

INFORME APROBACIÓN TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Dirección de Posgrado y Pos título de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias que la Tesis de Magíster presentada por el candidato:

CARLOS ABERTO NÚÑEZ POBLETE

Titulada:

Determinación de Aflatoxina M1 en Lecherías de La Región Metropolitana y de Valparaíso de Chile

Ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias, con Mención en Medicina Veterinaria Preventiva en el Examen de Defensa de tesis rendido el día 22 del mes de agosto del año 2018.

COMITÉ DE TESIS

Nota

Firma

Dr. Luis Pablo Hervé Claude

Dra. María Sol Morales Silva

Dra. Javiera Cornejo Kelly

Fuentes de Financiamiento y Departamento:

Laboratorio de Farmacología Veterinaria. Departamento de Ciencias Clínicas Pecuarias. Facultad de Ciencias. Veterinarias y Pecuarias

Biografía

El candidato Carlos Alberto Núñez Poblete, nace en la ciudad de San Bernardo, provincia de Santiago el 27 de abril de 1961, hijo de Sara Poblete Caro y Hernán Núñez Olivares, quien fallece en un accidente de aviación en febrero de 1967.

Cursa sus estudios básicos en la escuela superior de hombres de N° 3 de San Bernardo entre 1967 y 1974, y la enseñanza media en el liceo de hombres de San Bernardo entre 1975 y 1978.

En 1979 ingresa a la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, a la carrera de Medicina Veterinaria, obteniendo el título de Médico Veterinario y Licenciado en Ciencias Pecuarias, en diciembre de 1986, con el trabajo de tesis “Determinación de *Escherichia coli* K99+ en Terneros Neonatos Afectados de Diarrea”, obteniendo la calificación de distinción máxima.

Durante 1987 se desempeña como asesor agrícola municipal en la comuna de Curacaví y administrador técnico de la planta faenadoras de carnes de Melipilla (MAFIRJAZ), permaneciendo en esta última actividad, a jornada parcial, hasta 1994. Desde el inicio de su vida laboral y hasta la fecha se desempeña en la actividad pavadada como asesor predial en la zona central del país, en sistemas de producción de rumiantes, además de impartir docencia en el mismo ámbito en diversas instituciones privadas de educación superior.

En 1989 contrae matrimonio con Carolina González Gutiérrez, con quien tiene a la fecha dos hijos: Nicolás y Catalina.

En 1989 ingresa como profesor, en jornada parcial, al Liceo Politécnico Municipal Melipilla en la recién creada especialidad agropecuaria, funciones similares asume en el Centro Educacional Menesiano de Culipran, también en Melipilla, en 2005, desempeñándose en ambos establecimientos hasta la fecha.

En 2004 ingresa como académico a la Universidad de Chile en la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, en el área de medicina productiva de rumiantes, donde sirve hasta la actualidad. Entre 2005 y 2007, como actividad paralela dentro de la universidad, se desempeña como coordinador docente y profesor de la carrera técnica superior “Sistemas Agropecuarios”, programa creado por el candidato para el Instituto Politécnico de la Universidad de Chile (ITPUCH).

Durante su permanencia como académico en la Universidad de Chile se desempeña como profesor de las asignaturas dictadas por el Departamento de Ciencias Clínicas Pecuarias y como invitado en otros cursos de pre grado. Entre 2011 y 2012, asume la dirección del programa de pos título “Diplomado en Medicina Productiva del Bovino”. Ha participado de los proyectos de investigación y servicio, con financiamiento privado: “Diagnostico y Control de Brucelosis, Leucosis y Tuberculosis (Secotec / GTT Lechero Metropolitano) y “Desarrollo de un Regulador del Metabolismo Energético y Mineral” (Quimivetagro). Además, ha ocupado los cargos de presidente del comité editor de la revista “Tecnovet” (publicación de extensión de Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias), coordinación de la unidad de clínica de rumiantes desde 2009 a la fecha y subdirector del Departamento de Ciencias Clínicas Pecuarias desde 2017 a la fecha.

Durante su vida profesional asiste regularmente actividades de perfeccionamiento en el área disciplinal de medicina productiva de rumiantes y cursos de docencia técnica y superior, mención especial merecen los programas “Diplomado en Salud Animal”, Universidad de Chile, 2005 y “Diplomado en TICs Para Directivos y Profesores” Universidad de los Andes, 2016. Entre 2012 y 2015 cursa la “Especialidad en Reproducción Bovina” en la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Dedicatoria

A mi familia.

A mí también, por haber terminado por fin.

Agradecimientos

A la Dra. Betty San Martín, por haberme ofrecido este tema de tesis, y permitirme retomar el trabajo después de mucho tiempo detenido.

Al Dr. Luis Pablo Hervé por su entusiasmo, voluntad e intensa colaboración como profesor guía en la parte final de este trabajo.

Al personal del laboratorio de farmacología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, a varios que ya no están allí, pero que en su momento fueron de imprescindible ayuda y apoyo.

Al Dr. Aldo Maddaleno por su valiosísima colaboración en el procesamiento de los datos de validación del método.

A los Dres. Carlos Alvear, Valeria Rojas y Mario Duchens por sus consejos en la ejecución de los análisis estadísticos.

A la Srta. Daniela Sepúlveda, por su ayuda en la diagramación e impresión del documento final y sus productos intermedios.

A la Srta. Maite Díaz, ayudante de la cátedra, por su invaluable ayuda en la elaboración de las presentaciones y documento final de esta tesis.

Al Dr. Mendoza, por su compañía desde el mas allá en los periodos de trabajo nocturno en la facultad.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1	INTRODUCCIÓN.....	1
2	REVISION BIBLIOGRAFICA	3
2.1	Los hongos como contaminantes de productos agrícolas	3
2.2	Micotoxinas	4
2.3	Micotoxicosis.....	6
2.4	Aflatoxinas.....	8
2.4.1	Aflatoxinas B1 y M1	9
2.4.2	Metabolismo de aflatoxinas B1 y M1	10
2.5	Efectos patológicos.....	12
2.6	Efectos sobre animales de producción.....	14
2.7	Efectos en el ganado bovino	15
2.8	Efectos clínicos en humanos.....	16
2.9	Reglamentación.....	18
2.10	Aflatoxinas en alimentos de uso animal	19
2.11	Aflatoxina M1 en lácteos de consumo humano.....	21
2.12	Antecedentes nacionales	23
2.13	Métodos de detección de aflatoxinas.....	25
3	HIPOTESIS DE TRABAJO.....	27
4	OBJETIVOS.....	27
4.1	Objetivo general	27
4.2	Objetivos específicos.....	27
5	MATERIAL Y MÉTODO.....	28
5.1	Reactivos	28
5.2	Equipos	28
5.3	Sistema y Condiciones Cromatográficas	28
5.4	Extracción.....	29
5.5	Derivatización	29
5.6	Validación del método	29
5.7	Parámetros de validación	30
5.7.1	Tiempo de retención del analito:	30
5.7.2	Especificidad:	30
5.7.3	Recuperación:	30
5.7.4	Precisión:.....	31
5.7.5	Linealidad:.....	32
5.7.6	Límite de detección y Limite de cuantificación.....	32
5.8	ESTUDIO DE CAMPO	33
5.8.1	Predios en estudio	33
5.8.2	Obtención de Muestras.....	33
5.8.3	Cuantificación de aflatoxina M1.....	33
5.8.4	Análisis estadístico	34
6	RESULTADOS.....	36
6.1	Validación del método	36
6.1.1	Tiempo de retención del analito:	36
6.1.2	Especificidad:	36
6.1.3	Recuperación:	36

6.1.4	Precisión:.....	37
6.1.5	Linealidad:.....	40
6.1.6	Límite de decisión y límite de cuantificación	41
6.2	Cuantificación de AFM1	41
6.2.1	Características generales y estadística descriptiva	42
6.2.2	Análisis univariados.....	48
6.2.3	Análisis multivariante.....	51
7	DISCUSION.....	52
8	CONCLUSIONES.....	59
10	BIBLIOGRAFÍA	60

INDICE DE TABLAS

Tabla 1:	Principales micotoxinas según especies productoras y origen biosintético	4
Tabla 2:	Efectos Patológicos de Micotoxinas	7
Tabla 3:	Intervalos de recuperación aceptados según fracción de masa.	31
Tabla 4:	Coeficientes de variación aceptados según fracción de masa.	32
Tabla 5:	Variables incluidas en la evaluación de niveles de aflatoxinas en leche .	34
Tabla 6:	Porcentaje de Recuperación de AFM1 en leche analizada por HPLC- Fluorescencia	37
Tabla 7:	Reproducibilidad para AFM1 en leche analizada por HPLC- fluorescencia.....	38
Tabla 8:	Repetibilidad para AFM1 en leche analizada por HPLC-Fluorescencia...	39
Tabla 9:	Concentración de aflatoxina M1 según la norma chilena para consumo humano en 44 predios de las Regiones Metropolitana y de Valparaíso de Chile.....	42
Tabla 10:	Distribución geográfica (por comuna) de los predios estudiados para la detección de aflatoxina M1 en leche	43
Tabla 12:	Caracterización de predios según producción láctea diaria promedio por vaca, estudiados para la detección de aflatoxina M1 en leche.....	44
Tabla 13:	Caracterización de predios según sistema de alimentación estudiados para la detección de aflatoxina M1 en leche	45
Tabla 14:.	Asociación entre sistemas de alimentación y presencia de AFM1 en leche.....	50
Tabla 15:.	Resultados del análisis de Regresión Logística	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura de aflatoxinas B1 y M1	9
Figura 2: Curvas de calibración para AFM1 en Leche	40
Figura 3: Concentraciones de AFM1 en leche por predio según número de vacas en ordeña.	45
Figura 4: Concentraciones de AFM1 en leche por predio según producción láctea individual.	46
Figura 5: Concentraciones de AFM1 en leche por predio según sistema de alimentación (SP: Solo pastoreo, PS: Pastoreo y suplementación, RC: Ración completa).	47
Figura 6: Concentración de AFM1 y número de vacas en ordeña.....	48
Figura 7: Concentración de AFM1 y producción láctea individual promedio.....	49

RESUMEN

Las aflatoxinas son tóxicos de efectos carcinogénicos y mutagénicos, producidas por diferentes especies de *Aspergillus*. La aflatoxina B1 (AFB1) es la más frecuente de encontrar en tejidos vegetales, al ser consumida por los animales se transforma en aflatoxina M1 (AFM1), que puede ser eliminada por la leche de vacas expuestas a alimento contaminado.

En orden a contribuir al estudio del riesgo de eliminación láctea de AFM1 y la posible exposición de la población consumidora de lácteos, se realizó un estudio orientado a validar un método analítico de HPLC-FL para su detección en leche y mediante su utilización, la detección de la toxina en predios lecheros de la zona central de Chile.

Durante 2008 y 2009 se analizó la leche proveniente estanques de almacenamiento de 44 predios de las Regiones Metropolitana y Valparaíso, Chile, detectándose la presencia de AFM1 en 33 lecherías, en 16 de ellas los niveles de la toxina superaron los niveles aceptados por la norma nacional de 0,05 µg/l. La presencia de AFM se asoció positivamente a predios de mayor tamaño, mayor producción individual y alimentación con raciones completas que incluían concentrado.

ABSTRACT

Aflatoxins are toxics with carcinogenic and mutagenic effects, produced by different species of *Aspergillus*. Aflatoxin B1 (AFB1) is the aflatoxin most frequently found in plant tissues, and when consumed by animals is transformed into aflatoxin M1 (AFM1), which can be eliminated in the milk of cows exposed to contaminated feed.

In order to contribute to the study of the risk of milk elimination of AFM1 and the possible exposure of the population of dairy consumers, a study was carried out to validate an HPLC-HF analytical method for quantification of AFM1 in milk and, through its use, the detection of this toxic in dairy farms in central Chile.

During 2008 and 2009, milk from milk tanks of 44 farms from the Metropolitan and Valparaiso Regions was analyzed, detecting the presence of AFM1 in 33 dairies. In 16 of them, the levels of the toxicant exceeded the levels accepted by the national norm of 0.05 µg/lit. The presence and concentration of AFM1 was positively associated to farms with bigger herd size, individual milk yield and fed with complete rations, which included concentrate.

1 INTRODUCCIÓN

La inocuidad alimentaria es una de las principales preocupaciones sanitarias a nivel mundial, siendo los contaminantes ambientales y los residuos farmacológicos considerados de alto riesgo.

Las condiciones fito y zoo sanitarias de nuestro país y los tratados comerciales vigentes, han generado óptimas condiciones para la inserción de Chile en el mercado internacional de alimentos, pudiendo exportarse lácteos y otros productos de origen animal, a diferentes países en condiciones preferenciales.

Nuestro país cuenta con Programas de Control de Residuos de Medicamentos Veterinarios y Contaminantes Ambientales en diferentes productos de origen animal, incluida la leche y sus derivados. Estos programas permiten detectar concentraciones de sustancias indeseables sobre los niveles máximos permitidos de acuerdo con las exigencias de diferentes países y regiones, con el fin de monitorear y mejorar los procesos productivos y asegurar así la entrega de productos inocuos al mercado interno y externo.

Basándose en los efectos adversos que pueden generar esas sustancias, organismos intergubernamentales, el Comité de Expertos en Aditivos Alimentarios de la FAO/OMS, JEFCA, han establecido Límites Máximos Residuales (LMR) para diferentes contaminantes, los cuales son considerados por cada país para fijar sus propias reglamentaciones internas.

Dentro de los tóxicos naturales que pueden generar residuos en los productos de origen animal, las micotoxinas, y dentro de ellas las aflatoxinas, son de especial interés debido a sus efectos nocivos para la salud humana.

Diferentes tipos de aflatoxinas se encuentran en alimentos expuestos directamente a contaminación micótica y que son consumidos por la población humana. Existe además un tipo particular de estas, la aflatoxina M1 (AFM1), que

proviene de la leche de animales que consumen alimento contaminado por hongos la cual, vía cadena alimentaria, produce efectos tóxicos en las personas.

Chile dispone de reglamentaciones respecto a la presencia de aflatoxinas en los diferentes alimentos de origen animal, además están consideradas dentro de los programas oficiales de control de residuos, sin embargo, en el caso particular de AFM1 en leche, este control sólo se realiza rutinariamente para productos de exportación.

Debido al riesgo potencial que significa la presencia de aflatoxinas en leche y a la escasa información disponible a nivel nacional, este trabajo propone estudiar su presencia en leche producida en predios de la zona central del país.

2 REVISION BIBLIOGRÁFICA

2.1 Los hongos como contaminantes de productos agrícolas

Muchos productos agrícolas pueden ser invadidos por hongos durante los procesos de producción, cosecha y almacenamiento, dentro de los cuales los hongos filamentosos son uno de los principales involucrados (International Commission on Microbiological Specifications for Foods, 2001).

De acuerdo con la etapa en que afectan a los vegetales, pueden dividirse en hongos de campo y hongos de almacenamiento. Los hongos de campo están presentes en diferentes partes de las plantas, particularmente los granos, antes de su recolección y pueden ser patógenos o comensales. Para su desarrollo, estos hongos requieren niveles de humedad, expresados en actividad de agua (AW) del orden de 0,90 o más. Los principales efectos corresponden a manchas, escoriaciones, decoloraciones, reducción en el potencial de germinación y contaminación con metabolitos del hongo conocidos como micotoxinas. La mayoría de los hongos con capacidad para producir micotoxinas se encuentran en los géneros *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium* y *Aspergillus* (Marín, 2010; Carrillo, 2003; International Commission on Microbiological Specifications for Foods, 2001).

La mayor parte de los hongos que afectan a los productos vegetales, en particular a los granos durante su almacenamiento, no se encuentran presentes durante el proceso de cultivo, teniendo como origen principal los contenedores, sacos y bodegas de almacenamiento. La humedad en los granos es uno de los principales factores que determinan la proliferación de estos agentes, siendo el nivel óptimo de esta condición 13 a 13,5 %, equivalente a una AW de 0,68 a 0,9. Los principales géneros asociados a este tipo de contaminaciones corresponden a *Aspergillus* y *Penicillium*. Las alteraciones más frecuentes corresponden a decoloraciones, olores indeseables, reducción de la materia seca, calentamiento,

apelmazamiento, pérdida de nutrientes y presencia de micotoxinas (Carrillo, 2003; International Commission on Microbiological Specifications for Foods, 2001).

Además de la humedad, la temperatura participa en la generación de ambientes propicios para el desarrollo de hongos en los vegetales durante su proceso productivo y almacenamiento existiendo, dentro de ciertos rangos, una relación directa entre la temperatura y la tasa de crecimiento fúngico (FAO, 2003), en función a ello, la mayoría de los hongos proliferan a temperatura ambiente en climas templados y tropicales, en el rango de 15° a 35° C, siendo las temperaturas óptimas de 30° a 40° C para los *Aspergillus* y 20° a 30° C para los *Penicillium* (Council for Agricultural Science and Technology, 2003).

2.2 Micotoxinas

Las micotoxinas corresponden a metabolitos secundarios producidos por hongos bajo condiciones sub óptimas y de estrés. Son moléculas relativamente pequeñas (PM menor a 7.000 Daltons) y por lo general son específicas para las especies de un mismo género de hongos (Abarca *et al.*, 2000). Las micotoxinas en los productos vegetales pueden encontrarse en forma simultánea a la presencia del hongo toxigénico o bien luego de que éste ha sido eliminado (Carrillo, 2003).

Las micotoxinas producidas por distintas especies de hongos poseen particulares características estructurales y químicas, las cuales determinan sus propiedades biológicas y toxicológicas. Se reconocen entre 300 y 400 tipos, alrededor de una docena de ellas se consideran amenazas importantes para la salud humana o animal (Bennett y Klitch, 2003).

En la Tabla 1, se presentan los hongos toxigénicos y las micotoxinas producidas por cada especie, según su origen biosintético.

Tabla 1: Principales micotoxinas según especies productoras y origen biosintético.

