

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE AGRONOMIA

**ALTERNATIVA TECNICA PARA LA REDUCCION DE LA PRESENCIA DE
AFLATOXINA M1 EN LECHE**

por

María Eugenia BENTANCOR CAMEJO

María Antonella HUGO BELSTERLI

**TESIS presentada como uno de
los requisitos para obtener el
título de Ingeniero Agrónomo**

MONTEVIDEO

URUGUAY

2012

Tesis aprobada por:

Director: _____

Ing. Agr. MSc. Yamandu M. Acosta

Ing. Agr. MSc. Ana Bianco

Ing. Agr. MSc. PhD. Laura Astigarraga

Fecha: 19 de octubre de 2012

Autores: _____

María Eugenia Bentancor Camejo

María Antonella Hugo Belsterli

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar esta etapa de nuestras vidas, queremos decir que no hubiésemos logrado llegar hasta acá sin la motivación y colaboración de ciertas personas que nos ayudaron para que esta meta llegue a su fin. Por ello es un verdadero placer utilizar este espacio para dedicarles este trabajo a todos ellos.

En primer lugar queremos agradecer a Yamandú Acosta, nuestro tutor, por su dedicación y constante apoyo.

A Marcelo Plá, a Esteban y Tomas López, a Alejandro Mendoza, a Juan Mieres, a los funcionarios de los laboratorio de leche, Nutrición, y a los de Biblioteca de INIA Estanzuela. A todos ellos muchas gracias por hacer que esta tesis saliera adelante.

También queremos agradecer a la familia Gómez Zabala que desde un principio nos abrieron las puertas de su hogar y fue nuestra segunda familia en Montevideo.

A mis padres Danilo y Luján, y mi hermano Mauricio por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, por su esfuerzo y dedicación para darme una formación académica y sobre todo humanista y espiritual. De ellos es este triunfo y para ellos es todo mi agradecimiento.

A mi tía Liliana, mi segunda mamá, por estar siempre. Agradezco a mis tíos Daoiz y Alejandra y a María Isabel por abrirme las puertas de sus casas. A mis amigos de la vida y a los que la facultad me regaló ya que sin duda han sido muy importantes en esta etapa de mi vida.

(Ma. Eugenia)

Agradezco a Dios por haberme dado los dos pilares que tengo en mi vida, mis padres Yanela y Leonel que sin escatimar esfuerzo alguno , por la confianza e inspiración depositada; han sacrificado gran parte de sus vidas para formarme, educarme y guiarme en este camino. Ofreciéndome esta gran oportunidad de crecer en lo personal como en lo profesional. A mis hermanos Eugenia, Florencia y Martin por el apoyo incondicional y porque siempre han estado para aconsejarme.

También quiero agradecer a “mi familia adoptiva” Tío Alberto, Tía Cristina y Mariana, ya que sin ellos tampoco hubiese llegado hasta acá, estando en todas las etapas de este proceso. A mis abuelos Carlos y Olga, y tíos, que sin su apoyo y colaboración, también habría sido difícil llevar a cabo esta meta. Y a mis amigos/as de la vida y de facultad,

porque he conocido a excelentes personas en este camino y junto a ellos he crecido, he aprendido y he compartido un montón de cosas, siendo una huella imborrable.

(Antonella).

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	IX
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	2
2.1. <u>BIOLOGIA DE HONGOS</u>	2
2.1.1. <u>Aspectos generales de los hongos</u>	2
2.2. <u>CARACTERIZACION DE LA PROBLEMÁTICA DE LAS MICOTOXINAS</u>	2
2.2.1. <u>Generalidades de las micotoxinas</u>	4
2.2.2. <u>Factores que predisponen la producción de micotoxinas</u>	4
2.2.3. <u>Micotoxinas en alimentos</u>	6
2.2.4. <u>Factores de manejo que afectan la presencia de micotoxina</u>	7
2.2.5. <u>Clasificación de las micotoxinas</u>	8
2.2.6. <u>Principales grupos de micotoxinas</u>	8
2.2.7. <u>Detoxificación ruminal de micotoxinas</u>	9
	9

