

# Evaluación de adsorbentes para la reducción de aflatoxina M<sub>1</sub> en leche de vacas alimentadas con dietas contaminadas artificialmente con AFB<sub>1</sub>

## Comparison of methods to evaluate aflatoxin B<sub>1</sub> exposure in dairy cattle and the effect of mycotoxin adsorbents to reduce AFM<sub>1</sub> residues in milk

Federico Rojo<sup>a</sup>, Severiano Patricio Martínez<sup>a</sup>, Víctor Hugo Isaías Espinoza<sup>a</sup>, Martha Adriana Nathal Vera<sup>a</sup>, Ernesto De Lucas Palacios<sup>a</sup>, Waldina Patricia Reyes Velázquez<sup>a</sup>

### RESUMEN

Los adsorbentes han sido utilizados ampliamente para prevenir las micotoxicosis y la transferencia de toxinas o sus metabolitos dentro de la cadena alimentaria. Particularmente, se unen a las aflatoxinas dentro del tracto gastrointestinal de los rumiantes, disminuyendo su biodisponibilidad y la transferencia de aflatoxina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) a la leche. El presente estudio se desarrolló para evaluar dos métodos de exposición a aflatoxina B<sub>1</sub> en vacas Holstein y monitorear la transferencia AFM<sub>1</sub> a la leche. Adicionalmente, se analizó el potencial de tres adsorbentes de aflatoxinas en ambos experimentos. Los resultados mostraron una tasa de transferencia de AFB<sub>1</sub> a AFM<sub>1</sub>/día de 3.35 y 1.8 % en los dos experimentos respectivamente. La transferencia estimada de AFM<sub>1</sub> en la leche observada en el segundo método fue cercana a las obtenidas de vacas alimentadas con alimentos naturalmente contaminados con aflatoxinas. A diferencia de los glucomanos de paredes celulares de levaduras, ambos adsorbentes de aluminosilicatos disminuyeron significativamente los niveles de AFM<sub>1</sub> en la leche ( $P < 0.05$ ).

**PALABRAS CLAVE:** Aflatoxinas, Adsorbentes, Leche, HPLC.

### ABSTRACT

The adsorbents have been extensively used to prevent mycotoxicosis and the carryover of the toxins or their metabolites into the food chain. Particularly, the aflatoxins binding in the gastrointestinal tract of ruminants and reduce the aflatoxin M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) carryover to milk. This study was carried out to evaluate two exposition methods to AFB<sub>1</sub> in Holstein cows and monitoring AFM<sub>1</sub> in milk. Additionally, the potential of three aflatoxin binders were evaluated in both experiments. Results showed the carryover of AFB<sub>1</sub> to AFM<sub>1</sub>/day to be 3.35 and 1.8 %, respectively. Data obtained in the second experiment showed an estimated carryover closer to those obtained from cows fed with natural aflatoxin contaminated feeds. Unlike yeast cell wall glucomannan, both aluminosilicate adsorbents were found to significantly reduce the carryover of AFM<sub>1</sub> to raw milk ( $P < 0.05$ ).

**KEY WORDS:** Aflatoxins, Adsorbent, Milk, HPLC.

### INTRODUCCIÓN

Las aflatoxinas (AFs) son compuestos tóxicos para la salud humana y animal, relacionadas con diversas enfermedades, incluyendo la

### INTRODUCTION

Aflatoxins (AFs) are toxic compounds for animal and human health. They have been implicated in dangerous illnesses including tumor induction

Recibido el 28 de junio de 2012. Aceptado el 6 de noviembre de 2012.

<sup>a</sup> Departamento de Salud Pública. División Medicina Veterinaria, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Guadalajara. 2100 Camino Ing. Ramón Padilla Sánchez, Poblado La Venta del Astillero, Zapopan. Jalisco, México. Tel.: +33 36820574. Fax: +33 36820574. waldinareyes2@gmail.com. Correspondencia al último autor.

inducción de tumores con efectos mutagénicos, carcinogénicos, teratogénicos e inmunosupresión. Estos compuestos son metabolitos secundarios producidos principalmente por *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*, tanto en condiciones de pre o post-cosecha<sup>(1,2)</sup>.

La alimentación de vacas, ovejas y cabras con alimento contaminado con aflatoxinas genera la transformación y activación de la AFB<sub>1</sub> por enzimas del citocromo P450 hepático (CYP3A4 y 1A2) en un metabolito hidroxilado denominado AFM<sub>1</sub>, que se excreta en la leche y orina<sup>(3,4)</sup>. La exposición a AFM<sub>1</sub>, incluso a niveles bajos representa un riesgo potencial para la salud pública, especialmente en niños que son los principales consumidores<sup>(5)</sup>. AFB<sub>1</sub> y AFM<sub>1</sub> fueron clasificadas por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el cáncer (IARC) como agentes carcinógenos en humanos del tipo 1A y 2B respectivamente<sup>(6)</sup>. La tasa media de conversión de AFM<sub>1</sub> en la leche es de 1.81 % (rango 0.32 a 6.2 %) con relación a la ingesta de AFB<sub>1</sub><sup>(7)</sup>. Algunas investigaciones sugieren que la producción de leche es el principal factor que afecta la excreción total de AFM<sub>1</sub> siendo influenciado por el estado nutricional y fisiológico, régimen de alimentación, capacidad de biotransformación hepática (alta variabilidad individual), infecciones, fuente de contaminación y la concentración de aflatoxinas presente en el alimento<sup>(2,5,8)</sup>. Los estudios señalan que las variaciones en la conversión de AFM<sub>1</sub> son significativos, aún a niveles altos o bajos de contaminación con AFB<sub>1</sub><sup>(5,9)</sup>.

Las regulaciones en México establecen como límite máximo permitido para alimentos 20 µg/kg de AFB<sub>1</sub><sup>(10)</sup> y en la leche 0.5 µg/L de AFM<sub>1</sub><sup>(11)</sup>. Los estudios realizados en México han demostrado contaminación con AFB<sub>1</sub> en granos y alimentos destinados a la producción animal. Los mayores niveles de AFB<sub>1</sub> se encontraron en gluten de maíz y en alimentos para animales con valores de 8 a 77 µg/kg (media: 31.4 µg/kg) y 5 a 61 µg/kg (media: 15.3 µg/kg), respectivamente<sup>(12)</sup>. El estudio realizado en el estado de Jalisco, demostró la

with immunosuppressive, mutagenic, carcinogenic, and teratogenic effects. These compounds are secondary metabolites principally produced by *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*, either in pre- or post-harvest conditions<sup>(1,2)</sup>.

When dairy cows, sheep and goats are fed with aflatoxin-contaminated feedstuffs, AFB<sub>1</sub> will be activated and transformed by liver cytochrome P450 enzymes (CYP3A4 and 1A2) into a hydroxylated metabolite denominated AFM<sub>1</sub>, which is excreted into milk and urine<sup>(3,4)</sup>. The aflatoxin M<sub>1</sub> exposure even at low levels represents a potential risk for public health, specially of children who are the main consumers<sup>(5)</sup>. Aflatoxin B<sub>1</sub> and AFM<sub>1</sub> were classified by the International Agency for Research on Cancer as human carcinogens class 1A and 2B, respectively<sup>(6)</sup>. The mean carryover rate of AFM<sub>1</sub> in milk was reported to be 1.81 % (range 0.4 to 3.68 %) relative to AFB<sub>1</sub> intake<sup>(7)</sup>. Some investigations suggested that milk yield is the main factor affecting the total excretion of AFM<sub>1</sub> being this carryover rates influenced by nutritional and physiological status, feeding regimens, hepatic biotransformation capacity (high individual variability), infections, source of contamination and dosis of AFs<sup>(2,5,8)</sup>. Studies pointed out that the variations in carryover rates are significant either at high or low levels of AFB<sub>1</sub> contamination<sup>(5,9)</sup>.

