



Presencia de aflatoxina B₁ en alimentos para cabras en unidades de producción de leche caprina del altiplano mexicano



José Jesús Pérez González ^a

Salvador Vega y León ^a

Rey Gutiérrez Tolentino ^{a*}

Beatriz Sofia Schettino Bermúdez ^a

Fátima Itzel Martínez Solís ^a

Arturo Camilo Escobar Medina ^{ab}

^a Universidad Autónoma Metropolitana. Departamento de Producción Agrícola y Animal. Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, Delegación Coyoacán, 04960, Ciudad de México, México.

^b Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

*Autor de correspondencia: reygut@correo.xoc.uam.mx

Resumen:

La presencia de aflatoxinas en el ensilaje y en granos que se destinan para la alimentación de los rumiantes en lactación representa un problema para la salud animal y la inocuidad de la leche. El objetivo del presente trabajo fue determinar el contenido de aflatoxina B₁ en alimentos consumidos por cabras procedentes de cuatro unidades de producción de leche caprina del altiplano mexicano (APM). Un total de 47 muestras de concentrados y 29 muestras de ensilados procedentes de cuatro unidades de producción de leche caprina del Altiplano Mexicano (APM). Se analizaron 47 muestras de concentrados y 29 muestras de ensilados por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC), empleando una columna de fase reversa y detección por fluorescencia previa derivatización de las aflatoxinas. Los resultados mostraron que el 38.29 % y 31.02 % de las muestras de concentrados y ensilados respectivamente presentaron niveles de AFB₁ superiores al límite máximo permisible establecido por la

Unión Europea (UE) (0.05 µg/kg); mientras el 29.78 % y 10.34 % para concentrados y ensilados respectivamente presentaron valores superiores a los 20 µg/kg propuesto por la norma oficial mexicana. Los resultados obtenidos corroboran la problemática actual de la presencia de aflatoxinas en la alimentación de las cabras lactantes, al poder metabolizarse esta toxina en aflatoxina M₁ y afectar la inocuidad de la leche y derivados de encontrarse la misma.

Palabras clave: Aflatoxina B₁, Concentrado, Ensilado, HPLC, Cabras lactando.

Recibido: 13/04/2018

Aceptado: 08/01/2020

Hoy en día, la seguridad de la calidad e inocuidad alimentaria constituye un factor relevante para muchos países⁽¹⁾. La salud y productividad de un animal, junto con la calidad e inocuidad de su leche producida, dependen de la calidad y el manejo del alimento que consumen. Ningún alimento destinado a la nutrición de los animales productores de leche debe presentar algún riesgo de contaminación física, química o microbiológica. Tanto el alimento comercial, como el producido en la granja, deben considerarse como potencial de riesgo para la salud, por lo que antes de proporcionarlo al ganado productor de leche como las cabras, debe ser examinado cuidadosamente para cerciorarse de que no exista presencia de contaminantes (tierra, cuerpos extraños, alambre, hongos, entre otros)⁽²⁾.

La contaminación de alimentos por hongos es un fenómeno muy frecuente, debido a que sus esporas se encuentran ampliamente distribuidas en el ambiente (aire, agua, suelo); de tal modo que la producción agrícola (granos y semillas principalmente) se ve afectada en más de un 25 % con la presencia de algún tipo de micotoxinas⁽³⁾. Los hongos son capaces de desarrollarse en cualquier punto de la cadena alimentaria, en condiciones (pH, humedad relativa, humedad del grano, viabilidad, tiempo de almacenamiento y la presencia de microflora) que favorezcan su desarrollo⁽⁴⁾, cabe hacer mención que algunas especies de hongos son capaces de colonizar y producir aflatoxinas en diferentes medios como alimentos para humanos y animales.