2.3. AFLATOXINAS.....	11
2.3.1. <u>Generalidades de las aflatoxinas</u>	11
2.3.2. <u>Caracterización química de aflatoxina</u>	13
2.3.3. <u>Caracterización de la aflatoxina M1</u>	13
2.3.4. <u>Aparición de aflatoxina M1 en leche</u>	14
2.4. EFECTOS DE LAS AFLATOXINAS.....	16
2.4.1. <u>Efectos de las aflatoxinas en la salud humana</u>	16
2.4.2. <u>Efectos de la aflatoxina en los animales</u>	17
2.4.3. <u>Efecto de la aflatoxina en el sistema inmunológico</u>	18
2.4.4. <u>Efectos de las aflatoxinas sobre las membranas</u> <u>celulares y el metabolismo energético</u>	19
2.4.5. <u>Efecto en la síntesis de biomoléculas</u>	20
2.4.6. <u>Efecto sobre consumo</u>	20
2.4.7. <u>Efecto de aflatoxina sobre la producción de leche</u>	21
2.4.8. <u>Efecto de la aflatoxina en la actividad reproductiva</u>	21
2.5. MANEJOS PARA EVITAR LA PRESENCIA DE AFLATOXINAS....	22
2.5.1. <u>Utilización de adsorbentes</u>	22
2.5.1.1. Adsorbentes inorgánicos.....	22
2.5.1.2. Adsorbentes orgánicos.....	23
2.5.1.3. Agentes biotransformadores de micotoxinas.....	25

2.5.2. <u>Ejemplos del uso de adsorbentes</u>	25
3. <u>MATERIALES Y METODOS</u>	27
3.1. LOCALIZACION Y DURACION.....	27
3.2. SELECCIÓN DE ANIMALES.....	27
3.3. TRATAMIENTOS.....	28
3.4. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	28
3.5. ALIMENTOS.....	29
3.6. MANEJO.....	29
3.7. DETERMINACIONES.....	30
3.7.1. <u>En los alimentos</u>	30
3.7.2. <u>En los animales</u>	31
3.7.2.1. Producción de leche.....	31
3.7.2.2. Componentes de la leche.....	31
3.7.2.3. Contenido de aflatoxina en leche.....	32
4. <u>RESULTADOS Y DISCUSION</u>	33
4.1. DESCRIPCION DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES.....	33
4.1.1. <u>Dieta ofrecida</u>	33
4.1.1.1 Perfil nutricional.....	34
4.1.2. <u>Dieta consumida</u>	35

4.2. RESULTADOS DE PRODUCCION.....	36
4.2.1. <u>AFB1 total en alimentos y presencia de AFM1 en leche</u>	43
5. <u>CONCLUSIONES</u>	45
6. <u>RESUMEN</u>	46
7. <u>SUMMARY</u>	47
8. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	48
9. <u>ANEXOS</u>	57

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.		Página
1.	Micotoxinas más comunes y fuentes de las mismas.....	9
2.	Bioconversión de Micotoxinas en rumen.....	10
3.	Condiciones propicias de producción de micotoxinas por diferentes hongos.....	12
4.	Dieta media teórica ofrecida.....	33
5.	Dieta semanal ofrecida real.....	34
6.	Perfil nutricional ofrecido teórico.....	34
7.	Perfil nutricional ofrecido real.....	35
8.	Medias de consumo en los distintos tratamientos.....	35
9.	Producción y composición de la leche según tratamiento.....	37
10.	Eficiencia de utilización de los nutrientes para producir un litro de leche según tratamiento.....	39
11.	Aflatoxina presente en alimentos y en leche.....	43

Figura No.