The regulations in Mexico established that AFB<sub>1</sub> and AFM<sub>1</sub> should not be higher than 20 µg/kg<sup>(10)</sup> and 0.5 µg/L<sup>(11)</sup> for feeds and milk, respectively. Studies in Mexico have demonstrated the AFB<sub>1</sub> contamination of grains and feed intended for animal production. The highest values for naturally occurring AFB<sub>1</sub> were found in corn gluten and feed samples with levels ranging from 8 to 77 µg/kg (mean of 31.4 µg/kg) and 5 to 61 µg/kg (mean of 15.3 µg/kg), respectively<sup>(12)</sup>. The study carried out in Jalisco State, Mexico, demonstrated the presence of AFM<sub>1</sub> in raw cow's milk<sup>(13)</sup>, although the observed levels were below the national regulation. However, further investigations are need to determine the

presencia de AFM<sub>1</sub> en leche de vaca<sup>(13)</sup>, aunque los niveles observados estuvieron debajo de lo establecido por la Normatividad Mexicana. Sin embargo, se requieren nuevas investigaciones para determinar la contaminación por aflatoxinas en los alimentos destinados a consumo humano y animal.

Una estrategia práctica para prevenir la aflatoxicosis en animales y para evitar los residuos de aflatoxinas en los alimentos, es la adición de adsorbentes no-nutritivos en el alimento, los cuales se unen a las aflatoxinas en el tracto gastrointestinal y reducen su biodisponibilidad y distribución en la sangre, hígado y otros órganos<sup>(14,15)</sup>. Se han realizado numerosos estudios de adsorción *in vitro*, incluso con fluido ruminal<sup>(16)</sup>, sin embargo, los adsorbentes deben ser evaluados *in vivo* para establecer la eficacia de la utilización de animales. Hasta el momento existen pocos estudios sobre la eficiencia de los diferentes adsorbentes en vacas lecheras, a diferencia de los realizados en otras especies animales. Los estudios *in vivo* mostraron que la adición de aluminosilicatos, o glucomananos de paredes celulares de *Saccharomyces cerevisiae* en el alimento de vacas y cabras productoras de leche expuestas a AFB<sub>1</sub>, disminuyeron los niveles de AFM<sub>1</sub> en la leche<sup>(17,18)</sup>. El objetivo del estudio fue comparar dos métodos de exposición a aflatoxina B<sub>1</sub> en ganado lechero y evaluar la eficiencia de adsorbentes de micotoxinas para reducir los niveles de AFM<sub>1</sub> en la leche de vacas expuestas a alimentos contaminados artificialmente con AFB<sub>1</sub>.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Producción de aflatoxina B<sub>1</sub> en arroz*

Se inocularon 50 g de arroz con un disco de agar a partir del cultivo de *A. parasiticus* (cepa NRRL2999) desarrollado en extracto de malta (MEA) a 28 °C. Los matraces se incubaron durante 8 a 10 días en la oscuridad a 28 °C. El material de cultivo se esterilizó en autoclave, se secó a 60 °C en un horno de aire forzado durante 24 h, y se almacenó a 4 °C hasta su

aflatoxin contamination in Mexican foods and feeds.

A practical approach to prevent aflatoxicosis in animal and to avoid aflatoxin residues in food is the dietary addition of non-nutritive adsorbents that bind aflatoxins in the gastrointestinal tract, and reduce their bioavailability and distribution to the blood, liver and other target organs<sup>(14,15)</sup>. Many adsorption studies have been performed *in vitro* even in ruminal fluid<sup>(16)</sup>, however adsorbents should be evaluated *in vivo* to establish efficacy for animal use. At the moment there are only a few studies reported about the efficacy of different adsorbents in dairy cows, less than in other animal species. *In vivo* studies with dairy cows and goats exposed to AFB<sub>1</sub>, have shown that the dietary addition of aluminosilicates, or glucomannan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls decrease the levels of AFM<sub>1</sub> in the milk<sup>(17,18)</sup>. The aim of this work was to compare two methods for the evaluation of aflatoxin B<sub>1</sub> exposure in dairy cattle and testing the efficacy of mycotoxin adsorbents to reduce AFM<sub>1</sub> residues in milk obtained from cows exposed to artificially AFB<sub>1</sub>-contaminated feeds.

## MATERIALS AND METHODS

### *Production of aflatoxin B<sub>1</sub> on rice*

The rice (50 g) was inoculated with an agar disc of *A. parasiticus* NRRL2999 grown on Malt Extract Agar (MEA) at 28 °C. The flasks were incubated at 28 °C during 8 to 10 d in the dark. Then, the culture material was autoclaved, dried at 60 °C in a forced-air oven for 24 h, finely grounded, and stored at 4 °C until its incorporation into diet<sup>(19)</sup>. Prior to use, the aflatoxin content in rice was determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) using pre-column derivatization and fluorescence detection. Two batches of aflatoxin-contaminated rice were produced (4.8 and 1.7 kg/batch) and tested in triplicate. Mean AFB<sub>1</sub> levels in rice powder were 45.4 and 48.6 µg/g, respectively.

incorporación en la dieta<sup>(19)</sup>. Antes de utilizarlo, se determinó el contenido de aflatoxinas en el arroz mediante cromatografía de líquidos de alta precisión (HPLC), derivatización en pre-columna y detección por fluorescencia. Se obtuvieron dos lotes de arroz contaminado con aflatoxinas (4.8 y 1.7 kg/lote) y se analizaron por triplicado. La media de los niveles de AFB<sub>1</sub> en el arroz fueron de 45.4 y 48.6 µg/g, respectivamente.

#### *Análisis de aflatoxina B<sub>1</sub> en el alimento<sup>(20,21)</sup>*

Se mezclaron 50 g de muestra de alimento con 250 ml de acetona:agua (85:15 v/v) durante 2 min. El extracto se filtró con papel Whatman N° 4, y 5 ml se diluyeron en 100 ml con solución buffer de fosfato (PBS). Una alícuota de 50 ml se pasó a través de una columna de inmunoafinidad (AflaTest Vicam). La AFB<sub>1</sub> se eluyó con metanol (2 ml) y evaporó a sequedad bajo nitrógeno a 45 °C. El residuo se disolvió en 1 ml de acetonitrilo:agua (9:1 v/v). Posteriormente una alícuota de 200 µl se derivatizó con 700 µl de ácido trifluoroacético:ácido acético:agua (20:10:70). Las aflatoxinas derivatizadas (50 µl) se analizaron utilizando el equipo de Cromatografía de líquidos Agilent 1100 (Palo Alto, CA, EE.UU.) conectado a un detector de fluorescencia FLD Agilent 1100. Las separaciones cromatográficas se realizaron en una columna de fase inversa (150 x 4.6 mm id, tamaño de partícula 5 micras, Beckman Coulter Ultrasphere). La fase móvil fue agua:metanol:acetonitrilo (4:1:1) con flujo de 1.5 ml/min. El detector FLD se fijó a 360 nm de excitación y 440 nm de emisión. La cuantificación de aflatoxina B<sub>1</sub> se realizó mediante el método de estándar externo. El estándar de aflatoxina B<sub>1</sub> se adquirió en Sigma Chemical Company (St Louis, MO). Las soluciones de trabajo para el estándar de AFB<sub>1</sub> se prepararon con acetonitrilo a concentraciones de 0.99 a 15.90 ng/ml. Pruebas de recuperación se realizaron por triplicado con alimento libre de AFB<sub>1</sub> (<1 µg/kg). La recuperación media y la desviación estándar calculada fueron de 85 ± 6%. El límite de cuantificación fue 1 µg/kg, y

#### *Detection of aflatoxin B<sub>1</sub> in feeds<sup>(20,21)</sup>*

Briefly, 50 g of feed sample was blended for 2 min with 250 ml acetone:water (85:15 v/v). The extract was filtered with Whatman paper No. 4, and 5 ml were diluted to 100 ml in a volumetric flask with phosphate buffer solution (PBS). A 50 µl aliquot was injected into an immunoaffinity column (Aflatest Vicam). The AFB<sub>1</sub> was eluted with methanol (2 ml) and evaporated to dryness under nitrogen at 45 °C. The residue was dissolved in 1 ml of acetonitrile:water (9:1 v/v). An aliquot (200 µl) was derivatized with 700 µl of trifluoroacetic acid:acetic acid:water (20:10:70). The derivatized aflatoxins (50 µl solution) were analyzed using the HPLC system consisted of an Agilent 1100 pump (Palo Alto, CA, USA) connected to a FLD Agilent 1100 fluorescence detector. Chromatographic separations were performed on a stainless steel Beckman Coulter Ultrasphere reversed-phase column (150 x 4.6 mm i.d., 5 µm particle size). Water:methanol:acetonitrile (4:1:1) was used as the mobile phase, at a flow rate of 1.5 ml/min. The FLD detector was set at 360 nm excitation and 440 nm emission wavelengths. Aflatoxin B<sub>1</sub> quantification was performed by peak area measurements using the standard external method. aflatoxin B<sub>1</sub> standard was obtained from Sigma Chemical Company (St Louis, MO). Standard AFB<sub>1</sub> working solutions were prepared in acetonitrile containing from 0.99 to 15.90 ng/ml. Recovery experiments were done in triplicate with AFB<sub>1</sub>-free feed (< 1 µg/kg). Test portions of sample feed were analyzed after spiking at 10 µg of AFB<sub>1</sub>/kg. The mean recovery and standard deviation were calculate to be 85 ± 6 %. The limit of quantification, based on a signal-to-noise ratio of 10, was 1 µg/kg, while the limit of detección (LOD), signal-to-noise ratio of three, was 0.3 mg/kg.