Las aflatoxinas son sustancias tóxicas producidas en el metabolismo secundario de los hongos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y *Penicillium puberulum*⁽⁵⁾. Se han identificado 18 tipos de aflatoxinas, de las cuales seis tienen significación como contaminantes de los alimentos: B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ y M₂; de ellas la AFB₁ es la más carcinogénica y tóxica⁽⁴⁾. Las aflatoxinas, al encontrarse en forrajes, ensilados y concentrados, estos al ser consumidos por los animales pueden estar presentes en su forma original o metabolizados en sus tejidos. Entre sus metabolitos aparece la aflatoxina M₁ (AFM₁) que es excretada en la leche^(6,7).

Los primeros estudios sobre la determinación de AFB₁ en México, fueron realizados en el estado de Sonora por Esqueda *et al*⁽⁸⁾ en muestras de leche de vaca ultrapasteurizada y comercializada en dicho estado, y por otra parte tampoco se ha informado sobre la presencia de AFB₁ en alimentos para cabras lecheras en hatos mexicanos. Algunos de los países en los que se han hecho investigaciones sobre alimentos, leche y derivados lácteos de cabra son: Egipto^(9,10), Cuba⁽¹¹⁾, Portugal⁽¹²⁾, España⁽¹³⁾, Italia⁽¹⁴⁻¹⁷⁾, Brasil⁽¹⁸⁾, Turquía^(19,20), Kenia^(21,22), Sudáfrica⁽²³⁾. En la mayoría de las investigaciones se determinó la transferencia de AFB₁ de los alimentos a AFB₁ en la leche y queso. También evaluaron el contenido de AFB₁ en leche y quesos, encontrando hasta un 69 % de muestras positivas con niveles superiores al límite máximo permisible establecido por la Unión Europea (UE) de 0.05 µg/kg para el caso de la leche y hasta un 19 % de muestras positivas con niveles superiores al límite máximo permisible establecido por la UE para el caso de los quesos. En México se desconoce el estado actual de la presencia de AFB₁ en alimento para cabras y la aplicación permanente de métodos y técnicas para valorar esa micotoxina considerada como patógena.

El objetivo de este trabajo fue determinar el contenido de AFB₁ en alimento para cabras procedentes de cuatro unidades de producción de leche caprina del Altiplano mexicano (APM). La metodología se desarrolló de la siguiente forma: se obtuvieron un total de 47 muestras de concentrados (compuestos principalmente por maíz, sorgo y soya) y 29 muestras de ensilados de maíz procedentes de cuatro unidades de producción de leche caprina (Unidad 1, Unidad 2, Unidad 3 y Unidad 4) del APM. Las muestras se tomaron simultáneamente cada mes durante el periodo comprendido de junio del 2008 a agosto del 2009, de acuerdo con la metodología propuesta por la Norma NOM-188-SSA1-2002⁽²⁴⁾. La cantidad mínima para cada una de las muestras fue de un kilogramo, tomándose de distintos puntos del lote. Las muestras se transportaron al laboratorio en recipientes limpios, etiquetados, y protegidos contra la contaminación y deterioro del transporte. Las muestras se analizaron para determinar su contenido de AFB₁ por HPLC con detector de fluorescencia de acuerdo con lo establecido en los métodos 968.22 (extracción y columna cromatográfica), 971.22 (preparación de soluciones y determinación de concentración de aflatoxinas) y 990.33 (derivatización) de la AOAC⁽²⁵⁾ e ISO 14718 (método de cromatografía líquida de alta resolución)⁽²⁶⁾.

Para el procesado de las muestras, se molieron 500 g de muestra en un molino y se pasó por un tamiz con una abertura de 1 mm. Posteriormente, se dividió la muestra por el procedimiento de cuarteo, tomando la muestra en forma diagonal, se mezcló y se almacenó en una bolsa de nylon o frasco bien cerrado. Para la extracción, se pesaron 50 g de muestra previamente molida y tamizada con exactitud de 0.1 g y se colocó en un matraz Erlenmeyer con tapa y se le adicionaron 25 g de Celite 545, 25 ml de agua y 250 ml de cloroformo. Se aseguró el tapón y se agitó mecánicamente durante 30 min. Posteriormente, se decantó la solución pasándola por un papel filtro estriado. Se colectaron los primeros 50 ml del filtrado y se almacenaron en un frasco de color ámbar a 4 °C hasta su análisis.