1. Fases de crecimiento fúngico y localización de la síntesis de micotoxinas.....	4
2. Transformación de aflatoxina B1 en M1.....	13
3. Biotransformación de aflatoxinas.....	17
4. Estructura básica de los silicatos.....	23
5. Producción de leche según tratamientos.....	40
6. Leche corregida por energía según tratamientos.....	40
7. Porcentaje de proteína según tratamientos.....	41
8. Porcentaje de grasa según tratamientos.....	41
9. Recuento de células somáticas en leche según tratamientos.....	42
10. Aflatoxina M1 en leche según tratamientos.....	42

1. INTRODUCCIÓN

El proceso de intensificación de la producción lechera del país tiene una base muy importante en el manejo de los alimentos y de la alimentación del ganado en producción. La participación creciente de alimentos conservados suministrados por el productor en detrimento de los cosechados directamente por el animal llevará a que algunos factores antinutricionales como las micotoxinas pasen de ser problemas coyunturales a limitantes productivas estructurales, para las que debemos diseñar estrategias específicas y permanentes para su mitigación y control. Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos con capacidad de causar efectos indeseables en humanos y animales. La exposición a éstas proviene generalmente de la ingestión de alimentos contaminados, pero también ocurre por inhalación y/o por contacto directo con la fuente de contaminación. Los efectos biológicos más típicos incluyen la intoxicación renal y/o hepática, afecciones al sistema nervioso central, efectos estrogénicos, inmuno supresión, cáncer, etc.

Típicamente a éstas micotoxinas se las clasifica como de “hongos del campo”, mayoritariamente causadas por hongos del género *Fusarium*, o causadas por “hongos de almacenaje”, mayoritariamente hongos del género *Aspergillus*.

Las aflatoxinas son un grupo de micotoxinas, particularmente potentes, extremadamente tóxicas, con propiedades mutagénicas y carcinogénicas, producidas principalmente por *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*. Tienen la particularidad de mantener su presencia y actividad en la cadena alimenticia, encontrándose en concentraciones variables en tejidos y leche de animales alimentados con materiales contaminados. Entre los diferentes grupos de aflatoxinas la B1 es la más dañina y suele aparecer como aflatoxina M1 en leche. La aflatoxina M1 suele ser el 1,7% (rango 0, a 2,0%) de la ingesta de aflatoxina en la materia seca de la vaca lechera en cuestión. Los niveles máximos de aparición de aflatoxina en leche se dan entre 3 y 5 días luego de comenzada la ingesta de alimento contaminado, y bajan a los niveles iniciales en 3 a 4 días de removido el alimento contaminado de la dieta.

El presente trabajo tiene por objetivo determinar la eficacia del secuestrante Mycosorb y de un secuestrante mezcla a base de Mycosorb y un aluminio silicato; Biotox, para reducir las concentraciones de aflatoxina M1 en leche en vacas lecheras alimentadas con dietas experimentalmente contaminadas con aflatoxinas.

2. REVISION BIBLIOGRÁFICA

2.1. BIOLOGIA DE HONGOS

2.1.1. Aspectos generales de los hongos

Los hongos son pequeños organismos, generalmente microscópicos, eucariotas, usualmente filamentosos, ramificados, que carecen de clorofila (Agrios, 2005).

La mayoría de las más de cien mil especies de hongos conocidas son estrictamente saprofitas, es decir que viven de materia orgánica muerta. Algunas, alrededor de 50 especies causan daño en el humano. Sin embargo más de 10000 especies de hongos pueden causar enfermedades de plantas. Todas las plantas son atacadas por algún tipo de hongo y cada uno de los hongos parásitos puede atacar a uno o varios tipos de plantas. Algunos hongos son conocidos como parásitos obligados o biótrofos, pueden crecer o multiplicarse solo en asociación con su planta huésped. Otros son conocidos como parásitos no obligados, los cuales requieren de una planta huésped en cierto momento de su ciclo de vida, también pueden completarlo en la materia orgánica muerta, o bien pueden crecer y multiplicarse en ésta, así como en plantas vivas. Los hongos que no son parásitos obligados pueden ser saprofitos facultativos o parásitos facultativos en función de si son principalmente parásitos o saprofitos (Agrios, 2005).