Origen	Micotoxinas	Especies productoras
Policetonas	Ácido penicílico	<i>Aspergillus ochraceus, Penicillium simplicissimum</i>
	Ácido secalónico	<i>D Penicillium oxalicum, Claviceps purpurea</i>
	Aflatoxinas	<i>Aspergillus flavus, A. nomius, A. parasiticus</i>
	Alternariol	<i>Alternaria alternata</i>
	Citrinina	<i>Penicillium citrinum, P. verrucosum</i>
	Citroviridina	<i>Aspergillus terreus, Penicillium citreonigrum</i>
	Esterigmatocistina	<i>Aspergillus versicolor, Eurotium amstelodami</i>
	Fumonisinias	<i>Fusarium nygamai, F. proliferatum, F. verticilloides, Alternaria arborescens</i>
	Luteoskirina	<i>Penicillium islandicum</i>
	Moniliformina	<i>Fusarium nygamai, F. tapsinum, F. Proliferatum</i>
	Ocratoxinas	<i>Aspergillus ochraceus, Penicillium verrucosum</i>
	Patulina	<i>Penicillium expansum, P. griseofulvum, P. Roqueforti</i>
	Zearalenona	<i>Fusarium equiseti, F. graminearum</i>
Aminoácidos	Ácido ciclopiazónico	<i>Aspergillus flavus, A. tamarii, Penicillium commune</i>
	Alcaloides del ergot	<i>Claviceps purpurea</i>
	Bovericina	<i>Fusarium proliferatum, F.subglutinans, F. verticilloides</i>
	Citocalasinas	<i>Aspergillus terreus, Phoma medicaginis</i>
	Eslaframina	<i>Macrophomina phaseolina</i>
	Roquefortinas	<i>Penicillium roqueforti</i>
Terpenos	Fusaproliferina	<i>Fusarium proliferatum, F. subglutinans</i>
	Paspalinina	<i>Claviceps paspali</i>
	Penitrem A	<i>Penicillium crustosum</i>
	Tricotecenos	<i>Fusarium graminearum, F. sporotrichoides, F. poae, Myrothecium roridum, Stachybotrys chartarum</i>
Ácidos tricarbóxicos	Rubratoxinas	<i>Alternaria arborescens, A.tenuissima</i>
	Ácido tenuazoico	<i>Penicillium purpurogenum</i>

(Carrillo, 2003).

2.3 Micotoxicosis

Si bien las enfermedades e intoxicaciones asociadas a hongos se conocen desde la antigüedad, los primeros antecedentes científicamente documentados y el término “*micotoxicosis*” se originan luego de una intoxicación masiva en 1962, en Inglaterra, episodio que causó la muerte de alrededor de 100.000 pavos, asociado al consumo de harina de maní proveniente de Brasil, contaminada con aflatoxina derivada del *Aspergillus flavus* (Bennett y Klitch, 2003).

Las micotoxicosis se definen como: “intoxicación del huésped causada por la entrada al cuerpo de una sustancia de origen fúngico” (López, 1988) y tienen variada presentación de acuerdo con la ruta metabólica, órgano o sistema afectado. Los efectos clínicos de las micotoxinas, en humanos como animales, pueden ser hepatotóxicos, nefrotóxicos, neurotóxicos, inmunotóxicos, alteraciones endocrinas, cancerígenos o mutagénicos (Bennett y Klitch, 2003).

La toxicidad y los efectos en el huésped están influenciados por varios factores, como el tipo de micotoxina, concentración y volumen de consumo en el alimento, sinergismos entre micotoxinas y otros tóxicos, continuidad o intermitencia de la exposición, además de edad, peso, condición fisiológico-productiva y presencia de patologías de base (Fink-Gremmels, 2008).

La ingesta de micotoxinas puede provocar o no enfermedad clínica en los individuos expuestos. Una vez ingeridas se distribuyen en el organismo y se pueden eliminar a través de secreciones y productos como leche y huevos (Yiannikouris y Jouany, 2002). Se denominan micotoxicosis primarias las causadas por consumo de alimentos vegetales contaminados y micotoxicosis secundarias cuando se consumen productos de origen animal contaminados con micotoxinas (Carrillo, 2003). En la tabla 2 se resumen los efectos patológicos de diferentes micotoxinas.

Tabla 2: Efectos Patológicos de Micotoxinas.

ÁCIDO CICLOPIAZÓNICO	Desórdenes gastrointestinales y neurológicos; cambios degenerativos y necrosis en vísceras
ÁCIDO PENICÍLICO	Hepatotóxico y cancerígeno
ÁCIDO SECALÓNICO D	Teratogénico
ÁCIDO TENUAZÓNICO	Reducción en la eficiencia de la alimentación, pérdida de peso; congestión y hemorragias de estómago e intestino, agrandamiento de riñones
AFLATOXINAS	Daño hepático agudo, cirrosis, inducción de tumores, teratogénesis; excreción por leche, acumulación en tejidos
ALTERNARIOL-METILÉTER	Mutagénica
BEAUVERICINA	Alteración de la contractilidad del músculo liso de mamíferos
CITOCALASINAS	Inhibición de la división celular, función tiroidea y secreción de amilasa
CITRININA	Toxicidad renal en monogástricos
DESOXINIVALENOL	Rechazo del alimento, vómitos; inmunosupresión en cerdos y otros animales
ESTERIGMATOCISTINA	Cambios patológicos en hígado, inducción de tumores
FUMONISINAS	Leucoencefalomalacia equina; edema pulmonar en cerdos; cáncer hepático en ratas; excreción por leche
OCRATOXINA A	Nefropatía en cerdos y aves; acumulación en riñón, hígado y músculo
RIZONINA A	Gastroenteritis, afecta hígado y riñones
PATULINA	Trastornos gastrointestinales y neurológicos; inducción de tumores
TREMÓGENOS (FUMITREMÓGENO, PASPALININA, PENITREM A, PENITREM B OTROS)	Daño del sistema nervioso central, temblores
ZEARALENONA	Síndrome estrogénico en cerdos y ganado de cría; excreción por leche (junto con alfa y beta zearalenol)

(Carrillo, 2003).

2.4 Aflatoxinas

Corresponden sustancias producidas esencialmente por *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus nomius* y, al igual que otras micotoxinas, son metabolitos secundarios tóxicos. Corresponden a compuestos resultantes de las reacciones que tienen lugar cuando, en determinadas condiciones físicas, químicas y biológicas, se interrumpe la reducción de los grupos cetónicos en la biosíntesis de los ácidos grasos en los hongos (Scheidegger y Payne, 2003).

La aflatoxina B1 (AFB1) se sintetiza por la ruta metabólica de los policétidos, la cual incluye reacciones de condensación, oxidación, reducción, alquilación y halogenación, que forman finalmente una molécula consistente en un anillo cumarín unido a una unidad bisdihidrofurano y a una ciclopentanona. Estos metabolitos se forman por la condensación del acetil-coenzima A y malonil coenzima A, dando lugar al acetil-S-Coenzima A, la cual es la molécula precursora de la AFB1 (Steyn y Vleggaar, 1986). Dentro de la vía biosintética, la formación de la versicolorina A es un paso crítico, ya que es la primera molécula en la vía de la AFB1 que contiene un doble enlace en la posición 8,9 de la molécula del bisfurano, el cual es el blanco para su posterior activación en una molécula altamente reactiva (Groopman *et al.*, 1986). Durante la síntesis ocurren al menos 23 reacciones enzimáticas, identificándose 15 intermediarios bien definidos estructuralmente (Quevedo, 2014; Yu *et al.*, 2004).

Existen unos 18 tipos de aflatoxinas de las cuales la más tóxica es la AFB1, seguida de la aflatoxina M1 (AFM1), derivado metabólico de la anterior, y la aflatoxina G1. Otras como, las Aflatoxinas B2, G2 y M2 (derivada de la aflatoxina B2) son menos tóxicas (Gimeno y Martins, 2003).

Las aflatoxinas, pueden encontrarse como contaminantes naturales en cereales como maíz, sorgo, trigo, avena, cebada, centeno, mijo, arroz y sus subproductos; leguminosas y sus derivados: harinas de maravilla, algodón, sésamo, raps, soya y maní, frutos y semillas, plátanos, dátiles, higos, pistachos, granos de

café crudo, avellanas, coco, nueces, almendras, pasas, cacao, camote; productos procesados como: pastas de semillas de damasco y almendras, vino, aceites, salchichas y queso (EFSA, 2004; Gimeno y Martins, 2003; Abdallah *et al.*, 2017).

2.4.1 Aflatoxinas B1 y M1

Las cuatro aflatoxinas principales corresponden a aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂. La letra B indica que tienen fluorescencia azul (“Blue”) frente a la luz ultravioleta, mientras que la letra G (“Green”) indica fluorescencia verde amarillenta (Calvo, 2008; Scheidegger y Payne, 2003). Estructuralmente AFB₁ y AFB₂ difieren entre ellas por la presencia de un doble enlace más en la primera, las aflatoxinas G₁ y G₂ difieren entre sí en el mismo detalle estructural. Las aflatoxinas B difieren de las G porque el anillo furano de las primeras se convierte en un anillo de lactona en las segundas (Calvo, 2008). La AFM₁ y AFM₂ pueden encontrarse en secreciones de animales que han ingerido alimentos contaminados con AFB₁ y AFB₂ respectivamente, correspondiendo a metabolitos hidroxilados de éstas últimas. En el caso de hembras en lactancia, la leche puede aparecer contaminada con estas toxinas (Boudra *et al.*, 2007; Yiannikouris y Jouany, 2002). En la figura 1 se muestran los cambios estructurales de la AFB₁ a AFM₁ después del proceso de hidroxilación.

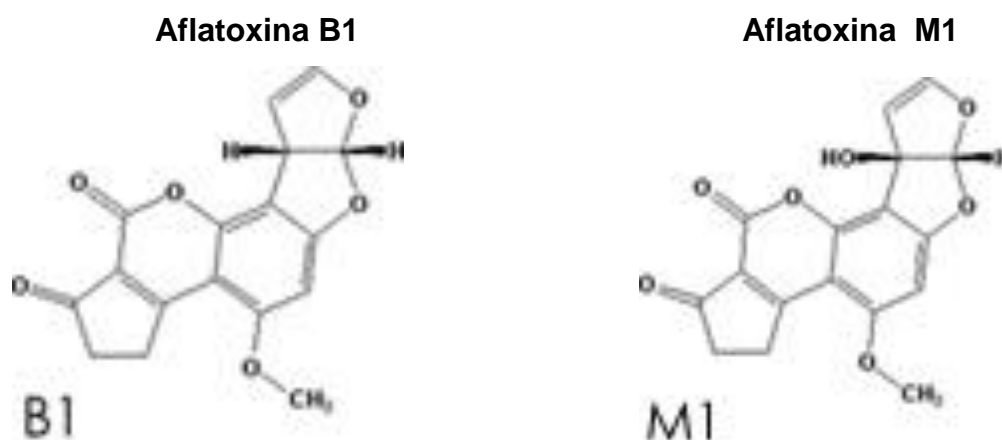


Figura 1: Estructura de aflatoxinas B1 y M1.

Metabolismo de aflatoxinas B1 y M1

En los rumiantes, luego de la ingestión de alimentos contaminados, la AFB1 es escasamente degradada por los microorganismos del rumen, a diferencia de otras micotoxinas como la ocratoxina, que es casi completamente inactivada en este órgano, incluso se ha descrito un efecto inhibitor sobre la flora ruminal por AFB1, absorbiéndose luego desde el tracto digestivo, alcanzando rápidamente la circulación sanguínea (Santi Devi *et al.*, 2009; Yiannikouris y Jouany, 2002).

En el hígado, las aflatoxinas son atacadas por las enzimas de fase I, como la súper familia citocromo P450 (CYP-450), metabolizándose a compuestos polares, lo cual facilita su excreción directa o su reacción con las enzimas de fase II, las cuales catalizan reacciones de conjugación para su excreción biliar y renal, reaccionando algunos productos de la primera fase con diferentes biomoléculas pudiéndose formar nuevos metabolitos (Uribe y Navas, 2012). Este fenómeno ocurre en fase de activación, cuando la AFB1 llega al retículo endoplasmático de los hepatocitos, y expuesta a formas de citocromo CYP-450, forma el AFB1exo-8,9-epóxido, el cual es altamente inestable, pudiendo ligarse con alta afinidad a la guanina y unirse covalentemente con el ADN. En este proceso se originan dos metabolitos hidroxilados: la AFQ1 y la AFM1, los cuales son menos tóxicas que el compuesto original (Farombi, 2006; Uribe y Navas, 2012). Posteriormente se forma el aducto 8,9-dihidro-8-(N7-guanil)-9-hidroxi aflatoxina-B1 (AFB1-ADN), el cual corresponde a la unión de AFB1exo-8,9-epóxido-guanina con ADN, con su anillo imidazol abierto, a partir de este compuesto se forma una molécula más estable química y biológicamente: la AFB1-formamidopirimidina (AFB1-FAPY), la cual induce errores en transcripciones del ADN y consecuentemente efectos mutagénicos (Uribe y Navas, 2012).

La forma de epóxido hidroxilado (8,9-dihidro-8,9dihidroxiAFB1) se oxida al dialdehído y se condensa con el grupo amino épsilon de la lisina, formando una alfa-aminocetona, en este aducto de AFB1-albúmina se modifica la estructura de la AFB1 reteniendo sólo los anillos cumarín y ciclopentanona, haciéndose afín con la

albúmina sérica. Este aducto AFB1-Lisina tiene una vida media igual a la de la albúmina (20 días), lo que ha permitido que este compuesto se utilice como marcador biológico para medir la exposición a AFB1. Altas concentraciones de AFB1-lisina en suero indican una ingestión crónica de AFB1, en cambio concentraciones bajas pueden indicar una sola o reciente exposición (Guzmán De Peña, 2007).

La siguiente fase del metabolismo de AFB1 corresponde a las reacciones de conjugación enzimática que inactivan al 8,9epóxido, el cual puede hidrolizarse a 8,9dihidrodiol, lo cual ocurre espontáneamente, éste a su vez, puede conjugarse con glutatión para formar AFB1-SG. Este compuesto se forma por la acción catalítica de una familia de isoenzimas glutatión S-transferasas (GTS). El conjugado AFB1-SG es el metabolito biliar más abundante, existiendo evidencia de que es excretado en la orina de diferentes organismos (Uribe y Navas, 2012).

Como consecuencia de las reacciones enzimáticas que se llevan a cabo en el hígado se forman la AFM1, AFQ1, AFP1, formas hidroxiladas que se pueden conjugar para formar ésteres de sulfato o glucurónicos que son excretados por orina, bilis y leche (Sudakin, 2003). Otras formas conjugadas, solubles en agua, y metabolitos no conjugados se distribuyen de forma sistémica alcanzando leche, músculo y tejidos comestibles (Yiannikouris y Jouany, 2002). El aflatoxicol se forma por la acción de una reductasa en el citosol a partir de la AFB1, pudiendo también reoxidarse a AFB1 (Karabulut *et al.*, 2014).

Se ha demostrado la eliminación de AFM1 por leche humana, caprina, ovina, bovina (Battacone *et al.*, 2005) y porcina (Quiles, 2016). Las vacas pueden transformar la AFB1 en AFM1 dentro de las 12-24 horas de ingestión del alimento contaminado, incluso a las 6 horas ya pueden aparecer trazas de AFM1 en la leche (Gimeno, 2008a).

Estudios realizados en vacas lecheras, con el fin de establecer la relación entre la cantidad de AFB1 consumida en la ración y la de AFM1 eliminada por leche,

han determinado proporciones de 540 µg/kg de AFB1 en el alimento v/s 92 µg/l de AFM1 en leche. En otros estudios la proporción encontrada fue de 64/0,35 y 1799/14,2 µg/l (Gimeno y Martins, 2003). La concentración final de AFM1 en la leche alcanzaría entre el 2 al 4% de la cantidad total de AFB1 ingerida, ésta proporción puede variar entre animales e incluso entre ordeñas sucesivas, puesto que es influenciada por diversos factores fisiológicos y patológicos, incluyendo el régimen de alimentación, estado de salud individual, la capacidad de metabolización y finalmente el volumen de producción láctea. Vacas de alto rendimiento, con producciones de hasta 40 litros de leche por día, pueden eliminar por esta vía porcentajes tan altos como el 6,2% de la AFB1 ingerida (Boudra *et al.*, 2007; Masoero *et al.*, 2007).

2.5 Efectos patológicos

Las aflatoxinas tienen actividad cancerígena, teratogénica y mutagénica, su principal efecto directo es hepatotóxico, pudiendo también provocar alteraciones renales y neurológicas (Uribe y Navas, 2012; Guzmán De Peña, 2007; Creppy, 2002), son inmunosupresoras, inhibiendo la fagocitosis y la síntesis de anticuerpos, alteran la formación del ADN, ARN y proteínas en el ribosoma (Luzia *et al.*, 2002). El grado de toxicidad y carcinogenicidad de las aflatoxinas sigue el siguiente orden: B₁ > G₁ > B₂ > G₂ (Calvo, 2008).

La molécula AFB1-8,9 epóxido es la responsable de las propiedades carcinogénica y mutagénica, unida con la guanina del ADN forma la AFB1-FAPY. Se ha demostrado una alta correlación entre la persistencia del AFB1-FAPY en tejido hepático y la formación de tumores en este órgano (Uribe y Navas, 2012), la susceptibilidad a mutaciones depende de la especie, siendo por ejemplo menos frecuente en la rata que en la trucha a un mismo nivel de contaminación (Dohnal *et al.*, 2014).

El hígado es el órgano que más AFB1-ADN acumula, la concentración hepática de este aducto se correlaciona con la susceptibilidad de especie a la toxina

y su efecto carcinógeno se ha demostrado en animales experimentales como ratas, patos, trucha arcoíris y mono Rhesus. La susceptibilidad está también influenciada por la edad, sexo, cepa y vía de administración. La exposición a aflatoxinas causa principalmente carcinoma hepatocelular y colangiocarcinoma, también se ha reportado adenocarcinoma renal, otros tejidos afectados por la toxina incluyen la tráquea y la piel. Existe evidencia también, de un potencial efecto en la inducción de melanomas (Dohnal *et al.*, 2014; Uribe y Navas, 2012; Guzmán De Peña, 2007).

La capacidad carcinogénica es dependiente de la mutagenicidad de las aflatoxinas, propiedad que también permite su acción en generaciones sucesivas (Uribe y Navas, 2012; Guzmán De Peña, 2007), efecto que se ha estudiado en bacterias, levaduras y células de mamíferos, demostrándose la inducción de mutaciones puntuales de guanina-citosina a timina-adenina o guanina-citosina a adenina-timina, afectando particularmente regiones de ADN ricas en guanina-citosina, las cuales también son las zonas más sensibles para la formación del aducto AFM1-n-guanina (Moudgil *et al.*, 2013).