#### *Experimental designs*

Two comparative experimental procedures were performed using the same dairy cows fed with artificially AFB<sub>1</sub>-contaminated diets to evaluate the efficacy of commercial mycotoxin adsorbents to reduce AFM<sub>1</sub> residues in milk. The protocols

el límite de detección (LOD) 0.3 µg/kg.

### *Diseño experimental*

Se evaluaron dos procedimientos experimentales utilizando las mismas vacas lecheras, las cuales fueron alimentadas con dietas contaminadas artificialmente con AFB<sub>1</sub>, y se valoró la eficacia de adsorbentes de micotoxinas comerciales para reducir los residuos de AFM<sub>1</sub> en la leche. Los protocolos fueron aprobados por el Departamento de Medicina Veterinaria y los ensayos se llevaron a cabo en el Rancho Cofradía de la Universidad de Guadalajara, ubicado en el Km 7.5 de la Carretera San Isidro Mazatepec, del municipio de Tlajomulco de Zuñiga, Jalisco, México.

### *Composición mineralógica de los adsorbentes*

El registro de la difracción de rayos X (XRD) de los patrones fue mediante un Goniómetro Philips 3020 con controlador PW 3710, CuK alfa radiación ( $\lambda = 1.5405 \text{ \AA}$ ) y filtro de Ni a 40 kV y 20 mA. Los datos de difracción se recuperaron en un rango 2 $\theta$  de 3°-70°, con una amplitud de 0.04 ° y un tiempo de conteo de 2.0 s/fase. La cuantificación mineral se obtuvo por FULLPROF<sup>(22)</sup> utilizando el método de Rietveld<sup>(23)</sup>. Todas las muestras se analizaron por medio de la técnica de difracción de Rayos X de polvos. La precisión de los resultados cuantitativos estimados por el uso de mezclas naturales de estándar fue de 5 % v/v. El Cuadro 1 resume los porcentajes obtenidos de los aluminosilicatos analizados.

### *Manejo de dietas, animales y corrales*

Se seleccionaron vacas de la raza Holstein procedentes del hato lechero del Rancho Cofradía, con base al número de partos (media= 2), producción de leche (media= 27.9 ± 2.8 kg/d), días en leche (media= 220 ± 20), la edad (media= 3.2 ± 0.5 años) y condición corporal (media= 2.7 ± 0.2). Los corrales experimentales (n= 4) se localizaron cerca del resto del hato, por lo que los animales

were approved by the Veterinary Medicine Department and the trials were carried out at the Rancho Cofradía (Universidad de Guadalajara, Km 7.5 Carretera San Isidro-Mazatepec, Tlajomulco de Zuñiga, Jalisco, Mexico).

### *Mineralogical composition of adsorbents*

A Philips 3020 Goniometer with PW 3710 Controller, Cu K $\alpha$  radiation ( $\lambda=1.5405 \text{ \AA}$ ), and Ni filter at 40 kV and 20 mA. was used to record X-ray diffraction (XRD) patterns. Diffraction data were collected over a 2 $\theta$  range of 3° to 70°, with a step width of 0.04° and a counting time of 2.0 s/step. Mineral quantification was obtained by FULLPROF<sup>(22)</sup> utilized by the Rietveld method<sup>(23)</sup>. All samples were analyzed by means of the powder mounting technique. The result does not take into account the presence of phases not detected by XRD and amorphous materials. The accuracy of quantitative results estimated by the use of natural standard mixtures was 5 % w/w. Table 1 summarizes the percentage values obtained for each aluminosilicate sample by Rietveld method.

### *Cows, housing, and total diet management*

Holstein cows were selected from the Rancho Cofradía herd population on the basis of lactations number (average= 2), milk production (average=

Cuadro 1. Composición química de los adsorbentes aluminosilicatos de micotoxinas

Table 1. Chemical composition of aluminosilicate mycotoxin adsorbents

		Chemical composition (%)	
		AA-1	AA-2
Silicon dioxide	SiO <sub>2</sub>	60-70	62.0
Aluminum oxide	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	10-20	11.6
Ferric oxide	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	<5	2.2
Calcium oxide	CaO	<8	4.9
Magnesium oxide	MgO	<5	1.0
Sodium oxide	Na <sub>2</sub> O	-	0.31

AA= Aluminosilicate adsorbent.

permanecieron en su hábitat natural. Se alojaron un máximo de 4 vacas por corral (28 m<sup>2</sup>) y se mantuvieron con suministro de agua y alimentación adecuada. Se procedió a un período de adaptación de 15 días previo a la prueba experimental. Las dietas se formularon de acuerdo a los requerimientos nutricionales recomendados por NRC para vacas lecheras en función del nivel de producción de leche y el peso corporal. Las vacas se alimentaron con una ración totalmente mezclada (RTM) compuesta de 60 % de forraje (ensilaje de maíz) y 40 % de concentrado de grano en materia seca (MS). Antes y durante el experimento, las muestras de alimento se analizaron para determinar la presencia natural de AFB<sub>1</sub>. Las vacas se ordeñaron aproximadamente a las 4:00 y 16:00 h todos los días y se registró la producción de leche diariamente. En cada ensayo, los cuatro grupos experimentales se compararon: T1= grupo testigo (aflatoxinas sin adsorbente); T2= aluminosilicato adsorbente comercial 1 (0.2% MS); T3= aluminosilicato adsorbente comercial 2 (0.2% MS) y T4= glucomanos de paredes celulares de levadura (0.075% MS). Los adsorbentes se incluyeron en la dieta de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. En todos los tratamientos, las vacas fueron expuestas a AFB<sub>1</sub> (880 µg/día/vaca), nivel que corresponde a 40 µg de AFB<sub>1</sub>/kg de alimento (de acuerdo al consumo de alimento de 22 kg de MS/día).

#### *Experimento No. 1*

Bajo un diseño cuadrado latino se seleccionaron aleatoriamente 12 vacas raza Holstein y se distribuyeron en corrales de acuerdo a los cuatro tratamientos descritos. Se realizaron cuatro períodos experimentales, cada uno de 11 días. Durante los primeros seis días de cada periodo, las vacas recibieron una dieta libre de aflatoxinas y los restantes cinco días las vacas se alimentaron con dietas que contenían 40 µg de AFB<sub>1</sub>/kg con o sin adición de adsorbente, de acuerdo con el tratamiento correspondiente (T1, T2, T3, T4). Al final de cada período, las vacas se asignaron aleatoriamente a otro grupo de tratamiento. Antes del suministro de la dieta

27.9 ± 2.8 kg/d), days in milk (average= 220 ± 20), age (average= 3.2 ± 0.5 yr old) and corporal condition (average= 2.7 ± 0.2). A maximum of four heads per pen (28 m<sup>2</sup>) were kept with adequate feeding and watering facilities. The experimental pens (n=4) were located near to the rest of the dairy herd, so the animals remained in their natural habitat. An adaptation period of 15 d preceded the experiments and it was used for the training of the animal-care staff. Diets were formulated to meet the NRC-recommended nutrients requirements for dairy cows according to their milk production level and body weight. Cows were fed a total mixed ration (TMR) composed of 60 % forage (corn silage) and 40 % grain concentrate on dry matter (DM). Before and during the experiment, feed samples were analyzed to determine the natural occurrence of AFB<sub>1</sub>. Cows were milked at approximately 0400 and 1600 h every day and the milk production was daily recorded. In each trial, the same four experimental groups were compared: T1= control group (non mycotoxin adsorbent added); T2= Commercial aluminosilicate adsorbent 1 at 0.2% DM; T3= Commercial aluminosilicate adsorbent 2 at 0.2% DM and T4= Commercial yeast cell wall glucomannan at 0.075% DM. All adsorbents were included to the diet according to manufacturer's dose recommendations. In all treatments, cows were exposed to AFB<sub>1</sub> at 880 µg/d per head, level corresponding to 40 µg of AFB<sub>1</sub>/kg of feed (based on feed consumption of 22 kg DM/d). The diet was daily weighed and the effectively consumed feed by each cow was measured.

