites de $0.5 \mu\text{g kg}^{-1}$ para leche. La incidencia de aflatoxina M1 en leche y productos lácteos depende de varios factores como el clima, la raza de animal, calidad del forraje y del pienso con el que es alimentado el animal, etapa de lactancia y el rendimiento de la producción de leche, entre otros (Hassan *et al.*, 2018).

Por su parte, si la contaminación ocurre en leche en polvo que se utiliza para elaborar un producto lácteo específico, por ejemplo, yogurt, las aflatoxinas aparecerán en esa leche fermentada sin que haya habido contaminación fúngica previa (Vázquez, 2014).

Otro producto lácteo de importancia es el queso, el cual es especialmente sensible al crecimiento de mohos, ya que durante una de sus etapas de producción o durante su almacenamiento o maduración, intervienen mohos que podrían producir toxinas. Sin embargo, este tipo de contaminación no suele representar un problema importante, ya que en el crecimiento de mohos aflatoxigénicos en un alimento da lugar a alteraciones organolépticas del mismo y a su rechazo para el consumo (Vázquez, 2014).

Por lo que, no es posible garantizar que la ausencia de mohos toxigénicos en un producto asegure que éste se encuentre libre de aflatoxinas, debido a que estas sustancias pueden persistir después de que los mohos hayan desaparecido (Vázquez, 2014).

Por otro lado, la contaminación indirecta ocurre cuando en los alimentos crecen mohos aflatoxigénicos que producen aflatoxina B1, la que será consumida por los animales, quienes la hidroxilarán y la transformarán en aflatoxina M1, y aparecerá en la leche y los productos derivados, constituyendo un problema serio para la salud pública (Vázquez, 2014).

El inconveniente que se presenta con este tipo de contaminación es más grave que con la contaminación directa, ya que existe el riesgo potencial de producir efectos tóxicos crónicos por el consumo reiterado de alimentos contaminados incluso con dosis bajas de aflatoxina. La aflatoxina M1 es 10 veces menos carcinogénica que la aflatoxina B1, excretándose en la leche tanto de humanos como de animales en lactación que ingieren alimentos contaminados con aflatoxina B1. Una vaca es

capaz de transformar la aflatoxina B1 en aflatoxina M1 dentro de las 12 a 24 horas posteriores a la ingestión del alimento contaminado, incluso a las 6 horas, ya que pueden aparecer residuos de aflatoxina M1 en la leche (Vázquez, 2014).

La IARC, ha reportado a las aflatoxinas B1 y M1 como posibles carcinógenos humanos, estos reportes, a la par con otros, han demostrado el efecto tóxico de las aflatoxinas y han llevado a que se establezcan límites máximos de residuo (LMR) en alimentos (Pérez *et al.*, 2008).

La Unión Europea (UE) ha establecido un LMR para la aflatoxina M1 en leche y productos lácteos de $0.05 \mu\text{g kg}^{-1}$, mientras que el *Codex Alimentarius* de la FAO y la FDA de los Estados Unidos han propuesto valores de $0.5 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Pérez *et al.*, 2008). Algunos países han establecido concentraciones límite de aflatoxina M1 en leche; por ejemplo, Bulgaria de $0.5 \mu\text{g kg}^{-1}$ en leche cruda, Francia de $0.05 \mu\text{g kg}^{-1}$ y $0.03 \mu\text{g kg}^{-1}$ en leche para consumo de niños menores a 3 años, y Austria de $0.05 \mu\text{g kg}^{-1}$ y $0.01 \mu\text{g kg}^{-1}$ para leche pasteurizada destinada a infantes (Dashti *et al.*, 2009).

Se ha demostrado que la aflatoxina M1 presente en la leche no se degrada totalmente durante su proceso tecnológico en la producción de derivados lácteos y por otra parte, la unión de la aflatoxina M1 a las proteínas de la leche provoca que su concentración sea mayor en la cuajada que en la propia leche (Urbán *et al.*, 2009).

En México se ha reportado la presencia de aflatoxina M1 en leche en polvo y fluida comercializada durante la década del 90 y más recientemente en el Estado de Hidalgo y en el Altiplano Mexicano, donde pone en evidencia que la presencia de aflatoxina M1 en este alimento es una problemática actual en México (Urbán *et al.*, 2009). El alto porcentaje de aflatoxina M1 encontrado en la leche producida de manera convencional y orgánica en el estado de México sobrepasa el LMP ($0.5 \mu\text{g kg}^{-1}$) y dado que esta toxina no se destruye por los procesos tecnológicos se puede suponer una alta incidencia de la misma en productos lácteos con énfasis en la producción de queso (Urbán *et al.*, 2009).

En productos lácteos, como quesos, natas y mantequilla, la distribución de aflatoxina M1 se ha encontrado en porcentajes de 40-60%, 10% y <2% respectivamente. A pesar de que dicha aflatoxina es muy soluble en agua, existe una asociación entre ésta y la caseína, por lo que los porcentajes más elevados los presentan los quesos (Gimeno, 2005). Por otro lado, estudios más recientes han demostrado que la concentración de aflatoxina M1 depende del tipo de queso, del contenido de agua y de las tecnologías de producción (Iha *et al.*, 2013).

2.3.4 Toxicidad de aflatoxinas

No se sabe con exactitud el nivel de toxicidad de las aflatoxinas para consumo humano; sin embargo, se han reportado intervalos de toxicidad de 100 a 200 $\mu\text{g kgpc}^{-1}$, por lo que, su estudio de incidencia se ha convertido en un tema importante para la inocuidad alimentaria (Eaton & Groopman, 1994). Recientemente, se determinaron las LD₅₀ (dosis letal media) de 0.36, 0.78, 1.70 y 3.44 mg kgpc^{-1} para las aflatoxinas B1, G1, B2 y G2, respectivamente (Martínez & Anadón, 2012).

Debido a la presencia del moho *Aspergillus* y las aflatoxinas en el ambiente, se considera un problema casi inevitable la presencia de estos compuestos en los alimentos tanto de consumo humano como animal. Por ello, en diferentes países se han establecido límites máximos de aflatoxinas totales en alimentos; por ejemplo, en Estados Unidos es de 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (NGFA, 2011) y en la Comunidad Europea es de 4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ en la mayoría de los productos (CONTAM, 2007).

La IARC ha concluido que las aflatoxinas son carcinogénicas para humanos, particularmente como agente etiológico de cáncer de hígado (Filazi & Sireli, 2013). La LD₅₀ y la TD₅₀ (dosis tóxica media) en humanos se estima en 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ y 132 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corporal al día, respectivamente (Moss, 2003). De acuerdo con una comisión de expertos de FAO/OMS, la aflatoxina B1 es la de mayor toxicidad aguda y crónica, estimando su potencia a partir de datos epidemiológicos (Filazi & Sireli, 2013), mientras que la aflatoxina M1 que deriva de ésta y se encuentra en la leche, es menos tóxica que su precursora (Moss, 2003), causando también cáncer hepático mediante un mecanismo similar al de la B1 (Filazi & Sireli, 2013).

2.3.5 Métodos de determinación de aflatoxinas

La obligación de aplicar los límites reglamentarios ha impulsado el desarrollo de métodos analíticos para la identificación y cuantificación de micotoxinas en alimentos, piensos y matrices biológicas. Esto implica el empleo de métodos de análisis contrastados que cumplan con unos requerimientos de calidad establecidos y con los sistemas de control de seguridad alimentaria con el fin de preservar la salud de la población.

Existen diversos métodos de análisis recomendados para la determinación de micotoxinas en alimentos, como los Métodos Oficiales de Análisis de la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (AOAC), donde se pueden encontrar más de cincuenta métodos validados para la determinación de diversas micotoxinas en gran variedad de alimentos, o los métodos normalizados propuestos por la Organización Internacional para la Normalización (ISO) y el Comité Europeo de Normalización (CEN) (Arroyo *et al.*, 2014).

Los análisis requieren un alto grado de exactitud y por esta razón se usan métodos recomendados o se lleva a cabo la validación de los nuevos métodos propuestos a través de procedimientos que garanticen la calidad de los resultados, incluido el uso de materiales de referencia certificados, o de comparaciones inter-laboratorio (Arroyo *et al.*, 2014).

Por su sencillez, rapidez, sensibilidad y la poca manipulación de las muestras, las técnicas por inmunoensayos se han utilizado recientemente como métodos para cuantificación de diversos sustratos (Repetto & Repetto, 2009).

2.3.5.1 Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

El método ELISA para determinar micotoxinas se basa en la capacidad de un anticuerpo específico para distinguir la estructura tridimensional de una micotoxina determinada. El ELISA directo competitivo se utiliza comúnmente en el análisis de micotoxinas.

Una placa de ELISA convencional de micro-valoración consiste en la reacción en equilibrio del complejo antígeno-anticuerpo. Actualmente, la mayoría de los kits de

prueba ELISA disponibles comercialmente para las micotoxinas están trabajando en la fase de la cinética de la unión antígeno-anticuerpo, lo que reduce el tiempo de incubación a minutos (Osorno, 2015).

Aunque la reducción en el tiempo de incubación puede conllevar a una cierta pérdida de la sensibilidad del ensayo, la técnica puede proporcionar resultados exactos y reproducibles.

En la actualidad existen kits para diferentes micotoxinas, por ejemplo, ASTORI TECNICA el cual determina AFLA (aflatoxinas), OTA y FUM (fumonisina) para bebidas, granos, cereales, frutos secos y alimentos; COMPETITOX determina FUM, ZEA y AFLA para maíz, cereales y alimentos; VICAM determina AFLA, FUM y OTA para alimentos y cereales; NEOGEN determina AFLA, FUM, toxina T-2 y ZEA para cereales y alimentos balanceados, por último, RIDASCREEN que determina AFLA, FUM, toxina T-2, y ZEA para alimentos balanceados, granos y cereales (Flores *et al.*, 2014).

2.3.5.2 Columnas de inmunoafinidad

Las columnas de inmunoafinidad (IAC) están diseñadas para una rápida y fácil purificación de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 de extractos de alimentos. Kits comerciales como lo es AflaStar de Romer Labs contienen anticuerpos monoclonales para las aflatoxinas que se unen de forma covalente a las partículas de gel. Las IAC atrapan a las aflatoxinas y separan a otras sustancias del extracto, posteriormente se aíslan las aflatoxinas eluyéndolas con metanol (Vallejo, 2012).

2.3.5.3 Inmunoensayo de polarización de fluorescencia (FP)

Se ha descrito que esta técnica cuantifica la presencia de micotoxinas como aflatoxinas, deoxinivalenol (DON) y fumonisinas. A diferencia de otras técnicas, los inmunoensayos de FP son ensayos en fase de solución, es decir, que se pueden realizar sin la unión de un anticuerpo o antígeno a una superficie sólida. El fundamento de la técnica se basa en que los detectores de polarización de fluorescencia miden indirectamente la velocidad de rotación de un fluoróforo en solución (Maragos, 2004).

La velocidad de rotación está directamente relacionada con el tamaño de las moléculas; las moléculas más grandes giran lentamente a una temperatura determinada. Se usa un conjugado de micotoxina-fluoróforo (trazador). El trazador tiene un bajo peso molecular y gira rápidamente en solución. La adición de anticuerpos antitoxina da como resultado la formación de un complejo inmune del trazador con el anticuerpo reduciendo efectivamente la velocidad de rotación del fluoróforo y aumentando la polarización. Por lo tanto, el inmunoensayo de FP permite la detección de materiales de bajo peso molecular en solución sin requerir un paso para separar la etiqueta "unida" y "no unida", una ventaja significativa sobre las técnicas de ELISA tradicionales (Maragos, 2004).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar la incidencia de mohos toxigénicos en alimento para ganado (concentrado y zacate de maíz) a través de métodos de análisis microbiológicos establecidos en la normativa mexicana para establecer una relación con la presencia de aflatoxinas en alimento y leche provenientes del Valle del Mezquital y Valle de Tulancingo, Hidalgo.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar los mohos presentes en alimento para ganado (concentrado y zacate de maíz) y diferenciar los mohos toxigénicos considerando su morfología macro y microscópica, para evaluar la relación con la producción de aflatoxinas.
- Determinar la incidencia de aflatoxinas en el alimento para ganado analizado y en leche, utilizando métodos de bioensayo para establecer una posible correlación con la presencia de mohos toxigénicos.
- Determinar la composición química nutrimental de las muestras de alimento para ganado bajo estudio a través de métodos oficiales para determinar la relación de los componentes y el crecimiento fúngico, con la producción de aflatoxinas.

4. METODOLOGÍA

4.1 Muestras

Se analizaron muestras de dos tipos de alimento para ganado: zacate de maíz y concentrado. Los concentrados correspondían a muestras comercializadas en las zonas bajo estudio. Además, se analizaron muestras de leche provenientes de diferentes centros de acopio del Valle de Tulancingo y del Valle del Mezquital, Hidalgo.

La recolección de las muestras (alimento y leche) se llevó a cabo de forma aleatoria y se realizó por los técnicos responsables de los centros de acopio, quienes laboran para la Dirección General de Fomento Lechero. Las muestras se recolectaron durante el periodo de agosto a noviembre del año 2016. En la Figura 6 se presenta un mapa en el que se indican las dos regiones donde se obtuvieron las muestras.



Figura 6. Mapa de las zonas de muestreo.

Se analizaron 30 muestras de alimento, 18 fueron concentrados (de las cuales 13 se obtuvieron del Valle del Mezquital y 5 del Valle de Tulancingo) y 12 de zacate de maíz (de las cuales 10 se recolectaron del Valle del Mezquital y 2 del Valle de Tulancingo).

En cada muestreo se recolectaron por triplicado entre 250 y 500 g de cada muestra de alimento, las cuales se recibieron en bolsas de polietileno de cierre hermético, se identificaron y se mantuvieron en refrigeración (4°C) por un lapso no mayor a 48 horas o en ultracongelación (-70°C) hasta su análisis.

En cuanto a las muestras de leche, se analizaron 14 muestras, de las cuales 10 provenían del Valle de Mezquital y 4 del Valle de Tulancingo. Se recolectó por duplicado 1 L de cada muestra, las cuales se identificaron y se mantuvieron en ultracongelación (-70°C) hasta su análisis.

4.2 Análisis microbiológico

El análisis microbiológico sólo se realizó a las muestras de alimento ya que, a diferencia de la leche, por su naturaleza y composición son susceptibles a contaminación fúngica (Londoño-Cifuentes & Martínez-Miranda, 2017; Ruíz *et al.*, 2017). En la Figura 7 se presenta un diagrama de la metodología seguida durante el análisis microbiológico.