Diferentes estudios sugieren que la AFB1 metabólicamente activada es capaz de mutar oncogenes inactivos a su forma oncogénica, la mutación en los genes Ha-ras no se ha reportado en hepatocarcinomas en poblaciones humanas expuestas al consumo de alimentos contaminados con AFB1, en ratas, en cambio, se han identificado dos mutaciones en ADN aislado de carcinoma hepático inducido por AFB1, indicando que la mutación en el gen Ki-ras es un evento dominante en la carcinogénesis inducida por aflatoxinas en estos roedores (Massey *et al.*, 2000).

El efecto de corto plazo de las aflatoxinas en animales superiores se manifiesta como una hepatitis aguda, presentándose ictericia, fiebre, depresión, anorexia y diarrea (Arango, 2008; Guzmán De Peña, 2007). Los indicadores bioquímicos más evidentes de aflatoxicosis aguda corresponden a hipolipidemia, hipocolesterolemia e hipocarotenemia, asociados con esteatosis hepática severa y pérdida de peso. Estas señales de alteración del metabolismo de los lípidos se han

asociado a la modificación de la lisina en la proteína B-100 de las lipoproteínas de baja densidad, las cuales participan en el transporte de grasas a partir del hígado, dificultando su reconocimiento por receptores específicos y su posterior ingreso a células periféricas, regresando al órgano y depositándose en los hepatocitos, lo cual causa infiltración grasa hepática y deficiencia lipídica en los tejidos periféricos, situación que tiende a la cronicidad en la medida que el huésped continúe expuesto a aflatoxina (Hussein y Brasel, 2001; Amaya-Farfán, 1999).

El sistema inmune también se ve afectado, alterándose las respuestas específicas e inespecíficas, se reduce la actividad de linfocitos y macrófagos. El daño al sistema inmune se refleja en parámetros como la fijación de complemento, la capacidad fagocítica y las reacciones de hipersensibilidad tardía, se ha propuesto que la inmunosupresión causada por éstas sustancias podría estar mediada por sus efectos sobre la involución del timo y los linfocitos derivados de éste, interfiriendo de esta manera con la respuesta inmune celular del huésped (Hussein y Brasel, 2001).

2.6 Efectos sobre animales de producción

La AFB1 provoca cuadros clínicos agudos en varias especies animales, el principal órgano blanco es el hígado, en donde sus metabolitos inducen daño hepatocelular. Los signos clínicos en los animales, asociados con la exposición aguda y/o alta cantidad de la toxina pueden manifestarse como anorexia, ictericia, depresión, pérdida de peso, secreción nasal, afecciones gastrointestinales, hemorragias, ascitis y edema pulmonar (EFSA, 2004; Luzia *et al.*, 2002).

Estudios de campo y de exposición controlada, indican que el consumo en largo plazo en concentraciones relativamente bajas de aflatoxinas, del orden de 1,5 mg/kg de alimento, pueden inducir fibrosis y tumores del hígado. La trucha es especialmente sensible, apareciendo tumores a concentraciones de 0,1 µg de aflatoxina por kg de alimento. En otras especies como aves, cerdos y ovejas

también se observa la presentación de carcinomas hepáticos, sin embargo, ésta presentación no se considera como la consecuencia final de la toxicidad de estos compuestos (Hussein y Brasel, 2001; EFSA, 2004; Guzmán De Peña, 2007).

Estudios en cerdos lechones han determinado una alta susceptibilidad a aflatoxina, demostrando daño en linfocitos y macrófagos y, consecuentemente, un debilitamiento del sistema inmunitario al inhibir la fagocitosis y la síntesis proteica, alterando la formación de ADN y ARN y proteínas del ribosoma (Quiles, 2016). En la misma especie provocan rechazo del alimento y reducción del crecimiento, sin la presentación de signología clínica (Marín *et al.*, 2002). En aves productivas se han determinado disminución en la producción de huevos, hígado friable, erosión y fistulas de la mucosa intestinal (Daodu y Adebowale, 2016).

2.7 Efectos en el ganado bovino

Existen posturas opuestas respecto a la habilidad de la microbiota ruminal para metabolizar micotoxinas en comparación con animales no rumiantes, y consecuentemente al posible efecto protector sobre el riesgo de ingreso efectivo al organismo en este tipo de animales (Upadhaya *et al.*, 2009; Driehuis *et al.*, 2010). De todas formas, en el ganado vacuno, los signos clínicos se producen después de la exposición a concentraciones de 1,5 a 2,23 mg/kg de alimento, en los pequeños rumiantes después de una exposición mayor a 50 mg/kg. El examen post mortem de los animales expuestos, revela daños en las células hepáticas (necrosis centrolobulillar), engrosamiento de conductos biliares, así como lesiones renales. En la sangre, se alteran los parámetros bioquímicos de enzimas hepáticas, aumentan la transaminasa glutámico-oxalacética, amoniaco, nitrógeno ureico, se alteran los factores de la coagulación y la glicemia. La disminución de la producción de leche y fotosensibilización pueden preceder a los signos clínicos graves de intoxicación (Gimeno, 2008b).

Las aflatoxinas son conocidas por afectar poblaciones celulares y procesos de síntesis molecular del sistema inmunológico, haciendo a los animales más

susceptibles en exposiciones a bacterias, virus, hongos y parásitos. Este efecto inmunosupresor también afecta la resistencia adquirida por vacunaciones y puede ocurrir en un nivel subclínico de intoxicación (EFSA, 2004).

Considerando que las intoxicaciones agudas, con manifestaciones clínicas son raramente observadas en condiciones de las actuales prácticas ganaderas, se estima que la exposición a aflatoxinas, dependiendo del nivel de exposición, determina finalmente efectos en la eficiencia productiva, como reducción en la ganancia de peso, disminución de la producción de leche, alteraciones reproductivas, así como una mayor susceptibilidad a enfermedades infecciosas, todo lo cual puede dar lugar a pérdidas económicas considerables en la producción animal (EFSA, 2004; Fink-Gremmels, 2008).

2.8 Efectos clínicos en humanos

En los países en que se informa la presencia de AFB1 en alimentos vegetales y AFM1 en lácteos, se describen periódicamente casos de toxicidad en humanos asociadas a estas micotoxinas (Guzmán De Peña, 2007; Imtiaz *et al.*, 2008; Unusan, 2006). En casos extremos se han presentado brotes de intoxicación con mortalidades entre 10% y 60% asociadas a estas micotoxicosis (Gimeno, 2008b; Peraica *et al.*, 1999). Otro tipo de toxicidad frecuente en zonas endémicas es la presentación variadas formas de cáncer, particularmente hepático (Guzmán De Peña, 2007).

La intoxicación aguda por aflatoxinas corresponde a una hepatitis aguda y se manifiesta por vómitos, dolor abdominal, edema pulmonar, infiltración grasa y necrosis del hígado, reportándose esta presentación clínica en exposiciones a alimentos contaminados con concentraciones entre 10 y 600 µg/kg y 0,25 y 15,6 mg/kg (Gimeno, 2008b). Dietas bajas en lípidos y/o proteínas hacen más vulnerable el hígado, por el contrario, el mismo órgano, con dietas con gran cantidad de ácidos grasos insaturados, es menos afectado por estas toxinas (Arango, 2008). Cuadros

crónicos, asociados a concentraciones en el alimento de 1 mg/kg, se manifiestan como hepatocarcinomas, presentándose vómito, dolor abdominal y hepatitis hasta causar la muerte. Estudios de asociación entre la ingestión de AFB1 y la presentación de cáncer hepático, indican que, con concentraciones de 3 a 22 µg de AFB1/kg de peso por día, los valores de incidencia de cáncer variaban de 2 a 35 casos por cada 100.000 habitantes por año, evidenciándose una asociación positiva entre el nivel de ingestión de aflatoxina e incidencia de cáncer (Guzmán De Peña, 2007). La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) ha clasificado a la AFB1 y a la AFM1 como cancerígenos en humanos (IARC, 2002; Gimeno, 2008a).

Los hallazgos bioquímicos en presentaciones agudas o crónicas son similares a los descritos en animales, correspondiendo a hipolipidemia, hipocolesterolemia e hipocarotenemia, asociados con esteatosis hepática severa y pérdida de peso (Gimeno, 2008b; Guzmán De Peña, 2007).

En exposiciones crónicas a dosis bajas, similares a las cancerígenas, también se afecta la inmunidad, se reduce la fagocitosis por macrófagos, la hipersensibilidad tardía y la linfoblastogénesis. Las células T son aparentemente más susceptibles a las aflatoxinas que las células B, además están reducidas las inmunoglobulinas G y A, la actividad del complemento y la actividad bactericida del suero mediada por inmunoglobulinas. El tiempo que dura la inmunosupresión es muy variable y una vez que se retira la aflatoxina, la respuesta inmunológica vuelve a ser normal (Arango, 2008; Guzmán De Peña, 2007).

Se cree que las aflatoxinas pueden ser factor etiológico de cuadros de encefalopatía y degeneración grasa visceral asociada a disfunción hepática con signos neurológicos (Síndrome de Reyé), también existen reportes de detección de metabolitos de aflatoxinas en suero, hígado, orina y heces diarreicas de niños con signos de subnutrición intensa (Arango, 2008; Guzmán De Peña, 2007).

2.9 Reglamentación

La presencia de residuos de medicamentos y contaminantes en los alimentos de origen animal destinados al consumo humano se encuentra regulada en diferentes países y regiones (San Martín, 2001). Un estudio realizado por FAO en el año 2003, señala que 99 países representantes del 87% de la población mundial, tenían reglamentaciones respecto a micotoxinas en alimentos humanos y raciones para el ganado, todos estos países incluyen reglamentaciones para aflatoxinas (FAO, 2004).

En la especie humana, para AFM1 y AFB1, se han determinado una TD50 (dosis con la cual el 50% de los individuos desarrollan tumores malignos) de 10,38 y 1,15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal/día, respectivamente. La ingesta diaria tolerable para la AFB1 está comprendida entre 0,11 y 0,19 $\text{ng}/\text{kg}/\text{día}$. El nivel de micotoxina con el que no se observan reacciones adversas para la AFM1 y la AFB1 son $< 2,5$ y $0,75$ $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal/día, respectivamente (Gimeno, 2008a).

Basándose en estudios de toxicidad, organizaciones nacionales e intergubernamentales han establecido los Límites Máximos Residuales (LMR), para medicamentos veterinarios y Límites Máximos Aceptados (LMA) para sustancias de otro origen. La Comisión del Codex Alimentarius, define estos conceptos como: “La concentración máxima de residuos contaminantes en el alimento, expresada en mg/kg o $\mu\text{g}/\text{kg}$, sobre la base de peso fresco, que se permite legalmente o se reconoce como admisible dentro de un alimento o en la superficie del mismo” (Codex Alimentarius, 2001).

La Unión Europea (UE), para AFM1, ha definido un Límite Máximo Permitido de $0,05$ $\mu\text{g}/\text{kg}$ en leche fluida y $0,025$ $\mu\text{g}/\text{kg}$ en alimentos lácteos para uso infantil, Estados Unidos de América, permite una concentración más alta: $0,5$ $\mu\text{g}/\text{kg}$, en leche y derivados, el mismo límite aplican los países del MERCOSUR (Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay) (Michlig *et al.*, 2015). Otros estados han determinado

sus límites de concentraciones permisibles entre los rangos citados (Berg, 2003; Codex Alimentarius, 2001).

En Chile los LMR establecidos por el Reglamento Sanitario de los Alimentos, corresponden a: aflatoxinas totales (B1, B2, G1 y G2): 5 µg/kg para alimentos en general; AFM1 en leche: 0,05 µg/kg (Chile, 1997). Para alimentos compuestos de uso animal, se considera un LMR de AFB1 de 5 µg/kg y 20 µg/kg para aflatoxinas totales; para ingredientes individuales corresponden a 20 µg/kg y 50 µg/kg, respectivamente (SAG, 1991).

2.10 Aflatoxinas en alimentos de uso animal

Las aflatoxinas son predominantemente producidas en climas cálidos y en consecuencia su presencia en estas regiones en insumos alimentarios es frecuente. Entre los alimentos para animales susceptibles a contaminación, los cereales y sus subproductos industriales son las principales fuentes de aflatoxinas, otra fuente de contaminación relativamente dependiente de las condiciones climáticas o ambientales corresponde a forrajes conservados como los henos y ensilajes, particularmente cuando su procesamiento es inadecuado o defectuoso (Boudra *et al.*, 2007; Garon *et al.*, 2006; Bucio-Villalobos *et al.*, 2001). Alpizar (2015), describe la presencia de hongos toxigénicos y particularmente aflatoxinas, en ensilajes de diferentes especies vegetales en diversas regiones del mundo.

La presencia de aflatoxinas en los insumos alimentarios se asocia al clima, las prácticas de cultivo y las condiciones de almacenamiento de los insumos, además de la presencia de insectos y la composición de la microbiota (Magan *et al.*, 2003). Por ejemplo, Castellari *et al.* (2016) señalan que el desarrollo de *Aspergillus* en silos bolsa conteniendo maíz húmedo es influenciado negativamente por la acidez y condición de anaerobiosis de este método de almacenamiento, lo cual coincide con lo reportado previamente respecto al efecto inhibitorio del pH sobre el desarrollo estos hongos.

En países templados, como los del continente europeo, la menor producción natural de aflatoxinas y el control de alimentos, determinan una baja frecuencia de contaminación con aflatoxinas en las dietas del ganado (EFSA, 2004). Sin embargo, episodios de contaminación se describen esporádicamente: en el año 2008, en Suecia, se detectaron altos niveles de AFB1 ($56 \mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$) en afrecho de arroz, destinado a la alimentación de vacas lecheras (Nordkvist *et al.*, 2009); durante los años 2004 y 2005 se detectaron altas concentraciones ($20 \mu\text{g}/\text{kg}$) de la toxina en forrajes producidos en Italia, asociadas a un inusual aumento de temperatura durante ese periodo (Decastelli *et al.*, 2007). En Portugal entre 1995 y 2004, AFB1 fue detectada en el 37,4% de muestras de alimentos para bovinos, en general, en concentraciones bajas, sin embargo, algunas muestras alcanzaron hasta $20,1 \mu\text{g}/\text{kg}$ (Martins *et al.*, 2007). En la CEE, la presencia de micotoxinas, aflatoxinas en particular, está intensamente controlada en la importación de insumos y en las fábricas de alimentos para ganado y, por consiguiente, la contaminación en raciones e insumos comerciales sobre los límites tolerables es infrecuente (EFSA, 2004; Martins *et al.*, 2007).

Por el contrario, en África y Asia, y consecuentemente en productos exportados desde estas regiones, es frecuente encontrar altos niveles de contaminación con aflatoxinas, algunos de ellos al ser controlados por la UE han demostrado los siguientes niveles de contaminación: semilla de palma proveniente de Nigeria: $22 \mu\text{g}/\text{kg}$, semilla de maravilla proveniente de India: $24 \mu\text{g}/\text{kg}$, afrecho de arroz indio y pakistaní: 10 y $17 \mu\text{g}/\text{kg}$. Otros insumos de la región, como torta de maní, torta de maravilla, germen y gluten de maíz, semilla de algodón, afrecho de arroz y semillas de soya, entre otros, también han presentado niveles notables de contaminación (EFSA, 2004). Estudios locales en países tropicales han detectado altos niveles de contaminación: en Kenia se detectaron sobre un 88% de alimentos para el ganado contaminados en niveles sobre las recomendaciones internacionales (Kang'ethe EK y Lang'a KA, 2009), otro estudio indicó una prevalencia de AFB1 en el alimento del ganado del 98,6% (69/70) con 83% de las muestras superando $10 \mu\text{g}/\text{Kg}^{-1}$ (Kang'ethe EK *et al.*, 2007). Otra investigación en

el mismo país, en diferentes temporadas, detectó entre 16 y 51% de maíces con niveles de contaminación, sobre la norma nacional (20 µg/kg), alcanzando valores de hasta 48.000 µg/kg (Daniel *et al.*, 2011), en Egipto se describen niveles de concentración del orden del 1979 µg/kg, (Abdallah *et al.*, 2017).

En América, particularmente Central y Sur, además de México, la situación es similar a Asia y África, consecuentemente, la autoridad sanitaria europea también ha detectado insumos contaminados de este origen, como semilla de algodón argentina conteniendo 22-26 µg/kg. Asimismo, es frecuente encontrar altos niveles contaminación con aflatoxinas en torta de maní, torta de maravilla, germen y gluten de maíz, semilla de algodón, afrecho de arroz y semillas de soya, entre otros (EFSA, 2004). En México se detectan AFB1 en niveles variables, pero frecuentemente sobre la norma, en ensilajes, concentrados comerciales, harina, gluten, maíz entero, canola y heno de alfalfa (Rosiles y Bautista, 2001). Se describen, además, hallazgos de hasta 19 µg/kg de AFB1, en ensilajes de alfalfa y concentrado comercial (Córdoba *et al.*, 2003), otro estudio detectó un 60% de muestras de maíz grano en rangos de 2-77 µg/kg (Flores *et al.*, 2006).

En Brasil, se han detectado concentraciones de AFB1 de 29,04 µg/kg (Sassahara *et al.*, 2005), 3,65 a 36,93 µg.kg-1 (De Freitas *et al.*, 2015), 1,68 a 194,51 µg.kg-1. (Motta *et al.*, 2015) hasta 6,2±1,2 a µg/kg-1, (Moura *et al.*, 2016) en muestras compuestas e insumos individuales de alimento para bovinos y caprinos. En Ecuador, ensayos en maíz para uso humano y animal arrojaron valores superiores a 20 µg/kg (Fon-Fay *et al.*, 2016), mientras que, en Argentina, se han registrado niveles de 0,02 mg/kg en maíz grano (Castellari *et al.*, 2015).

2.11 Aflatoxina M1 en lácteos de consumo humano

La presencia de AFM1 en leche y productos lácteos refleja la contaminación de los alimentos consumidos por los animales productores (Boudra *et al.*, 2007;

Sudakin, 2003) y, en consecuencia, presenta un patrón de distribución regional similar al descrito para la contaminación de alimentos para animales (EFSA, 2004).

En la CEE se desarrollan programas de monitoreo de AFM1 en lácteos, lo cual, sumado a la exigente legislación respecto a contaminantes en alimentos, determinan que se detecte la toxina con cierta frecuencia desde leche cruda y lácteos procesados, pero por lo general, en concentraciones por bajo de las exigencias oficiales. Los eventuales hallazgos de niveles prohibidos coinciden por lo general con esporádicos brotes de contaminación de alimentos animales importados: Italia 2000: 108 ng/l; Italia, 2004-2005: 0,035 µg/l; Suecia 2006: 257 ng/kg⁻¹ (Bognanno *et al.*, 2006; Decastelli *et al.*, 2007; Nordkvist *et al.*, 2009).