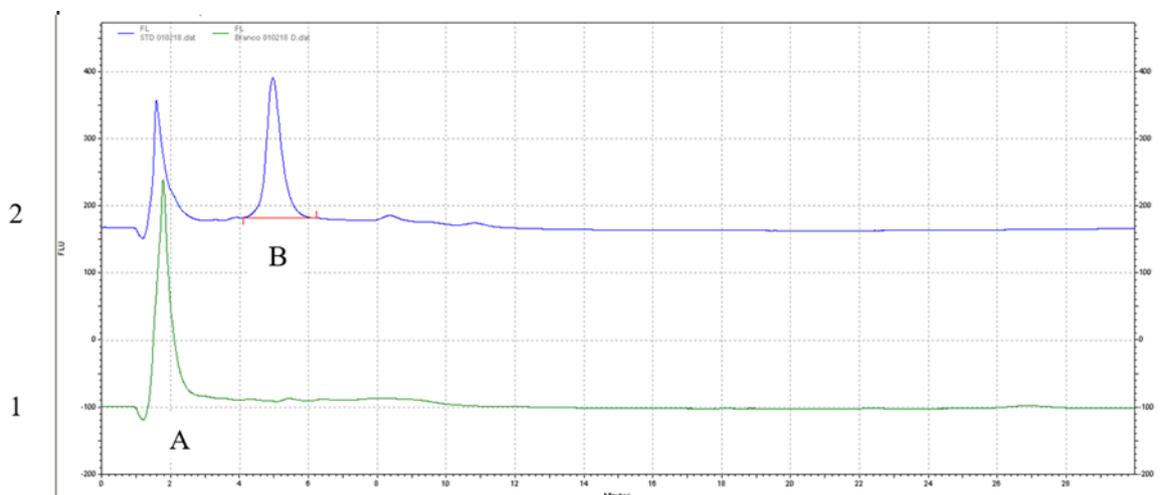
Para la purificación, se rellenó el fondo de una columna cromatográfica con lana de vidrio, se adicionaron 5 g de sulfato de sodio anhidro (J.T. Baker) y una cantidad suficiente de cloroformo hasta la mitad de la columna. Seguidamente se adicionaron 10 g de sílica gel (J.T. Baker) disuelta en cloroformo deslizándola sobre las paredes de la columna. Se lavaron las paredes de la columna con 20 ml de cloroformo dejando drenar, cuando quedaron entre 5 a 7 cm de cloroformo por encima de la sílica, se adicionaron 15 g de sulfato de sodio anhidro dejando entre 1 a 2 cm de cloroformo por encima del tope del sulfato, se drenó el cloroformo hasta el tope del sulfato, se adicionó la muestra y se drenó hasta que llegó al tope de la columna. Se lavó la misma con 150 ml de hexano y 150 ml de éter dietílico, ambos lavados se descartaron y se eluyeron las aflatoxinas con 150 ml de una mezcla de cloroformo: metanol (97:3 v/v). El eluato cloroformo:metanol se rotoevaporó a casi sequedad bajo presión reducida a una temperatura de 30 °C. El residuo obtenido se transfirió a un vial recuperándolo con 500 a 1000 µl de cloroformo y se evaporó a sequedad bajo nitrógeno. Al residuo seco se le adicionaron 200 µl de hexano y se agitó con el vortex (ZX4 Advanced IR Vortex Mixer- VELP Scientifica) por 1 min. Posteriormente, se agregaron 50 µl de ácido trifluoroacético, se tapó y se mezcló con el vortex por 1 min y se colocó en baño María a 40 °C por 30 min. Una vez transcurrido este lapso se evaporó bajo nitrógeno. El residuo se resuspendió en 500 µl de la fase móvil (200 ml de metanol, 200 ml de acetonitrilo y 600 ml de agua; filtrada y desgasificada) antes de someterlo a la cromatografía. Para derivatizar el estándar se tomaron 50 µl de la concentración conocida del estándar, se llevó a sequedad bajo nitrógeno y se procedió de la misma forma anteriormente descrita. Se empleó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución Merck-Hitachi con detector de fluorescencia LaCrom-7480 (longitud de excitación y emisión de 350 nm y 450 nm respectivamente) y una columna de fase reversa C₁₈ Lichrocart 100 (5µm 250 x 0.4 cm). El flujo fue de 1 ml/min. Primero se aplicó fase móvil seguida del estándar para comprobar los tiempos de retención. Posteriormente, se aplicaron 50 µl del eluato de las muestras.