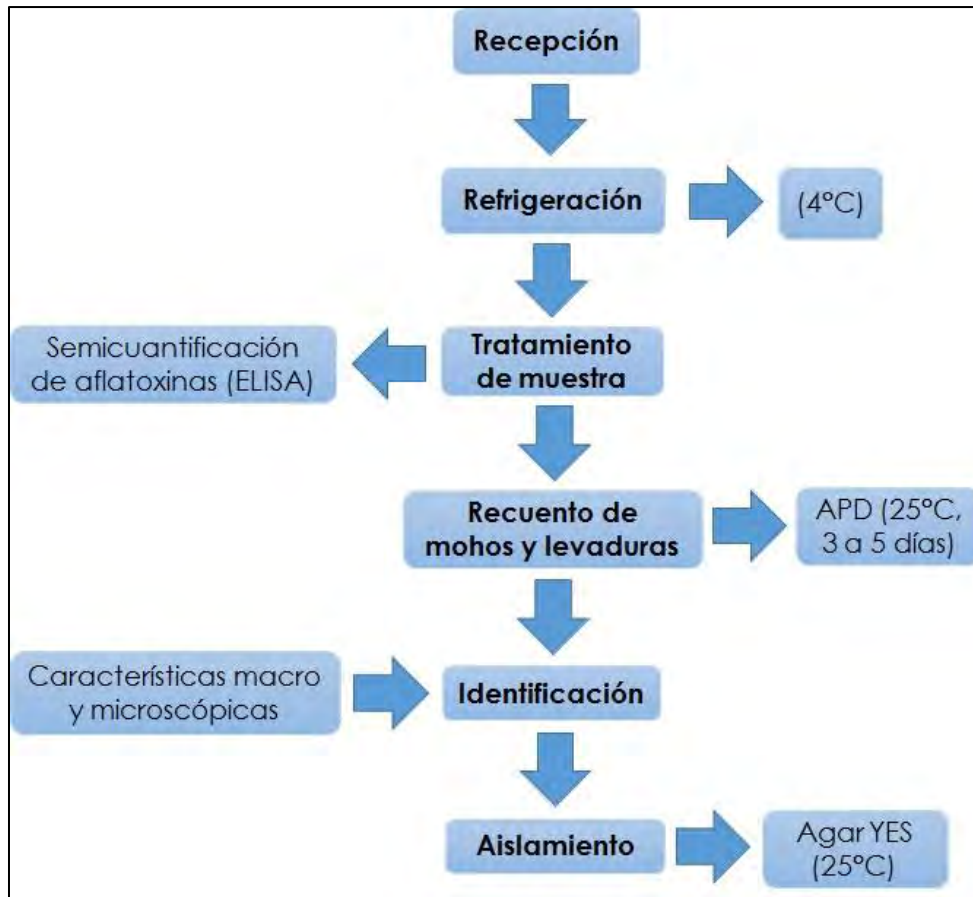


Figura 7. Metodología seguida para análisis microbiológico.

4.2.1 Recuento de mohos

Antes del recuento de mohos, se realizó el análisis del crecimiento fúngico aparente en las diferentes muestras analizadas, esto se efectuó mediante una inspección visual.

El conteo de mohos se expresa como el número de unidades formadoras de colonias por gramo de muestra (UFC/g), que se hacen visibles cuando una alícuota de la suspensión de un producto examinado, ha sido transferida a un medio nutritivo para mohos e incubada aeróbicamente a 25°C por cinco días (ICC, 1980).

El análisis se llevó a cabo de acuerdo con la técnica descrita en la NOM-111-SSA1-1994 (con modificación, ya que se realizó por extendido sobre superficie). Se pesaron 10 g de cada muestra, a continuación, cada una se diluyó en la proporción

1:10 en solución salina con Tween 80 y se homogenizó en el Stomacher® durante aproximadamente 2 min. Esta dilución se consideró la primera dilución decimal, a partir de la cual se efectuaron 4 diluciones sucesivas, utilizando el mismo diluyente. Se sembró 0.1 mL de cada una de las diluciones de cada muestra, por duplicado, en el medio de cultivo agar papa dextrosa (APD).

Todas las placas sembradas se incubaron durante 5-7 días a 25°C. Trascurrido este tiempo, se procedió al recuento de todas las colonias de mohos y levaduras crecidas; tomando en cuenta que este recuento se efectúa al tercer día (ya que el crecimiento no es tan extendido) y al quinto día (confirmación) a partir del día en que se sembraron las muestras

4.2.2 Identificación de colonias fúngicas

La identificación de las colonias fúngicas sólo se llevó a cabo a nivel de género, basados en sus características macroscópicas y microscópicas.

El estudio macroscópico se llevó a cabo a simple vista, observando la morfología y la forma de crecimiento de las colonias sobre la superficie del medio (APD). Inmediatamente, se procedió a realizar el estudio microscópico.

La preparación de la muestra se efectuó según la técnica de la cinta adhesiva (Rodríguez-Tudela & Aviles, 1991), la cual consiste en aplicar una porción de cinta adhesiva transparente sobre la superficie de la colonia y pegarla posteriormente, por presión, sobre un portaobjetos en el que previamente se ha colocado una gota de azul de metileno.

Para la identificación y clasificación de los mohos, se utilizaron los criterios establecidos en el tratado de Von Arx (1981) y el manual de Samson y colaboradores (2000).

Tras siete días de incubación se procedió a la observación de las características morfológicas macroscópicas y microscópicas de los cultivos. Para las características macroscópicas se tomaron en cuenta parámetros como: coloración del anverso y reverso de las colonias, textura de las colonias y presencia de pigmento difundido. Los principales parámetros microscópicos tomados en

consideración fueron: forma de los cuerpos fructíferos, forma, disposición y ornamentación de las esporas, forma y tamaño de las ascosporas (si las había).

Las colonias de mohos que no se podían identificar a causa de la ausencia de cuerpos fructíferos, se resembraron en medio Agar Extracto de Levadura (YES) y se incubaron a la misma temperatura, tratando de promover el desarrollo de estos. Las colonias que no desarrollaron cuerpos fructíferos después de 7 días de incubación bajo estas condiciones se denominaron como *Mycelia sterilia*.

4.2.3 Aislamiento de colonias fúngicas potencialmente micotoxigénicas

Paralelamente al recuento, se realizó el aislamiento e identificación de aquellas colonias que, a simple vista o mediante su observación al microscopio, se consideraron pertenecientes a los géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*. Mediante un asa de platino se depositó un inóculo de esporas en tres sitios distintos (formando un triángulo equilátero) (Figura 8) de la placa de Petri con 30 mL del medio de cultivo (YES) y se incubó a 25°C, durante el tiempo requerido para el desarrollo óptimo de la colonia fúngica. Se realizaron las resiembras necesarias hasta obtener cultivos puros. Cada cepa se aisló por duplicado.

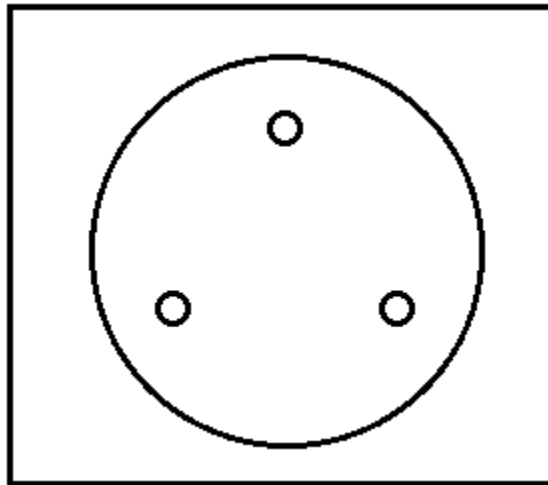


Figura 8. Depósito del inóculo de esporas sobre la superficie del medio.

4.3 Extracción y determinación de aflatoxinas totales

Las muestras se analizaron por el método ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), para determinar la presencia de aflatoxinas totales.

4.3.1 Fundamento

El test se basa en una reacción antígeno-anticuerpo. Los micropozos están recubiertos con anticuerpos de captura contra anticuerpos anti-aflatoxina. Se agregan estándares de aflatoxina o la solución de las muestras, conjugado aflatoxina-enzima y anticuerpos anti-aflatoxina a los micropozos.

La aflatoxina libre y el conjugado aflatoxina-enzima compiten para unirse a sitios del anticuerpo anti-aflatoxina (inmunoensayo enzimático competitivo). Al mismo tiempo, los anticuerpos anti-aflatoxina se unen a los anticuerpos de captura inmovilizados sobre la placa. El conjugado aflatoxina-enzima que no se unió es removido posteriormente en un proceso de lavado.

El sustrato/cromógeno es agregado a los micropozos e incubado. El conjugado aflatoxina-enzima unido a los micropozos a través de los anticuerpos, convierte al cromógeno en una sustancia azul. La adición de la solución *stop* provoca un cambio de color de azul a amarillo. La medición se realiza fotométricamente a 450 nm; la absorción es inversamente proporcional a la concentración de aflatoxinas en la muestra.

4.3.2 Preparación de las muestras

La extracción y determinación de las aflatoxinas se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita en el kit comercial utilizado (RIDASCREEN®). Para ello, una muestra representativa se sometió a molienda con la finalidad de reducir el tamaño de partícula y homogeneizarla. Se pesaron 2 g de la muestra molida en un vial de vidrio con tapón de rosca; se adicionaron 10 mL de una mezcla metanol:agua (70:30 v/v) y se mezclaron durante 10 min a temperatura ambiente (20-25°C) usando un vórtex. Todo el extracto se filtró; posteriormente se tomó una alícuota de 100 µL y se diluyó con 600 µL de agua destilada. Se tomaron 50 µL de esta dilución y se colocaron en un micropozo para el ensayo.

4.3.3 Análisis

Se colocaron suficientes micropozos en el soporte de la microplaca para los estándares y muestras a analizar. El análisis se llevó a cabo por duplicado y se registró la posición de cada una de ellas. Se colocaron 50 µL de los estándares y las diluciones preparadas anteriormente en los micropozos correspondientes (se utilizó una punta de pipeta nueva para cada estándar y muestra). Así mismo, se adicionaron 50 µL del conjugado aflatoxina-enzima y 50 µL del anticuerpo anti-aflatoxina a cada uno de los micropozos, se mezcló el contenido de la microplaca suavemente y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente (20-25°C). Se vaciaron los micropozos y se golpeó enérgicamente (3 veces consecutivas) el marco de los micropozos sobre un papel absorbente limpio para asegurar la eliminación completa de residuos líquidos. Se lavaron los micropozos (250 µL por micropozo) con tampón de lavado ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 10mM, pH 7.4 que contenía 0.05% de Tween 20), se utilizó una micropipeta y se vaciaron nuevamente los micropozos de la forma indicada. Se repitió este paso dos veces más.

Se agregaron 100 µL de substrato-cromógeno a cada micropozo y se mezcló el contenido de la microplaca suavemente; posteriormente se incubó durante 5 min en la oscuridad a temperatura ambiente (20-25 °C). Finalmente, para detener la reacción, se adicionaron 100 µL de la solución *stop* (H_2SO_4 1N) a cada micropozo, se mezcló el contenido de la microplaca suavemente y se midió la absorción a 450 nm en el transcurso de los siguientes 10 min.

4.4 Análisis proximal

Debido a que la composición química del alimento para ganado (concentrado y zacate de maíz) puede ser un factor de importancia para el crecimiento de mohos toxigénicos, sólo estas muestras se sometieron a un análisis proximal. La determinación de análisis proximal se realizó con base a los métodos oficiales de la AOAC.

4.4.1 Determinación de humedad

El contenido de humedad se llevó a cabo mediante el método AOAC 925.09, por secado en estufa. En charolas de aluminio a peso constante se colocaron muestras de aproximadamente 5 g de alimento para ganado (concentrado y zacate de maíz) (todas las muestras molidas). Las muestras se llevaron a peso constante en un horno (FELISA FE-291AD) a 105°C por 4 horas. Los resultados se obtuvieron utilizando la Ecuación 1.

$$\% \text{ Humedad} = \frac{P_i - P_f}{m} \times 100 \quad (1)$$

Donde: m=Peso húmedo de la muestra (g); P_i=Peso de la charola con muestra antes del secado (g); P_f=Peso de la charola con la muestra seca (g).

4.4.2 Determinación de cenizas

La determinación de cenizas totales se llevó a cabo por el método AOAC 923.03. Se utilizaron crisoles a peso constante donde se colocaron aproximadamente 3 g de muestra molida y se incineraron en parrilla de calentamiento dentro de una campana de extracción, hasta la desaparición del humo. Posteriormente, el residuo se colocó en una mufla (Thermo SCIENTIFIC FB 1415M) a 550°C hasta obtener un color homogéneo de las cenizas y un peso constante del crisol. Los resultados se obtuvieron aplicando la Ecuación 2.

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{P_f - P_0}{m} \times 100 \quad (2)$$

Donde: m=Peso húmedo de la muestra (g); P_o=Peso del crisol (g); P_f= Peso del crisol con la muestra calcinada (g).

4.4.3 Determinación de grasa cruda

El contenido de grasa se determinó mediante el método AOAC 920.39 Soxhlet. Se colocaron muestras de alimento para ganado (concentrado y zacate de maíz) libres de humedad en un saco de papel filtro y se introdujeron en la cámara de extracción de un equipo Soxhlet (LAB-LINE MULTI-UNIT). En matraces balón de 250 mL a

peso constante, se adicionaron 150 mL de éter de petróleo; se juntó cada matraz con la cámara de extracción y el condensador y se procedió a calentamiento moderado hasta la extracción de grasa durante 8 h aproximadamente. Para finalizar, se recuperó el solvente y el resto se eliminó colocando el matraz en una estufa a 65°C. Los resultados se obtuvieron aplicando la Ecuación 3.

$$\% \text{ Grasa cruda} = \frac{P_f - P_i}{m} \times 100 \quad (3)$$

Donde: m=Peso de la muestra fresca referido al peso original (g); P_i=Peso inicial del matraz a peso constante (g); P_f=Peso del matraz con extracto etéreo (g).

4.4.4 Determinación de fibra bruta

La determinación de fibra se realizó por el método AOAC 7.073. Se pesaron aproximadamente 2 g de muestras de alimento para ganado (concentrado y zacate de maíz) libres de humedad y grasa, se colocaron en vasos de Berzelius y se procedió a una digestión ácida con H₂SO₄ al 1.25% por 30 minutos a reflujo en un digestor. Las muestras de la primera digestión se filtraron en una tela de lino y se prosiguió con una digestión básica con NaOH al 1.25% por 30 minutos a reflujo. Se filtró el resto de la muestra no digerida con la misma tela de lino y se colocó en un crisol, que previamente se llevó a peso constante en estufa a 105°C por 1 h para eliminar la humedad. Después, se incineró en una parrilla de calentamiento hasta la desaparición de humo en una campana de extracción. Posteriormente, se colocaron los crisoles en una mufla (Thermo SCIENTIFIC FB 1415M) a 550°C hasta obtener un color homogéneo de las cenizas y un peso constante del crisol. Los resultados se obtuvieron aplicando la Ecuación 4; se utilizó un blanco (tela de lino) para la corrección de los resultados restando el blanco a las muestras.

$$\% \text{ Fibra bruta} = \frac{P_1 - P_2}{W} \times 100 \quad (4)$$

Donde: W=peso húmedo de la muestra (g); P₁=peso del crisol con muestra antes de la incineración y después del secado a 105°C (g); P₂=peso del crisol con muestra incinerada (g).