Situación opuesta se presenta en África y Asia, donde los niveles de contaminación láctea con AFM1 tienden a estar por sobre las recomendaciones internacionales y la contaminación es más frecuente (Abolfazl, 2005; EFSA, 2004; Ghanem y Orfi, 2009; Kim *et al.*, 2000; Shipra *et al.*, 2004; Srivastava *et al.*, 2001). Lo anterior estaría condicionado por una mayor contaminación natural de alimentos, un menor control de los insumos alimentarios para el ganado y legislaciones menos exigentes (EFSA, 2004). En algunos estudios esta contaminación se asocia a variaciones estacionales y a la comercialización informal de productos lácteos (Aslam *et al.*, 2016). En Indonesia se analizaron 113 muestras resultando el 57,5% positivas a AFM1, pero bajo la concentración aceptada por Europa (Nuryono *et al.*, 2008). En Japón se han detectado niveles de AFM1 de 0,011 ng/g, (Sugiyama *et al.*, 2008).

En el continente americano, los estudios tienden a encontrar contaminaciones frecuentes y altos niveles de AFM1 en zonas tropicales o calurosas como Bolivia (Montaño *et al.*, 2007), Brasil (Oliveira *et al.*, 1997; Oliveira *et al.*, 2008; Shundo *et al.*, 2009) y México (Flores *et al.*, 2006), y algunos hallazgos en países templados como Argentina (López *et al.*, 2001; López *et al.*, 2003). Destaca la escasa información disponible en los Estados Unidos de América, lo cual

podría interpretarse como una subestimación del riesgo sanitario de estas micotoxinas, en función a que la concentración máxima aceptada en lácteos de consumo humano, para AFM1 (0,5 µg /kg) en este país, es diez veces superior al límite vigente en Europa (EFSA, 2004).

2.12 Antecedentes nacionales

En regiones con características agroclimáticas similares a Chile se describe frecuentemente la presencia, tanto de hongos aflatoxigénicos como de las mismas aflatoxinas en una amplia gama de alimentos para humanos y animales (González *et al.*, 1999). En Chile se evidenció manifiesto interés científico por el tema durante la década de 1980, a partir de ese periodo existen esporádicas publicaciones nacionales relativas a la detección de aflatoxinas, orientadas por lo general a insumos nutricionales para el ganado y alimentos no lácteos para humanos. En 1983, el Servicio Agrícola y Ganadero reporta la detección de AFB1 en afrecho de soya de origen paraguayo en concentración de 37 µg/kg (Cotta, 1989). Un estudio realizado en las regiones IX y X, detectó la presencia de aflatoxina en 9 de 42 muestras de alimentos utilizados en vacas lecheras (Tamayo *et al.*, 1984). Entre 1986 y 1987, un estudio multidisciplinario investigó la presencia de AFB1 en trigo y maíz de origen nacional en diversos momentos de la cosecha y almacenaje, determinando un 22% de muestras contaminadas para el primero y 14% para el segundo, en concentraciones cercanas a 1 ppm (Rossi, 1989).

En 1989 se reporta la detección de aflatoxinas en insumos alimentarios y vísceras de animales detectándose estas toxinas en 8 de 29 especímenes (Vega y Zaelzer, 1989), también se detectó la presencia de aflatoxinas en 78 muestras de un total de 643, provenientes de insumos alimentarios de origen nacional e importados (Vega *et al.*, 1994). El Instituto de Salud Pública (ISP), entre 1989 y 1999, analizó 796 muestras de alimentos, la mayoría destinados al consumo humano, detectando una muestra de maní y otra de maíz positivas (Chile, 2010).

El Servicio Agrícola y Ganadero, en 78 muestras de tejidos animales recolectadas en 2003 y 2004, analizadas por el “Programa de Vigilancia de Exportaciones Pecuarias”, no encontró especímenes positivos, el mismo organismo no detectó la toxina en 15 muestras de nueces en el mismo periodo. Por otra parte, el “Programa de Control de Alimentos Para Uso Animal” del mismo servicio, del año 2004, en un total de 415 muestras, detectó 3 positivas (Cornejo y Villarroel, 2009). 726 análisis realizados por la Universidad de Concepción durante los años 2001, 2002 y 2003 en diversas matrices (maíz, trigo, centeno, soya, triticale, sorgo, avena, lupino, gluten, semilla de algodón, alimentos balanceados para ganado, aves y peces), indicaron que, tras realizar un “screening” de micotoxinas en 234 muestras, una resultó positiva a aflatoxinas (torta de maní). De la misma manera, la detección de aflatoxinas en 260 muestras arrojó una muestra positiva (torta de maní) en el rango de 1,3 y 17 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Vega *et al.*, 2003). Un estudio de 2007 sobre 12 muestras de maíz nacional, 12 argentinas y 6 estadounidenses determinó la presencia de AFB1 en dos de las últimas, en el rango de 6,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (INDAP, 2008).

Entre 2008 y 2009 el ISP, detectó solo una muestra positiva a AFB1 en maní tipo japonés importado. En 2011 detectó AFB1 en nuez moscada y curry, en concentraciones de 173, 3 y 23 $\mu\text{g}/\text{kg}$ respectivamente. En 2012 el mismo instituto detectó aflatoxinas totales en rangos de 0,99 a 4,68 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en muestras de pimentón y pimienta blanca (Chile, 2010; Chile, 2011; Chile, 2012).

A la fecha, no se ha reportado oficialmente la detección de AFM1 en el país, existiendo la tecnología disponible para su análisis y correspondiendo, además, a uno de los requisitos para la exportación de lácteos. El Servicio Agrícola y Ganadero informa, respecto a la detección de AFM1 en el programa de control de residuos de 2008, que desde el año 2005 incluye a lácteos, la ausencia de la toxina en 17 muestras de leche (SAG, 2009).

2.13 Métodos de detección de aflatoxinas

Existe una amplia variedad de métodos analíticos para la detección y cuantificación de aflatoxinas en los alimentos, materias primas, leche y productos lácteos. Para la CEE, los métodos validados para determinación de AFB1 se basan en la extracción en fase sólida en combinación con cromatografía líquida, y técnicas que combinan pruebas de inmunoafinidad (IA) con cromatografía líquida. Los métodos que emplean extracción en fase sólida han sido validados para la determinación de AFB1 en alimento para animales en niveles que van desde 8 a 14 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Por otra parte, la IA ha sido validada para concentraciones de 1 a 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para este tipo de matrices (Stroka *et al.*, 2004).

Para AFM1 en leche, existen métodos de análisis basados en ensayos de inmunoafinidad combinados con cromatografía líquida, validados en esta matriz para niveles entre 0,02 a 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Dragacci y Grosso, 2001). Además de los métodos descritos, existen técnicas analíticas basadas exclusivamente en extracción con solventes y cromatografía líquida, que no incluyen el uso de columnas de inmunoafinidad, con menores costos de implementación y niveles de eficiencia similares (Manetta *et al.*, 2005). También se dispone de técnicas de ELISA tanto para trabajo en laboratorio (Rodríguez *et al.*, 2003) o en terreno (Romerlabs, 2009). En los últimos años se han aplicado con éxito métodos como la cromatografía líquida en tándem acoplada a masas (LC-MS/MS) para la determinación de aflatoxinas en diferentes matrices, entre ellas leche (Aabdalah *et al.*, 2017).

En nuestro país se han implementado métodos analíticos para detección de aflatoxinas como la cromatografía en capa fina (Vega y Zaelzer, 1989). El Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Chile ha desarrollado una técnica de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) para la determinación de AFB1 en músculo de salmón, además algunos laboratorios privados disponen de métodos similares. El método oficial para nuestro país para la determinación de AFM1 en leche y leche en polvo (NCh3052 Of2007), corresponde a un proceso de extracción con solventes, purificación por

inmunoafinidad y determinación por cromatografía de alta resolución en fase líquida (Chile, 2007).

De acuerdo con Codex Alimentarius (Horwitz, 2000), los métodos analíticos deben detectar, cuantificar e identificar todos los residuos del analito en concentraciones inferiores a los LMR, con el fin de garantizar el cumplimiento de los requisitos relativos a la inocuidad alimentaria.

La aceptación de un método analítico y en consecuencia sus resultados, dependen de la confiabilidad de la metodología, este concepto se conoce como validación y corresponde a la demostración de la mencionada confiabilidad del método. En términos más precisos la validación corresponde a la demostración formal de que un método realiza lo que se espera de él, es decir establecer la concentración del analito en la concentración determinada en el límite de detección, en forma continuada y ajustada a los objetivos del análisis. El procedimiento de validación de un método analítico debe incorporarse en todas las investigaciones, lo que permite demostrar que el método seleccionado y desarrollado para una sustancia específica, en una muestra específica, produce resultados confiables y comparables. Lo anterior corresponde a un procedimiento establecido por organismos reguladores, aplicado a los resultados obtenidos en el análisis estadístico respectivo, que permite demostrar la confiabilidad de los resultados. Los parámetros por definir en una validación son tiempo de retención del analito, especificidad, recuperación, precisión, repetitividad, linealidad, límite de detección y capacidad de detección (Europa, 2002).

3 HIPOTESIS DE TRABAJO

En la leche de vacas productoras proveniente de predios de la zona central de Chile existen concentraciones de AFM1 sobre los niveles permitidos por las reglamentaciones nacionales.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar la concentración AFM1 en leche proveniente de vacas de planteles productivos de las Regiones Metropolitana y de Valparaíso de Chile, destinada al consumo de la población humana.

4.2 Objetivos específicos

1. Validar una metodología analítica de HPLC-FL que permita detectar AFM1 en leche.
2. Determinar y cuantificar AFM1 en leche de estanque proveniente de lecherías de la Región Metropolitana y de Valparaíso de Chile.
3. Asociar la presencia de AFM1 en leche con el manejo alimentario y características poblacionales de los predios en estudio.

5 MATERIAL Y MÉTODO

5.1 Reactivos

- Acetonitrilo grado HPLC
- Ácido Acético grado HPLC
- Ácido Trifluoroacético grado HPLC
- Agua desionizada para HPLC
- Benceno grado HPLC
- Cloruro de sodio
- Diclorometano grado HPLC
- Hexano grado HPLC
- Metanol grado HPLC
- Estándar de aflatoxina M1 (Sigma ®)

5.2 Equipos

- Balanza analítica (Precisa® modelo 125)
- Centrifuga (Eppendorf®, Modelo Centrifuge 5416)
- Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución acoplado a detector de fluorescencia (HPLC FL) (Waters®)

5.3 Sistema y Condiciones Cromatográficas

- Columna : Symmetry C18 5µm,6x250 mm
- Fase móvil : Agua para HPLC 1600 ml
Acetonitrilo 300 ml
Metanol 400 ml
- Flujo de la fase móvil : 0,8 ml/minuto
- Temperatura de la columna : 35° C
- Longitud de onda excitación/emisión : 363/423 nm
- Volumen de inyección : 150 µl

5.4 Extracción

A 20 ml de leche en estudio se le agregaron 35 ml de metanol; se agitó, sonicó y centrifugó a 3000 rpm por 7 minutos. El sobrenadante se filtró través de un papel Wattman-41; a 25 ml del filtrado se le adicionaron 10 ml de NaCl al 20% y 15 ml de hexano; se agitó y centrifugó a 3000 rpm por 7 min. Se descartó la fase orgánica rica en lípidos. A la fase acuosa se le adicionaron 10 ml de diclorometano, se agitó y se dejó reposar por 5 min, para permitir la separación de fases, extrayendo y conservando la nueva fase orgánica; se repitió la extracción con diclorometano dos veces, los sobrenadantes se llevaron a sequedad bajo flujo de nitrógeno.

5.5 Derivatización

La muestra se suspendió en 250 µl de benceno/acetonitrilo en proporción de 98/2; se centrifugó a 2000 rpm por 5 minutos. Al sobrenadante se le adicionó 300 µl de una mezcla de agua/Ácido Acético/Ácido Trifluoroacético en proporción de 7/1/2 y se incubó a 65° C por 10 min.

Finalizada la incubación, las muestras fueron sometidas a Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detector de Fluorescencia (HPLC-FL).

5.6 Validación del método

Siguiendo las recomendaciones de la Decisión 96/23/CE de la CEE (Europa, 2002), se seleccionaron los siguientes parámetros para la validación del método analítico: tiempo de retención del analito, especificidad, recuperación, precisión (reproducibilidad y repetibilidad), linealidad, límite de decisión y límite de detección.

5.7 Parámetros de validación

5.7.1 Tiempo de retención del analito:

Se analizaron 6 preparaciones de droga pura a concentración conocida, utilizando un estándar de aflatoxina M1 (Sigma ®) y se sometieron a un ensayo de HPLC-FL para establecer el promedio de tiempo de elución del analito en el cromatograma.

5.7.2 Especificidad:

Se define como la propiedad de un método de distinguir entre el analito que se está midiendo y otras sustancias. Se determinó analizando 20 muestras o matrices blanco, las cuales correspondieron a muestras de leche de origen comercial, que sometidas a análisis laboratorio, no evidenciaron la presencia de AFM1. En estas muestras se verificó la existencia de posibles interferencias en la región de los cromatogramas en la que cabía esperar la elución del analito.

5.7.3 Recuperación:

Se fortificaron 10 matrices en blanco, adicionándoles estándares de AFM1, para obtener concentraciones de 0,01 µg/kg, luego se calculó el porcentaje de recuperación mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de recuperación} = \frac{100 \times \text{concentración muestra}}{\text{Nivel de fortificación}}$$

Los resultados obtenidos fueron aceptados cuando se encontraron dentro de los intervalos presentados en la tabla 3.

Tabla 3. Intervalos de recuperación aceptados según fracción de masa.

Fracción de Masa ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Intervalo (%)
≤ 1	- 50 a + 20
> 1 a 10	- 30 a + 10
≥ 10	- 20 a + 10

(Europa, 2002).

5.7.4 Precisión:

Corresponde al grado de concordancia entre los resultados de diferentes ensayos obtenidos en condiciones estipuladas (predeterminadas). Su determinación se basa en el análisis de diferencias de los resultados entre ensayos, cuanto mayor es la variación menor es la precisión. Este parámetro se compone de la determinación de la reproducibilidad y la repetibilidad.

Para estos efectos se realizaron ensayos a concentraciones de 0,01; 0,02 y 0,4 $\mu\text{g}/\text{l}$, construyendo las curvas de concentración, calculando la media aritmética, estándar (DE) y coeficiente de variación (CV), para cada nivel de fortificación, en cada uno de los parámetros señalados.

Para determinar la reproducibilidad se desarrollaron 6 ensayos, de las características señaladas, por diferentes operadores dentro del laboratorio, con el mismo método e idénticas muestras, los resultados fueron aceptados conformes si los coeficientes de variación se encontraban dentro de los valores presentados en la tabla 4.

Tabla 4. Coeficientes de variación aceptados según fracción de masa.

Fracción de masa	CV de Reproducibilidad (%)
1 µg/l	35
10 µg/l	35
100 µg/l	23
1000 µg/l	16

Para aquellas fracciones de masa inferiores a 10 µg/l, los CV deben ser lo más bajos posible. (Europa, 2002).

Para determinar la repetibilidad, se desarrollaron los mismos ensayos que para reproducibilidad, en este caso por un único operador, con el mismo método e idénticas muestras y equipo. Los resultados fueron aceptados cuando el coeficiente de variación de cada concentración fue la mitad o igual al coeficiente de variación de la precisión (Europa, 2002).

5.7.5 Linealidad:

La linealidad del método se determinó a través de la cuantificación de AFM1 en matrices fortificadas a concentraciones de: 0,01; 0,02; 0,04; 0,08 y 0,2 µg/l, con tres repeticiones, construyendo curvas de calibración y aplicándoles una prueba de correlación, obteniendo los respectivos coeficientes de determinación (R^2), los cuales mientras más cercanos al valor 1 indicaron una mayor o mejor linealidad de las curvas.

5.7.6 Límite de detección y Límite de cuantificación

El límite de detección corresponde a la mínima concentración del analito detectable por el método, por otra parte, el límite de cuantificación se define como la más pequeña concentración del analito que puede ser determinada con un nivel de exactitud y precisión aceptable.

Para determinar estos dos parámetros, se realizó un ensayo con 20 matrices fortificadas con 0,01 µg/l de droga pura, correspondiente a la concentración mínima utilizada en todos los ensayos del presente trabajo, a partir del cual se establecieron la media de la concentración, desviación estándar y coeficiente de variación de los resultados cada análisis para el posterior cálculo aritmético de los parámetros definidos.

5.8 ESTUDIO DE CAMPO

5.8.1 Predios en estudio

El universo total de predios incorporados al estudio, correspondieron a 44 planteles bovinos de las Regiones Metropolitana y de Valparaíso, dedicados a la producción de leche comercializada a plantas industriales o queserías artesanales. Cada predio fue caracterizado respecto a su ubicación geográfica, prácticas de alimentación, tamaño del rebaño y producción individual.

5.8.2 Obtención de Muestras

Durante los años 2008 y 2009, se obtuvieron muestras de 40 ml de leche cruda desde el estanque de almacenamiento de cada predio, la cual incluyó leche producida por la totalidad de las vacas del predio durante la ordeña anterior. Las muestras fueron recogidas en tubos Falcon de 50 ml y transportadas en refrigeración ($4 \pm 2^\circ \text{C}$) desde el predio al laboratorio dentro de 24 horas, donde fueron almacenadas a $-20 \pm 2^\circ \text{C}$ hasta el momento del análisis.

5.8.3 Cuantificación de aflatoxina M1

Las muestras de leche de los predios en estudio fueron sometidas a un ensayo de HPLC-Fluorescencia. Para determinar la concentración de AFM1, el área obtenida en el respectivo cromatograma, asociada al *peak* identificado como AFM1,

se interpoló en un análisis de correlación en curvas de calibración, cuya ecuación se define como:

$$\text{Concentración del analito en la muestra} = (c-y)/b$$

Donde:

c= área cromatográfica

y= intercepto

b= pendiente

El resultado de interpolación en las curvas de calibración permitió determinar la concentración de la toxina en cada muestra.

5.8.4 Análisis estadístico

Se realizó estadística descriptiva de las variables en estudio, de acuerdo con lo indicado en Tabla 5. Adicionalmente se realizó una prueba de normalidad (Shapiro-Wilks modificado) y, cuando fue necesario, se realizó la transformación de los valores a logaritmo en búsqueda de una distribución normal.