#### *Experiment No. 1*

Twelve lactating Holstein cows were randomly allocated into a Latin-square design assigned to the four treatment groups previously mentioned. Four experimental periods were performed and each consisted of 11 d. During the first 6 d, cows were offered an AFs-free diet. For the remaining 5 d, cows were administered with feed containing 40 µg of AFB<sub>1</sub>/kg with or without adsorbent addition

experimental, se preparó un "vehículo" de AFB<sub>1</sub> mezclando 19.4 µg del cultivo de arroz con AFB<sub>1</sub> en 280 g de concentrado de grano. Para la administración del "vehículo" que contenía AFB<sub>1</sub>, cada animal se trasladó del corral experimental a un comedero individual con trampa y se mantuvo durante 45 min para asegurar el consumo total de la dieta con AFB<sub>1</sub>. Se obtuvieron muestras de leche de cada vaca los días 6, 10, y 11 de cada periodo. Se procedió a obtener una muestra compuesta diaria de 3 L de la ordeña de la mañana y 3 L de la tarde, las cuales se almacenaron a 4 °C durante 16 h antes de la determinación de AFM<sub>1</sub>.

### *Experimento No. 2*

A partir del lote de vacas Holstein utilizadas en el Exp 1, se seleccionaron al azar cuatro vacas y fueron alojadas en un corral experimental. El grupo conformado se trató durante cuatro periodos de 11 días cada uno. Durante el primer periodo los animales recibieron el T1, y posteriormente fueron recibiendo los T2, T3 y T4 de manera consecutiva. Cada periodo consistió en dos sub-periodos de 6 y 5 días como fue descrito en el Exp 1. Para la administración de AFB<sub>1</sub> se mezcló primero la cantidad calculada del cultivo de arroz con AFB<sub>1</sub> (18.1 g) con aproximadamente 0.5 kg de salvado de trigo, y después se incorporó con el concentrado de grano (con o sin adsorbentes de micotoxinas). El concentrado contaminado con AFB<sub>1</sub> se mezcló con el ensilado de maíz para obtener la ración totalmente mezclada (RTM), para lo cual se utilizó una mezcladora de la marca Kuhn 3120. En cada periodo, el grupo de vacas recibió en los tratamientos T2, T3, y T4 el adsorbente de micotoxinas correspondiente. De manera similar que el Exp 1, las muestras de leche se recolectaron para las determinaciones de AFM<sub>1</sub>.

### *Análisis de AFM<sub>1</sub><sup>(24)</sup>*

Después de calentar la leche a 37 °C, y centrifugar a 2000 xg, 50 ml, de la fase acuosa se filtraron en papel Whatman N° 4. Posteriormente se limpió el extracto utilizando

according to the correspondig treatment (T1, T2, T3, and T4 treatment groups). At the end of every period, the cows were randomly reassigned to other treatment group. Prior to aflatoxin administration, an AFB<sub>1</sub>-vehicle was prepared by mixing an adequate quantity of AFB<sub>1</sub> cultured rice powder (19.4 µg) with 280 g of grain concentrate. During AFB<sub>1</sub> administration, each animal was moved out of the experimental pen into an individual feeding pen for 45 min to ensure a proper AFB<sub>1</sub>-vehicle intake. Milk samples were obtained from each cow at d 6, 10, and 11 of each period. Three liters from the morning- and evening-milkings were combined to constitute a daily composite sample. Milk samples were stored at 4 °C during 16 h prior to AFM<sub>1</sub> assay.

### *Experiment No. 2*

Four lactating Holstein cows, selected by random from same batch of twelve cows used in the Exp 1, were housed in an experimental pen. All animals were treated during four periods of 11 d each one. During the first period the animals were fed with T1 (as previously described). For the 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> periods, all animals were treated with T2, T3 and T4, respectively. Each period consisted of two sub-periods of 6 and 5 d as described in Exp 1. The AFB<sub>1</sub> administration was made by first mixing an adequate quantity of AFB<sub>1</sub> cultured rice powder (18.1 g) with approximately 0.5 kg of wheat bran, and then mixed with the grain concentrate (with or without mycotoxin adsorbents). The AFB<sub>1</sub>-contaminated concentrate was mixed with corn silage using a Kuhn 3120 TMR mixer box to ensure adequate distribution of aflatoxins. This AFB<sub>1</sub>-contaminated TMR was formulated to feed a total of four cows/d during the last 5 d of each period. At each period, the T2, T3, and T4 treatment groups received the corresponding mycotoxin adsorbent. Milk sample collections were carried out as in Exp 1.

### *Aflatoxin M<sub>1</sub> assay<sup>(24)</sup>*

Briefly, after warming up the milk at 37 °C and centrifugated at 2000 xg, 50 ml of the aqueous

una columna de inmunoafinidad (AflaStar M<sub>1</sub> Romer Labs). La AFM<sub>1</sub> se eluyó con acetonitrilo (4 ml) y evaporó a sequedad bajo nitrógeno a 45 °C. El residuo se redisolvió en 200 µl de acetonitrilo:agua (25:75 v/v). Una alícuota de 50 µl se inyectó en el sistema de HPLC/FLD previamente mencionado. Las separaciones cromatográficas se realizaron en columna de fase inversa (250 x 4,6 mm id, tamaño de partícula 5 micras, Beckman Coulter Ultrasphere), conectada a una precolumna (C18, 20 mm x 4,6 mm., 5 µm, Phenomenex). La fase móvil fue agua:acetonitrilo (75:25 v/v) con flujo de 0.8 ml/min. El detector FLD se fijó en 365 nm de excitación y 435 nm de emisión. La cuantificación de aflatoxina M<sub>1</sub> se realizó utilizando el método de estándar externo. La solución estándar de AFM<sub>1</sub> (0.5 µg/ml en acetonitrilo) se adquirió en Biopure (Tulln, Austria) y se prepararon soluciones patrón en fase móvil conteniendo niveles de 1 a 200 ng/ml. Se realizaron pruebas de recuperación en la leche libre de AFM<sub>1</sub>. Repeticiones del ensayo con la leche (n= 3) se inocularon con estándar de AFM<sub>1</sub> a un nivel de 0.5 µg/L. El promedio de recuperación porcentual y la desviación estándar del método fue de 87±6 %. El límite de cuantificación de acuerdo a la señal de ruido de 10:1 se estimó en 0.02 µg/L.

#### *Análisis estadístico*

La concentración de AFM<sub>1</sub> (µg/L) en la leche y la producción de leche se promediaron en los últimos dos días de cada tratamiento, y las medias se sometieron al análisis de varianza (ANOVA). Se realizó la prueba de Tukey para todas las comparaciones de medias a un nivel de significancia de  $P < 0.05$ . El análisis estadístico se realizó utilizando el programa Sigma Stat (Versión 2.03 para Windows, SPSS. Inc., Chicago, IL).