4.4.5 Determinación de proteína

La determinación se realizó por el método AOAC 46.10. Se utilizó el método Kjeldahl, el cual consiste en someter la muestra a tres procedimientos: digestión, destilación y valoración, que se describen a continuación.

- *Mezcla digestiva.* Se preparó con 3 g de sulfato de cobre pentahidratado (el cobre actúa como catalizador) en 20 mL de agua destilada, 50 mL de ácido fosfórico y 430 mL de ácido sulfúrico concentrado.
- *Solución indicadora.* Se preparó con 5 g de ácido bórico disueltos en agua destilada, 35 mL del indicador A (100 mg de fenolftaleína aforados a 100 mL con alcohol etílico) y 10 mL del indicador B (33 mg de verde de bromocresol + 66 mg de rojo de metilo aforados a 100 mL con alcohol etílico). La mezcla se ajustó a un color café rojizo con ácido o álcali según se requirió y se aforó a 1 L con agua destilada.
- *Digestión.* En un tubo de digestión Kjeldahl se colocaron 70 mg de alimento para ganado (concentrado y zacate de maíz), 0.5 g de sulfato de potasio (para aumentar la ebullición) y 3 mL de mezcla de digestión. El tubo se colocó en el digestor durante 15 minutos a 370°C. Posteriormente se enfrió y se le adicionaron 1.5 mL de H₂O₂ al 30%, se volvió a colocar en el digestor a 370°C y se mantuvo así hasta el final de la digestión (hasta que su contenido se observó completamente translúcido, sin partículas negras en suspensión, que indican materia orgánica no digerida). A la par, se corrieron blancos preparados de la misma forma, pero sustituyendo la muestra por sacarosa.
- *Destilación.* La muestra digerida se sometió a destilación. El destilador se programó para que adicionara al contenido del tubo 60 mL de NaOH al 50%, con un tiempo de destilación de 6 minutos al 60% de potencia de vapor. El destilado se recolectó en un matraz Erlenmeyer con 50 mL de solución indicadora.
- *Valoración.* El contenido del matraz de recolección se valoró con HCl 0.01 N (previamente estandarizado) hasta el vire de verde esmeralda a café rojizo.

El porcentaje de proteína se calculó mediante la aplicación de las Ecuaciones 5 y 6.

$$\%Nitrógeno = \frac{(P - B) \times N \times meq}{m} \times 100 \quad (5)$$

$$\%Proteína = \%Nitrógeno \times F \quad (6)$$

Donde: P= Volumen de HCl gastado en la valoración de la muestra (mL); B= Volumen de HCl gastado en la valoración del blanco (mL); N= Normalidad del HCl; meq= miliequivalentes de nitrógeno (0.014); m= Peso húmedo de la muestra (g); F= Factor de conversión (6.25)

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Análisis microbiológico

En general, las muestras que se analizaron en este estudio presentaron contaminación por mohos, ya que mostraron una alta incidencia de diversos géneros fúngicos. A pesar de que algunos de los géneros fúngicos identificados no son productores de micotoxinas, se pone de manifiesto que las prácticas agrícolas y de manufactura de las regiones analizadas, así como el lugar de procedencia de cada una de las muestras, no son adecuadas para un correcto mantenimiento del alimento destinado a la alimentación de ganado vacuno.

5.1.1 Alimento concentrado

En las muestras de concentrado provenientes del Valle del Mezquital (Tabla 6) se determinó la presencia de 29 géneros fúngicos, de los cuales 24 no son productores de micotoxinas. Sin embargo, su control es importante debido a que géneros como *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Acremonium*, *Chrysosporium*, *Botrytis*, *Aurebasidium*, y *Drechslera*, a pesar de que no presentan patogenicidad o toxicidad, son comúnmente considerados como contaminantes saprofitos, es decir, provocan deterioro de materia orgánica (Larone, 1987).

Por otro lado, en estas muestras se determinó una incidencia máxima de 33.33% de mohos en los que no se observaron cuerpos fructíferos (*Mycelia sterilia*). El rango de géneros fúngicos no identificados fue de 2.91 a 73.92%, ya que a pesar de que presentaron cuerpos fructíferos, no concordaban con los géneros descritos en los manuales consultados.

Tabla 6. Porcentaje de incidencia de géneros fúngicos identificados en 13 muestras de alimento concentrado, proveniente del Valle del Mezquital.

Concentrado (n=13)		
Género fúngico	% Incidencia	
	Mínimo	Máximo
<i>Cladosporium</i>	1.99	42.11
<i>Candida</i>	1.16	50.76
<i>Mycelia sterilia</i>	1.49	33.33
No identificado	2.91	73.92
<i>Trichophyton</i>	0.5	15.52
<i>Nigrospora</i>	0.76	6.87
<i>Piedraia</i>	1.32	5.17
<i>Coccidioides</i>	0.58	2.22
<i>Trichoderma</i>	5.47	8.33
<i>Pseudallescheria</i>	2.48	3.95
<i>Chrysosporium</i>	1.32	1.49
<i>Madurella</i>	1.49	5.15
<i>Levaduriforme</i>	11.84	32.34
<i>Streptomyces</i>	2.22	5.26
<i>Aureobasidium</i>	6.66	8.7
<i>Acremonium</i>	24.24	
<i>Botrytis</i>	15.52	
<i>Rhizopus</i>	13.33	
<i>Exophilia</i>	8.33	
<i>Nocardia</i>		8.33
<i>Drechslera</i>		7.42
Ascas sueltas y ascosporas		5.26
<i>Aspergillus</i>		
<i>Blastomyces</i>		2.22
<i>Phialophora</i>		2.22
<i>Wagniella</i>		2.17

Aunado a esto, se identificaron los 4 principales géneros fúngicos productores de micotoxinas: *Aspergillus* (30.47%), *Penicillium* (69.77%), *Fusarium* (48.28%) y *Alternaria* (13.33%), siendo estos datos los porcentajes máximos de las muestras donde se identificaron (Figuras 9A-D). La presencia de estos mohos toxigénicos es indicativo de un riesgo potencial en cuanto a la producción de toxinas, si las condiciones son propicias para ello (Martínez & Anadón, 2012).

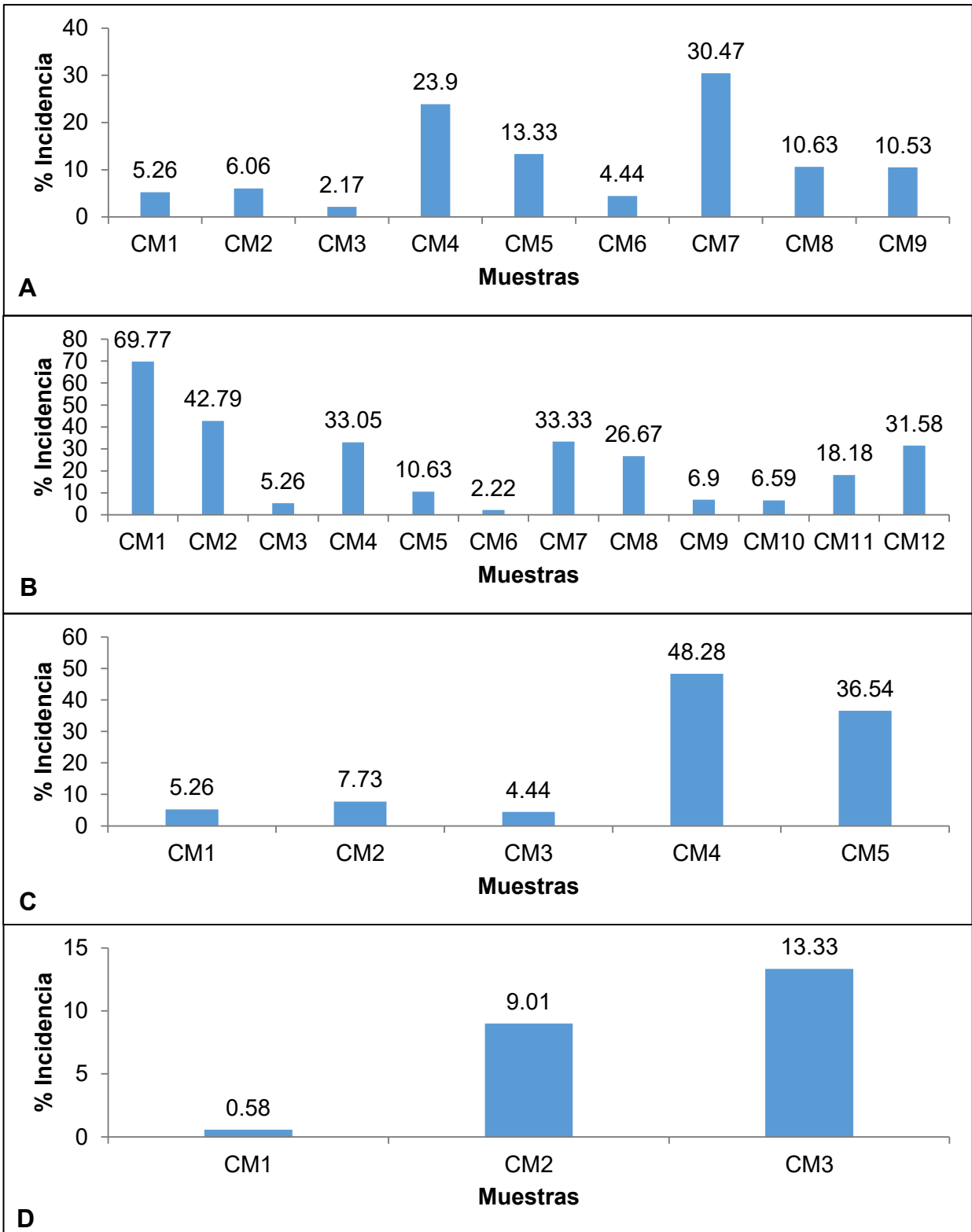


Figura 9. Incidencia de los principales mohos toxigénicos en muestras de alimento concentrado provenientes del Valle del Mezquital (CM). (A) *Aspergillus*, (B) *Penicillium*, (C) *Fusarium*, (D) *Alternaria*.

De acuerdo con lo que reporta la literatura, los géneros *Fusarium* y *Alternaria* son considerados mohos de campo; mientras que los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* son tratados como mohos de almacenamiento. Es decir, que su crecimiento está influenciado por las condiciones (temperatura, humedad e higiene de los almacenes) donde se lleva a cabo el almacenamiento del alimento que se destina al consumo del ganado (Fleurat-Lessard, 2017). La principal diferencia entre los mohos de campo y de almacén, son los requerimientos de agua para que puedan crecer. Los mohos de campo requieren humedades relativas de 90 a 100%, en cambio los de almacén requieren humedades relativas de 65 a 90% (Santibáñez *et al.*, 2011). Por lo que el desarrollo de mohos como *Penicillium* y *Aspergillus* observado en las muestras de concentrado principalmente, se puede atribuir a las malas condiciones de almacenamiento, ya que su contenido de humedad era elevado.

Por otro lado, en las muestras de alimentos concentrados provenientes del Valle de Tulancingo, de las cepas aisladas se identificaron 12 géneros fúngicos (Tabla 7). A pesar de que *Fusarium* y *Aspergillus* sólo se presentaron en una muestra, existe el riesgo de presencia de micotoxinas.

Al comparar con muestras de la misma naturaleza, pero de diferente lugar de procedencia, se observa que el género *Penicillium*, es el que presenta mayor porcentaje de incidencia. De acuerdo con Hussein & Brasel (2001) los géneros más importantes para la producción de micotoxinas y que afectan a los animales domésticos son *Aspergillus* y *Penicillium*.

Tabla 7. Porcentaje de incidencia de géneros fúngicos identificados en 5 muestras de alimento concentrado, proveniente del Valle de Tulancingo.

Concentrado (n=5)		
Género fúngico	% Incidencia	
	Mínimo	Máximo
<i>Aspergillus</i>	15.9	
<i>Fusarium</i>	13.89	
No identificado	3.70	22.22
<i>Trichophyton</i>	2.78	66.67
<i>Mycelia sterilia</i>	7.41	10.53
<i>Piedraia</i>	7.41	10.53
<i>Cladosporium</i>	5.56	43.2
<i>Coccidioides</i>	5.56	11.4
<i>Acremonium</i>	8.33	
<i>Nigrospora</i>	4.5	
<i>Dreschlera</i>	4.5	

El género *Penicillium* se encontró en 4 de las 5 muestras que se evaluaron y presentó un porcentaje de incidencia máxima de 55.56%; mientras que *Alternaria* se encontró en 3 de las 5 muestras con una incidencia máxima de 25.93% (Figuras 10A-B).

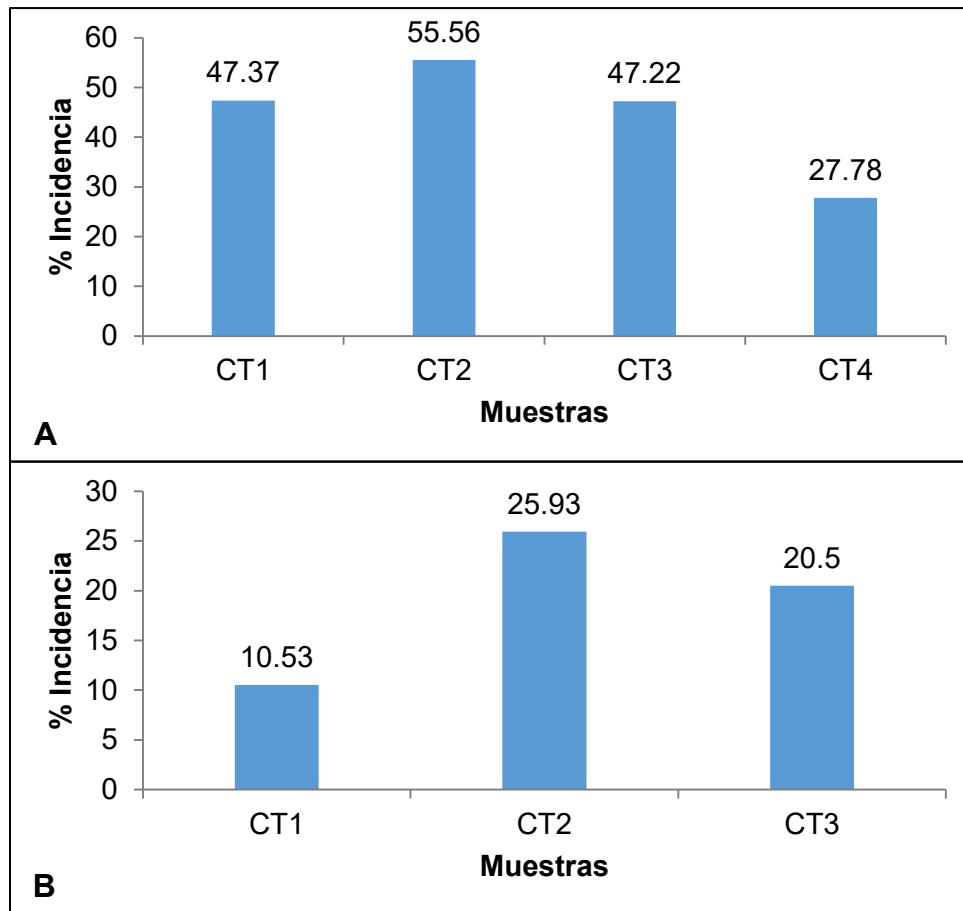


Figura 10. Incidencia de los principales mohos toxigénicos en muestras de alimento concentrado provenientes del Valle de Tulancingo (CT). (A) *Penicillium* y (B) *Alternaria*.