Tabla 5. Variables incluidas en la evaluación de niveles de aflatoxinas en leche

Nombre	Tipo	Característica	Unidad
Aflatoxinas	Cuantitativa	Dependiente	µg/kg
Vacas en ordeña	Cuantitativa	Independiente	Número
Producción láctea individual	Cuantitativa	Independiente	Litros/vaca/día
Sistema de alimentación	Cualitativa	Independiente	SP, PS o RC*

*SP: Sólo pastoreo, PS: Pastoreo más suplementación, RC: Ración completa.

Se representaron las asociaciones de manera gráfica utilizando diagramas de gráficos de caja (*box-plot*). Para describir la asociación entre la variable dependiente y las independientes, se realizó una serie de análisis univariados dependiendo del tipo y distribución de las variables. En el caso de variables cuantitativas

independientes se realizó una prueba de correlación y un análisis de varianza (paramétrico o no paramétrico dependiendo de la distribución de las variables). Para las variables cualitativas independientes se realizó una prueba de asociación (χ^2). Para establecer la asociación entre variables independientes sobre la presencia de AFM1 en las muestras de leche se realizó una prueba de regresión logística. Para estos efectos se utilizó el software estadístico Infostat® (Di Rienzo *et al.*, 2010).

6 RESULTADOS

6.1 Validación del método

6.1.1 Tiempo de retención del analito:

Se determinó un tiempo de retención del analito, de 16,15 minutos, con una DE de 0,0548 min. y un CV de 0,34%, lo anterior indica la zona de los cromatogramas donde eluye efectivamente AFM1.

6.1.2 Especificidad:

En ninguno de los cromatogramas de las 20 muestras blanco sometidas a análisis se detectaron interferencias en la zona asociada al tiempo de retención de AFM1, lo cual indica la inexistencia de sustancias en la matriz, leche fluida, que pueda ser confundido con la aflatoxina en estudio al emplear este método analítico.

6.1.3 Recuperación:

Los datos de recuperación obtenidos para AFM1 en las matrices en blanco se presentan en la tabla 6:

Tabla 6. Porcentaje de Recuperación de AFM1 en leche analizada por HPLC-Fluorescencia.

Porcentaje de Recuperación de AFM1				
Análisis	Concentración (µg/l)	Área Matriz Fortificada	Área Droga Pura	Promedio %
1	0,01	132,659	144,566	91,76%
2	0,01	142,456	152,698	93,29%
3	0,01	132,666	144,577	91,76%
4	0,01	128,456	142,030	90,44%
5	0,01	145,123	137,899	105,24%
6	0,01	137,987	158,001	87,33%
7	0,01	144,236	156,307	92,28%
8	0,01	132,659	140125	94,67%
9	0,01	142,456	149,456	95,32%
10	0,01	147,258	156,360	94,18%
Promedio		138595,60	148201,90	93,52%
Desv. Estándar		6566,68	7347,68	
CV %		4,74%	4,96%	

Se establece, entonces, un porcentaje de recuperación de un 93,52%, el cual se encuentra dentro de los rangos recomendados por la Decisión 657 de año 2002 (Europa, 2002), indicando que el método es altamente eficiente para recuperar, y en la práctica, determinar la cantidad de AFM1 contenida en los especímenes analizados.

6.1.4 Precisión:

Para determinar el grado de concordancia entre los resultados de ensayos desarrollados en diferentes condiciones, se analizaron las diferencias de los resultados obtenidos mediante los análisis de reproducibilidad y repetibilidad (tablas 7 y 8).

Tabla 7. Reproducibilidad para AFM1 en leche analizada por HPLC-Fluorescencia.

Reproducibilidad									
Concentración enriquecimiento	Concentración cuantificada						Promedio	DE	CV %
	a	b	c	d	e	f			
0,01	0,003	0,013	0,016	0,015	0,016	0,014	0,013	0,005	38,622
0,04	0,049	0,037	0,032	0,034	0,035	0,036	0,037	0,006	16,270
0,20	0,199	0,200	0,201	0,201	0,201	0,201	0,201	0,001	0,417

En el ensayo de reproducibilidad se buscó determinar el coeficiente de variación de la concentración de analito cuantificada en concentraciones conocidas de 0,01, 0,04 y 0,2 µg/l de AFM, en diferentes condiciones dentro del mismo laboratorio, se consideró aceptable este parámetro cuando el CV de cada concentración medida, es menor a lo señalado por la siguiente tabla.

Fracción de masa	CV de Reproducibilidad (%)
1 µg/l	35
10 µg/l	35
100 µg/l	23
1000 µg/l	16

Según lo anterior, se acepta la reproducibilidad intralaboratorio, ya que el CV obtenido, 18,45 %, es menor que el indicado para las fracciones de masa analizadas, lo anterior indica que variaciones menores en las condiciones de procesamiento no afectan de manera importante los resultados de los ensayos.

Tabla 8. Repetibilidad para AFM1 en leche analizada por HPLC-Fluorescencia.

Repetibilidad									
Concentración enriquecimiento	Concentración cuantificada						Promedio	DE	CV %
	a	b	c	d	e	f			
0,01	0,010	0,010	0,011	0,011	0,007	0,009	0,010	0,0015	15,57
0,04	0,040	0,040	0,018	0,038	0,043	0,041	0,037	0,0093	25,33
0,20	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200	0,0000	0,00

En el ensayo de repetibilidad se buscó determinar la variabilidad de los resultados correspondientes a la concentración de analito, cuantificada en concentraciones conocidas de 0,01, 0,04 y 0,2 $\mu\text{g/l}$ de AFM1, en condiciones idénticas en tres ensayos, determinándose un CV promedio de 13,62 %.

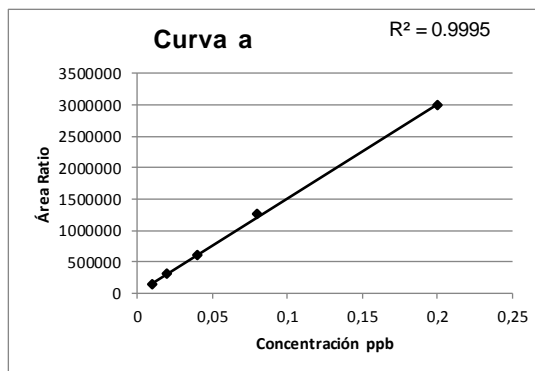
El ultimo valor citado se encuentra en rango correspondientes a la mitad o igual al CV de la reproducibilidad intralaboratorio en las mismas concentraciones de la toxina, consecuentemente se determinó que el método cumple con el criterio de validación aceptado convencionalmente para considerarlo preciso (Europa, 2002).

6.1.5 Linealidad:

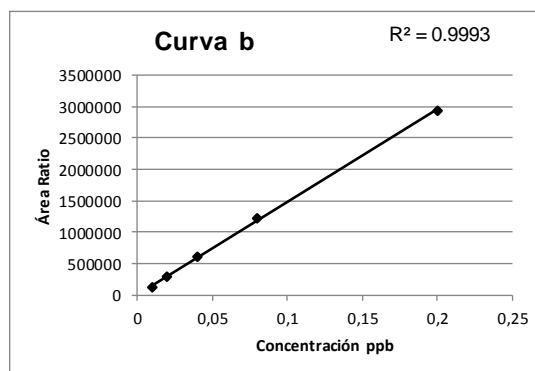
La figura 2 presenta las curvas de calibración, que demuestran la linealidad del método.

LINEALIDAD DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN ESTANDAR: AFLATOXINA M1

CURVA A AFLAM1		
Análisis	Concentración (ppb)	Area
1a	0,01	148456,0
2a	0,02	301545,0
3a	0,04	601458,0
4a	0,08	1254659,0
5a	0,20	2987445,0



CURVAB AFLAM1		
Análisis	Concentración (ppb)	Area
1b	0,01	132456,0
2b	0,02	300547,0
3b	0,04	611453,0
4b	0,08	1239987,0
5b	0,20	2942587,0



CURVAC AFLAM1		
Análisis	Concentración (ppb)	Area
1c	0,01	152669,0
2c	0,02	356987,0
3c	0,04	685456,0
4c	0,08	1326977,0
5c	0,20	3001445,0

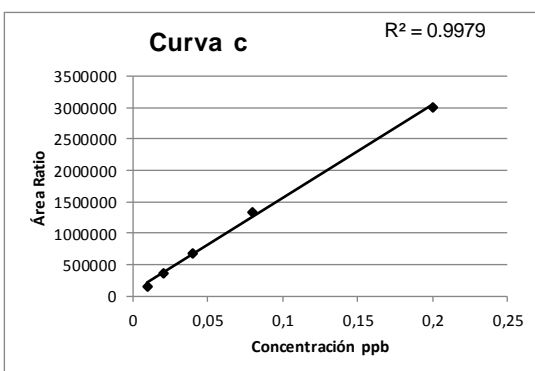


Figura 2: Curvas de calibración para AFM1 en Leche.

Los valores del coeficiente de determinación (R^2) obtenidos en cada caso correspondieron a 0,995; 0,9993 y 0,9979 respectivamente, muy cercanos a 1, lo cual indica una alta correlación entre las concentraciones reales de AFM1 y las concentraciones determinadas por el método utilizado para determinarla, consecuentemente se considera que el método presenta una alta linealidad.

6.1.6 Límite de detección(LD) y Limite de cuantificación (LC)

Se analizaron 20 muestras fortificadas a concentraciones de 0.01 $\mu\text{g/l}$, determinándose una concentración promedio detectada de 0.00909 $\mu\text{g/l}$, una DE de 0,00036 $\mu\text{g/l}$, y un CV de 3,932 %, aplicando las fórmulas de cálculo sugeridas por la bibliografía, se determinó un límite de detección de 0.00909 $\mu\text{g/l}$, puesto que el CV de no supera el 25%. Para el cálculo del Límite de Cuantificación, al LD se le sumó 1,64 veces la DE de la concentración de las muestras, obteniendo un valor de 0,00967 $\mu\text{g/l}$ ($\text{LC} = 0.00909 + (1,64 \times 0,00036)$). Estos resultados indican que el método posee una precisión y veracidad aceptables a concentraciones del analito cercanas a 0.01 $\mu\text{g/l}$. (ISO, 1997; Europa, 2002).

6.2 Cuantificación de AFM1

Se obtuvieron y analizaron muestras de leche de 44 predios, detectándose concentraciones de AFM1 entre 0 (no detectada) y 0,3 $\mu\text{g/l}$, con una media de 0,06 $\mu\text{g/l}$ y una DE de 0,08 $\mu\text{g/l}$. Respecto a la presencia de la toxina en el universo de predios, se determinó su ausencia (no detectada) en 11 de ellos, en 17 se encontró en concentraciones bajo los límites de la normativa nacional y en 16 sobre los niveles aceptados en el país (0,05 $\mu\text{g/l}$), cabe consignar para efectos de los análisis estadísticos posteriores, que esta variable no presento distribución normal (tabla 9).

Tabla 9. Concentración de aflatoxina M1 según la norma chilena para consumo humano en 44 predios de las Regiones Metropolitana y de Valparaíso de Chile.

Concentración de AFM1	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa (%)
No detectada	11	25
Positivos bajo norma chilena (<0,05 µg/l)	17	38,6
Positivos sobre norma chilena (=>0,05 µg/l)	16	36,4
Total	44	100

6.2.1 Características generales y estadística descriptiva

Los 44 predios fueron caracterizados según distribución geográfica, tamaño del rebaño, producción diaria individual por vaca y sistemas de alimentación, presentándose estos resultados en las siguientes tablas:

Tabla 10: Distribución geográfica (por comuna) de los predios estudiados para la detección de aflatoxina M1 en leche.

COMUNA	Número de predios
Melipilla	20
Casablanca	16
María Pinto	4
Catemu	1
San Felipe	1
Curacavi	1
Calera de Tango	1
Total	44

El número de vacas en ordeña por predio fluctuó entre 6 y 950 individuos, la media de esta variable fue de 211 vacas y la DE de 200,52. Estos resultados indican una alta variabilidad en el tamaño de rebaño de los predios estudiados. La distribución de las lecherías según número de vacas en ordeña se presenta en la tabla 12.

Tabla 11: Caracterización de predios según número de vacas en ordeña estudiados para la detección de aflatoxina M1 en leche.

Número de vacas en ordeña (VO)	Frecuencia absoluta (n)	Frecuencia relativa (%)
Pequeño (1-20)	9	20,4
Mediano (21-100)	5	11,4
Grande (101 o más)	30	68,2
.Total	44	100

La producción individual de leche, estimada según el promedio de litros/vaca/día, varió entre 8 y 44 litros, siendo la media 23,6 litros y la DE 9,66, indicando una alta variabilidad entre las lecherías estudiadas. La distribución de los predios según producción láctea individual promedio se presenta en la tabla 13.

Tabla 12: Caracterización de predios según producción láctea diaria promedio por vaca, estudiados para la detección de aflatoxina M1 en leche.

Producción individual por vaca (l./día)	Frecuencia absoluta(n)	Frecuencia relativa (%)
Baja (0-10 l./día)	8	18,2
Media (11-20 l./día)	10	22,7
Alta (21-30 l./día)	18	40,9
Muy alta (31 ó + l./día)	8	18,2
Total	44	100

Los sistemas de alimentación, respecto al tipo y forma de ofrecer el alimento a las vacas lecheras, presentaron importantes variaciones, para efecto de análisis se agruparon los predios en tres estratos: sólo pastoreo, en los cuales las vacas obtenían el alimento directamente desde las empastadas, pastoreo con suplementación, cuando además de lo anterior se les ofrecía harinilla de trigo. El resto de los predios utilizaba el sistema de alimentación con ración completa, el cual corresponde al ofrecimiento de una combinación de forrajes, subproductos y concentrados, con diferente grado de mezclado, directamente a comederos ubicados en patios de alimentación. La distribución de las lecherías de acuerdo a los sistemas de alimentación se presenta en la tabla 14.

Tabla 13: Caracterización de predios según sistema de alimentación estudiados para la detección de aflatoxina M1 en leche.

Sistema de alimentación	Frecuencia absoluta (n)	Frecuencia relativa (%)
Sólo pastoreo	9	20,5
Pastoreo y suplementación	3	6,8
Ración completa	32	72,7
Total	44	100

A continuación se presentan, en forma de gráficos de caja y estadígrafos descriptores, la relación entre las concentraciones de AFM1 y las características de los predios, pudiéndose evidenciar parámetros de dispersión (DE, valores máximos y mínimos), como de posición (media, mediana), en cada caso las variables cuantitativas (número de vacas en ordeña y promedio diario de producción láctea) y sistemas de alimentación, se estratificaron según los criterios definidos previamente: figuras 3, 4 y 5.

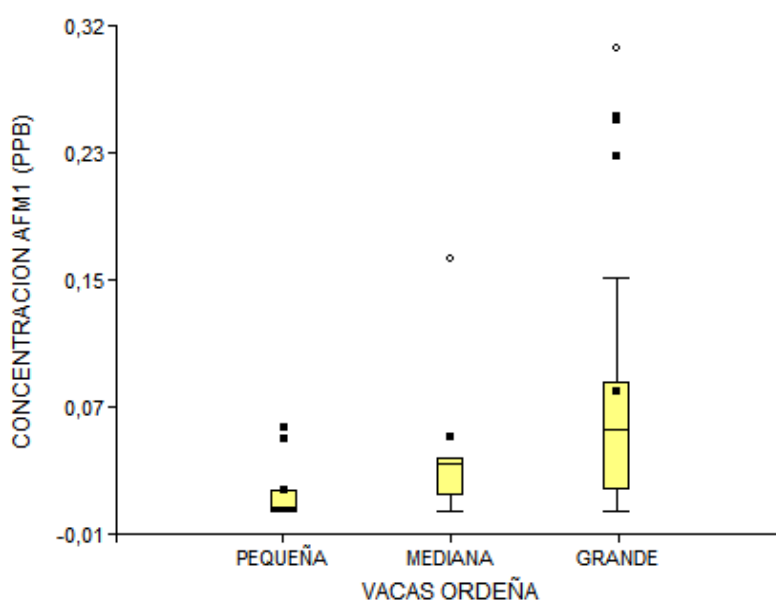


Figura 3: Concentraciones de AFM1 en leche por predio según número de vacas en ordeña.

Los estadígrafos descriptores (media, DE y mediana) de la variable “Concentración de AFM1 en leche” según número de vacas en ordeña, de acuerdo a la estratificación definida, corresponden respectivamente a: lechería pequeña: 0,014; 0,02 y 0,003, lechería mediana 0,05; 0,06 y 0,03 y lechería grande 0,08; 0,08 y 0,03 $\mu\text{g/l}$, estas cifras, además de la observación del gráfico, indican una tendencia a encontrar mayores concentraciones de la toxina en la medida que el tamaño del rebaño aumenta, también puede observarse una dispersión importante de las concentraciones de AFM1 y la existencia de valores extremos, particularmente valores más altos, dentro de cada estrato.

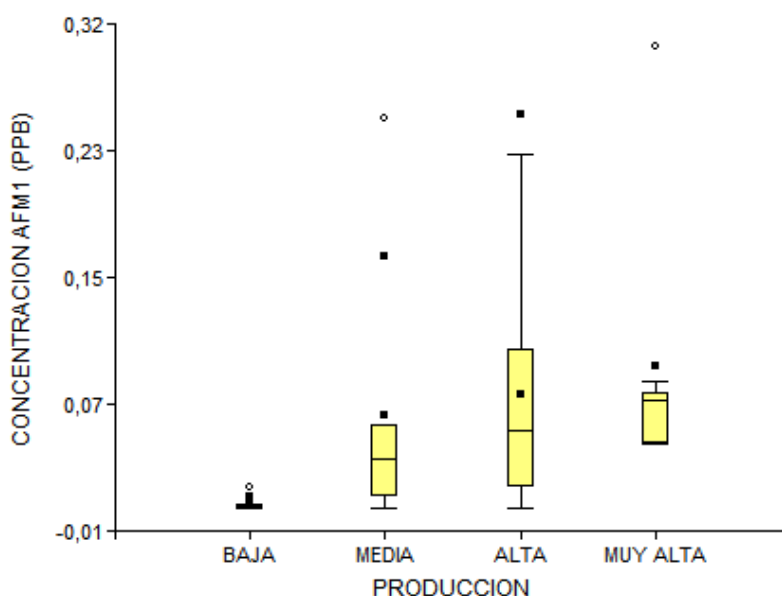


Figura 4: Concentraciones de AFM1 en leche por predio según producción láctea individual.