## **RESULTADOS**

La presencia natural de AFB<sub>1</sub> en muestras de la RTM fue de  $2.5 \pm 1.5$  µg/kg. Antes de la incorporación de AFB<sub>1</sub> en las dietas la presencia

phase was filtered with Whatman paper No. 4 and poured into an immunoaffinity column (AflaStar M<sub>1</sub> Romer Labs). AFM<sub>1</sub> was eluted with acetonitrile (4 ml) and evaporated to dryness under nitrogen at 45 °C. The resultant residue was dissolved in 200 µl of acetonitrile:water (25:75 v/v). An aliquot of 50 µl was injected into HPLC/FLD mentioned above. Chromatographic separations were performed on a stainless steel Beckman Coulter Ultrasphere reversed-phase column (250 x 4.6 mm i.d., 5 µm particle size) connected to a precolumn (C<sub>18</sub>, 20 mm x 4.6 mm., 5 µm, Phenomenex). Water:acetonitrile (75:25 v/v) was used as the mobile phase, at a flow rate of 0.8 ml/min. The FLD detector was set at 365 nm excitation and 435 nm emission wavelengths. Aflatoxin M<sub>1</sub> quantification was performed by peak area measurements using the external standart method. AFM<sub>1</sub> standard solution (0.5 µg/ml in acetonitrile) was purchased from Biopure (Tulln, Austria) and used to prepare standard solutions in mobile phase containing 1 to 200 ng/ml. Recovery experiments were done with AFM<sub>1</sub>-free raw milk. Milk test portions (n=3) were spiked with standard AFM<sub>1</sub> at a level of 0.5 µg/L. The mean-percent recovery and standard deviation of the method was  $87 \pm 6$  %. The limit of quantitation with a signal to noise of 10:1 was estimated to be 0.02 µg/L.

#### *Statistical analysis*

Milk AFM<sub>1</sub> concentration (µg/L) and milk production were averaged for the last 2 d in each treatment groups and means were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA). Tukey-test for all pairwise comparisons were performed and  $P < 0.05$  was considered statistically significant. Statistical analyses were carried out using SigmaStat (Sigma Stat Version 2.03 for Windows; SPSS, Inc., Chicago, IL).

## **RESULTS**

The natural occurrence of AFB<sub>1</sub> in TMR samples was  $2.5 \pm 1.5$  µg/kg. Before the AFB<sub>1</sub> intake the presence of AFM<sub>1</sub> was not detected (Limit



de AFM<sub>1</sub> en la leche no fue detectada (límite de detección= 0.02 µg/L). En ambos experimentos, seis días después de la exposición a AFB<sub>1</sub> de cada periodo, los niveles de AFM<sub>1</sub> en la leche fueron de 0.028 ± 0.002 µg/L o no se detectó. Este "periodo de eliminación" se llevó a cabo para disminuir la contaminación de AFM<sub>1</sub> en la leche a niveles basales antes de la administración AFB<sub>1</sub> del nuevo periodo.

La concentración de AFM<sub>1</sub> en la leche de los grupos tratados del Exp 1 se muestra en la Figura 1. Los niveles promedio observados de AFM<sub>1</sub> fueron 1.343 ± 0.341, 1.084 ± 0.421, 1.106 ± 0.423, 1.193 y ± 0.353 µg/L en los tratamientos T1, T2, T3, y T4, respectivamente. Aunque se aprecia disminución en la concentración de AFM<sub>1</sub> en la leche, no se observó diferencia entre tratamientos (*P*>0.05).

El porcentaje de reducción de la transformación de AFB<sub>1</sub> a AFM<sub>1</sub> en la leche se presenta en el Cuadro 2. El porcentaje de conversión (AFB<sub>1</sub>/AFM<sub>1</sub> en la leche) fue de 3.35 % en las vacas que recibieron 40 mg de AFB<sub>1</sub>/kg de alimento por día sin adsorbente (T1), similar a lo reportado previamente<sup>(7)</sup>.

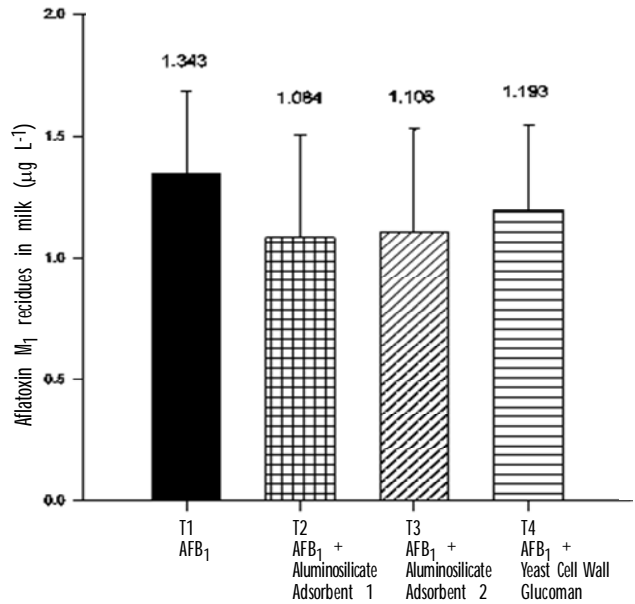
El efecto de los adsorbentes sobre los niveles de AFM<sub>1</sub> en la leche observados en el Exp 2 se muestra en la Figura 2. Los niveles promedio observados de AFM<sub>1</sub> fueron 0.736 ± 0.096, 0.492 ± 0.097, 0.465 ± 0.081 y 0.649 ± 0.100 µg/L para los tratamientos T1, T2, T3,

of Detection (LOD) = 0.02 µg/L). In both experiments, six days after finish AFB<sub>1</sub> exposure, AFM<sub>1</sub> in milk was either 0.028 ± 0.002 µg/L or not detected at all. This denominated "clearance period" was carried out to decrease AFM<sub>1</sub> contamination in milk to the basal levels prior to the AFB<sub>1</sub> administration.

The AFM<sub>1</sub> concentration in the raw milk from treated groups in Exp 1 is shown in Figure 1.

Figura 1. Reducción de AFM<sub>1</sub> en la leche por efecto de los adsorbentes durante el consumo de AFB<sub>1</sub>. Exp 1.

Figure 1. Reduction of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk caused by adsorbents during artificially aflatoxin B<sub>1</sub> intake. Exp 1.



Cuadro 2. Tasa de conversión de AFB<sub>1</sub> a AFM<sub>1</sub> en la leche y porcentaje de reducción de AFM<sub>1</sub> (%)

Table 2. Carryover of AFB<sub>1</sub> to AFM<sub>1</sub> in milk and percent of reduction of AFM<sub>1</sub> in cow's milk (%)

Treatments	Carry-over		Reduction of AFM <sub>1</sub> milk	
	Exp N° 1	Exp N° 2	Exp N° 1	Exp N° 2
T1 = AFB <sub>1</sub>	3.4	1.8	-	-
T2 = AFB <sub>1</sub> + AA-1	2.7	1.2	19.3	33.2
T3 = AFB <sub>1</sub> + AA-2	2.8	1.2	17.6	36.8
T4 = AFB <sub>1</sub> + Glucomannan derived from yeast cell walls	2.9	1.6	11.2	11.8

Exp = Experiment; AA= Aluminosilicate adsorbent.

T4, respectivamente. La tasa de conversión (AFB<sub>1</sub>/AFM<sub>1</sub> en la leche) fue del 1.8 % en las vacas que recibieron 40 mg de AFB<sub>1</sub>/kg de alimento por día sin adsorbente. Resultados similares se reportan en otros estudios con vacas lecheras alimentadas con dietas contaminadas naturalmente con aflatoxinas<sup>(10)</sup>. Las concentraciones de AFM<sub>1</sub> en la leche mostraron reducción significativa ( $P < 0.05$ ) cuando las vacas recibieron los tratamientos T2 y T3, respecto al T1. No hubo diferencia significativa entre T2 y T3, los porcentajes de reducción de AFM<sub>1</sub> en la leche fueron 33.2 y 36.8 %, respectivamente. Sin embargo, las concentraciones de AFM<sub>1</sub> en la leche de las vacas alimentadas con el T4, (11.8 %) no fueron significativamente diferentes ( $P > 0.05$ ) del T1.

## DISCUSIÓN

Este estudio se realizó para encontrar un método *in vivo* confiable de exposición artificial a AFB<sub>1</sub> en vacas lecheras. En nuestros ensayos, siempre fue detectada la presencia de residuos de AFM<sub>1</sub> en la leche después de la exposición a aflatoxina B<sub>1</sub>. Cuando las vacas lecheras se expusieron a AFB<sub>1</sub>, la AFM<sub>1</sub> apareció en la leche 48 h después de la ingestión y volvió a nivel no detectable después de 72 a 96 h después del retiro del alimento contaminado con AFB<sub>1</sub>. Estos resultados coinciden con los reportados previamente<sup>(17,18)</sup>.