Investigaciones reportan que en la elaboración de algunos alimentos concentrados comerciales se les adiciona ácido fórmico o propiónico, y que estos compuestos pueden ayudar a reducir el riesgo de crecimiento de mohos y algunas bacterias. Sin embargo, muchos de los ingredientes individuales, utilizados en la preparación de alimentos concentrados, son productos con un alto riesgo de contaminación por micotoxinas (Pettersson, 2004).

De acuerdo con Muñoz y colaboradores (2015), los alimentos concentrados pueden ser elaborados con diversas materias primas, como lo son vegetales, carnes y cereales (maíz, sorgo y arroz); las cuales pueden estar contaminadas por esporas de los mohos, especialmente cuando los granos de cereal son molidos, y provocar la presencia de micotoxinas.

5.1.2 Alimento de zacate de maíz

En cuanto a las muestras de zacate de maíz provenientes del Valle del Mezquital, de las cepas aisladas se identificaron 18 diferentes géneros fúngicos (Tabla 8), incluyendo los 4 principales géneros productores de micotoxinas.

Tabla 8. Porcentaje de incidencia de géneros fúngicos identificados en 10 muestras de alimento zacate de maíz, proveniente del Valle del Mezquital.

Zacate de maíz (n=10)		
Género fúngico	% Incidencia	
	Mínimo	Máximo
<i>Cladosporium</i>	1.14	61.15
<i>Mycelia sterilia</i>	1.09	19.67
<i>Trichophyton</i>	0.82	67.21
No identificado	3.28	26.92
<i>Candida</i>	15.91	60
<i>Levaduriforme</i>	0.87	14.10
<i>Nigrospora</i>	0.64	1.28
<i>Piedraia</i>	51.25	
<i>Microsporum</i>	7.65	
<i>Madurella</i>	3.28	
<i>Exophiala</i>	1.64	
<i>Nocardia</i>	1.64	
Ascas sueltas y ascosporas de <i>Aspergillus</i>	0.82	
<i>Actinomadura</i>	0.55	
<i>Acremonium</i>	0.55	

Géneros como *Cladosporium* (moho de campo) se han encontrado en maíz con altos contenidos de humedad, además de que tiene la capacidad de crecer aún a temperaturas <0°C. Este género fúngico no presenta patogenicidad, sin embargo, es un moho deteriorador (Santibáñez *et al.*, 2011). Es importante destacar que los

zacates de maíz o rastrojo de cereales se recogen y se prensan en pacas después de la cosecha (Pettersson, 2004), lo cual implica que, si el grano se encontraba contaminado desde el inicio, el producto destinado a consumo animal estará contaminado de igual forma.

Se ha reportado que en muestras de maíz la micoflora presente pertenece a géneros como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Cladosporium*. Aunque en granos almacenados *Aspergillus* y *Penicillium* fueron los dominantes (Sinha & Sinha, 1992). Estos resultados concuerdan con los géneros fúngicos encontrados en las muestras de zacate de maíz, ya que los porcentajes de incidencia máxima fueron 65.91% para *Penicillium*, 68.03% para *Aspergillus*, 26.23% para *Fusarium* (Figuras 11A-C) y 61.15% para *Cladosporium*.

En cuanto al género *Alternaria*, el porcentaje de incidencia máxima fue de 3.41% (Figura 11D); a pesar de que este valor es relativamente bajo en comparación a los demás géneros, no debe minimizarse su presencia, ya que es un moho productor de micotoxinas, entre las que se encuentra alternariol, altenueno, alternariol monometiléter, ácido tenuazónico y altertoxinas; estas toxinas presentan actividad mutagénica, genotóxica y citotóxica. Cabe destacar que estas no son todas las toxinas producidas por *Alternaria*, sin embargo, son las más comunes y más reportadas (Pavón *et al.*, 2012).

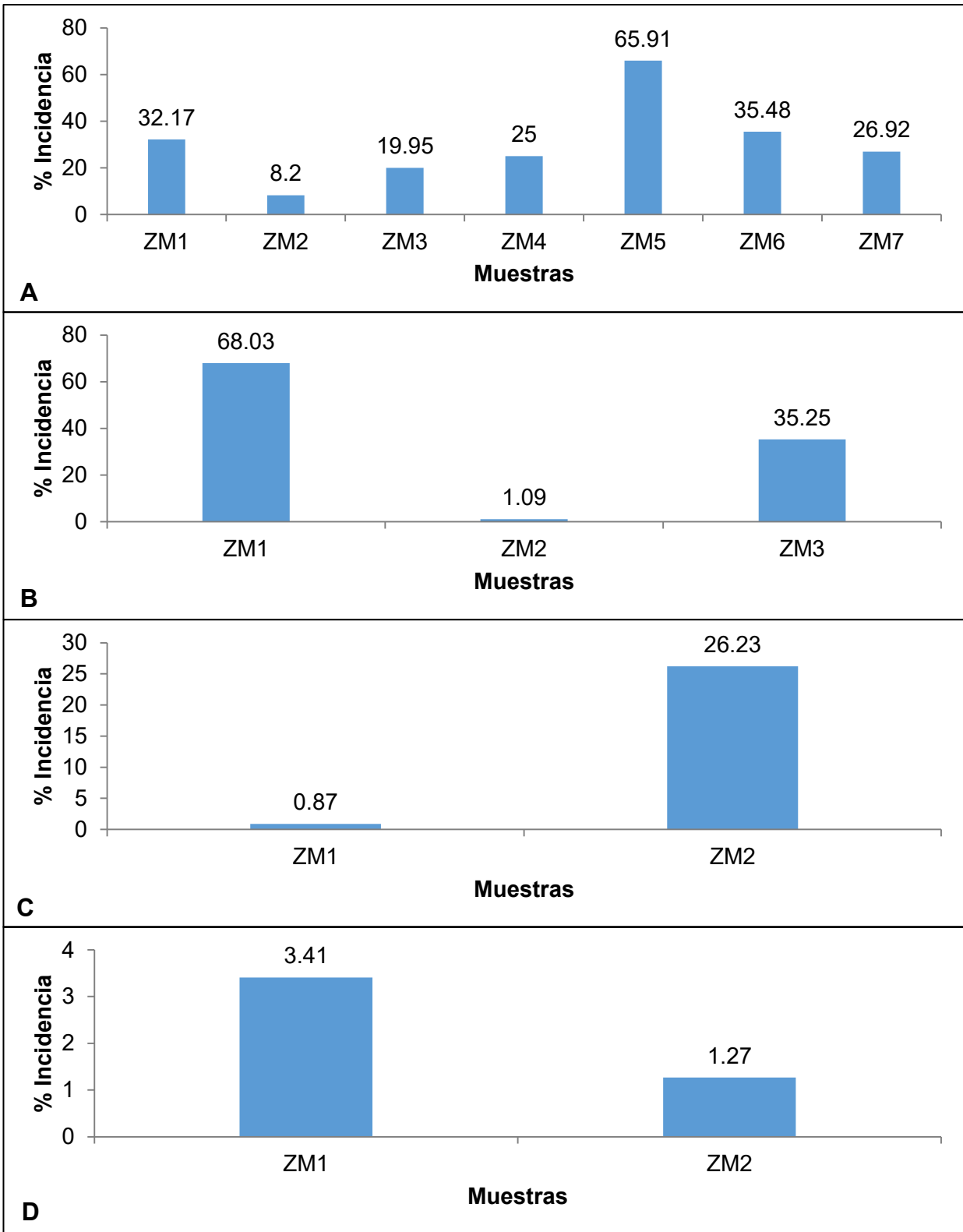


Figura 11. Incidencia de los principales mohos toxigénicos en muestras de alimento zacate de maíz provenientes del Valle del Mezquital (ZM). (A) *Penicillium*, (B) *Aspergillus*, (C) *Fusarium*, (D) *Alternaria*.

En cuanto a las muestras de zacate de maíz provenientes del Valle de Tulancingo, de las cepas aisladas se identificaron sólo 5 géneros fúngicos, de los cuales dos son productores de micotoxinas (Tabla 9).

Tabla 9. Porcentaje de incidencia de géneros fúngicos identificados en 2 muestras de alimento zacate de maíz, proveniente del Valle de Tulancingo.

Zacate de maíz (n=2)		
Género fúngico	% Incidencia	
	Mínimo	Máximo
<i>Penicillium</i>	2.96	
<i>Cladosporium</i>	26.56	31.03
<i>Trichophyton</i>	27.09	
<i>Acremonium</i>	1.97	

En comparación con las muestras de la misma naturaleza provenientes del Valle del Mezquital, el género *Penicillium* fue el moho menos dominante, con un porcentaje de incidencia de 2.96%; siendo *Fusarium* el que presentó un porcentaje de incidencia máxima del 73.44% (Figura 12).

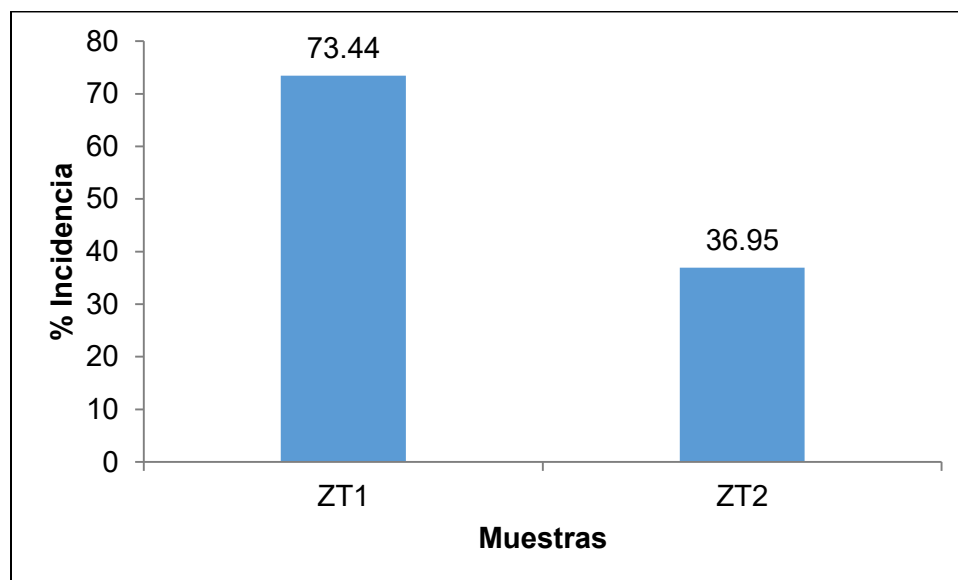


Figura 12. Incidencia de *Fusarium* en muestras de alimento zacate de maíz provenientes del Valle del Tulancingo (ZT).

Los mohos toxigénicos identificados para el zacate de maíz también han sido identificados en granos de diferentes maíces provenientes del Norte de Tamaulipas, México (*Fusarium* 76.9% y *Penicillium* 11.6%) (Hernández-Delgado *et al.*, 2007), aunque a diferencia de la presente investigación, en ese estudio también se observó incidencia del género *Aspergillus*. Si bien, el zacate y los granos de maíz son diferentes matrices, se encontraron coincidencias en la micoflora presente en estos dos sustratos.

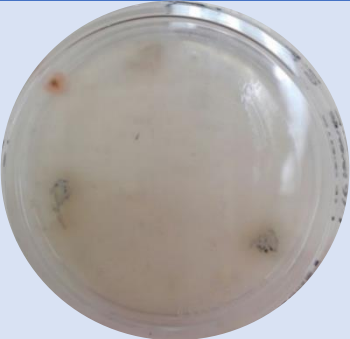

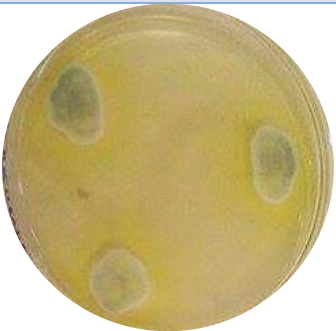
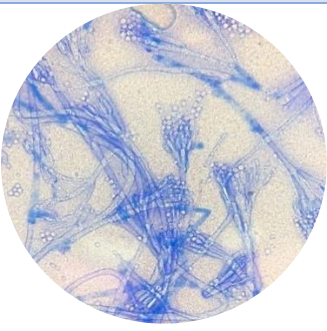

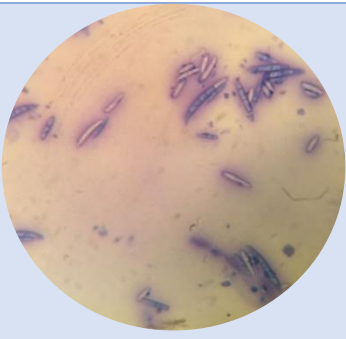

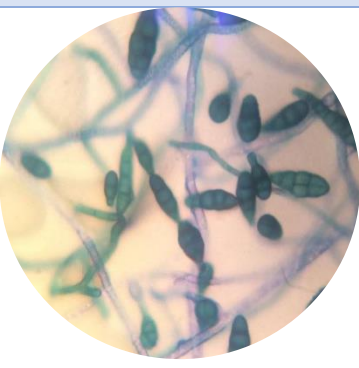
Esto puede ser debido a las condiciones ambientales en las que se cultivó el maíz del cual proviene y las condiciones de humedad durante el almacenamiento. Así mismo, la ausencia de especies descritas como toxigénicas en muestras de alimentos, no significa que no se encuentren micotoxinas en las mismas, debido a que las toxinas fúngicas pueden persistir después de la muerte vegetativa del hongo (Muñoz *et al.*, 2015).