Los estadígrafos descriptores (DE y mediana) de la variable “Concentración de AFM1 en leche” según producción láctea individual, de acuerdo a la estratificación previamente definida, corresponden respectivamente a: baja producción: 0,003; 0,005 y 0,00001, producción media: 0,06; 0,08 y 0,03, alta producción: 0,07; 0,07 y 0,05 y muy alta producción: 0,09; 0,08 y 0,07 $\mu\text{g/l}$. En forma similar al análisis anterior, se evidencia una tendencia a encontrar mayores concentraciones promedio de la toxina en la medida aumentan, en este caso, los

niveles de producción individual, y nuevamente una dispersión importante de las concentraciones de AFM1 y la existencia de valores extremos, particularmente valores más altos, dentro de cada estrato.

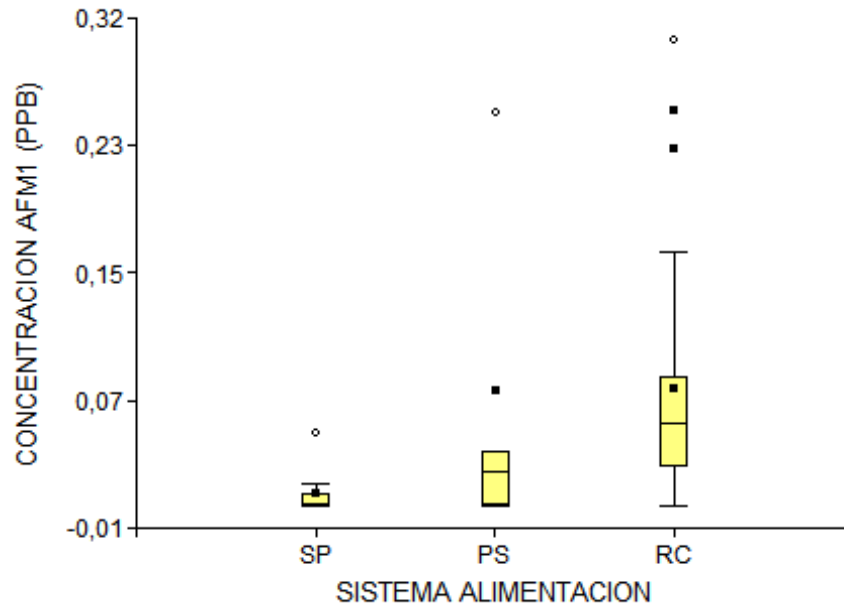


Figura 5: Concentraciones de AFM1 en leche por predio según sistema de alimentación (SP: Solo pastoreo, PS: Pastoreo y suplementación, RC: Ración completa).

Los estadígrafos descriptores (media, DE y mediana) de la variable “Concentración de AFM1 en leche” según sistema de alimentación, de acuerdo a la estratificación definida, corresponden respectivamente a: solo pastoreo: 0,01; 0,01 y 0,001, pastoreo y suplementación: 0,07; 0,1 y 0,02 y ración completa: 0,01; 0,07 y 0,05 $\mu\text{g/l}$. Estos resultados más la observación del gráfico correspondiente, señalan una tendencia a encontrar mayores concentraciones de la toxina en la medida que se incorpora mayor proporción de concentrado en las raciones, observándose también una dispersión importante de las concentraciones de AFM1 y la existencia de valores extremos, particularmente valores más altos, dentro de cada estrato.

En resumen, los análisis precedentes denotan una distribución relativamente heterogénea de las concentraciones de AFM1 en la leche los predios de acuerdo con las características estudiadas, no obstante, se evidencia cierta asociación entre las variables relacionadas con la intensificación productiva y los niveles de concentración de la toxina en la leche.

6.2.2 Análisis univariados

Con el objetivo de asociar el efecto individual de cada una de las variables independientes sobre la concentración de AFM1 en las muestras de leche, se aplicaron pruebas estadísticas, según se expone a continuación.

6.2.2.1 Concentración de AFM1 y cantidad de vacas en ordeña

La relación entre estas variables se expone gráficamente en la figura 6, la correlación (Spearman) para concentración de AFM1–Vacas en ordeña entregó un coeficiente de correlación (r) de 0,28 ($p=0,06$), lo cual indica la una baja asociación positiva y no significativa entre las variables, concluyéndose la inexistencia de correlación relevante entre ellas.

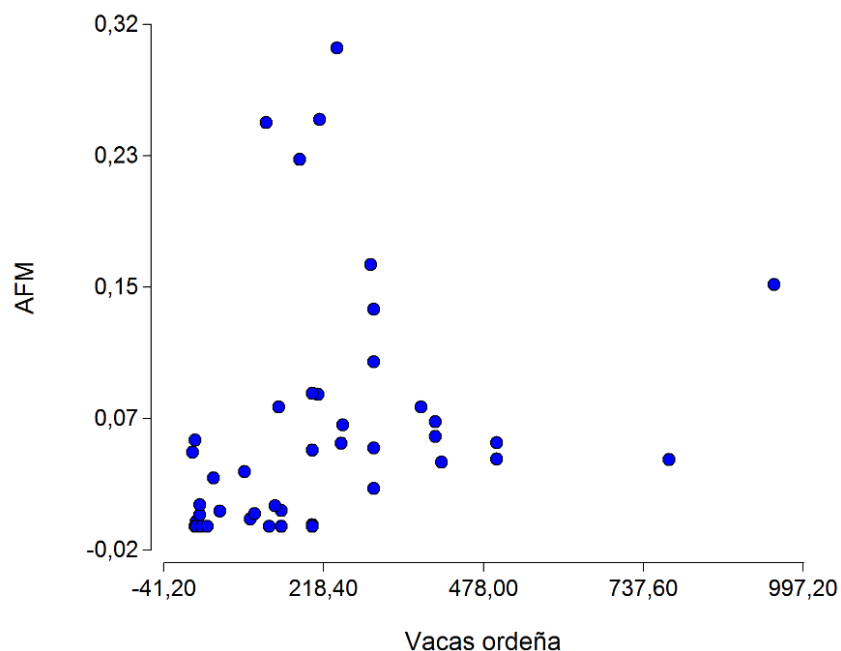


Figura 6: Concentración de AFM1 y número de vacas en ordeña.

Al someter los datos a un análisis de varianza (normalizando la distribución de AFM1 mediante su transformación a logaritmo) y agrupando arbitrariamente los predios en dos estratos, considerando para ello poblaciones de vacas en ordeña sobre y bajo 100 individuos, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,0076$), demostrándose mayor concentración de AFM1 en predios con mayor número de vacas en ordeña (101 vacas o más).

6.2.2.2 Concentración de AFM1 y producción láctea

El análisis de correlación (Spearman) entre concentración de AFM1 y producción láctea individual, entregó un coeficiente de correlación (r) de 0,33 ($p=0,03$), es decir una baja correlación, aunque, positiva y significativa entre ambas variables.

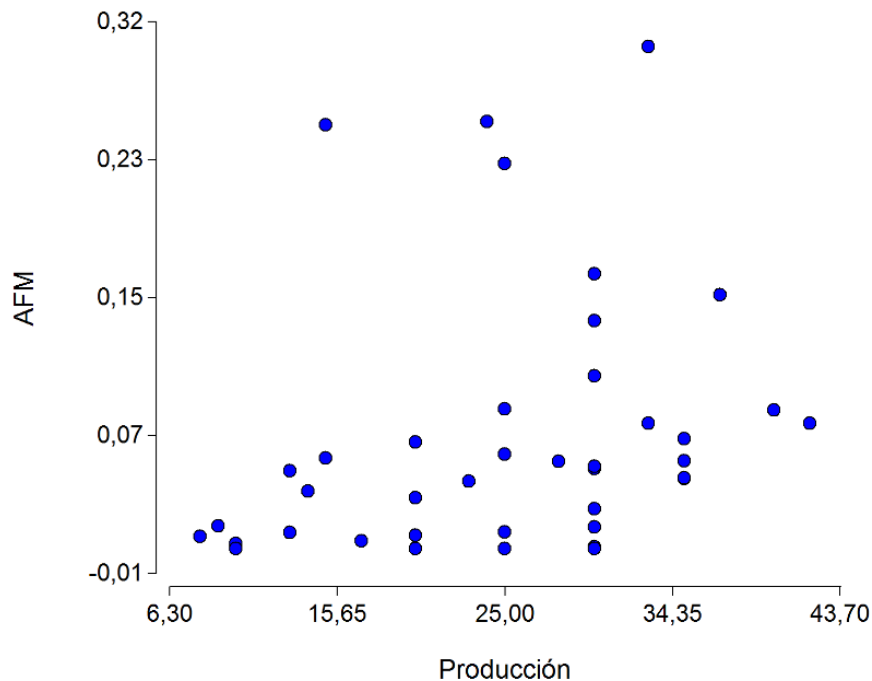


Figura 7: Concentración de AFM1 y producción láctea individual promedio.

Al someter los datos a un análisis de varianza (normalizando la distribución de AFM1 mediante su transformación a logaritmo), considerando dos estratos de producción, con un punto de corte en los 21 litros/vaca/día, se concluye que existe

diferencia estadísticamente significativa ($p=0,0257$) respecto la concentración de láctea de la toxina entre ambos grupos.

6.2.2.3 Presencia de AFM1 y sistemas de alimentación.

Con el objetivo de determinar la existencia de asociación entre las variables cualitativas, sistema de alimentación y presencia de AFM1, se realizó una Prueba de X^2 entre los sistemas que utilizaban Ración Completa (RC) con los que alimentaban a los animales con algún componente de pastoreo, combinando los sistemas con Solo Pastoreo (SP) y Pastoreo con Suplementación (PS) en un nuevo estrato único, respecto a la presencia o ausencia de la toxina en la leche producida. La tabla de contingencia respectiva se presenta a continuación.

Tabla 14: Asociación entre sistemas de alimentación y presencia de AFM1 en leche.

Sistema de Alimentación	AFM1		Total
	Positivos	Negativos	
RC	27	4	31
PS+SP	6	7	13
Total	33	11	44

En este ensayo se obtuvo un valor de $p = 0,0078$, mediante la corrección de Fisher, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos y un *Odds ratio* de 7,88 (1,85 – 33,5), indicando casi 8 veces más probabilidades de encontrar niveles detectables de AFM1 en la leche de rebaños alimentados exclusivamente con ración completa, versus predios con componente de pastoreo en su alimentación.

6.2.3 Análisis multivariante

Con el objetivo de determinar el efecto conjunto de las variables independientes (tamaño del rebaño, producción individual por vaca y sistema de alimentación) sobre la presencia de AFM1 en leche, se realizó una prueba de regresión logística. Para ello se dicotomizó la variable dependiente de acuerdo al siguiente criterio: a) ausencia de toxina o presencia en concentraciones bajo la norma nacional de 0,05 µg/l ó, b) presencia de la toxina en concentraciones sobre la citada norma, considerándola entonces como una variable cualitativa categórica. Los resultados indicaron que: las variables en conjunto, el número de vacas en ordeña, y los sistemas de alimentación no tenían efecto en la presencia o ausencia de la toxina en la leche, sin embargo, el volumen de producción individual presentó un efecto significativo ($p = 0,0017$) sobre la presencia de la toxina en las muestras, es decir la existencia de la toxina en concentraciones superiores es más frecuente en predios con alta producción individual promedio.

Tabla 15: Resultados del análisis de Regresión Logística.

Factor de Variación	Grados de libertad	-2[L0-L1]	p
Producción	3	15,1	0,0017
Tamaño del rebaño	2	4,5	0,1074
Sistema de alimentación	1	0,0	>0,9999

7 DISCUSION

Los estudios de validación de metodologías analíticas corresponden a la demostración que el método en estudio es capaz de detectar un analito de forma confiable y precisa, en una determinada matriz. Previo a este estudio, el Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (FARMAVET) disponía de un método de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) para la determinación de AFB1 en músculo de salmón. El trabajo desarrollado, previa y durante el presente estudio, aplicó la técnica con mínimas modificaciones, en la práctica utilizar el estándar específico de AFM1 y reemplazar a igualdad de peso las matrices, utilizando esta vez una matriz líquida, en este caso leche fluida.

La validación de la metodología analítica se realizó bajo las condiciones del laboratorio de FARMAVET y los resultados obtenidos indican que cumple con los requisitos exigidos a nivel internacional para su utilización en la detección de AFM1 en leche (Europa, 2002; Horwitz, 2000). Se determinó un tiempo de retención del analito de 16,15 minutos, no detectándose interferencias en la zona cercana al tiempo de retención, por lo que la prueba se consideró específica. Los parámetros asociados a la exactitud y confiabilidad, como el porcentaje de recuperación, que correspondió a un 93,52%, la precisión, la repetitividad y la linealidad, son compatibles con lo exigido para validar el método. Respecto a la eficacia del método para obtener resultados confiables a bajas concentraciones de AFM1, se determinó un límite de detección de 0,0097 µg/l y una capacidad de detección de 0,0103 µg/l. Los anteriores resultados indican que el método cumple los requisitos de validación convencionales correspondientes a la Decisión 657 de año 2002 (Europa, 2002). Cabe consignar que en la abundante literatura relativa a estudios de contaminación láctea con AFM1, los métodos empleados han sido validados de acuerdo a la normativa internacional, difiriendo básicamente en los parámetros asociados en la eficiencia de las técnicas para detectar muy bajas concentraciones de la toxina (Aabdalah *et al.*, 2007; Nuryono *et al.*, 2008; Quevedo, 2014; Michlig *et al.*, 2015; Crispim De Oliveira *et al.*, 2016).

A pesar del buen despeño del método utilizado, al seleccionar una técnica analítica para la cuantificación de AFM1 debe tenerse en consideración, en futuros estudios, la existencia otras metodologías que se complementan con otras tecnologías, como el uso de columnas de inmunoafinidad, pruebas de ELISA, cromatografía líquida acoplada a masas en tándem (HPLC-MS/MS) y que también han demostrado ser eficientes para detectar este analito en la matriz láctea (Aabdalah *et al.*, 2007; Nuryono *et al.*, 2008; Quevedo, 2014; Crispim De Oliveira *et al.*, 2016). Recientemente se ha aplicado la tecnología de Cromatografía Líquida de Ultra Eficiencia (UPLC-MS/MS) asociada análisis masa/masa presentando un eficiente despeño (Michlig *et al.*, 2015).

En el presente estudio se analizaron 44 muestras de leche cruda provenientes de igual número de predios de las regiones de Valparaíso y Metropolitana de Chile, detectándose AFM1 en 33 (75%) de ellas, entre las cuales en 16 (36.3%) la concentración de la toxina sobrepasó la norma nacional de 0,05 µg/l, siendo éste el primer reporte positivo de la toxina en leche en el país. Otros estudios realizados en Sudamérica, en condiciones agroecológicas diversas, presentan resultados variables: en Argentina, Rosario, Provincia de Santa Fe, se detectaron 18 de 77 muestras positivas, pero bajo 0,05 µg/l (López *et al.*, 2003), recientemente, en la misma provincia, se detectó AFM1 en el 38,8% de 160 muestras de leche de estanque, también bajo el límite citado (Michlig *et al.*, 2015), en la provincia de Córdoba, localidad de Villa María, 64 de 94 muestras de leche de estanque resultaron positivas a AFM1, el 28 % del total superó el límite de la CEE para lácteos de uso infantil (0,025 µg/l) y el 11% la normativa general para leche (0,05 µg/l) (Alonso *et al.*, 2010). En el estado de Paraná, Brasil, se estudiaron 42 muestras resultando el 24% positivas a la toxina, tres de las cuales presentaron valores superiores al límite citado (Sassahara *et al.*, 2005). Otro estudio en Sao Paulo detectó un 6,5% de las muestras contaminadas sobre la norma (Shundo y Sabino, 2006). En un estudio en el sur de Brasil, se analizaron leches en diferentes grados de proceso entre leche fresca y leche en polvo, detectándose hasta un 67 % de las muestras contaminadas sobre el límite previamente explicitado (Scaglioni

et al., 2014). En Bolivia, Municipio de Achacachi, se analizó leche fresca en dos épocas: húmeda (abril-mayo) y época seca (agosto-septiembre). De un total de 20 muestras, 5 resultaron positivas con niveles de concentración sobre el límite de 0,05 µg/l, en la época de mayor temperatura ambiental (Montaño *et al.*, 2007). Esta diferencia estacional también es descrita en Brasil (Crispim de Oliveira *et al.*, 2016). En contraste, en Arequipa, Perú, Ortiz (2009) no encuentra reaccionantes positivos en 40 muestras de leche fresca. En México de un total de 51 muestras de leche fresca, se determinó un 31% con niveles de contaminación que superan los niveles aceptables (Quevedo, 2014). En general los estudios citados indican frecuente eliminación de AFM1 por la leche, aunque mayormente en zonas de clima tropical, lo cual es consistente con nuestros resultados tanto en la frecuencia como en las concentraciones de la toxina.

La concentración máxima determinada de AFM1, de 0,3 µg/l y la alta frecuencia (41%) de rebaños con concentraciones por sobre el límite nacional de 0,05 µg/l, supone la existencia de riesgo de exposición a AMF1 por la población humana, una vez procesada y consumidos los lácteos elaborados a partir de esta materia prima, con las potenciales consecuencias patológicas descritas previamente. Cabe indicar que el riesgo señalado aumenta en individuos que consumen, además, otras fuentes potenciales de aflatoxinas y muy en particular en la población rural, la cual también está expuesta a este grupo de toxinas fúngicas, al participar, o convivir geográficamente, en los procesos de producción agrícola, especialmente de cereales como maíz, situación recientemente documentada en Chile (Nogueira *et al.*, 2015). En nuestro país existen programas de vigilancia oficiales orientados a detección de contaminantes en alimentos procesados, particularmente los que tienen como destino la exportación, no obstante, hasta la fecha, no se han publicado resultados positivos respecto a la presencia de AFM1 en lácteos, a pesar de que se ha reportado la presencia de AFB en otros productos alimenticios (Chile, 2010; Chile, 2011; Chile, 2012) , cabe señalar que este trabajo es el primer estudio nacional desarrollado en leche sin procesar. Llama la atención lo anterior, puesto que, en regiones cercanas de Argentina, con condiciones

agroclimáticas, composición de la dieta de los animales y prácticas de manejo productivo similares a la zona central de nuestro país, la presencia del AFM1 es detectada con cierta frecuencia (Resnik, 1989; Alonso *et al.*, 2010; Michlig *et al.*, 2015). Uno de los factores que podrían explicar la ausencia, o presencia a concentraciones muy bajas y no detectables de la toxina en los lácteos procesados sometidos a vigilancia, corresponde a la gran proporción de leche industrializada proveniente de zonas del país de menor riesgo para la presencia de la toxina, como los sistemas predominantemente pastoriles, típicos de la zona sur, además de la eventual dilución de la aflatoxina al mezclar leches de diferente origen en los procesos de industrialización. Otra consideración al respecto, ya planteada en zonas templadas de Europa (Decastelli *et al.*, 2007), es el relativamente reciente aumento de la producción de aflatoxinas en las materias primas de los alimentos para animales debido a sostenidas o esporádicas alzas de la temperatura en las zonas productoras, asociadas al cambio climático. Finalmente, tampoco debería descartarse la presencia de contaminación primaria con aflatoxinas en insumos alimentarios importados desde regiones de riesgo y que con frecuencia se utilizan en plantales industriales (Alonso *et al.*, 2010; Michlig *et al.*, 2015).