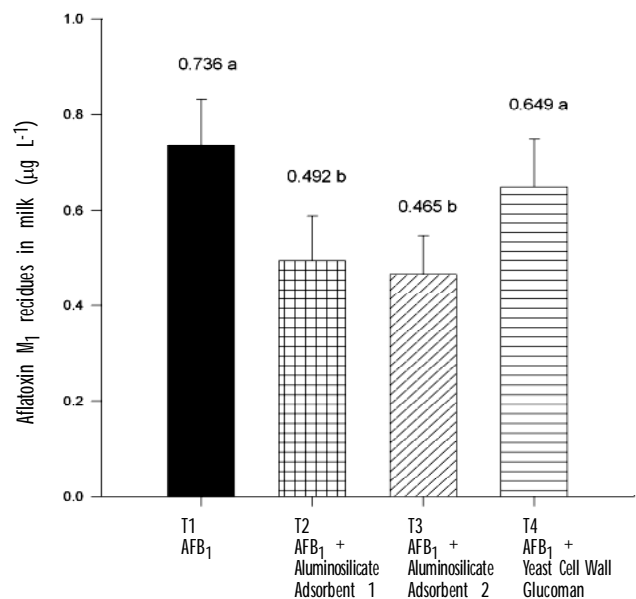
El presente estudio destaca la importancia de simular la exposición natural de AFB<sub>1</sub> en vacas lecheras para la estimación de la tasa de conversión de AFB<sub>1</sub> del alimento a AFM<sub>1</sub> en la leche. Siendo importante el diseño experimental para la evaluación *in vivo* de adsorbentes, debido a que la tasa de conversión se utiliza con frecuencia para comparar la eficacia de adsorbentes sobre diferentes micotoxinas<sup>(18)</sup>. La tasa de conversión para los grupos testigo (T1) en el Exp 1 fue 3.35 %, y 1.8 % en el Exp 2. La naturaleza y magnitud de transformación de AFB<sub>1</sub> en el primer ensayo pudo deberse principalmente al método de exposición. En animales experimentales, algunos investigadores

Average AFM<sub>1</sub> concentrations were  $1.343 \pm 0.341$ ,  $1.084 \pm 0.421$ ,  $1.106 \pm 0.423$ , and  $1.193 \pm 0.353$   $\mu\text{g/L}$  in T1, T2, T3, and T4, respectively. Although a decrease in AFM<sub>1</sub> residues in milk was observed, no significant differences among treatments were found ( $P > 0.05$ ). Percent reduction of carryover rate of AFB<sub>1</sub> from feed into AFM<sub>1</sub> cow's milk achieved by different mycotoxin adsorbents is shown in Table 2. The carryover (AFB<sub>1</sub>/AFM<sub>1</sub> in milk) value was 3.35 % for cows receiving 40  $\mu\text{g}$  of AFB<sub>1</sub>/kg of artificially-contaminated feed per day without adsorbent (T1), which is similar to the range previously reported<sup>(7)</sup>.

The effect of adsorbents on the amount of AFM<sub>1</sub> in milk in Exp 2 is shown in figure 2. The mean concentrations of AFM<sub>1</sub> were  $0.736 \pm 0.096$ ,  $0.492 \pm 0.097$ ,  $0.465 \pm 0.081$  and  $0.649 \pm 0.100$   $\mu\text{g/L}$  for T1, T2, T3, and T4 treatment

Figura 2. Reducción de AFM<sub>1</sub> en la leche por efecto de los adsorbentes durante la exposición a la dieta contaminada artificialmente por AFB<sub>1</sub>. Exp 2.

Figure 2. Reduction of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk caused by adsorbents during exposure to artificially aflatoxin B<sub>1</sub> contaminated diet. Exp 2.



ab Different letters above each bar indicate significant difference ( $P < 0.05$ )

han utilizado eficientemente un “vehículo” portador de la AFB<sub>1</sub> en la dieta de los animales, especialmente en rumiantes<sup>(3,4)</sup>. Sin embargo, las condiciones del suministro de la dieta en el Exp 1 modificó la tasa de paso de los nutrientes por el rumen, generando mayor degradación ruminal. La mayor concentración de AFM<sub>1</sub> observada en la leche sugiere: i) un paso rápido de AFB<sub>1</sub> a través del tracto gastrointestinal y ii) que el proceso de oxidación AFB<sub>1</sub> se incrementó. También se debe considerar que la actividad del citocromo NADPH reductasa es mayor en la mucosa olfativa nasal que en el hígado de bovinos<sup>(25,26)</sup>. En el Exp 1, las vacas incrementaron la exposición a través de la vía nasal debido al procedimiento de alimentación de las dietas contaminadas con AFB<sub>1</sub>, por lo que se pudo concluir que la ingesta diaria del “vehículo-AFB<sub>1</sub>” no reprodujo la tasa de conversión natural de AFM<sub>1</sub> en las vacas lecheras.

La tasa de conversión observada en el Exp 2 fue similar a la reportada por otros investigadores<sup>(7)</sup>. Además, los niveles de AFM<sub>1</sub> en la leche coinciden con el modelo mecanista propuesto por Van Eijkeren *et al*<sup>(9)</sup> y con la ecuación propuesta por Petterson<sup>(27)</sup>. Por lo tanto, se considera al segundo método de exposición a AFB<sub>1</sub> semejante a la exposición natural que ocurre en la alimentación de vacas lecheras, siendo un método más recomendable para la evaluación de adsorbentes de micotoxinas.

Respecto a la eficiencia de los tres adsorbentes de micotoxinas comerciales, los grupos que recibieron los T2 y T3 mostraron niveles de AFM<sub>1</sub> en la leche por debajo del límite máximo permitido por la normatividad Mexicana<sup>(10,11)</sup>, a pesar que las vacas consumieron el doble del nivel permitido de AFB<sub>1</sub> en la dieta. Los resultados demostraron que los adsorbentes de aluminosilicatos (1 y 2) redujeron con eficiencia los niveles de AFM<sub>1</sub> en la leche de manera similar que lo encontrado en otros estudios<sup>(18,28)</sup>. La composición mineralógica y química de los aluminosilicatos podría explicar

groups, respectively. The carryover rate (AFB<sub>1</sub>/AFM<sub>1</sub> in milk) was 1.8 % for cows fed with artificially AFB<sub>1</sub>-contaminated without adsorbents. Similar results are reported in other studies with lactating dairy cows fed with an AFs-naturally contaminated diet with aflatoxins<sup>(10)</sup>. Milk AFM<sub>1</sub> concentrations, were significantly reduced ( $P < 0.05$ ) when dairy cows were fed with feed containing T2, and T3, compared to T1. There were no significant differences ( $P > 0.05$ ) between T2 and T3 treatment groups and the percentages of AFM<sub>1</sub> reduction in milk were 33.2 and 36.8 %, respectively. However, AFM<sub>1</sub> concentrations in the milk from cows fed with T4, (11.8 %) was not significantly different from T1.

The milk production was not affected by the experimental trials. No significant differences among treatments were found ( $P > 0.05$ ). In Exp 1, the average daily milk production for each group was  $30.1 \pm 3.4$ ,  $29.9 \pm 3.7$ ,  $29.6 \pm 3.1$ , and  $29.4 \pm 4.7$  kg/d for T1, T2, T3, and T4 treatment groups, respectively. In Exp 2, average milk production was  $25.4 \pm 3.0$ ,  $26.4 \pm 3.1$ ,  $23.8 \pm 1.0$ , and  $24.9 \pm 2.2$  kg/d for the T1, T2, T3, and T4 treatment groups, respectively.

## DISCUSSION

This study was conducted to find an *in vivo* reliable method for artificially AFB<sub>1</sub>-exposure in lactating dairy cows. In our experiments, the presence of AFM<sub>1</sub> residues in the cow's milk was always detected after the exposure to AFB<sub>1</sub> in agreement with previous reports. When dairy cows are exposed to AFB<sub>1</sub>, AFM<sub>1</sub> will appear in milk 48 h after ingestion and return to an undetectable level after 72 to 96 h of the removal of AFB<sub>1</sub>-contaminated feed from diet. These results agree with data previously reported<sup>(17,18)</sup>.

The present study stresses the importance of simulating natural AFB<sub>1</sub>-exposure in dairy cows in the carryover rate estimation of AFB<sub>1</sub> from feed into AFM<sub>1</sub> cow's milk. Therefore, the

razonablemente la eficacia de los adsorbentes evaluados. En el presente estudio, los experimentos se realizaron de acuerdo a la dosis del adsorbente recomendada por el fabricante.