Existe una relación entre los géneros fúngicos identificados y la naturaleza de la muestra. La falta de condiciones adecuadas para el almacenamiento del alimento destinado a consumo animal es un factor de importancia para el desarrollo de mohos y a su vez la producción de micotoxinas. Aunado a esto, pueden existir otros factores como la composición química de la muestra, ya que los mohos pueden encontrar los nutrientes necesarios para su óptimo crecimiento (sección 5.3).

Si bien, los dos tipos de alimento analizados estaban contaminados por mohos, la presencia de los 4 géneros micotoxigénicos puede depender de condiciones de almacenamiento, condiciones de cosecha y poscosecha, así como la elaboración adecuada de alimentos concentrados. En el caso de estos últimos, por tratarse de alimentos comerciales, se debe de garantizar que se encuentren por debajo de los límites establecidos para mohos y micotoxinas.

En la Tabla 10 se muestran imágenes de los principales géneros micotoxigénicos aislados de algunas de las muestras analizadas. Se observa la morfología macroscópica y microscópica típica de cada género. Microscópicamente se destaca la forma de “abanico” para el género *Aspergillus*, de “pincel” para *Penicillium*, “plátano” para *Fusarium* y “elipsoidal” para *Alternaria*.

Tabla 10. Características morfológicas macroscópicas y microscópicas de los principales géneros fúngicos productores de micotoxinas identificadas en las muestras analizadas.

Género	Morfología macroscópica*	Morfología microscópica*
<i>Aspergillus</i>		
<i>Penicillium</i>		
<i>Fusarium</i>		
<i>Alternaria</i>		

5.2 Análisis de aflatoxinas totales

5.2.1 Alimento para ganado

Se realizó una cuantificación de aflatoxinas de las muestras de alimento analizadas. En general, hubo presencia de contaminación por aflatoxinas totales en ambos tipos de alimentos (concentrados y zacate de maíz) de las dos regiones que se evaluaron.

Cabe destacar que en México no hay normativas tan extensas y específicas para contaminantes como lo son las aflatoxinas, a diferencia de otros países donde la regulación es más estricta.

En cuanto a las 13 muestras de alimento concentrado proveniente del Valle del Mezquital, se obtuvo un rango de concentración de aflatoxinas totales de 1.28 a 17.53 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Figura 13). La NOM-188-SSA1-2002 establece un límite máximo de aflatoxinas en cereales para consumo animal de 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$, por lo que las concentraciones encontradas estuvieron dentro de lo establecido en la normatividad mexicana.

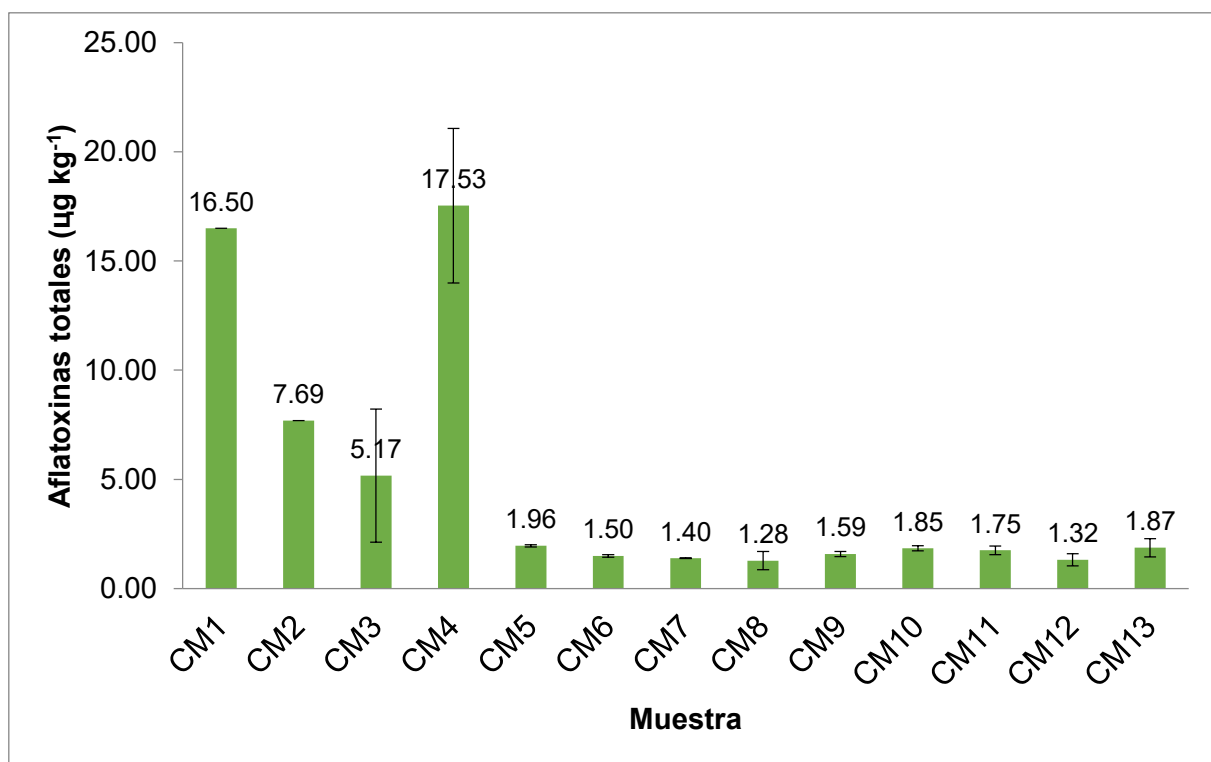


Figura 13. Concentración de aflatoxinas totales de las 13 muestras de alimento concentrado proveniente del Valle del Mezquital (CM). Nivel de confianza ($p=0.05$).

Las 10 muestras provenientes del Valle de Tulancingo presentaron un rango de concentración de aflatoxinas totales que va desde 2.12 a 18.44 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Figura 14). Estos resultados se encuentran dentro de los límites establecidos por las regulaciones mexicanas.

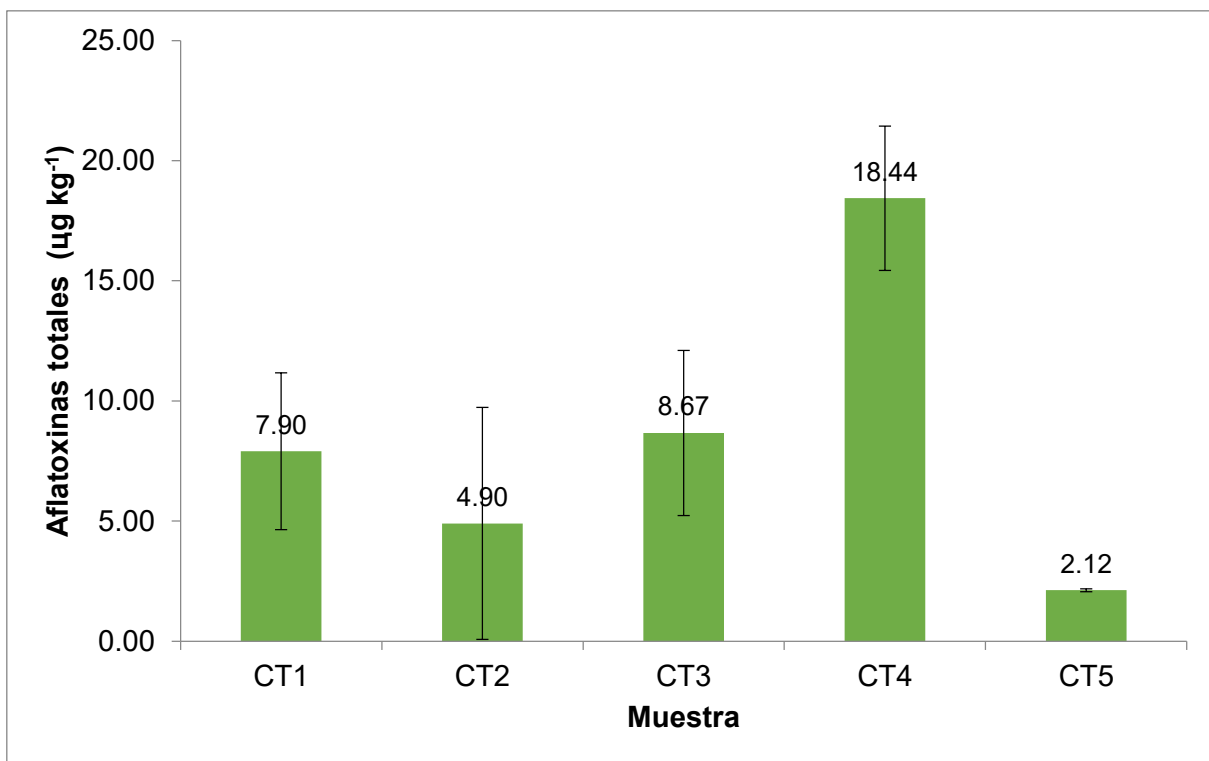


Figura 14. Concentración de aflatoxinas totales de las 5 muestras de alimento concentrado proveniente del Valle de Tulancingo (CT). Nivel de confianza ($p=0.05$)

En un estudio realizado por Capelli (2014), se analizó la concentración de aflatoxinas totales en diversos tipos de alimentos destinados al consumo de ganado lechero; entre ellos se analizaron muestras de concentrados (preparación a base de afrechillo de arroz, cascarilla de soya, mezcla de maíz y pellet de soya). Las concentraciones se presentaron en el rango de 2.17 a 10.4 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

La diferencia entre los resultados obtenidos y los reportados se puede deber a la formulación de los concentrados que se utilizan en las regiones del Mezquital y Tulancingo. Sin embargo, a pesar de que son alimentos comerciales, no se tiene información sobre los ingredientes que los componen.

Si se compara con los porcentajes de incidencia del género *Aspergillus* obtenidos en el análisis microbiológico; se tiene que en el Valle del Mezquital el porcentaje de incidencia máxima del género *Aspergillus* es de 30.47%, mientras que la concentración máxima de aflatoxinas totales es de 17.53 $\mu\text{g kg}^{-1}$. En cuanto al Valle de Tulancingo el porcentaje de incidencia máxima de este género fue de 15.9% y la concentración máxima de aflatoxinas fue de 18.44 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Esto indica que hay una relación directa entre crecimiento fúngico y producción de aflatoxinas. Cabe destacar que esto no es una regla general, ya que puede haber presencia de aflatoxinas aun cuando no se detecten mohos en las muestras (Muñoz *et al.*, 2015).

En las 10 muestras de zacate de maíz provenientes del Valle del Mezquital se determinó un rango de concentración de aflatoxinas totales de 1.56 a 22.61 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Figura 15). Considerando lo que establece la normatividad mexicana (NOM-188-SSA1-2002), el resultado promedio obtenido de la muestra ZM4 es superior a los límites permisibles que establece la norma.

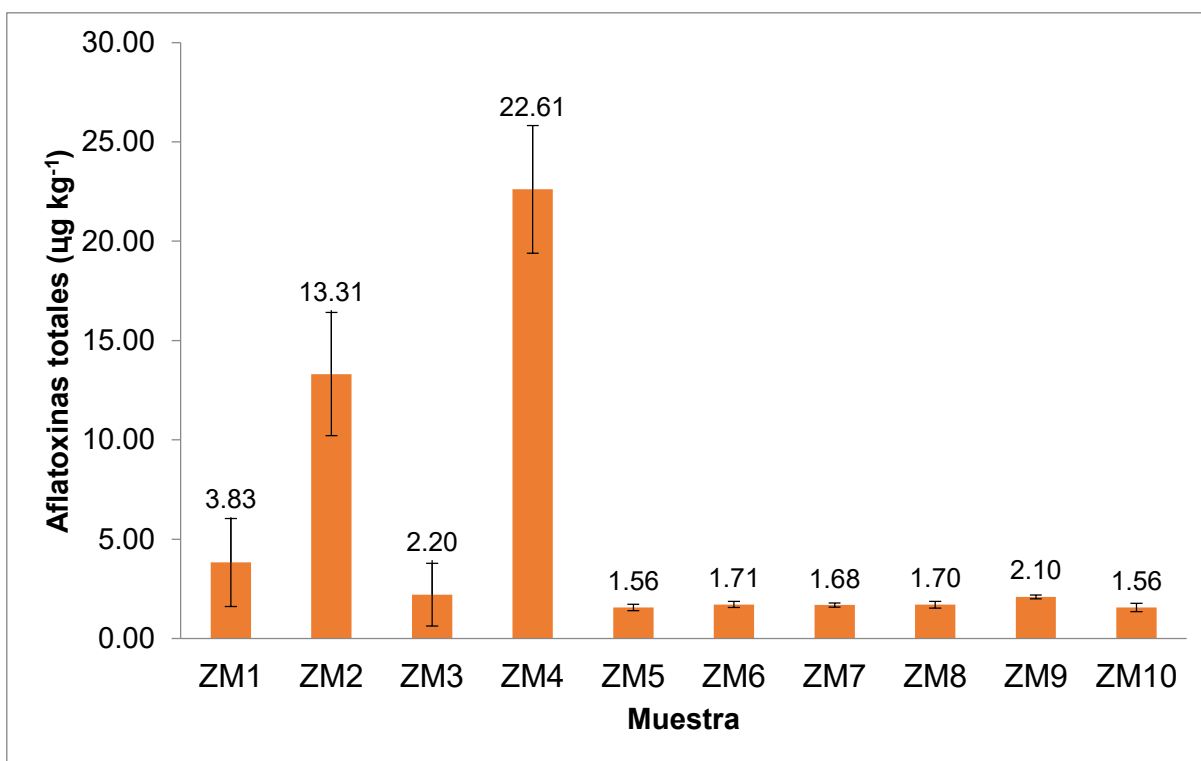


Figura 15. Concentración de aflatoxinas totales de las 10 muestras de alimento zacate de maíz, provenientes del Valle del Mezquital (ZM). Nivel de confianza ($p=0.05$).

El contenido de aflatoxinas totales obtenidos en las muestras de esta investigación, se relaciona, en algunos casos, al porcentaje de incidencia máxima del género *Aspergillus*.

En un estudio realizado por Lutfullah & Hussain (2012) se cuantificaron aflatoxinas en 6 muestras de grano de maíz, de las cuales 3 presentaron rangos de 13 a 18.5 $\mu\text{g kg}^{-1}$, mientras que las otras 3 muestras presentaron contenidos entre 3-8.5 $\mu\text{g kg}^{-1}$. A partir de esto, se observó que los datos obtenidos en este trabajo son muy cercanos a los reportados.

Adicionalmente, en las 2 muestras de zacate de maíz provenientes del Valle de Tulancingo se cuantificaron concentraciones de aflatoxinas entre 5.61 y 21.35 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Figura 16). Sin embargo, en el análisis microbiológico, no hubo presencia aparente del género *Aspergillus*, por lo que se infiere que en alguna etapa de producción de estas muestras presentaron contaminación con algún género fúngico micotoxigénico y que las condiciones fueron apropiadas para la formación de toxinas.