Los diferentes análisis estadísticos realizados en este estudio, orientados a evidenciar las causas de la presencia de la toxina en leche, muestran, con cierto nivel de dispersión y algunas excepciones, tendencias o evidencia significativa de la asociación entre los niveles, o la sola existencia, de contaminación láctea con AFM1 con algunas de las características de los predios estudiados. Es así como se evidencian asociaciones entre las variables correspondientes a indicadores de intensificación del proceso productivo y la concentración de AFM1 en la leche, en las cuales, en la medida que los rebaños presentan mayor tamaño, mayor producción individual y manejo alimentario más intensivo, particularmente la inclusión de concentrado en las raciones, aumenta el riesgo de encontrar la toxina a mayores concentraciones. La presencia de la toxina en concentraciones sobre la norma nacional se asoció positiva y significativamente, en el análisis multivariado, con el volumen individual de producción de las vacas.

La justificación biológica de lo anterior implica, en definitiva, la exposición de los animales de los predios estudiados a alimentos contaminados primariamente con AFB, consecuentemente las prácticas de manejo alimentario aplicadas en cada predio podrían determinar la presencia de AFM1 la leche. La literatura indica que la presencia de la toxina en la leche corresponde a un proceso de biomagnificación a partir del consumo de alimentos contaminados con aflatoxinas (Boudra *et al.*, 2007), que son incorporadas al organismo por difusión pasiva desde la mucosa oral, esofágica, ruminal e intestinal, incluso epitelios de pulmón y vías aéreas, apareciendo la AFM1 derivada de procesos oxidativos hepáticos y extra hepáticos (Gallo *et al.*, 2008), en la primera ordeña luego de la ingesta (Masoero *et al.* 2007). La relación cuantitativa entre la concentración de aflatoxinas en el alimento y la concentración de AFM1 láctea, varía entre un 0,4 a un 17 % (Gimeno y Martins, 2003). La concentración final de AFM1 en la leche alcanzaría entre el 2 al 4% de la cantidad total de AFB1 ingerida, variando de acuerdo con características fisiológicas, patológicas y ambientales (Boudra *et al.*, 2007; Masoero *et al.*, 2007). Consecuentemente, se puede colegir que los animales de los planteles detectados como positivos en el presente estudio, estuvieron expuestos a dietas con altas concentraciones de aflatoxinas.

AFB se puede encontrar en voluminosos henificados, también se reporta su presencia en ensilajes de maíz en altas concentraciones, siendo uno de los ingredientes de mayor incorporación en dietas de sistemas intensivos de producción (Rosiles y Bautista, 2001). También se reporta la presencia de altas concentraciones de aflatoxinas en maíz grano y sus derivados, siendo estos también importantes constituyentes de las dietas de vacas de alta producción láctea (Fon-Fay *et al.*, 2016; Rosiles y Bautista, 2001; Boudra *et al.*, 2007; Garon *et al.*, 2006; Alpizar, 2015). En Tailandia, se asoció la concentración de AFM1 en leche de estanque de pequeños rebaños, y consecuentemente la presencia de AFB en los alimentos ofrecidos, al consumo granos de maíz partido y ensilaje de maíz elaborado a partir de subproductos agroindustriales (Chaisri *et al.*, 2017). Por otra

parte, AFB se considera inexistente o presente en muy bajas concentraciones en alimentos frescos como *soiling* o directamente en la pradera consumida por pastoreo (Skládanka *et al.*, 2011), y, por el contrario, en altas concentraciones en subproductos de origen industrial como expeler de soya y semilla de algodón o concentrados premezclados que los contienen (Michlig *et al.*, 2015). Un estudio realizado en Córdoba, Argentina, encontró tendencias, aunque sin significación estadística, entre la presencia de afrecho de maní y semilla de algodón en la dieta, con la concentración de AFM1 en la leche producida (Alonso *et al.*, 2010).

Redundando, los resultados obtenidos en este estudio son consistentes con lo reportado previamente a nivel internacional: mayor frecuencia y concentración de la AFM1 en la leche producida en sistemas intensivos y de mayor productividad, donde los animales son alimentados con raciones compuestas, que incluyen insumos de alto riesgo. Lo anterior es evidente en este trabajo al comparar la concentración de AFM1 y la producción individual y el manejo alimentario de los predios. Por otra parte, se estableció la ausencia o cantidades mínimas de la toxina en sistemas con componente pastoril, cuando se analizó el tipo de manejo alimentario y su relación con la concentración de la toxina en la leche.

Finalmente, los resultados expuestos deberían estimular la implementación predial de medidas orientadas a impedir o reducir la exposición de los animales a alimento contaminado con aflatoxinas y/o a reducir la absorción de estas sustancias cuando estas ya están presentes en el alimento. Lo anterior debiese corresponder a mejoras en las prácticas de cultivo, cosecha y almacenamiento de alimentos de origen predial; monitoreo de aflatoxinas y adecuada selección de alimentos de origen externo, nacional y, particularmente, importados desde zonas de riesgo; el empleo de secuestrantes de aflatoxinas, ente las cuales se incluyen arcillas del tipo bentonita, montmorillonita y extractos de levaduras, utilizadas como aditivo de las raciones que consumen los animales y finalmente, el monitoreo de la presencia de AFM1 en la leche producida, como indicadores de la efectividad de estas prácticas productivas.

Desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, la industria y la autoridad sanitaria, ante el riesgo evidente de la presencia de AFM1 en lácteos de consumo humano, deberían reforzar los esfuerzos para la detección de aflatoxinas en alimentos de uso animal, especialmente de origen importado, y particularmente AFM1 en leche en diferentes etapas y tipos de procesamiento, para asegurar la inocuidad de la leche y sus derivados consumida al interior del país o exportada.

8 CONCLUSIONES

- La técnica descrita y empleada en el presente trabajo es adecuada para detectar aflatoxina en matriz láctea, en concentraciones la norma nacional de 0,05 µg/l.
- Se determinó la presencia de AFM1 en leche de estanque, por sobre la norma nacional en el 36,4% de predios muestreados de la zona central de Chile.
- La magnitud y frecuencia de la presencia de AFM1 está asociada con sistemas intensivos de producción de leche, particularmente con el nivel de producción láctea individual.

10 BIBLIOGRAFÍA

- **ABARCA, M.; BRAGULAT, M.; CASTELLA, G.; ACCENSI, F.; CABAÑES, F.J.** 2000. Hongos productores de micotoxinas emergentes. *Rev. Iberoam. Micol.* 17: S63-S68.
- **ABDALAH, M.; GIRGIN, G.; BAYDAR, T.; KRŠKA, R.; SÜLYÖK, M.** 2017. Occurrence of multiple mycotoxins and other fungal metabolites in animal feed and maize samples from Egypt using LC-MS/MS *J. Sci. Food. Agric.*
- **ABOLFAZL, K.** 2005. A study on the occurrence of aflatoxin M1 in raw milk produced in Sarab city of Iran. *Food Contr.* 16:593–599.
- **ALONSO, V.A.; MONGE, M.P.; LARRIESTRA, A.; DALCERO, A.M.; CAVAGLIERI, L.R.; CHIACCHIERA, S. M.** 2010. Naturally occurring aflatoxin M1 in raw bulk from farm cooling tanks in Argentina. *Food. Addit Contam.* 27(3): 373-379.
- **ALPÍZAR, C.** 2015. Presencia de hongos y contaminación con micotoxinas en ensilajes para alimentación de rumiantes. Artículo de Revisión *Rev. Cs. Vet.* 33(1).
- **AMAYA-FARFAN, J.** 1999. Aflatoxin B1-induced hepatic steatogenesis: role of the carbonyl compounds and active diols on steatogenesis. *Lancet.* 353:747-748.
- **ARANGO, M.** 2008. Micotoxinas y Salud Humana. [En línea]. <<http://www.geocities.com/biosaluduc/MICOTOXINAS.html>> [Consulta:01-06-2017]
- **ASLAM N.; YASIN TIPU M.; ISHAQ M.; COWLING A.; MCGILL D.; MAHMOOD WARRIACH H., WYNN P.** 2016. Higher Levels of Aflatoxin M1 Contamination and Poorer Composition of Milk Supplied by Informal Milk Marketing Chains in Pakistan. *Toxins.* 8(12): 347.
- **BATTACONE G.; NUDDA A.; PALOMBA M.; PASCALE M.; NICOLUSSI P.; PULINA G.** 2005. Transfer of aflatoxin B1 from feed to milk and from milk to curd and whey in dairy sheep fed artificially contaminated concentrates. *J. Dairy Sci.* 88(9):3063–3069.
- **BENNETT, J.; KLITCH, M.** 2003. Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* 16(3): 497-516.
- **BERG, T.** 2003. How to establish international limits for mycotoxins. *Food and feed. Food Control.* 14(4):219–224.

- **BOGNANNO, M.; LA FAUCI, L.; RITIENI, A.; TAFURI, A.; DE LORENZO, A.; MICARI, P.; DI RENZO, L.; CIAPPELLANO, S.; SARULLO, V.; GALVANO, F.** 2006. Survey of the occurrence of Aflatoxin M1 in ovine milk by HPLC and its confirmation by MS. *Mol. Nutr. Food. Res.* 50(3):300 – 305.
- **BOUDRA, H.; BARNOUIN, J.; DRAGACCI, S.; MORGAVI, D.** 2007. Aflatoxin M1 and ochratoxin A in raw bulk milk from french dairy herds. *J. Dairy. Sci.* 90(7):3197–3201.
- **BUCIO-VILLALOBOS, C.; PEÑA, J.; GUZMÁN DE PEÑA, D.** 2001. Producción de Aflatoxinas en Maíz in vitro. México. *Rev. Mex. Fitopat.* 19(2):218-222.
- **CALVO, M.** 2008. Bioquímica de los alimentos: Toxinas Fúngicas. [En línea]. <[Http://Milksci.Unizar.Es/Bioquimica/Temas/Tóxico/Micotoxinas.Html](http://Milksci.Unizar.Es/Bioquimica/Temas/Tóxico/Micotoxinas.Html)> [Consulta 21- 05-2017].
- **CARRILLO, L.** 2003. Los Hongos de los alimentos y los forrajes. [En línea] 1:1-22. <<http://www.unsa.edu.ar/matbib/micologia/hm/>> consulta 21-05-2010.
- **CASTELLARI, C.; CENDOYA, M.; MARCOS VALLE F.; BARRERA, V.; PACINC A.** 2015. Factores extrínsecos e intrínsecos asociados a poblaciones fúngicas micotoxigénicas de granos de maíz (*Zea mays* L.) almacenados en silos bolsa en Argentina. *Rev. Argent Microbiol.* 47(4):350-359.
- **CHAISRI, W.; MONGKON, W.; SUGITA-KONISHI, Y.; VAN DAM, D.; HUNTLEY, I.; SURIYASATHAPORN, W.** 2017. Feed and feed storage factors in relation to aflatoxin M1 contamination in bulk milk of smallholder dairy farms. *JSM Mycotoxins.* 67(2);85-88.
- **CHILE, INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACION.** 2007. NCh3052. Of2007 Leche y leche en polvo - Determinación de contenido de aflatoxina M1 - Purificación por cromatografía de inmunoafinidad y determinación por cromatografía de alta resolución en fase líquida.
- **CHILE, INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA.** 2010. Micotoxinas en alimentos de consumo directo en Chile 2008-2009. [En línea]. <<http://www.ispch.cl/documento/19255>> [consulta 21-05-2017].
- **CHILE, INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA.** 2011. informe monitoreo de micotoxinas en alimentos año 2011. [En línea]. <http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento/2013/05/informe_micotoxinas_2011.pdf> [Consulta 21-05-2017].
- **CHILE, INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA.** 2012. Informe de Resultados de Vigilancia de Laboratorio Micotoxinas en Alimentos.

<<http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento/2013/07/Informe%20Micotoxinas%202012%2014-06-2013.pdf>> [consulta 21-05-2017].

- **CHILE, MINISTERIO DE SALUD.** 1997. Reglamento Sanitario de los **Alimentos**. Dto. N° 977/96.
- **CODEX ALIMENTARIUS.** 2001. Comments submitted on the draft maximum level for aflatoxin M1 in milk. Codex committee on food additives and contaminants, 33rd sessions, Hauge, The Netherlands.
- **CÓRDOVA, A.; DORANTES, V.; ESCOBAR, R.; ÍÑIGUEZ, G.; MUÑOZ, C.; PEÑA, S.; TRAMPE, G.** 2003. Efecto de aflatoxinas sobre parámetros reproductivos en vacas Holstein. *Med. Vet.* 20(4): 41-44.
- **CORNEJO J.; VILLARROEL O.** 2009. Antecedentes generales sobre las aflatoxinas y otras micotoxinas: elementos a tener en cuenta para el diseño de prácticas correctas de cultivo y elaboración de nueces. División de Políticas Públicas Saludables y Promoción Departamento de Alimentos y Nutrición. [En línea].<<http://www.redsalud.gov.cl/archivos/alimentosynutricion/inocuidad/aflatoxinas.pdf>> [Consulta 15-03-2017].
- **COTTA, G.** 1989. Aflatoxinas en alimentos de uso animal y leche. In: Encuentro nacional sobre Micotoxinas y Micotoxicosis. 13°ed. INIA. Santiago, Chile. pp. 18-19.
- **COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY.** 2003. *Mycotoxins: Risks in plant, animal, and human systems.* Ames. Iowa, United States.
- **CREPPY, E.** 2002. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol. Lett.* 127(1-3):19-28.
- **CRISPIM DE OLIVEIRA, C.; DAMASCENO J.; KAZAMA, R.; WISCHRAL, T.; ALAVARSE, M.; GAZAR, F.; DOS SANTOS G.** 2016. Seasonal milk contamination by aflatoxin m1, organophosphates and carbamates in Paraná – Brazil. *Semina: Ciências Agrárias.* 37(4):2145-2154.
- **DANIEL, J.; LEWIS, L.; REDWOOD, Y.; KIESZAK, S.; BREIMAN, R.; FLANDERS, W.** 2011. Comprehensive assessment of maize aflatoxin levels in Eastern Kenya, 2005–2007. *Environ. Health. Persp.* 119(12):1794-1799
- **DAODU, O.B.; ADEBOWALE, T.K.** 2016. Aflatoxin in Commercial Poultry Feeds and Clinico-Pathological Manifestation of Aflaxoxicosis in Poultry in Southwest, Nigeria. *Niger. Vet. J.* 37(2).
- **DECASTELLI, L.; LAI, J.; GRAMAGLIA, M.; MONACO, A.; NACHTMANN, C.; OLDANO, F.; RUFFIER, M.; SEZIAN, A.; BANDIROLA, C.** 2007. Aflatoxins

occurrence in milk and feed in Northern Italy during 2004–2005. *Food Control*. 18(10):1263–1266.

- **DE FREITAS, T.; D'ARC J.; PONTES, D.; FELICIO, R.; GONÇALEZ, E.** 2015. Monitoring of Mycotoxins in Feed for Goats and Their Residues in Milk. *J. Agric. Sci.* 7(12).

- **DI RIENZO, J.A.; CASANOVES, F.; BALZARINI, M.G.; GONZALEZ, L.; TABLADA, M.; ROBLEDO, C.W.** 2008. Infostat versión 2008. Grupo Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

- **DRAGACCI, S.; GROSSO, F.** 2001. Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography for determination of aflatoxin M₁ in liquid milk: Collaborative study. *J. AOAC Int.* 84(2):437- 443.

- **DRIEHUIS, F.; TE GIFFEL, M. C.; VAN EGMOND, H. P.; FREMY, J. M.; BLÜTHGEN, A.** 2010. Feed-associated mycotoxins in the dairy chain: occurrence and control. [En Línea] <<https://www.fil-idf.org/wp-content/uploads/2016/04/IDF-factsheet-Feed-associated-mycotoxins.pdf> > [Consulta 10-10-2017].

- **DOHNAL, V.; WU, Q.; KUCA, K.** 2014. Metabolism of aflatoxins: key enzymes and interindividual as well as interspecies differences. *Arch. Toxicol.* 88(9):1635–1644.

- **EFSA.** 2004. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to aflatoxin B1 as undesirable substance in animal feed. *Eur. Food. Stand. Agency J.* 39:1–27.

- **EUROPA.** 2002. Decisión 2002/657/CE por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas.* 12 de agosto de 2002.

- **FAO.** 2003. Manual Sobre la Aplicación del Sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC) en la Prevención y Control de las Micotoxinas. *Estudio FAO alimentación y nutrición.* 73:1-25.

- **FAO.** 2004. Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y raciones. *Estudio FAO alimentación y nutrición.* 81:1-60.

- **FAROMBI, E.** 2006. Aflatoxin contamination of foods in developing countries: Implications for hepatocelular carcinoma and chemopreventive strategies. *Afr. J. Biotechnol.* 5(1):1-14.

- **FINK-GREMMELS. J.** 2008. The role of mycotoxins in the health and performance of dairy cows. *Vet. J.* 176(1):84–92.