Por otra parte, los resultados de la presente investigación demostraron que el uso de algunos productos comerciales que habían demostrado tener gran potencial para la disminución de los niveles de AFM<sub>1</sub> en la leche requiere nuevos estudios *in vivo* en vacas.

En otro estudio la inclusión de 200 y 100 mg de aflatoxina/kg de alimento en bovinos redujo 24 y 44 % los niveles de AFM<sub>1</sub> en la leche, cuando se incluyeron 0.5 y 1.0 % del adsorbente aluminosilicato hidratado de sodio y calcio en las dietas respectivamente<sup>(17)</sup>. Otros investigadores mostraron que la exposición de vacas lactantes a dietas contaminadas naturalmente con 55 µg/kg de AFB<sub>1</sub> incluyendo glucomananos derivados de paredes celulares de levaduras (MTB-100® de Alltech, Inc.) y bentonitas sódicas (rango 31 a 65 %) redujeron los niveles de AFM<sub>1</sub> en la leche<sup>(18)</sup>. En contraste, en otro estudio<sup>(28)</sup>, no se apreciaron los resultados reportados previamente para el adsorbente MTB-100®<sup>(18)</sup>. En nuestra investigación los glucomananos derivados de paredes celulares de levadura evaluados, no demostraron eficiencia para reducir los niveles de AFM<sub>1</sub> en la leche. Las diferencias en las dosis del adsorbente entre los estudios previamente desarrollados con el presente, posiblemente podrían explicar estas discrepancias.

En el presente estudio se administró a las vacas un preparado de cultivo de *A. parasiticus* en arroz que contenía además de AFB<sub>1</sub> otras aflatoxinas (AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> y AFG<sub>2</sub>) y metabolitos. Informes previos<sup>(3)</sup> han demostrado que la exposición en vacas a un cultivo con una cantidad equivalente de AFB<sub>1</sub> provocó una disminución en la producción de leche en comparación con la observada cuando se utilizó la toxina pura, lo cual no fue observado en nuestra investigación. Las diferencias en la

importancia of the experimental design for a proper adsorbent *in vivo* evaluation is mainly due to the fact that the carryover rates are frequently use to compare the efficacy of different mycotoxin adsorbents<sup>(18)</sup>. In the present study, the carryover rates for the control groups (T1) were 3.35 and 1.8 % in Exp 1 and 2, respectively. In Exp 1, the nature and magnitude of AFB<sub>1</sub>-biotransformation may be due principally to exposure method. Pellet or bolus of cereal grain have been susccesfully used as carriers for exposure to AFB<sub>1</sub> in experimental animals, especially in ruminants<sup>(3,4)</sup>. However, the conditions of supply of diet in Exp 1 modified the rate of passage of nutrients through the rumen, generating greater ruminal degradation. The higher observed levels of AFM<sub>1</sub> in milk suggest: i) a fast passage of AFB<sub>1</sub> through the gastrointestinal tract, and ii) that the AFB<sub>1</sub> oxidation process has been enhanced. It should also be considered that NADPH cytochrome reductase activity is much higher in the nasal olfactory mucosa than in the liver of cattle<sup>(25,26)</sup>. In Exp 1, the cows were highly exposed trough nasal route due to the feeding procedure of the AFB<sub>1</sub>-contaminated diets. It can be concluded that, intake of AFB<sub>1</sub>-vehicle once a day failed to reproduce the natural carryover rate in dairy cows.

The carryover rate in Exp 2 agrees to those reported by other researchers mentioned above<sup>(7)</sup>. Besides, the AFM<sub>1</sub> residues in milk agrees with the mechanism model proposed by Van Eijkeren *et al*<sup>(9)</sup> and with the equation proposed by Petterson<sup>(27)</sup>. Therefore, it seems the second method of exposition to aflatoxin B<sub>1</sub> simulates better the natural contaminated AFB<sub>1</sub> metabolism of lactating dairy cows. The results of Exp 2, suggest that this artificial exposure in dairy cows to AFB<sub>1</sub> may be considered a reliable method for evaluation of mycotoxins adsorbent.

In relation to the efficacy of the three commercial mycotoxin adsorbents, the AFM<sub>1</sub> residues in milk in T2 and T3 groups dropped beyond the levels allowed by the Mexican

producción de leche entre los experimentos 1 y 2 se debieron principalmente al aumento proporcional de los días en producción de leche de las vacas. También es posible que otros metabolitos en el cultivo compitieran con los sitios de unión a AFB<sub>1</sub> en el tracto gastrointestinal, cambiando la eficiencia del adsorbente. Estudios *in vitro* e *in vivo* han encontrado que la monensina, agente coccidiostático en aves de corral, afectó el potencial de desintoxicación del adsorbente bentonita de sodio<sup>(29,30,31)</sup>.

## CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

este trabajo sugiere que existe una fuerte variabilidad de las tasas de conversión de AFM<sub>1</sub> en la leche de vaca debido al método de exposición a aflatoxinas. La exposición artificial a AFB<sub>1</sub> en raciones totalmente mezcladas (RTM) es un método confiable para evaluar la eficiencia de adsorbentes de micotoxinas comerciales en las vacas productoras de leche. Este método podría facilitar la comparación de los adsorbentes comerciales o durante el desarrollo de nuevos productos. La concentración de AFM<sub>1</sub> en la leche se redujo significativamente con la inclusión de los adsorbentes de origen mineral.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. Michele Solfrizzo (CNR, ISPA, Italia), Dra. Elisa Cabrera Díaz (UDG, México), Dra. Stella Chiacchiera (UNRC, Argentina), Dr. Armando Burgos Hernández (USON, México) y el Dr. Mario Cortés Rocha (USON, México) por sus valiosos comentarios en la revisión crítica del manuscrito. El estudio fue apoyado por la Universidad de Guadalajara (Proyecto N ° 84117).

## LITERATURA CITADA

1. Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. Clin Microbiol Rev

regulation, despite that cows had consumed twice the allowed amount of AFB<sub>1</sub> in their diets. The results demonstrated that aluminosilicate adsorbents 1 and 2 effectively reduced the AFM<sub>1</sub> residues in milk when added to the diet and are in agreement to some mycotoxins adsorbents used in previous studies<sup>(18,28)</sup>. Both mineralogical and chemical composition of the aluminosilicates could reasonable explain the comparative efficacy of the assayed adsorbents. In the present study, the experiments were carried out at fixed adsorbent dose, following manufacturer's suggestions in the product label. Moreover, results of the present investigation showed that the use of commercial products that had been claimed to have a great potential for the decrease of AFM<sub>1</sub> levels in milk require further studies in dairy cows.

A study reported that diets containing aflatoxin at 200 and 100 µg/kg reduced the AFM<sub>1</sub> levels in cow's milk 24 and 44 % when 0.5 and 1.0 % hydrated sodium calcium aluminosilicate were added to the respective diets<sup>(17)</sup>. Others researchers<sup>(18)</sup> used late lactation cows exposed to naturally AFB<sub>1</sub>-contaminated feed at a level of 55 µg/kg, and demonstrated that yeast cell wall glucomannan (MTB-100® Alltech, Inc.) and sodium bentonites (range 31 to 65 %) reduced AFM<sub>1</sub>. However other study<sup>(28)</sup>, had not confirmed the results of MTB-100® observed previously<sup>(18)</sup>. In the present study, another glucomannan derived from yeast cell walls showed no efficacy to reduce AFM<sub>1</sub> in milk. Differences in the effective adsorbent dose between studies as previously discussed might possible explain these discrepancies.