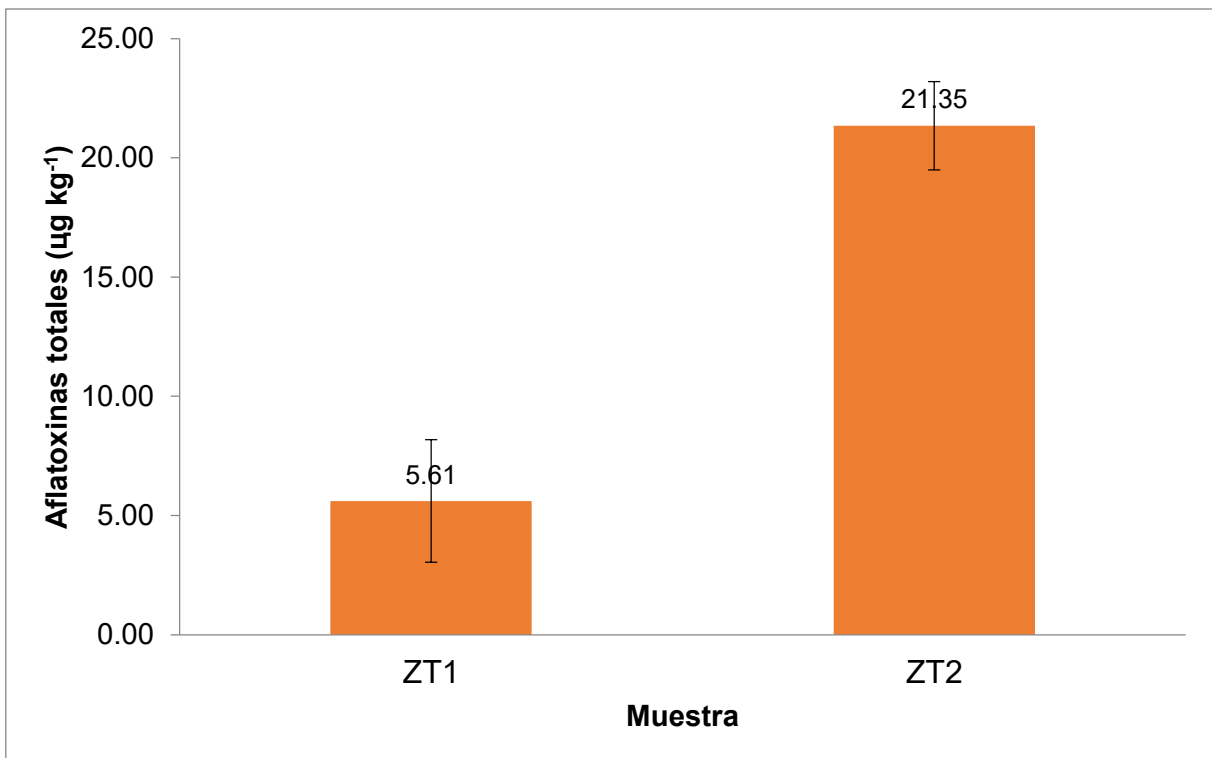


Figura 16. Concentración de aflatoxinas totales de las 2 muestras de alimento zacate de maíz, provenientes del Valle de Tulancingo (ZT). Nivel de confianza ($p=0.05$).

Los valores obtenidos para las muestras analizadas en este estudio son muy similares a los reportados por Reyes y colaboradores (2009), quienes determinaron concentraciones de aflatoxinas totales en alimento destinado a consumo animal de 8 municipios de Jalisco, México; los rangos encontrados fueron de 5.99 a 22.04 $\mu\text{g kg}^{-1}$; además, de las 40 muestras analizadas, sólo 3 de ellas sobrepasaron los niveles superiores permitidos por la legislación mexicana.

Existen diversos métodos para la prevención de la formación de micotoxinas. El grado de contaminación por mohos y la producción de aflatoxinas van a depender de las condiciones de cultivo: la cosecha previa, el cultivo del suelo, la variedad del cereal, el tiempo de siembra, las condiciones climáticas, el uso de fungicidas, el tiempo de cosecha y las condiciones de almacenamiento son factores agrícolas que pueden controlarse y ajustarse para evitar el crecimiento de mohos toxigénicos, que a su vez, producen micotoxinas (Pettersson, 2004). Sin embargo, a través de los años, ha sido difícil implementar condiciones que eviten el crecimiento de mohos en su totalidad.

De forma general, las concentraciones de aflatoxinas totales de los alimentos para ganado (concentrados y zacates de maíz) son elevadas y en algunos casos sobrepasan límites establecidos por la normatividad mexicana. Países como Filipinas, El Salvador, Estados Unidos, Israel y Japón, establecen los mismos límites permisibles ($20 \mu\text{g kg}^{-1}$) para aflatoxinas en alimentos destinados para consumo animal (FAO, 2003). Tomando en cuenta este límite, las muestras que lo sobrepasan son las de zacate de maíz, el 10% para las que provienen del Valle del Mezquital y el 50% para las del Valle de Tulancingo.

La Comunidad Europea es más estricta en el marco normativo, ya que establece como límite máximo permisible $4 \mu\text{g kg}^{-1}$ de aflatoxinas totales (CONTAM, 2007); por lo que, considerando esta normativa, tanto el alimento concentrado como el zacate de maíz presentan contenidos superiores al máximo permisible. Los porcentajes de muestras contaminadas fueron: 31 % para concentrados del Valle del Mezquital, 80% para concentrados del Valle de Tulancingo, 20% para zacate de maíz del Valle del Mezquital y 100% para el zacate de maíz del Valle de Tulancingo.

De forma general, las muestras analizadas se encontraron dentro de los límites establecidos en el marco normativo de México; sin embargo, el riesgo no depende 100% de la concentración de aflatoxinas; ya que estas toxinas son bioacumulativas y una exposición prolongada puede crear efectos nocivos en los animales como: reducción en la productividad animal, aumento del número de enfermedades, por el carácter inmunosupresor de las toxinas y daño a los órganos vitales (García, 2016).

5.2.2 Leche

Aunado a la cuantificación de aflatoxinas totales en alimento para ganado (concentrado y zacate de maíz); se determinaron aflatoxinas totales en 10 muestras de leche provenientes del Valle del Mezquital y 4 del Valle de Tulancingo.

En la Figura 17 se muestran los resultados obtenidos de la cuantificación de aflatoxinas totales, presentando una concentración mínima de $6 \mu\text{g L}^{-1}$ y una máxima de $25 \mu\text{g L}^{-1}$.

En México existen 2 normas que regulan el contenido máximo permitido de aflatoxina M1, para leche pasteurizada de vaca (NOM-091-SSA1-1994) y para leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos (NOM 243-SSA1-2010), las cuales establecen concentraciones máximas de $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$ y $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Por lo que, las concentraciones obtenidas en esta investigación fueron elevadas y sobrepasan los límites permitidos en ambas normas.

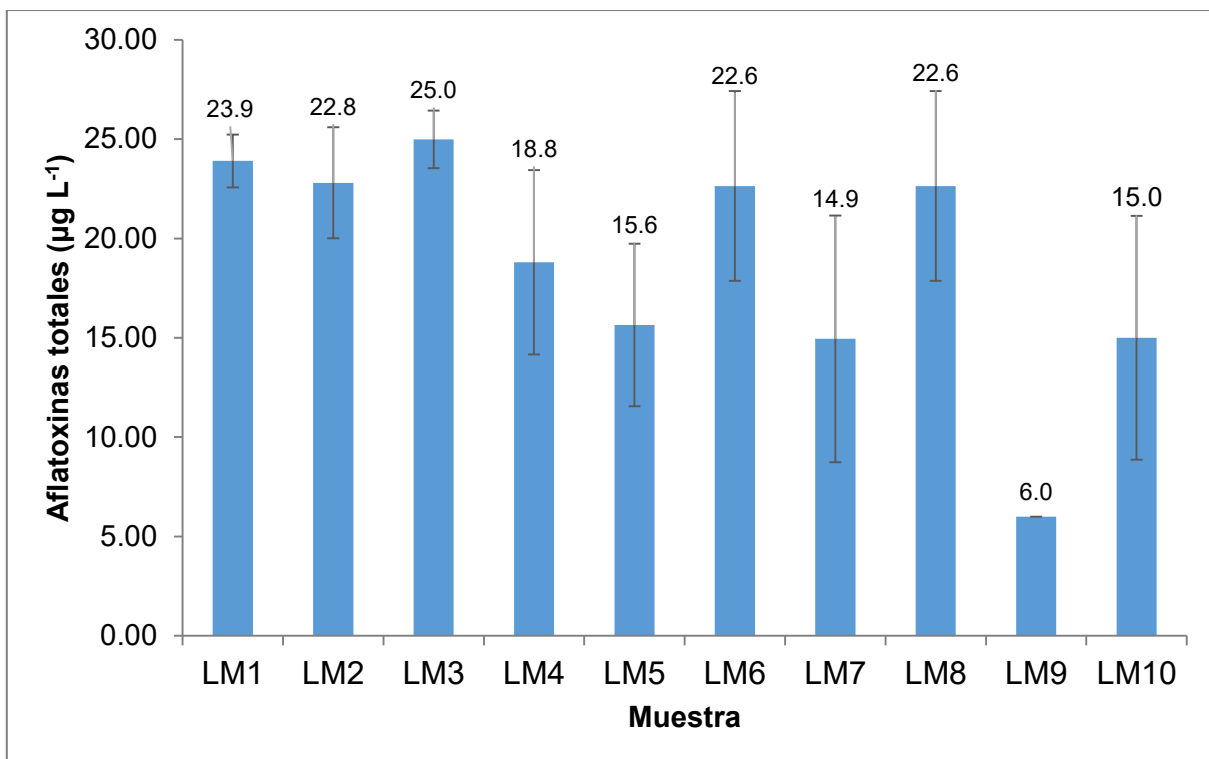


Figura 17. Concentración de aflatoxinas totales de 10 muestras de leche, provenientes del Valle del Mezquital (LM). Nivel de confianza ($p=0.05$).

La alta concentración de aflatoxinas presentes en las muestras de leche provenientes del Valle del Mezquital, pueden deberse a las malas prácticas de manufactura durante la producción de los piensos para ganado. Aunado a lo anterior, cabe mencionar que las condiciones climáticas de la propia zona geográfica donde está ubicada dicha comunidad son aptas para el crecimiento de hongos micotoxigénicos productores de toxinas como *Aspergillus flavus*, el principal productor de la aflatoxina B1.

Un estudio realizado por Rodríguez y colaboradores (2003), en cuencas lecheras ubicadas en la provincia de León, España, reportó concentraciones de aflatoxinas entre $0.0205 \mu\text{g L}^{-1}$ y $0.005 \mu\text{g L}^{-1}$, por lo que las concentraciones de aflatoxina M1 detectadas en las muestras fueron más bajas que los límites máximos establecidos por la Unión Europea, es decir, 0.05 mg L^{-1} referente a la normatividad de su país (Reglamento 98/1525/CE). La diferencia entre los resultados obtenidos en el

presente estudio y el estudio mencionado muy probablemente se debe a que las condiciones climáticas y de almacenamiento de los piensos son distintas para ambos casos, cabe mencionar que los parámetros de calidad en España son mas rigurosos, y a su vez existe un mayor control para este tipo de toxinas.

Las concentraciones de aflatoxinas totales de las 4 muestras de leche provenientes del Valle de Tulancingo se presentan en la Figura 18, en la que el 50% de las muestras analizadas sobrepasan las concentraciones límites permisibles en leche que establece la normatividad mexicana; siendo las muestras LT1 y LT2, con concentraciones de $21.9 \mu\text{g L}^{-1}$ y $24.2 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

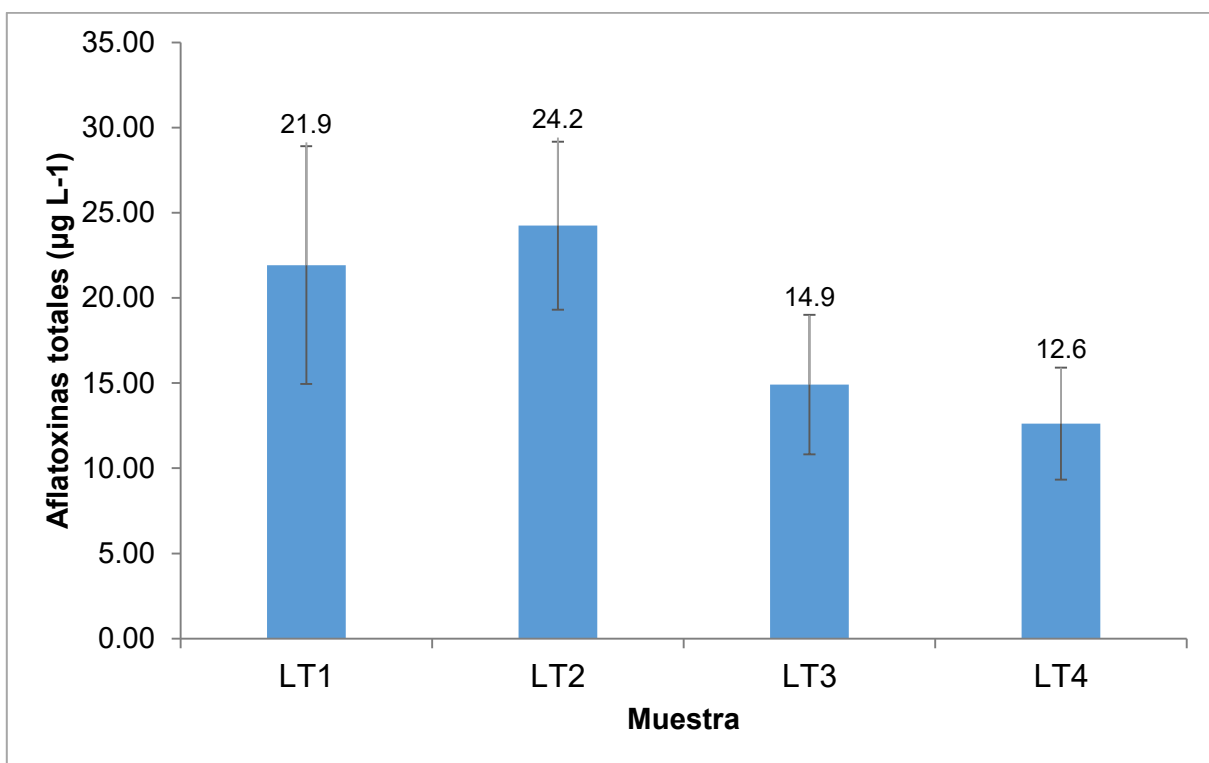


Figura 18. Concentración de aflatoxinas totales de 4 muestras de leche, provenientes del Valle de Tulancingo (LT). Nivel de confianza ($p=0.05$).