La mayoría de los hongos tienen un cuerpo vegetativo filamentoso llamado micelio. Este se ramifica en todas direcciones, las ramas individuales del micelio son llamadas hifas y son generalmente uniformes, de espesor por lo general de 2 a 10 micrómetros de diámetros. En algunos hongos el micelio se compone de muchas células que contienen uno o dos núcleos por célula. En otros, el micelio contiene muchos núcleos, los que pueden o no estar divididos por paredes transversales (septos) (Agrios, 2005).

Los hongos se reproducen por medio de esporas. Las esporas son estructuras reproductivas especializadas para la propagación del hongo, que constan de una o varias células. Estas estructuras pueden formarse asexualmente (mediante la producción de las esporas por el micelio del hongo, sin intervención de cariogamia o meiosis), o ser el resultado de un proceso sexual. En la mayoría de los hongos los gametos masculinos y femeninos se forman en un mismo micelio (como es el caso de los hongos hermafroditas). Cuando los gametos masculinos fecundan a los femeninos de los mismos micelios al hongo se los denomina homotálico. Sin embargo en la mayoría de los casos, los gametos masculinos fecundan únicamente a los gametos femeninos de otro

micelio sexualmente compatible por lo que se dice que el hongo es heterotálico (Agrios, 2005).

Casi todos los hongos fitopatógenos pasan parte de su vida en sus plantas hospederas y parte en la materia orgánica del suelo. Algunos hongos son estrictamente biótros, es decir que pasan toda su vida en el hospedero. Las esporas pueden alcanzar el suelo, donde mueren o quedan inactivas hasta que de nuevo llegan a un hospedero en el cual crecen y se multiplican. Otro grupo llamado hemibiótros deben pasar parte de su vida como parásitos en las plantas y parte en los tejidos muertos de las mismas, con el fin de completar su ciclo de vida en la naturaleza. Estos permanecen continuamente asociados con los tejidos del huésped ya sea vivo o muerto. Un tercer grupo de hongos son saprofitos facultativos debido a que crecen como parásitos en los hospederos pero siguen viviendo y multiplicándose sobre tejidos muertos del huésped. El material vegetal muerto que colonizan no necesariamente debe estar relacionado con el hospedero que pueden parasitar. Estos hongos suelen ser los patógenos del suelo que tienen un amplio rango de hospederos, y pueden sobrevivir en el suelo por muchos años en ausencia de estos. Algunos hongos son parásitos facultativos ya que pueden vivir perfectamente en el suelo o en otros lugares como saprofitos, pero si llegan a entrar en contacto con un órgano de la planta bajo las condiciones adecuadas, tienen la facultad de parasitar y causar la enfermedad en la misma. La supervivencia y el rendimiento de la mayoría de los patógenos de plantas dependen en gran medida de las condiciones prevalecientes de temperatura y humedad o la presencia de agua en su entorno. El micelio libre solo sobrevive dentro de cierto rango de temperatura (-5 a 45 °C) y en contacto con superficies húmedas, dentro o fuera del huésped. Sin embargo la mayoría de los tipos de esporas pueden soportar un amplio rango de temperaturas y humedad (Agrios, 2005).

La gran mayoría de los hongos fitopatógenos dependen para su diseminación de agentes como el viento, agua, pájaros, insectos, otros animales, y seres humanos (Agrios, 2005).

Para su rápida identificación se utiliza con frecuencia la forma, tamaño, color y disposición de esporas en los cuerpos fructíferos, siendo estas características suficientes para sugerir una cierta experiencia en la taxonomía de los hongos, definiendo así la clase, orden, familia y género al que pertenece (Agrios, 2005).