In the present trial, powder rice containing AFB<sub>1</sub> plus other aflatoxins (AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>) and their metabolites from *A. parasiticus* was administered to dairy cows. A previous report<sup>(3)</sup> have shown that a culture with an equivalent amount of AFB<sub>1</sub> caused a decrease in milk production compared to the observed when the pure toxin was used. Our results differ from that study. Differences in milk production between Exp 1 and 2, was mainly due to a

- 2003;16(3):497-516.
2. Fink-Gremmels J. Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: A review. *Food Addit Contam* 2008;25(2):172-180.
  3. Applebaum RS, Brackett RE, Wiseman DW, Marth EH. Responses of dairy cows to dietary aflatoxin: Feed intake and yield, toxin content, and quality of milk of cows treated with pure and impure aflatoxin. *J Dairy Sci* 1982;65(8):1503-1508.
  4. Battacone G, Nudda A, Palomba M, Pascale M, Nicolussi P, Pulina G. Transfer of aflatoxin B<sub>1</sub> from feed to milk and from milk to curd and whey in dairy sheep fed artificially contaminated concentrates. *J Dairy Sci* 2005;88(9):3063-3069.
  5. Prandini A, Tansini G, Sigolo S, Filippi L, Laporta M, Piva G. On the occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and dairy products. *Food Chem Toxicol* 2009;47(5):984-991.
  6. IARC. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. summary of data reported and evaluation. IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk to humans. Vol. 82. International Agency for Research on Cancer, Lyon. 2002.
  7. Magan N, Olsen M. Mycotoxins in food. Detection and control. CRC Press. Boca ratón. Boston. New Cork, Washington, DC. 2004.
  8. Masoero F, Gallo A, Moschini M, Piva G, Diaz D. Carryover of aflatoxin from feed to milk in dairy cows with low or high somatic cell counts. *Animal* 2007;1(9):1344-1350.
  9. Van Eijkeren JCH, Bakker MI, Zeilmaker MJ. A simple steady-state model for carry-over of aflatoxins from feed to cow's milk. *Food Addit Contam* 2006;23(8):833-838.
  10. Norma Oficial Mexicana NOM-247-SSA1-2008, Productos y Servicios. Cereales y sus Productos. Cereales, Harinas de Cereales, Sémolas o Semolinas. Alimentos a base de: Cereales, Semillas Comestibles, de Harinas, Sémolas o Semolinas o sus mezclas. Productos de Panificación. Disposiciones y Especificaciones Sanitarias y Nutrimientales. Métodos de Prueba. 2008.
  11. Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010. Productos y Servicios. Leche, Formula Láctea, Producto Lácteo combinado y derivados Lácteos. Disposiciones y Especificaciones Sanitarias. Métodos de Prueba. 2010.
  12. Flores OCM, Portilla PLB, Vazquez MJ. Contaminación con micotoxinas en alimento balanceado y granos de uso pecuario en México en el año 2003. *Téc Pecu Méx* 2006;44(2):247-256.
  13. Reyes W, Patricio MS, Isaías EV, Nathal VMA, De Lucas PE, Rojo F. Aflatoxinas totales en alimento y AFM<sub>1</sub> en leche en establos lecheros del estado de Jalisco, México. *Téc Pecu Méx* 2009;47(2):223-230.
  14. Phillips TD, Afriyie-Gyawu E, Williams J, Huebner H, Ankrah NA, Ofori-Adjei D, *et al.* Reducing human exposure to aflatoxin through the use of clay: A review. *Food Addit Contam* 2008;25(2):134-145.
  15. Avantaggiato G, Solfrizzo M, Visconti A. Recent advances on the use of adsorbent materials for detoxification of *Fusarium* mycotoxins. *Food Addit Contam* 2005;22(4):379-388.
  16. Spotti M, Fracchioli M, Arioli F, Caloni F, Pompa G. Aflatoxin B<sub>1</sub> binding to sorbent in bovine ruminal fluid. *Veterinary Research Communications* 2005;29(6):507-515.

proportional increase of days in milk. It is also possible that other metabolites in the culture, could effectively compete with AFB<sub>1</sub> for the sites on the adsorbent surface in the gastrointestinal tract, changing the adsorbent efficacy. Studies *in vitro* and *in vivo* have found that monensin, a coccidiostatic agent in poultry, affected the detoxifying potential of a sodium bentonite<sup>(29,30,31)</sup>. The level of exposure to AFB<sub>1</sub> and characteristic of AFB<sub>1</sub>-vehicle preparation were used to challenge the mycotoxin adsorbents to real conditions that possibly occurs in a dairy herd.

## CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

This work suggests a strong variability of carryover rates due to different exposure methods of aflatoxin to dairy cows. The artificial exposure to AFB<sub>1</sub>-contaminated TMR was a reliable method to study the efficacy of mycotoxin commercial adsorbents in dairy cows. The method could facilitate the comparison of commercial adsorbents or during the development of new products. The concentrations of AFM<sub>1</sub> in milk were significantly reduced by the inclusion of assayed mineral adsorbents.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank to Dr Michele Solfrizzo (CNR, ISPA, Italy) Dr Elisa Cabrera Díaz (UDG, México), Dr Stella Chiacchiera (UNRC, Argentina), Dr Armando Burgos Hernández (USON, Mexico) and Dr Mario Cortez Rocha (USON, Mexico) for their invaluable helpful discussions and for the critical review of the manuscript. This study was supported by the Universidad de Guadalajara (Proyect No. 84117).

*End of english version*

- 
17. Harvey R, Phillips TD, Ellis J, Kubena L, Huff W, Petersen HD. Effects of aflatoxin M<sub>1</sub> residues in milk by addition of hydrated sodium calcium aluminosilicate to aflatoxin

## REDUCCIÓN DE AFLATOXINA M<sub>1</sub> EN LECHE DE VACAS

- contaminated diets of dairy cows. *Am J Vet Res* 1991;52(9):1556-1559.
18. Diaz DE, Hagler Jr WH, Blackwelder JT, Eve JA, Hopkins BA, Anderson KL, *et al.* Aflatoxin Binders II: Reduction of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed. *Mycopathologia* 2004;157(2):233-241.
  19. Shotwell OL, Hesselstine CW, Stubblefield RD, Sorenson WG. Production of aflatoxin on rice. *Appl Microbiol* 1966;14(3):425-428.
  20. Trucksess MW, Stack ME, Nesheim S, Albert RH, Romer TR. Multifunctional column coupled with liquid chromatography for determination of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> in corn, almonds, Brazil nuts, peanuts and pistachio nuts: collaborative study. *J AOAC Int* 1994;77(6):1512-1521.
  21. Stroka J, von Holst C, Anklam E, Reutter M. Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography using post-column bromination for determination of aflatoxin B<sub>1</sub> in cattle feed: collaborative study. *J Assoc Official Analytical Chemistry Inter* 2003;86(6):1179-1186.
  22. Rodríguez-Caravajal Fullprof J. A program for Rietveld refinement and pattern matching analysis. Abstracts XV Congress of the IUCr Toulouse, France. 1990.
  23. Rietveld HM. A profile refinement method for nuclear and magnetic structures. *J Appl Cryst* 1969;2:65-71.
  24. Dragacci S, Grosso F, Gilbert J. Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography for determination of aflatoxin M<sub>1</sub> in liquid milk: collaborative study. *J AOAC Int* 2001;84(2):437-443.
  25. Larsson P, Pettersson H, Tjälve H. Hepatic and extrahepatic bioactivation and GSH-conjugation of aflatoxin B<sub>1</sub> in sheep. *Carcinogenesis* 1994;15(5):947-955.
  26. Larsson P, Pettersson H, Tjälve H. Metabolism of aflatoxin B<sub>1</sub> in the bovine olfactory mucosa. *Carcinogenesis* 1989;10(6):1113-1118.
  27. Pettersson H, Bertilsson J, Wennberg O. Carry-over of aflatoxin from dairy cattle feed to milk. *Proc World Assoc Vet Food Hygienists Symp.* Stockholm, 1989.
  28. Stroud J. The effect of feed additives on aflatoxin in milk of dairy cows fed aflatoxin-contaminated diets [MS Thesis]. USA: Nort Carolina State Univ; 2006.
  29. Magnoli AP, Tallone L, Rosa CAR, Dalcerro AM, Chiacchiera SM, Torres RM. Commercial bentonites as detoxifier of broiler feed contaminated with aflatoxin. *Applied Clay Sci* 2008;40(1-4):63-71.
  30. Magnoli AP, Monge MP, Miazzo RD, Cavaglieri LR, Magnoli CE, Merkis CI, *et al.* Effect of low levels of aflatoxin B<sub>1</sub> on performance, biochemical parameters, and aflatoxin B<sub>1</sub> in broiler liver tissues in the presence of monensin and sodium bentonite. *Poultry Sci* 2011;90(1):48-58.
  31. Magnoli AP, Texeira M, Rosa CAR, Miazzo RD, Cavaglieri LR, Magnoli CE, *et al.* Sodium bentonite and monensin under chronic aflatoxicosis in broiler chickens. *Poultry Sci* 2011;90(1):352-357.