Los cromatogramas se registraron usando una interfase Perkin Elmer NCI 900 y procesados con el software TOTALCHROM versión 6.2. La validación del método se realizó bajo las directrices del Centro Nacional de Metrología⁽²⁷⁾. A partir de la solución de trabajo se preparó una curva patrón con concentraciones conocidas de 0.1, 0.25, 0.5 y 1 µg/ml; con el fin de establecer la linealidad, límite de detección, límite de cuantificación y exactitud del método.

Los resultados fueron los siguientes, en la Figura 1 se presenta el perfil cromatográfico de la AFB₁ cuando el estándar es derivatizado con ácido trifluoroacético. El tiempo de retención fue de 5.21 ± 0.10 min. La curva de calibración ($y=312869.71x+218056.30$) mostró una linealidad significativa ($P<0.05$) en un intervalo de 0.10-1 µg/ml con un coeficiente de regresión de 0.99. Los límites de detección y cuantificación fueron 0.241 y 0.43 µg/kg respectivamente. El recobrado fue de 87 %. Los resultados obtenidos fueron satisfactorios según los criterios propuestos en la Guía de Laboratorio para la Validación de Métodos⁽²⁷⁾ y muestran que el método fue eficiente para evaluar la

presencia de AFB₁ en los niveles que exige la UE⁽²⁸⁾ y la NOM-188-SSA1-2002⁽²⁴⁾ para 5 y 20 µg/kg respectivamente.

Figura 1: Perfil cromatográfico del estándar de AFB₁ (2.19 µg/ml) derivatizado



En el cromatograma 1 es del blanco de reactivo donde la señal (A) corresponde precisamente al pico del solvente.

En el Cuadro 1 se presenta un resumen del número de muestras de concentrados y ensilados en diferentes intervalos de contenidos de AFB₁, donde se observa que el 38.29 y 31.0 % de las muestras presentaron niveles de AFB₁ superiores al límite máximo permisible establecido por la UE (5 µg/kg) para los concentrados y ensilaje respectivamente⁽²⁸⁾, por otra parte el 29.78 y 10.3 % de las muestras de concentrado y ensilaje respectivamente, sobrepasan el valor establecido en la norma mexicana (NOM-188-SSA1-2002)⁽²⁴⁾.

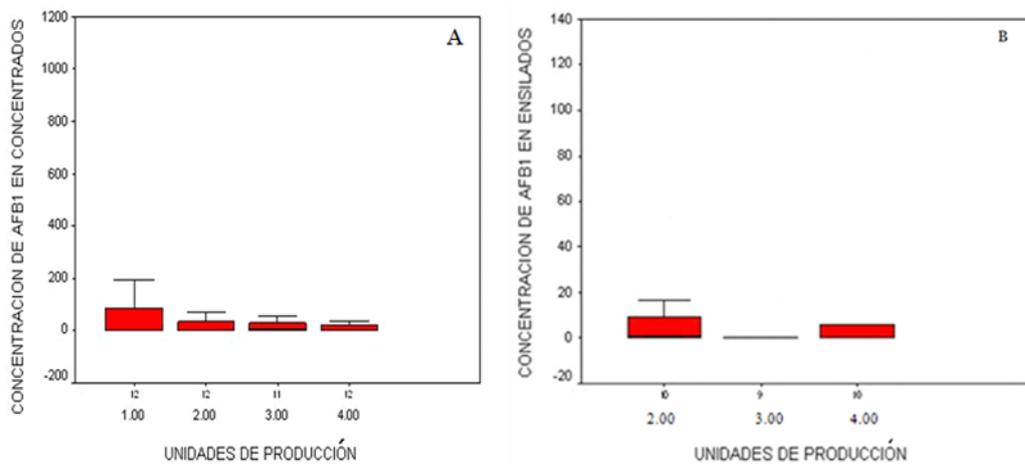
Cuadro 1: Ocurrencia de aflatoxina B₁ en muestras de concentrados y ensilados en cuatro unidades productoras de leche de cabra