En una investigación realizada por Gizachew *et al.* (2016), se analizaron 100 muestras de leche cruda proveniente de Addis Ababa, Etiopía, en todas se observó presencia de aflatoxina M1, donde la más contaminada mostraba una concentración de $4.98 \mu\text{g L}^{-1}$ y la menos de $0.028 \mu\text{g L}^{-1}$. Estos datos, discrepan con los obtenidos

en esta investigación, ya que las muestras resultaron muy contaminadas y en algunos casos sobrepasan los límites establecidos.

Las condiciones climáticas del lugar donde se obtuvieron las muestras de leche para este estudio, pudieron haber influido en la producción de aflatoxinas presentes en el alimento para ganado y que a su vez se metabolizaron al ser consumidas por los animales, ya que el Valle de Tulancingo y el Valle del Mezquital presentan climas secos y templados subhúmedos (INEGI, 2018).

Dichas temperaturas pueden ser un parámetro importante asociado a la presencia de aflatoxinas de acuerdo a Peña-Rodas (2018) quien considera que la incidencia en la contaminación fúngica del alimento destinado a la alimentación de vacas lecheras y en los contenidos de aflatoxina M1 en leche podrían estar relacionados con la sequía y periodos cálidos de donde fueron obtenidas sus muestras de estudio.

Por otro lado, de acuerdo con los resultados obtenidos en esta investigación, la concentración de aflatoxinas presentes en el alimento destinado a consumo animal no fue muy superior a lo que establece la normatividad mexicana, a diferencia de la concentración de aflatoxinas encontradas en las muestras de leche analizadas. Esto puede atribuirse a que el zacate de maíz y los alimentos concentrados, pueden no haber sido la única fuente de alimentación. Otros sustratos, como granos o diversos tipos de piensos, pueden haber contribuido a obtener concentraciones elevadas de aflatoxinas en leche.

Como se explicó con anterioridad, si el ganado está expuesto constantemente al consumo de aflatoxinas, estas se bioacumulan y son secretadas, tanto en leche como en tejidos (García, 2016).

Todas las muestras de leche analizadas presentaron contaminación por aflatoxinas totales, además, sobrepasan los límites establecidos por las normas mexicanas. Por ello, es importante considerar los riesgos sobre consumo de leche y derivados contaminados por aflatoxinas, puesto que la ingesta de dichas toxinas causan daños a la salud humana (Guzmán-de-Peña & Peña-Cabriales, 2005).

5.3 Análisis proximal

Una vez realizados los análisis microbiológicos y de cuantificación de aflatoxinas, se llevó a cabo un análisis proximal, para determinar si la composición química de los alimentos destinados a consumo animal (concentrados y zacates) pudo haber influido en el crecimiento de mohos productores de aflatoxinas.

Los resultados obtenidos de la composición química de los alimentos para ganado (concentrados y zacates) se muestran en la Tabla 11.

De acuerdo con un estudio realizado por Balocchi, Pulido & Fernández (2002) se realizó un análisis proximal a un alimento concentrado donde se obtuvieron porcentajes de humedad, extracto etéreo, cenizas, fibra cruda y proteína de 11.4, 3.50, 6.07, 8.12 y 14.3% respectivamente. Los datos reportados en ese estudio son muy similares a los obtenidos de las muestras provenientes del Valle del Mezquital y Valle de Tulancingo. Los datos pueden variar dependiendo de las materias primas con las que el alimento concentrado se elaboró.

Tabla 11. Porcentajes mínimos y máximos de la composición química de las muestras de alimento para ganado (concentrado y zacate de maíz).

Parámetro	Concentrado		Zacate de maíz	
	% Mín.±SD	% Máx.±SD	% Mín.±SD	% Máx.±SD
Humedad	6.98±0.21	11.89±0.29	3.74±0.19	25.53±0.05
Extracto etéreo	1.05±0.05	4.39±0.07	0.39±0.04	2.02±0.13
Ceniza	3.47±0.16	13.83±1.39	6.48±0.26	12.01±0.25
Fibra cruda	3.25±0.36	24.96±6.12	18.54±0.40	51.06±2.40
Proteína	5.42±0.23	19.89±1.63	1.97±0.14	12.30±1.42

*SD= Desviación estándar.

Por otro lado, Herrera y colaboradores (2015) determinaron la composición química de un alimento de zacate de maíz, donde se obtuvieron porcentajes de humedad, extracto etéreo, cenizas, fibra cruda y proteína de 9.79, 1.53, 6.87, 57.26 y 4.05%, respectivamente. A pesar de que se desconocen las condiciones y cuidados que se le tuvo al cultivo del maíz, puede ser un factor que influya en su composición

química. Al igual que en las muestras de concentrado, se puede considerar que no hay diferencia entre los resultados obtenidos y reportados, a excepción del parámetro de humedad, el cual presenta un porcentaje elevado (25%), lo que puede ser un factor determinante para favorecer el crecimiento de mohos toxigénicos productores de aflatoxinas. La variación entre resultados puede deberse a que la composición de cada alimento sea diferente en cada país.

5.4 Relación entre la composición química del alimento para ganado y la incidencia de mohos aflatoxigénicos

A partir de la composición química de los alimentos para ganado (concentrado y zacate de maíz) se puede saber si estos poseen los nutrimentos necesarios para que mohos aflatoxigénicos se desarrollen óptimamente y haya más probabilidad de que produzcan aflatoxinas, si se conjunta con otros factores necesarios para ellos (temperatura y humedad relativa).

Es importante mencionar que la humedad y la actividad de agua (A_w) del alimento son algunos de los factores más importantes en el crecimiento de mohos. A partir de A_w de 0.70 a 0.85, existe crecimiento de mohos, sin embargo, la producción de aflatoxinas es nula o muy baja con A_w inferiores a 0.85. Adicionalmente, con porcentajes de humedad relativa de 13 a 16% existe proliferación fúngica (Gimeno, 2002).

Las muestras a evaluar en este estudio presentaron un porcentaje de humedad máximo óptimo para el desarrollo de mohos toxigénicos (concentrados 11.89% y zacates de maíz 25.53%). Debido a que las muestras se mantuvieron en ultracongelación, no fue posible determinar la A_w , ya que es un parámetro que se ve afectado por la temperatura (Petzold & Aguilera, 2009).

Los nutrientes minerales están relacionados con el crecimiento de mohos y producción de micotoxinas, ya que requieren minerales como zinc, hierro y cobre. La falta de alguno de éstos, da como resultado un pobre crecimiento fúngico. En el caso de las aflatoxinas, son necesarios sustratos ricos en zinc y aminoácidos (como la prolina) para que el género *Aspergillus flavus* metabolice las aflatoxinas (Gimeno, 2002).

Si bien, no se realizó un estudio para determinar qué elementos minerales se encontraban en los alimentos para ganado (concentrados y zacates de maíz), se obtuvieron porcentajes elevados de ceniza (13.83 y 12.01% respectivamente), donde existe la probabilidad de que dichos elementos se encuentren presentes; ya que tanto la incidencia del moho *Aspergillus* y la producción de aflatoxina fue evidente, aunque se requieren de una combinación de factores no solo minerales.

La presencia de mohos toxigénicos y la producción de aflatoxinas está relacionada por varios parámetros como: las condiciones de almacenamiento, composición química, naturaleza y origen de la muestra. Las malas prácticas de manufactura de la muestra son factores que pueden corregirse para disminuir la contaminación por aflatoxinas y a su vez, cumplan con los límites establecidos por la normatividad mexicana.

6. CONCLUSIONES

Las muestras de alimento para ganado analizadas presentaron altos niveles de contaminación fúngica, provocando un riesgo para la salud humana y animal.

Las condiciones ambientales de las zonas estudiadas, así como las prácticas agrícolas y de manufactura del alimento para ganado estudiado, son propicias para el crecimiento de mohos y para la formación de micotoxinas en estas matrices.

La leche se ve afectada por la calidad del alimento destinado al ganado, ya que presentó contaminación por aflatoxinas, relacionada con la micoflora presente.

Los concentrados y zacates de maíz utilizados como alimento para ganado de las cuencas estudiadas mostraron características químicas adecuadas para el crecimiento de mohos potencialmente toxigénicos, por lo que el manejo apropiado durante su producción y almacenamiento es indispensable para minimizar la presencia de estos microorganismos.

El consumo de las muestras analizadas representa un riesgo para humanos y animales, puesto que una exposición prolongada a estas toxinas propicia la aparición de diversos padecimientos y disminuye la productividad animal.

REFERENCIAS

- Alpizar, C. (2015). Presencia de hongos y contaminación con micotoxinas en ensilajes para alimentación de rumiantes. *Revista de Ciencias Veterinarias*, 3, 7-31. doi:10.15359/rcv.33-1.1
- Arroyo M., N., Huertas P., J. F., Gámiz G., L. & García C., A. M. (2014). *Control de micotoxinas en alimentos*. Boletín GRASEQA, Granada. Obtenido de http://www.ugr.es/~fqm302/media/pdf/BOLETIN%20GRASEQA_7_2014.pdf
- Balocchi L., O., Pulido F., R. & Fernández V., J. (2002). Comportamiento de vacas lecheras en pastoreo con y sin suplementación con concentrado. *Agricultura Técnica*, 62(1), 87-98. doi: 10.4067/S0365-28072002000100009.
- Barkai-Golan, R. (2008). Aspergillus Mycotoxins. En R. Barkai-Golan, & N. Paster (Edits.), *Mycotoxins in Fruits and Vegetables* (págs. 117-118).USA: Academic Press.
- Bennett, J. W. & Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3), 497-516. doi:10.1128/CMR.16.3.497-516.2003
- Bonifaz T., A. (2012). Hongos Contaminantes. En *Micología médica básica* (Cuarta ed., págs. 68-74). México: McGraw Hill México.
- Bonifaz T., A. (2012). Micotoxicosis y micetismo. En *Micología médica básica* (Cuarta ed., págs. 557-558). México: McGraw Hill México.
- Capelli Micheltorena, M. A. (2014). *Determinación de aflatoxinas totales en alimentos destinados al consumo de vacas lecheras y aflatoxina M1 en leche*. (Tesis doctoral, Universidad de la República). Recuperado de <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/123456789/10397/1/FV-30911.pdf>
- Caro Jara, N. E. (2015). *Caracterización de especies de Fusarium aisladas de trigo nacional respecto a su capacidad micotoxigénica*. (Tesis de maestría, Universidad de Concepción) Recuperado de http://repositorio.udec.cl/bitstream/handle/11594/2427/Tesis_Caracterizacion_de_Especies_de_Fusarium.Image.Marked.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

- Carrillo, L. (2003). *Fusarium*. Universidad Nacional de Salta. Obtenido de <https://www.yumpu.com/es/document/view/11997728/6-fusarium/3>
- Castellari, C. C., Cendoya, M. G., Marcos Valle, F. J., Barrera, V. & Pacin, A. M. (2015). Factores extrínsecos e intrínsecos asociados poblaciones fúngicas micotoxigénicas de granos de maíz (*Zea mays* L.) almacenados en silos bolsa en Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(4), 350-359. doi:10.1016/j.ram.2015.08.003
- CONTAM (The Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain). (2007). Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pis. *The EFSA Journal*, 446, 1-127.
- Coppock, R. W., Christian, R. G. & Jacobsen, B. J. (2018). Chapter 69. Aflatoxins. En *Veterinary Toxicology. Basic and Clinical Principles* (Third ed., págs. 983-994). USA: Academic Press.
- Dashti, B., Al-Hamli, S., Alomirah, H., Al-Zenki, S., Bu Abbas, A. & 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(7), 686-690. doi:10.1016/j.foodcont.2009.01.001
- Eaton, D. L. & Groopman, J. D. (1994). Acute hepatotoxicity of aflatoxins. En *The toxicology of aflatoxins* (págs. 3-20). Baltimore, MD.: Academic Press Inc.
- Ellis, W. O., Smith, J. P., Simpson, B. K., Oldham, J. H. & Scott, P. M. (2009). Aflatoxins in food: Occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control. *Food Science and Nutrition*, 30(3), 403-439.
- FAO. (2003). Niveles máximos tolerados para las micotoxinas en los alimentos, en los productos lácteos y en las raciones animales. En *Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones en el año 2003*. Recuperado de <http://www.fao.org/docrep/007/y5499s/y5499s0g.htm>

- Filazi, A. & Sireli, T. U. (2013). Occurrence of Aflatoxins in Food. En *Aflatoxins - Recent Advances and Future Prospects*. En M. Razzaghi-Abyaneh (Ed.). InTech.
- Fleurat-Lessard, F. (2017). Integrated management of the risks of stored grain spoilage by seedborne fungi and contamination by storage mould mycotoxins. *Journal of Stored Products Research*, 71, 22-40. doi: 10.1016/j.jspr.2016.10.002
- Flores, C. M., Hernández, L. B., Urzua, M. A. & Pineda, A. (2014). Métodos de análisis de micotoxinas en granos y alimentos de uso pecuario *Entorno Ganadero*. Recuperado de <http://bmeditores.mx/metodos-de-analisis-de-micotoxinas-en-granos-y-alimentos-de-uso-pecuario/>
- García Fonseca, S. (2016). *Química supramolecular del estado líquido: disolventes nanoestructurados para la extracción de micotoxinas en productos agroalimentarios*. (Tesis doctoral, Universidad de Córdoba). Recuperado de <https://helvia.uco.es/handle/10396/13840>
- Gavrilova, M. A., Slepchenko, G. B., Mikheeva, E. V. & Derybina, V. I. (2014). Voltammetric determination of aflatoxin B1. *Procedia Chemistry*, 10, 114-119. doi:10.1016/j.proche.2014.10.021
- Gimeno, A. (2002). Principales factores condicionantes para el desarrollo de los hongos y la producción de micotoxinas. En *Los Hongos y las Micotoxinas en la Alimentación Animal; Conceptos, Problemas, Control y Recomendaciones*. Miami: Albéitar.
- Gimeno, A. (2005). Aflatoxina M1 en la Leche. Riesgos para la Salud Pública, Prevención y Control. Recuperado de http://www.adiveter.com/ftp_public/articulo1790.pdf
- Gizachew, D., Szonyi, B., Tegegne, A., Hanson, J. & Grace, D. (2016). Aflatoxin contamination of milk and dairy feeds in the Greater Addis Ababa milk shed, Ethiopia. *Food Control*, 59, 773-779. doi:10.1016/j.foodcont.2015.06.060