La distancia a la que las esporas pueden ser difundidas varía con el agente de difusión. El viento es probablemente el agente más importante de difusión de la mayoría de las esporas y estas pueden llegar a grandes distancias (Agrios, 2005).

Los hongos utilizan para su crecimiento una serie de sustancias químicas denominadas metabolitos primarios, como pueden ser ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos y lípidos mayoritariamente. El uso de estos metabolitos primarios se asocia con la fase de rápido crecimiento según lo menciona (Soriano del Castillo, 2007).

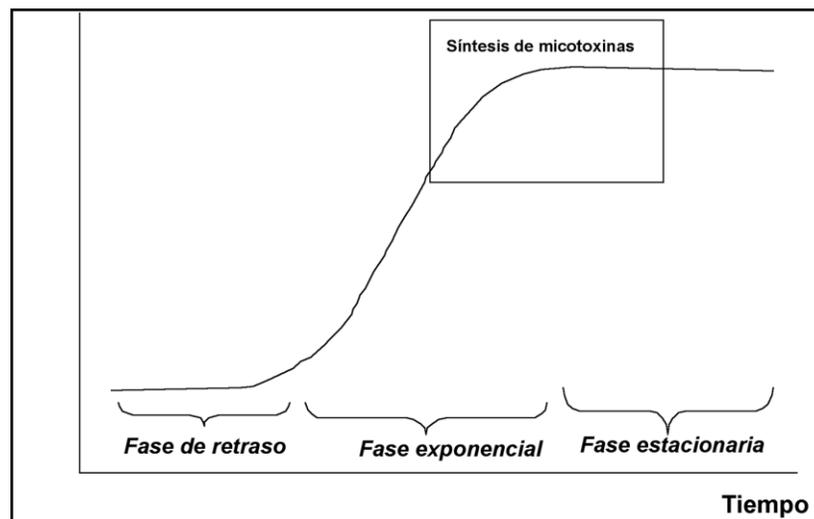
Los metabolitos secundarios son una serie de compuestos que no son esenciales para el crecimiento vegetativo en cultivo puro. Dentro de este grupo, tenemos a los antibióticos y a las micotoxinas. Las micotoxinas se suelen formar al final de la fase exponencial o al principio de la fase estacionaria del crecimiento del moho (Soriano del Castillo, 2007).

2.2. CARACTERIZACION DE LA PROBLEMÁTICA DE LAS MICOTOXINAS

2.2.1. Generalidades de las micotoxinas

Las micotoxinas son metabolitos tóxicos, biológicamente diversos, secundarios y fungoideos producidos por diversas fungosidades, en particular por especies de *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*. Estas son sustancias altamente indeseables que no deberían estar presentes y lo ideal sería una tolerancia cero en los alimentos (Díaz, 2005).

Figura No. 1: Fases de crecimiento fúngico y localización de la síntesis de micotoxinas.



Fuente: Soriano del Castillo (2007)

Las micotoxinas pueden estar presentes en el cultivo, en el transporte o almacenaje y presentan diverso grado de toxicidad para los animales que la ingieren. Suelen aparecer en productos tan diversos como granos, subproductos de molinería, de extracción de aceite, así como en reservas forrajeras como henos y ensilajes. Las fungosidades producen micotoxinas bajo condiciones de estrés como son los cambios de temperatura, humedad o aireación y en presencia de agentes agresivos (Acosta et al., s.f.).

Las micotoxinas pueden aumentar la incidencia de enfermedades y puede reducir la eficiencia de producción en el ganado. Estas ejercen sus efectos a través de tres mecanismos primarios:

- 1)- La alteración en contenido de nutrientes, la absorción y el metabolismo.
- 2)- Los cambios en el funcionamiento del sistema endocrino y neuroendocrino.
- 3)- La supresión del sistema inmunológico (Cast, 2003).

Dependiendo de la eficiencia de la absorción gastrointestinal y metabolismo hepático, las micotoxinas y sus metabolitos son preferentemente excretados por el camino de la orina y las heces.