Distribución de frecuencia (%)			
Matriz	Concentrado	Ensilado	Total
Muestras analizadas, No.	47	29	76
Muestras positivas que rebasan el LMR establecido por la UE, %	38.3	31	69.3
Muestras positivas que rebasan el LMR establecido por la NOM, %	29.8	10.3	41.1
nd-5 µg/kg	29 (61.7%)	20 (68.9%)	49 (64.4%)
5-20 µg/kg	4 (8.5%)	6 (20.6%)	10 (13.1%)
>20 µg/kg	14 (29.7%)	3 (10.3%)	17 (22.3%)

LMR= límite máximo permitido; UE= Unión Europea; NOM= Norma Oficial Mexicana.

En la Figura 2 se muestran los intervalos de concentraciones de aflatoxina B₁ por unidades para las muestras de concentrados y ensilados, donde el intervalo de concentración osciló entre 0.46-974 µg/kg y 0.44-123.98 µg/kg respectivamente. La unidad 1 para concentrado presentó los mayores valores de aflatoxinas con una mediana de 125 µg/kg, mientras en ensilado la unidad 2 presentó una mediana de 8 µg/kg. El 22.3 % de todas las muestras (concentrados y ensilados) presentaron valores por encima de 20 µg/kg, alcanzando niveles hasta 50 veces por encima del valor permisible, aspecto de gran preocupación por el riesgo que puede presentar en la inocuidad de los productos lácteos⁽²⁹⁾.

Figura 2: Concentraciones de AFB₁ en concentrados (A) y ensilados (B) procedentes de cuatro unidades de producción de leche de cabra en el altiplano mexicano



En la gráfica B, en la Unidad 1 no se proporciona el valor de aflatoxina porque no se oferta este producto.

La presencia de aflatoxinas en maíz en concentraciones altas en orden de miles de µg/kg han sido informada por diversos autores en la región de África⁽³⁰⁾, donde existe un predominio de un clima subtropical y tropical caracterizado por alta temperatura y humedad, que unido a malas prácticas agrícolas y de producción favorece el crecimiento de estas toxinas⁽³¹⁾. Informes en otras regiones como Asia y América Latina⁽³²⁾, también reportan altos valores de aflatoxinas en alimentos, lo que corrobora la problemática global de esta toxina y ha sido alertado por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación (FAO) en diferentes escenarios, donde se prevé que el riesgo de contaminación por aflatoxinas aumentará en el maíz por el efecto del cambio climático⁽³³⁾.

Otro factor que condiciona el nivel y la síntesis de aflatoxinas es el sustrato. De esta manera, alimentos con elevadas concentraciones de hidratos de carbono favorecen la producción de toxinas⁽²⁹⁾. Los hidratos de carbono constituyen la parte más importante de los cereales como el maíz, avena, sorgo y soya, utilizados para la elaboración de los concentrados que se proporcionan como alimento a las cabras, por lo cual, son más susceptibles a la contaminación fúngica y la consiguiente síntesis de aflatoxinas. La presencia de aflatoxina B₁ en ensilados también se ha reportado cuando se presenta un

deterioro aeróbico durante su proceso, lo que favorece el crecimiento de microorganismos patógenos y la producción de endotoxinas y micotoxinas^(34,35). Un estudio realizado en Brasil mostró valores de aflatoxina B₁ en ensilaje de maíz en un rango 0 -100 µg/g en muestra pre y post fermentada⁽³⁶⁾, superior a lo encontrado a este estudio. Otros estudios también reflejan altos conteos de hongos, lo que podría afectar la palatabilidad de los alimentos y reducir la absorción de nutrientes de los animales⁽³⁷⁾; sin embargo, la mayor preocupación está cuando se consumen estos alimentos por animales en lactación y la presencia de productos metabólicos en los productos lácteos, que eventualmente afectarán la salud humana, principalmente la de los bebés.