- Guzmán-de-Peña, D. & Peña-Cabriales, J. J. (2005). Regulatory considerations of aflatoxin contamination of food in Mexico. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 47(3), 160-164.
- Hassan, Z. U., Al-Thani, R., Atia, F. A., Almeer, S., Balmas, V., Migheli, Q., & Jaoua, S. (2018). Evidence of low levels of aflatoxin M1 in milk and dairy products marketed in Qatar. *Food Control*, 92, 25-29. doi:10.1016/j.foodcont.2018.04.038
- Hernández-Delgado., S., Reyes-López., M. Á., García-Olivares., J. G. & Mayek-Pérez., N. (2007). Incidencia de Hongos Potencialmente Toxígenos en Maíz (*Zea mays* L.) Almacenado y Cultivado en el Norte de Tamaulipas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 25(2), 127-133.
- Herrera V., J. M., García L., P. M., Rodríguez M., R., Isaac V., M., Ruíz L., M. A. & Zamora N., J. F. (2015). Caracterización nutricional de un ensilado de lupino (*Lupinus rotundiflorus*) con rastrojo de maíz y efecto de su inclusión en dietas para borregos pelibuey. *Interciencia*, 40(5), 337-342.
- Hsieh, D., Lin, M., Yao, R. & Singh, R. (1976). Biosynthesis of aflatoxin: conversion of norsolonic acid and other hypothetical intermediates into aflatoxin B1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24, 1170-1176.
- Hussein, H. S. & Brasel, J. M. (2001). Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 167(2), 101-134.
- ICC (The International Association for Cereal Science and Technology). (1980). *Determination of the fungus germ count (plate count methods) in cereals, cereals products, and animal feed. General Principles of the available ICC Standards Methods*. ICC standard No. 134. Recuperado de <https://www.icc.or.at/publications/icc-standards/standards-overview/134-determination-of-the-fungus-germ-count-plate-count-method-in-cereals,-cereal-products,-and-animal-feed>
- Iha, M. H., Baltazar, C., Akemi, I. & Trucksess, M. W. (2013). Aflatoxin M1 in milk and distribution and stability of aflatoxin M1 during production and storage of

- yoghurt and cheese. *Food Control*, 29, 1-6. doi: 10.1016/j.foodcont.2012.05.058
- INEGI. (2018). *Hidalgo. Clima*. Obtenido de Información por entidad: <http://cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/hgo/territorio/clima.aspx?tema=me&e=13>
- INSHT (Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo). (2012). Recuperado de <http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas%20de%20agentes%20biologicos/Fichas/Hongos/Ficha%20Aspergillus%20spp.pdf>
- INSHT (Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo). (2014). Recuperado de www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/.../Fichas/Alter%20spp.pdf
- Ismail, A., Goncalves, B. L., de Neeff, D. V., Ponzilacqua, B., Coppa, C., Hintzsche, H., Sajid M., Cruz, A., Corassin, C. H. & Oliveira, C. (2018). Aflatoxin in foodstuffs: Occurrence and recent advances in decontamination. *Food Research International*, 113, 74-85. doi: 10.1016/j.foodres.2018.06.067
- Kamika, I., Ngbolua, K.-t.-N., & Tekere, M. (2016). Occurrence of aflatoxin contamination in maize throughout the supply chain in the Democratic Republic of Congo. *Food Control*, 69, 292-296.
- Klich, M. A. (2007). *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. *Molecular Plant Pathology*, 8(6), 713-722. doi:10.1111/J.1364-3703.2007.00436.X
- Larone, D. H. (1987). Saprophytes and contaminants. En D. H. Larone, *Medically important fungi. A guide to identification* (Segunda ed., págs. 138-169). New York: Elsevier.
- Londoño-Cifuentes., E. M. & Martínez-Miranda., M. M. (2017). Aflatoxinas en alimentos y exposición dietaria como factor de riesgo para el carcinoma hepatocelular. *Revista Biosalud*, 16(1), 53-66. doi: 10.17151/biosa.2017.16.1.7

- Luo, Y., Liu, X. & Li, J. (2018). Updating techniques on controlling mycotoxins - A review. *Food Control*, 89, 123-132. doi:10.1016/j.foodcont.2018.01.016
- Lutfullah, G. & Hussain, A. (2012). Studies on contamination level of aflatoxins in some cereals and beans of Pakistan. *Food Control*, 23(1), 32-36. doi: 10.1016/j.foodcont.2011.06.004
- Maragos, C. M. (2004). Emerging Technologies for Mycotoxin Detection. *Journal of Toxicology. Toxin Reviews*, 23(2 & 3), 317-344. doi: 10.1081/TXR-200027859
- Martínez , M. M., Vargas del Río, L. M. & Gómez, V. M. (2013). Aflatoxinas: Incidencia, impactos en la salud, control y prevención. *Biosalud*, 12(2), 89-109. Recuperado de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1657-95502013000200008
- Martínez L., M. R., & Anadón N., A. (2012). Micotoxinas. En A. M. Cameán Fernández & M. Repetto Jiménez, *Toxicología alimentaria* (pág. 294). Madrid: Díaz de Santos.
- Martínez P., H. Y., Hernández D., S., Reyes M., C. A. & Vázquez C., G. (2013). El Género *Aspergillus* y sus Micotoxinas en Maíz en México: Problemática y Perspectivas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 31(2), 126-146. Recuperado de <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v31n2/v31n2a5.pdf>
- Méndez-Albores, J. A., Arámbula-Villa, G., Loarca-Piña, M. G., González-Hernández, J., Castaño-Tostado, E. & Moreno-Martínez, E. (2004a). Aflatoxins' fate during the nixtamalization of contaminated maize by two tortilla-making processes. *Journal of Stored Products Research*, 40(1), 87-94. doi: 10.1016/S0022-474X(02)00080-2
- Méndez-Albores, J. A., Arámbula-Villa, G., Preciado-Ortíz, R. E. & Moreno-Martínez, E. (2004b). Aflatoxins in pozol, a nixtamalized, maize-based food. *International Journal of Food Microbiology*, 94(2), 211-215. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.02.009

- Moreno, E. (1988). *Manual para la identificación de hongos en granos y sus derivados*. México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Moss, M. O. (2003). Aflatoxins. En B. Caballero, L. Trugo & P. M. Finglas (Edits.), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (Segunda ed., Vol. 1, págs. 66-72).USA: Elsevier Science Ltd.
- Muñoz, D. J., Rodríguez, R., Mota, J. J. & Suárez, L. R. (2015). Aislamiento e identificación de hongos filamentosos en alimentos concentrados para mascotas domésticas (perros y gatos). *Revista Científica*, 25(6), 432-438. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=95944009003>
- NGFA (National Grain and Feed Association). (2011). *FDA-Mycotoxin Regulatory Guidance*. USA: NGFA.
- Neme, K. & Mohammed, A. (2017). Mycotoxin occurrence in grains and the role of postharvest management as a mitigation strategies. *Food Control*, 78, 412-425. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.03.012>
- Norma Oficial Mexicana NOM-091-SSA1-1994. *Bienes y servicios. Leche pasteurizada de vaca. Disposiciones y especificaciones sanitarias*. Secretaría de Salud, Diario Oficial de la Federación, México, D.F.
- Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994. *Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos*. Secretaría de Salud, Diario Oficial de la Federación, México, D.F.
- Norma Oficial Mexicana NOM-188-SSA1-2002. *Productos y Servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones sanitarias*. Secretaría de Salud, Diario Oficial de la Federación, México, D.F.
- Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010. *Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba*. Secretaría de Salud, Diario Oficial de la Federación.
- Ocampo, I. O. (2006). *Estudio de la microflora y contenido de aflatoxinas de cebada cultivada en Tlanalapa, hidalgo*. (Tesis, Universidad Autónoma del Estado de

Hidalgo). Recuperado de
<http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/bibliotecadigital/handle/231104/1838>

Official Methods of Analysis of AOAC International. (2016). W. Horwitz & G. W. Latimer, Edits. (18th Ed.). Rockville, MD: AOAC International.

Osorno D., C. (2015). Kit ELISA para micotoxinas. En *Estandarización y evaluación de un método para la determinación de micotoxinas por medio de la técnica fotométrica (Kit ELISA) a materias primas de avicultura en la industria de alimentos para animales CIPA S.A* (págs. 64-65). Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira.

Pavón M., M. Á., González A., I., Martín, R. & García Lacarra, T. (2012). Importancia del género *Alternaria* como productor de micotoxinas y agente causal de enfermedades humanas. *Nutrición Hospitalaria*, 27(6), 1772-1781. doi: 10.3305/nh.2012.27.6.6017

Peña-Rodas, O., Martínez-López, R. & Hernández-Rauda, R. (2018). Occurrence of Aflatoxin M1 in cow milk in El Salvador: Results from a two year survey. *Toxicology Reports*, 5, 671-678. doi:10.1016/j.toxrep.2018.06.004

Pérez, J., Gutiérrez, R., Vega, S., Díaz, G., Urbán, G., Coronado, M. & Escobar, A. (2008). Ocurrencia de aflatoxina M1 en leches cruda, ultrapasteurizada y orgánica producidas y comercializadas en el altiplano mexicano. *Salud Animal*, 30(2), 103-109.

Peromingo, B., Rodríguez, A., Bernáldez, V., Delgado, J. & Rodríguez, M. (2016). Effect of temperature and water activity on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* on cured meat model systems. *Meat Science*, 122, 76-83. doi:10.1016/j.meatsci.2016.07.024

Pettersson, H. (2004). Chapter 11. Mycotoxin contamination of animal feed. En N. Magan, & M. Olsen, *Mycotoxins in food. Detection and control* (Primera ed., págs. 233-270). Cambridge: Woodhead Publishing.

- Petzold, G. & Aguilera, J. M. (2009). Ice Morphology: Fundamentals and Technological Applications in Foods. *Food Biophysics*, 4, 378-396. doi:10.1007/s11483-009-9136-5
- Pizzolato, F., Anater, A., Burchard, J. F., Bittencourt, F., Meca, G., Manyes, L. & Turra, C. (2018). Mycotoxins in dry-cured meats: A review. *Food and Chemical Toxicology*, 111, 494-502. doi:10.1016/j.fct.2017.12.008
- Prandini, A., Tansini, G., Sígolo, S., Filippi, L., Laporta, M. & Piva, G. (2009). On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 984-991. doi:10.1016/j.fct.2007.10.005
- Prats, G. (2006). Capítulo 5. Micología. En *Microbiología Clínica* (págs. 83-84). Barcelona: Médica Panamericana.
- Repetto J., M. & Repetto K., G. (2009). Sistemáticas analíticas toxicológicas. En *Toxicología fundamental* (Cuarta ed., pág. 541). Madrid: Díaz de Santos.
- Reyes V., W., Martínez, S. P., Isaías E., V. H., Nathal V., M. A., De Lucas P., E. & Rojo, F. (2009). Aflatoxinas totales en raciones de bovinos y AFM1 en leche cruda obtenida en establos del estado de Jalisco, México. *Técnica Pecuaria en México*, 47(2), 223-230.
- Reyes, W., Patricio, S., Pereyra, C., González, M. L., Cavaglieri, L., & Dalcerro, A. (2015). Aflatoxinas, Deoxinivalenol y Zearalenona en rastrojo de maíz cosechado en Tepatitlán, Jalisco, México. *Revista Bio Ciencias*, 4(1), 3-14.
- Rodríguez, M. L., Calonge, M. M. & Ordóñez, D. (2003). ELISA and HPLC determination of the occurrence of aflatoxin M1 in raw cow's milk. *Food Additives and Contaminants*, 20(3), 276-280. doi: 10.1080/0265203021000045208
- Rodríguez-Tudela, J. L. & Aviles, P. (1991). Improved Adhesive Method for Microscopic Examination of Fungi in Culture. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(11), 2604-2605.

- Ruíz R., J. L., Gutiérrez T., R., Orantes Z., M. A., & Manzur C., A. (2017). Contaminación por micotoxinas de la leche y derivados lácteos. *Quehacer Científico en Chiapas*, 12(1), 90-103.
- Samson, R. A., Hoekstra, E. S., Frisvad, J. C., & Filtenborg, O. (2000). *Introduction to Food and Airborne Fungi*. Wageningen, The Netherlands: Editorial CBS. 6th edition.
- Sandoval C., G. J. (2013). Aflatoxinas. En *Determinación de aflatoxinas totales, por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), en matriz de cereales: maíz y cebada*. Quito: Universidad Central del Ecuador.
- Santibáñez, R., Hernández, M., Montañez, O. D., Tapia, J. M., Martínez, J. A. & Avellaneda, J. H. (2011). Identificación y cuantificación de hongos micotoxigénicos en alimentos para bovinos. *Ciencia y Tecnología*, 4(1), 19-23. doi: 10.18779/cyt.v4i1.52
- Sinha, K. K. & Sinha, A. K. (1992). Impact of stored grain pests on seed deterioration and aflatoxin contamination in maize. *Journal of Stored Products Research*, 28(3), 211-219.
- Soriano del Castillo, J. M. (2007). ¿Qué son las micotoxinas? En J. M. Soriano del Castillo, *Micotoxinas en alimentos* (págs. 3-4). España: Díaz de Santos.
- The University of Adelaide. (2016). *Mycology Online*. Recuperado de <http://www.mycology.adelaide.edu.au/descriptions/hyphomycetes/fusarium/>
- Thomma, B. P. (2003). *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology*, 4(4), 225-236. doi: 10.1046/J.1364-3703.2003.00173.X
- Urbán, G., Pérez, J., Martínez, F., Salas, J., Díaz, G., Ramírez, M. L., Castro, G., Vega, S., Gutiérrez, R. & Escobar, A. (2009). Niveles de aflatoxina M1 en quesos frescos producidos en diferentes zonas de México. *Salud Animal*, 31(2), 115-121. Recuperado de <http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v31n2/rsa07209.pdf>

- Urrego N., J. R. & Díaz, G. J. (2006). Aflatoxinas: Mecanismo de toxicidad en la etiología de cáncer hepático celular. *Revista de la Facultad de Medicina de la Universidad de Colombia*, 54(2), 108-116. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/rfmun/v54n2/v54n2a06.pdf>
- Vallejo López, M. J. (2012). Capítulo 2: Materiales y Métodos. En *Determinación de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 presentes en harina de maíz del sector Tumbaco mediante el uso de columnas de inmunoafinidad (IAC) y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)* (pág. 45). Sangolquí: Escuela Politécnica del Ejército.
- Vázquez Z., J. A. (2014). *Contaminación con aflatoxinas en leche cruda y alimento de vacas Suizo Americano en la zona centro de Chiapas*. (Tesis de maestría, Colegio de Postgraduados). Recuperado de http://www.academia.edu/33294791/COLEGIO_DE_POSTGRADUADOS
- Von Arx, J. A. (1981). *The genera of fungi sporulating in pure culture, 3rd. Edition*. Vaduz, Germany: Cramer, J.
- Williams, J. H., Phillips, T. D., Jolly, P. E., Stiles, J. K., Jolly, C. M. & Aggarwal, D. (2004). Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *American Society for Clinical Nutrition*, 80(5), 1112.