- **FLORES, C.; HERNÁNDEZ L.; VÁZQUEZ, J.** 2006. Contaminación con micotoxinas en alimento balanceado y granos de uso pecuario en México en el año 2003. *Tec. Pec. Mex.* 44(2):247-256
- **FON-FAY F.; BARZOLA, S.; MORÁN, J.** 2016. La prevalencia de *Aspergillus spp.* y aflatoxinas en *Zea mays* L. (maíz) almacenado en silos, en Ecuador. *Revista Publicando.* 3(7):189-202.
- **GALLO, A.; MOSCHINI, M.; MASOERO F.** 2008. Aflatoxins absorption in the gastro-intestinal tract and in the vaginal mucosa in lactating dairy cows. *Ital J. Anim. Sci.* 7(1):53-63.
- **GARON, D.; RICHARD, E.; SAGE, L.; BOUCHART, V.; POTTIER, D.; LEBAILLY, P.** 2006. Mycoflora and multimycotoxin detection in corn silage: experimental study. *J. Agric. Food. Chem.* 54(9):3479–3484.
- **GHANEM, I.; ORFI M.** 2009. Aflatoxin M1 in raw, pasteurized and powdered milk available in the Syrian market. *Food Control.* 20(6):603–605.
- **GIMENO, A. (a).** 2008. Aflatoxina M1 en la leche: Riesgos para la salud pública Prevención y control: [En línea]. <http://www.engormix.com/aflatoxina_m1_leche;_riesgos_articulos_372MYC.htm> [Consulta 21-05-2017].
- **GIMENO, A. (b)** 2008. Aflatoxicosis en humanos provocada por el consumo de Alimentos contaminados que no son de origen animal. [En línea]. <http://www.engormix.com/s_articles_view.asp?art=1662&AREA=MYC> [Consulta 21-05- 2017].
- **GIMENO, A.; MARTINS, M.** 2003. “Micotoxinas y Micotoxicosis en Animales y Humanos”. *Special Nutrients, Inc. USA (ED.). Talleres gráficos del SRL, Buenos Aires (Argentina).* pp. 1-160.
- **GONZÁLEZ, H.; MARTÍNEZ, E.; PACIN, A.; RESNIK, S.; SYDENHAM, E.** 1999. Natural co-occurrence of fumonisins, deoxynivalenol, zearalenone and aflatoxins in field trial corn in Argentina. *Food. Addit. Contam.* 16(12):565-9.
- **GROOPMAN, J.; CAIN, L.; KENSLER, T.** 1988. Aflatoxin exposure in human populations: measurements and relationship to cancer. *Crit. RevToxicol.* 19(2):113-145.
- **GUZMÁN DE PEÑA, D.** 2007. Exposure to aflatoxin B1 in experimental animals and its public health significance. *Salud Pública Mexico.* 49(3):227-235.
- **HORWITZ, W.** 2000. *Official Methods of Analysis of AOAC International.* Seventeenth. 17° ed. Chapter 49 Natural Toxins. AOAC International, Gaithersburg, USA.

- **HUSSEIN, H.S.; Y BRASEL, J.M.** 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*. 167(2):101-134.
- **IARC.** 2002. World Health Organization. International agency for research on cancer. Aflatoxins: B1, B2, G1, G2, M1. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene styrene. vol. 82. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon. France. pp 193-200.
- **IMTIAZ H.; JAMIL A.; MUNAWAR A.; MUHAMMAD R.** 2008. Variation of levels of aflatoxin M1 in raw milk from different localities in the central areas of Punjab, Pakistan. *Food Control*. 19(12):1126-1129
- **INDAP: INSTITUTO DE DESARROLLO AGROPECUARIO.** 2008. Análisis Comparativo de la Calidad del Maíz Nacional Respecto de las Importaciones Provenientes desde Argentina y Estados Unidos.
- **ISO (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION) 11843-1:1997** Capability of detection -- Part 1: Terms and definitions . Suiza:
- **INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS.** 2001. Microorganismos de los alimentos 6: Ecología Microbiana de los alimentos. Editorial Acriba. Zaragoza, España. CapitM1 and B1 in milk and animal feeds from urban smallholder dairy production in Dagoretti Division Nairobi, Kenya. *East. Afr. Med. J.* 84(11): S83-6.
- **KANG'ETHE E.K.; LANG'A K.A.** 2009. Aflatoxin B1 and M1 contamination of animal feeds and milk from urban centers in Kenya. *Afr Health Sci.* 9(4):218-226.
- **KARABULUT, S.; PAYTAKOV BAND, G.; LESZCZYNSKIB, J.** 2014. Reduction of Aflatoxin B1 to Aflatoxicol: A Comprehensive DFT Study Provides clues to its toxicity. *J. Sci. Food. Agric.* 94(15):3134-3140.
- **KIM, E. K.; SHON, D. H.; RYU, D.; PARK, J. W.; HWANG, H. J.; KIM, Y. B.** 2000. Occurrence of aflatoxin M1 in Korean dairy products determined by ELISA and HPLC. *Food Addit. Contam.* 17(1):59–64.
- **LÓPEZ, L.** 1988. Introducción al tema de Micotoxinas y micotoxicosis. *Boletín Micológico.* 4(1): 1-25.
- **LÓPEZ, C.; RAMOS, L.; RAMADAN, S.; BULACIO, L.; PÉREZ, J.** 2001. Distribution of aflatoxin M1 in cheese obtained from milk artificially contaminated. *Int. J. Food Microb.* 64(1-2):211–215.

- **LÓPEZ, C.; RAMOS, L.; RAMADAN, S.; BULACIO, L.** 2003. Presence of aflatoxin M1 in milk for human consumption in Argentina. *Food Control*. 14(1):31–34.
- **LUZIA, M.; COMETA, F.; PALMERY, M.** 2002. Acute effects of aflatoxins on guinea pig isolated ileum. *Toxicol. in Vitro*. 16(5):525–529.
- **MAGAN, N.; HOPE, R.; CAIRNS, V.; ALDRED, D.** 2003. Post-harvest fungal ecology: Impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain. *Eur. J. Plant. Pathol.* 109(7):723-30.
- **MANETTA, A.; DI GIUSEPPE, L.; GIAMMARCOA, M.; FUSARO, I.; SIMONELLA, A.; GRAMENZI, A.; FORMIGONI, A.** 2005. High performance liquid chromatography with post-column derivatisation and fluorescence detection for sensitive determination of aflatoxin M1 in milk and cheese. *J. Chromatography*. 1083(1-2):219–222.
- **MARÍN P.** 2010. Análisis de factores ecofisiológicos que influyen en la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de toxinas en especies de “fusarium”. Tesis para optar a grado doctor. Madrid. Universidad Complutense de Madrid. pp 105-110
- **MARIN, D.; TARANU, I.; PASCALE, F.; LIONIDE, A.; BURLACU, R.; BAILLY, J.D.; OSWALD, I.** 2002. Changes in performance, blood parameters, humoral and cellular immune response in weanling piglets exposed to low doses of aflatoxin. *J. Anim. Sci.* 80(5)1250-1257.
- **MARTINS H.; MENDES, M.; GUERRA D’ALMEIDA, F.** 2007. Occurrence of aflatoxin B1 in dairy cow’s feed over 10 years in Portugal (1995-2004) *Rev. Iberoam. Micol.* 24(1): 69-71.
- **MASOERO, F.; GALLO, A.; MOSCHINI, M.; PIVA, G.; DIAZ, D.** 2007. Carryover of aflatoxin from feed to milk in dairy cows with low or high somatic cell counts. *Animal*. 1(9):1344–1350.
- **MASOERO, F.; GALLO, A.; DIAZ, B.; PIVA, G., MOSCHINI, M.** 2009. Effects of the procedure of inclusion of a sequestering agent in the total mixed ration on proportional aflatoxin M1 excretion into milk of lactating dairy cows. *Anim. Feed Sci. Tech.* 150(1–2):34–45.
- **MASSEY, T.; GRAEME, B.; SMITH, G.; TAM A.** 2000. Mechanisms of aflatoxin B1 in lung tumorigenesis. *Exp. Lung Res.* 26:673– 683.
- **MICHLIG, N.; SIGNORINI, M.; GAGGIOTTI, M.; CHIERICATTI, C.; BASILICO, J.C; REPETTI, M.R.; BELDOMENICO, H.R.** 2016. Risk factors associated with the presence of aflatoxin M1 in raw bulk milk from Argentina. *Food Control*. 64:151-156.

- **MONTAÑO, V.; CHIRICO, I.; GEMIO, R.** 2007. Estudio toxicológico de presencia de aflatoxina m1 en leche bovina recolectada del municipio de Achacachi. Rev. Bol. Quím. 24(1):89-93.
- **MOTTA T.; FRIZZARIN, A.; MARTINS, T.; MIRANDA, M.; ARCARO, J.; AMBRÓSIO, F.; POZZI, C.** 2015. Estudo sobre a ocorrência de fungos e aflatoxina B1 na dieta de bovinos leiteiros em São Paulo. Pesq. Vet. Bras. 35(1):23-28.
- **MOURA, L.; ARONOVICH, M.; MOURA, K.; CASTAGNA, A.; CAVAGLIERI, L.; DA ROCHA, C.** 2016. Incidence of Mycotoxins (AFB1 and AFM1) in Feeds and in dairy Farms from Rio de Janeiro State, Brazil. Vet. Med. Open J. 1(1):29-35.
- **MOUDGIL, V.; REDHU, D.; DHANDA, S.; SINGH J.** 2013. A review of molecular mechanisms in the development of hepatocellular carcinoma by aflatoxin and hepatitis B and C viruses. J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. 32(2):165-75.
- **NOGUEIRA, L.; FOERSTER, C.; GROOPMAN, J.; EGNER, P.; KOSHIOL, J.; FERRECCIO, C.** 2015. Association of aflatoxin with gallbladder cancer in Chile. JAMA. 313(20):2075-2077
- **NORDKVIST, E.; STEPINSKA, A.; HAGGBLOM, P.** 2009. Aflatoxin contamination of consumermilk caused by contaminated rice by-products in compound cattle feed. J. Sci. Food. Agric. 89: 359–361.
- **NURYONO, N.; AGUS, A.; WEDHASTRI, S.; MARYUDANI, Y.; SETYABUDI, F.; BOHM, J.; RAZZAZI-FAZELI E.** 2008. A limited survey of aflatoxin M1 in milk from Indonesia by ELISA. Food Control. 20 (8), 721-724.
- **OLIVEIRA, C.; SEBASTIAO L.; FAGUNDES, H.; ROSIM, R.; FERNANDES, A.** 2008. Aflatoxins and cyclopiazonic acid in feed and milk from dairy farms in Sao Paulo, Brazil. Food. Addit. Contam. 1(2):147- 152.
- **OLIVEIRA, C.; GERMANO, P.; BIRD, C. PINTO, C.** 1997. Immunochemical assessment of aflatoxin M1 in milk powder consumed by infants in Sao Paulo, Brazil. Food Addit. Contam. 14:7–10.
- **ORTIZ, C.** 2009 Análisis de aflatoxina M1 en leche fresca de establos lecheros de Arequipa. Rev. Investig. Vet. Perú. 20(1).
- **PRANDINI, A.; TANSINI, G.; SIGOLO, S.; FILIPPI, L.; LAPORTA, M.; PIVA G.** 2009. On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. Food Chem. Toxicol. 47(5):984–991.

- **PERAICA, M.; RADIA, B.; LUCIA, A.; PAVLOVIA, M.** 1999. Toxic effects of mycotoxins in humans. B. World Health Organ. 77:754 -766.
- **QUEVEDO, P.** 2014. Ocurrencia y estimación de la exposición humana a aflatoxina M1 en muestras de leche procedentes de Monterrey (México). Tesis doctoral en ciencia y tecnología de los alimentos. Bellaterra, Barcelona, Cataluña. Universitat Autònoma de Barcelona. Pp 97-125
- **QUILES, A.** 2016. Efecto de las micotoxinas en la reproducción porcina. [En línea]. <<http://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/15114/articulos-porcino/efecto-de-las-micotoxinas-en-la-reproduccion-porcina.html>> [Consulta 20-01-2017]
- **PRESELLO, D.; IGLESIAS, J.; FERNÁNDEZ, M.; FAUGUEL, C.; HÉRABIDE, G., LOREA, R.** 2009. Reacción de cultivares a hongos productores de micotoxinas en maíz. [En línea]. <<http://anterior.inta.gov.ar/pergamino/info/documentos/tmaiz/09/ac73.htm>> [Consulta 20-01-2017]
- **RESNIK S.; NEIRA, M.; PACIN, A.; MARTINEZ, E.; APRO, N.; LATREITE, S.** 1996. A survey of natural occurrence of aflatoxins and zearalenone in Argentine field corn: 1983-1994. Food. Addit. Contam. 3(1)115-120.
- **RODRÍGUEZ M.; CALONGE, M.; ORDÓNEZ D.** 2003. ELISA and HPLC determination of the occurrence of aflatoxin M1 in raw cow's milk. Food Addit. Contam. 20(3):276-280.
- **ROMERLABS.** 2009. Agra Quant® Mycotoxin ELISA Kits. [En línea]. <http://www.romerlabs.com/pdts_kits.html> [Consulta 15-03-2009].
- **ROSSI, F.** 1989. Detección de algunas micotoxinas en maíz y trigo nacionales. In: Jornada Nacional sobre Micotoxinas y Micotoxicosis. 13° ed. INIA. Santiago, Chile. pp.105-109.
- **ROSILES, M.; BAUTISTA, O.** 2001. Concentración de aflatoxinas m1 y b1 en alimento y leche de vacas que reciben alimento fresco y henificado. [En línea]. <<http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/departamentos/rumiantes/bovinotecnia/btrgclig012.pdf>> [consulta 20-01-2017]
- **SAG, SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO.** 1991. Resolución Exenta del Servicio Agrícola y Ganadero N°707 del 14 de mayo de 1991.
- **SAG, SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO.** 2009. Resultados del Programa de Control de Residuos en Productos Pecuarios. Boletín Veterinario Oficial.

- **SAN MARTÍN, B.** 2001. Residuos químicos en los alimentos de origen animal: un análisis global de la situación mundial y nacional. *TECNOVET*. 7(3):12-15.
- **SASSAHARA M., PONTES NETTO, D.; YANAKA D.** 2005. Aflatoxin occurrence in foodstuff supplied to dairy cattle and aflatoxin M1 in raw milk in the North of Paraná state. *Food Chem. Toxicol.* 43(6):981–984.
- **SCAGLIONI, P.; BECKER-ALGERI, T.; DRUNKLER D.; BADIALE-FURLONG, E.** 2014. Aflatoxin B1 and M1 in milk. *Anal. Chim. Acta.* 829(4):68–74.
- **SCHEIDEGGER, K.; PAYNE, G.** 2003. Unlocking the secrets behind secondary metabolism: a review of *Aspergillus flavus* from pathogenicity to functional genomics. *J. Toxicol. -Toxin. Rev.* 22:423-459.
- **SHIPRA, R.; PREMENDRA, D.; SUBHASH, K.; MUKUL, D.** 2004. Detection of Aflatoxin M1 contamination in milk and infant milk products from Indian markets by ELISA. *Food Control.* 15(4):287–290.
- **SHUNDO, L.; APARECIDA, S.; CONCEIÇÃO L.; LAMARDO, A.; RUVIERI, V.; SABINO, M.** 2009. Estimate of aflatoxin M1 exposure in milk and occurrence in Brazil. *Food Control.* 20(7):655–657
- **SKLADANKA, J.; NEDELNIK, J.; ADAM, V.; DOLEZAL, P.; MORAVCOVA, H.; DOHNAL V.** 2011. Forage as a Primary Source of Mycotoxins in Animal Diets. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 8:37-50.
- **SRIVASTAVA, V.; BU-ABBAS, A.; ALAA-BASUNY AL-JOHAR, W.; AL-MUFI, S.; SIDDIQUI, M. K.** 2001. Aflatoxin M1 contamination commercial samples of milk and dairy products in Kuwait. *Food Addit. Contam.* 18(11):993–997.
- **STEYN, P. y VLEGGAR, R.** 1986. Application of biosynthetic techniques in the structural studies of mycotoxins. In: Cole RJ, ed. *Modern methods in the analysis and structural elucidation of mycotoxin*. New York: Academic Press. pp 77-206.
- **STROKA, J.; REUTTER, M.; VAN HOLST, C.; ANKLAM, E.** 2004. Immuno-affinity column clean-up with liquid chromatography using post-column bromination for the determination of Aflatoxin B₁ in cattle feed: Collaborative Study. *J.AOAC Int.* 83(6):1179-1186.
- **SUDAKIN, D.** 2003 Dietary aflatoxin exposure and chemoprevention of cancer: A clinical review. *J. Toxicol. Clin.* 41:195-204.
- **SUGIYAMA K.; HIRAOKA, H.; SUGITA-KONISHI, Y.** 2008 Aflatoxin M1 Contamination in Raw Bulk Milk and the Presence of Aflatoxin B1 in Corn Supplied to Dairy Cattle in Japan *J. Food. Hyg. Soc. Jpn.* 49(5):352-355.

- **TAMAYO, R.; CASTRO, R.; SCHOEBITZ, R.** 1984. Aflatoxinas en alimentos destinados a consumo animal. *Agro sur*. 12(1):65-66.
- **UNUSAN, N.**, 2006. Occurrence of aflatoxin M1 in UHT milk in Turkey. *Food Chem. Toxicol.* 44:1897–190.
- **URIBE D.; NAVAS M.** 2012. Mecanismos moleculares involucrados en la mutagenicidad inducida por aflatoxina B1. *Rev. Cienc. Salud.* 10 (3): 403-419
- **UPADHAYA, S.V.; SUNG, H. G.; LEE, C.H.; LEE, S. Y.; KIM, S. W.; CHO, K. J.; HA, J.K.** 2009. Comparative study on the aflatoxin B1 degradation ability of rumen fluid from Holstein steers and Korean native goats *J. Vet. Sci.*10(1), 29-34.
- **VEGA, M. y SAELZER, R.** 1989. Incidencia de aflatoxinas en alimentos y piensos. Experiencia de un laboratorio de prestación de servicios. In: Jornada Nacional sobre Micotoxinas y Micotoxicosis. 13°ed. INIA. Santiago, Chile. pp.117-120.
- **VEGA, M.; SAELZER, R.; OLAVARRIA, M.; REBUFFEL, P.** 1994. Micotoxinas: una metodología analítica para el estudio de su incidencia en Chile. *Serie Agro -Ciencia.* 10(2):93-98.
- **VEGA, M.; SAELZER, R.; RIOS, G.; HERLITZ, E.; BASTIS, C.** 2003. Chile, micotoxinas, globalización: Las micotoxinas son un problema emergente In: IV Congreso Latinoamericano de Micotoxicología. La Habana, Cuba. pp. 24-26.
- **YIANNIKOURIS, A. y JOUANY, J.** 2002. Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. *Anim. Res... Sci.* 51:81-99.
- **YU, J.; CHANG. P.; EHRLIHC, K.; CARY, J.; BHATNAGAR, D.; CLEVELAND, T.** 2004 Clustered genes in aflatoxin biosynthesis. *Appl. Environ. Microb.* 70:1253-1262.