La contaminación con micotoxinas pueden ser más probable en ciertas fases de producción y de manejo, pero la contaminación es raramente asociada con una sola micotoxina, debido a que la misma fungosidad puede producir varias micotoxinas y varias fungosidades pueden producir la misma micotoxina. Es difícil correlacionar micotoxinas por la presencia de mohos en los alimentos, ya que la presencia de estos directamente no indica la producción de micotoxinas, pero si las condiciones son las adecuadas hay un potencial para la producción de las mismas. La ausencia de mohos no garantiza la ausencia de micotoxinas debido a que la toxina puede estar presente bastante después de la muerte de este (De María et al., 2008).

En las dietas generalmente la multiplicidad de ingredientes puede aumentar la probabilidad de contaminación por micotoxinas pero se puede disminuir el riesgo de concentraciones altas debido a que el ingrediente es diluido en la alimentación final (De María et al., 2008).

Los alimentos conservados tienen mayor probabilidad de hospedar mohos y toxinas que los forrajes secos, cuando las condiciones anaerobias no están estrictamente controladas (De María et al., 2008).

Las micotoxinas tienen un impacto económico y comercial significativo en el mundo. Cada año se estima que el 25% de las cosechas están infectadas por algún tipo de micotoxinas (Cast, 1989). De esta forma, los cereales cobran una atención prioritaria por la incidencia de su contaminación, así como por su elevado consumo por animales y el hombre (Denli y Perez, 2006).

2.2.2. Factores que predisponen la producción de micotoxinas

Existen factores que influyen en la capacidad toxigénica; el tipo y cantidad de sustancias producidas no solo depende de las características de la cepa individual, sino también de las condiciones medioambientales (nutrientes, parámetros físico-químicos, etc.) Las condiciones de crecimiento que permiten la toxigénesis son más limitadas que aquellas que posibilitan el crecimiento del hongo. Entre los factores que conducen a la presencia de micotoxinas en los alimentos hay dos categorías principales, los factores intrínsecos que dependen de la cepa fúngica y los factores extrínsecos que dependen de las condiciones medioambientales.

Los factores intrínsecos influyen en la producción de una determinada micotoxina, la cual no está asociada con una especie en particular sino con una cepa en concreto.

Los parámetros que afectan al nivel de residuos de micotoxinas en animales son:

- 1-Especies y raza de los animales.
- 2- Concentración de micotoxina, cantidad y duración del consumo de alimento contaminado.
- 3- Estado de salud del animal.
- 4- Periodo que transcurre desde la retirada del alimento contaminado a la toma de muestras para el análisis de residuos.

Por otra parte los factores extrínsecos son:

1-La actividad agua (a_w), la cual influye considerablemente en la producción de toxinas, particularmente en los productos poco hidratados. La toxicogénesis tiene lugar únicamente para una (a_w) ligeramente superior que la (a_w) límite para el crecimiento.

2-El descenso de la presión parcial de oxígeno y especialmente el incremento del nivel de CO₂ conducen a una marcada reducción de la toxicogénesis.

3-Composición química del sustrato y el pH. La toxicogénesis, al menos para la mayoría de las micotoxinas conocidas, es más dependiente de la composición química del sustrato que el crecimiento fúngico.

4-La temperatura óptima para la toxicogénesis, se define como la temperatura a la cual el ritmo de producción de toxinas es máximo. Esta temperatura es, la mayoría de las veces, ligeramente más baja que la óptima para el crecimiento del hongo. Además el rango de la temperatura que permite una toxicogénesis significativa, es más estrecho que la que permite el crecimiento del hongo.

5-Las zonas de microflora, estas son pequeñas zonas del alimento con alto contenido en humedad.

6-Integridad física del grano o del alimento (insectos, roedores y pájaros).