La presencia de aflatoxina M₁ en leche es debido a la transformación metabólica de la aflatoxina B₁, donde una tasa de contaminación de 13.4 % en los materiales de alimentación, se estiman niveles de AFM₁ entre 0.22 a 3.47 %⁽³⁸⁾. Un estudio realizado en 17 granjas caprinas del noreste de Italia, mostraron una correlación positiva (0.6) entre la presencia de aflatoxina B₁ en el concentrado y la aflatoxina M₁ en leche, donde concentraciones de 5 µg/kg de aflatoxina B₁ en el alimento presentaron una tasa de conversión de aflatoxina M₁ del 0.5 % (25 ng/kg de leche)⁽³⁹⁾. Estos resultados alertan a los organismos reguladores en predecir la presencia de aflatoxina M₁ en la leche en estas unidades, si se considera que la mediana de concentración de AFB₁ en concentrado y ensilado fue mayor de 20 µg/kg en este estudio y considerando una tasa de conversión del 0.5 % se puede encontrar más de 100 ng de aflatoxina por kilo, estando por encima de LMP por la FDA. Por otra parte, se alerta la necesidad de tener un mayor control de los alimentos que se emplean en las granjas pecuarias que permita minimizar el impacto de la micotoxinas en la industria láctea y en la salud pública. Aspecto que ha sido corroborado en varios estudios cuando existe una mejora continua de las técnicas de alimentación en las granjas lecheras⁽⁴⁰⁾.

Existió una alta incidencia y concentración de AFB₁ en las cuatro unidades de producción de leche caprina del APM, encontrándose por arriba de los límites máximos permisibles establecidos. Por lo tanto, es necesario seguir con las investigaciones y desarrollar un programa de detección permanente en dichas unidades para evitar lotes de alimentos contaminados con AFB₁, ya que se debe tener presente que para la industria láctea la ausencia de AFB₁ es muy importante, debido a que cuando un animal ingiere un alimento contaminado con AFB₁, entre el 1 y 3 % de ésta es metabolizada hacia la leche y derivados lácteos en forma de AFM₁, lo que afecta la calidad e inocuidad de la leche y derivados lácteos.

Se reporta por vez primera la presencia de aflatoxina B₁ en ensilado en México, aspecto que se debe seguir profundizando para conocer la presencia de otras micotoxinas que también repercuten en la salud pública como son ocratoxina zearalenona y fumonisinas, que han sido reportadas en países del trópico como Brasil. Por otra parte, debido al incremento de la producción de leche de cabra en México en la última década y la poca información en este tema, se debe potencializar los estudios longitudinales con la

intención de entender la presencia de AFB₁ y AFM₁ en la producción caprina, sumando además otras zonas con gran potencial de producción de leche de cabra.

Literatura citada:

1. FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Sistemas Nacionales de Inocuidad de Alimentos en las Américas y el Caribe: Análisis de la situación actual <http://fao.org/docrep/fao/010/j6410s.pdf> 20/05/08. Consultado 30 Ago, 2017.
2. Trujillo J. Lineamientos para el reconocimiento de las buenas prácticas en producción de leche caprina. (2002). Fuente: http://64.233.187.104/search?q=cache:ILqy5ULsQi8J:www.senasica.sagarpa.gob.mx/web/propuestas_web/221204/inocuidad_agroalimentaria/Lineamientos. Consultado 30 Ago, 2017.
3. Escobar A, Vega S, Gutiérrez R, Coronado M, Díaz G. Aflatoxina M₁ en leche y derivados lácteos. Actualidad y Perspectivas en América Latina. *Carnilac Ind* 2005;20:21-27.
4. Vega S, León J. Residuos tóxicos en alimentos. Conceptos y métodos. 1.^a ed. CDMX, México: UAM-X. 1998.
5. Bolet M, Socarrás M. Micotoxinas y cáncer. *Rev Cubana Invest Bioméd* 2005;24:54-59.
6. Gimeno A, Martínez M. Residuos de Aflatoxina M₁ y otras micotoxinas en leche y derivados, control y recomendaciones <http://www.engormix.com> 20/05/08. 2001. Consultado 14 Jul, 2017.
7. Noa M, Pérez N, Gutiérrez R, Escobar A. Los residuos químicos en la leche: importancia y problemática actual en México y en el mundo. 1.^a ed. México, DF, UAM-X; 2001:192.
8. Esqueda M, Higuera I, Nieblas J. Aflatoxina M₁ en leche comercializada en Hermosillo, Sonora, México. *Rev Mex Mic* 1995;11:179-183.
9. Helferich W. Aflatoxin in food producing animals: metabolism and transmission. *Dissertation Abstr Internat* 1984;44:3583-3605.
10. Mashaly R, El-Deeb S, El-Nouty F, Hassan G, Salem M. Effect of feeding aflatoxins to Egyptian Baladi goats on milk yield, composition and physical properties. *Egypt J Dairy Sci* 1984;12:135-144.
11. Acosta A, Escobar A, Margolles E, Mella C. Dinámica de excreción de aflatoxina M₁ en leche de cabras. *Rev Salud Anim* 1989;11:208-211.

12. Bento H, Fernandes A, Barbosa M. Detection of aflatoxin M₁ in goat milk [abstract]. XXIII International Dairy Congress. Montreal. Quebec. 1990:26.
13. Barrios M, Gualda M, Cabanas J, Medina LM, Jordano R. Occurrence of aflatoxin M₁ in cheeses from the south of Spain. *J Food Protect* 1996;59:898-900.
14. Finoli C, Vecchio A. Aflatoxin M₁ in goat dairy products. *Mic Aliment Nut* 1997;15:47-52.
15. Minervini F, Visconti A, Bottalico A, Montagna M. On the occurrence of aflatoxin M₁ in cheeses in some southern Italian areas. *Ind Aliment-Italy* 2001;40:513-516.
16. Battacone G, Nudda A, Palomba M, Pulina G. Carry over of aflatoxin from feed to ovine milk and curd. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia* 2002;53:283-293.
17. Viridis S, Corgiolu G, Scarano C, Pilo A, De Santis E. Occurrence of aflatoxin M₁ in tank bulk goat milk and ripened goat cheese. *Food Control* 2008;19:44-49.
18. Oliveira C, Ferraz J. Occurrence of aflatoxin M₁ in pasteurised, UHT milk and milk powder from goat origin. *Food Control* 2007;18:375-378.
19. Bingol N, Tanritanir P, Dede S, Ceylan E. Influence of aflatoxin present in forages and concentrated feedingstuffs on milk and some serum biochemical parameters in goats. *B Vet I Pulawy* 2007;51:65-69.
20. Ozdemir M. Determination of aflatoxin M₁ levels in goat milk consumed in Kils province. *Ankara Univ. Vet. Fak.* 2007;54:99-103.
21. Anyango G, Mutua F, Kagera I, Andang`O P, Grace D, Lindahl J. A survey of aflatoxin M₁ contamination in raw milk produced in urban and peri-urban areas of Kisumu County, Kenya. *Infect Ecol Epidemiol* 2018;8:1-10.
22. Kilonzo R, Imungi J, Muiiru W, Lamuka P, Kamau Njage P. Household dietary exposure to aflatoxins from maize and maize products in Kenya. *Food Addit Contam* 2014;31:2055-2062.
23. Bingol N, Tanritanir P, Dede S, Ceylan E. Influence of aflatoxin present in forages and concentrated feedingstuffs on milk and some serum biochemical parameters in goats. *B Vet I Pulawy* 2007;51:65-69.
24. NOM-188-SSA1-2002. Norma Oficial Mexicana. Productos y Servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones sanitarias. Secretaría de Salud. Diario Oficial de la Federación. 14 de junio de 2000.
25. AOAC. Official methods of analysis. 15th ed. Arlington, VA, USA: Association of Official Analytical Chemists. 1995.

26. ISO. International Organization for Standardization. Animal feeding stuffs-determination of aflatoxin B₁ content of mixed feeding stuffs-method using high-performance liquid chromatography. ISO. 14718:1998.
27. CENAM. CNM-MRD-PT-030. Métodos analíticos adecuados a su propósito. Guía de Laboratorio para la Validación de Métodos y Temas Relacionados. Centro Nacional de Metrología. Publicación Técnica. Los Cués, Querétaro., México. 2005.
28. UE. Commission Directive 2003/100/EC. Amending Annex I to Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council on undesirable substances in animal feed. European Union. Official Journal of the European Union. Brussels. 2003.
29. Moss M. Risk assessment for aflatoxins in foodstuffs. *Int Biodeter Biodegr* 2002;50:137-142.
30. Misihairabgwi JM, Ezekiel CN, Sulyok M, Shephard GS, Krska R. Mycotoxin contamination of foods in Southern Africa: A 10-year review (2007–2016). *Critical Rev Food Sci Nutr* 2017;1-16.
31. Matumba L, Van Poucke C, Njumbe Ediage E, De Saeger, S. Keeping mycotoxins away from the food: Does the existence of regulations have any impact in Africa. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2014;57(8):1584-1592.
32. Bhat R, Rai V, Karim A. Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2009;9:57-81.
33. EFSA. Modelización, predicción y cartografía de la aparición de aflatoxinas en los cereales en la UE debido al cambio climático. Informe científico presentado por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. 2012. Fuente: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/sp.efsa.2012.EN-223>. Consultado 20 ago, 2017.
34. Pahlow G, Muck R, Driehuis F, Oude Elferink S, Spoelstra S. Microbiology of ensiling. *Silage science and technology (Agronomy Series No. 42)*. Buxton DR, *et al* editors. Am Soc Agron. Madison, WI. 2003.
35. Ferrero FS, Prencipe D, Spadaro ML, Gullino L, Cavallarin S, Piano E, Tabacco BG. Increase in aflatoxins due to *Aspergillus* section *Flavi* multiplication during the aerobic deterioration of corn silage treated with different bacteria inocula. *J Dairy Sci* 2019;102(2):1176-1193.
36. Keller M, Pereyra M, Keller K, Alonso V, Oliveira A, Almeida T, *et al*. Fungal and mycotoxins contamination in corn silage: Monitoring risk before and after fermentation. *J Stored Prod Res* 2013;52:42–47.

37. Alonso A, Pereyra C, Keller L, Dalcero A, Rosa C, Chiacchiera S, Cavaglier L. Fungi and mycotoxins in silage: an overview. *J Appl Microbiol* 2013;115(3):637-643.
38. Dimitrieska-Stojković, E, Stojanovska-Dimzoska, B, Ilievska, G, Uzunov, R, Stojković G, Hajrulai-Musliu Z, *et al.* Assessment of aflatoxin contamination in raw milk and feed in Macedonia during 2013. *Food Control* 2016;59:201-206.
39. Sacca E, Boscolo D, Vallati A, Ventura W, Bigarand F, Piasentiera E. Aflatoxin occurrence in milk and supplied concentrates of goat farms of north-eastern Italy. *J Sci Food Agric* 2009;89(3):487-493.
40. Cammilleri G, Graci S, Collura R, Buscemi MD, Vella A, Macaluso A, *et al.* Aflatoxin M₁ in cow, sheep, and donkey milk produced in Sicily, Southern Italy. *Mycotoxin Res* 2019;35(1):47-53.