Las micotoxinas que afectan negativamente a la salud del hombre y de los animales se encuentran principalmente en los granos de cereales y forrajes recolectados. Estas toxinas son producidas por hongos saprofitos durante el almacenaje, o por hongos endofitos durante el crecimiento de la planta (De Luca, s.f.).

2.2.3. Micotoxinas en alimentos

El avance significativo de los sistemas animales intensivos de producción es la causa y la consecuencia del incremento en la producción de granos. Las condiciones de almacenamiento son determinadas por la interacción entre el grano, el macro y micro ambiente y una cantidad variada de organismos incluyendo los microorganismos, los insectos, los roedores y las aves. El grano provee una fuente abundante de nutrientes. El crecimiento de moho puede afectar negativamente los componentes nutritivos del grano y también pueden resultar en metabolitos secundarios que son altamente tóxicos para animales, humanos y las plantas (De María et al., 2008).

La aparición de micotoxinas en la leche comercialmente disponible y los productos lácteos es uno de los problemas más graves de higiene de los alimentos ya que la leche es una fuente importante de nutrientes para seres humanos. Esto es especialmente significativo para lactantes y niños que son potencialmente más sensibles y tienen menos variabilidad en su dieta (De María et al., 2008).

Debido al riesgo de aflatoxicosis en humanos, el rango promedio máximo seguro es mantener un nivel de 20 ppb de aflatoxina en la dieta total del ganado productor de leche (Basurto Kuba, s.f.).

2.2.4. Factores de manejo que afectan la presencia de micotoxina

Se ha demostrado que hay tres factores agronómicos que afectan de manera significativa la presencia y concentración de micotoxinas:

1-Presencia y rotación de cultivo: El monocultivo o la siembra de cultivos muy similares uno tras otro, aumentara el riesgo de formación de micotoxinas, pues las esporas se transfieren al siguiente cultivo y permitirán que se establezca el desarrollo de hongos más rápido.

2-Laboreo del suelo: La incorporación del rastrojo al suelo por medio del arado, reduce la contaminación por esporas para la siguiente siembra y por lo tanto reduce la infestación fúngica y la formación de micotoxinas. Los sistemas de siembra directa aumentan el riesgo.

3-Cultivo y variedades: Hay variedades de cultivos que son más resistentes a enfermedades foliares a hongos reduciendo la infección fúngica y por ende la formación de micotoxinas en el cultivo.

Por otra parte en la realización de las reservas se debe tener en cuenta evitar la permanencia del cultivo en el campo después de los niveles fisiológicos, asegurar la ruptura de granos durante la confección para lograr una buena fermentación, realizar los cortes a la longitud correcta para mejorar la compactación, planificar el llenado lo más rápido posible en caso de silo trinchera, compactar en forma adecuada y reparar cualquier hueco en las bolsas tan pronto sea posible. También es conveniente considerar el uso de inoculantes en el ensilaje para aumentar la fermentación mejorando la calidad y la vida útil del almacenamiento (De María et al., 2008).

2.2.5. Clasificación de las micotoxinas

Muchos Investigadores han dividido especies fungoideas en dos grupos: las de campo y las de almacenamiento. Las primeras mencionadas son las que invaden la semilla mientras el cultivo aun se encuentra en el campo y requieren condiciones altas de humedad (20-21%). Estos incluyen especies de *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Diplodia*, *Gibberella* y *Helminthosporium*.

Por otra parte las fungosidades de almacenamiento son esas que invaden granos o las semillas durante el almacenamiento, necesitan menos humedad que las de campo (13-18%). Estas fungosidades incluyen especies de *Aspergillus* y *Penicillium*.

En el campo los niveles de temperatura y humedad son factores determinantes para el crecimiento de los hongos y la subsiguiente producción de micotoxinas, el clima juega un papel clave en el desarrollo de las mismas. Los estudios de las cosechas muestran una gran variabilidad en los niveles de contaminación entre un año y el siguiente, debido a las variaciones climáticas, y el desafío parece ser cada vez mayor a medida que nos enfrentamos a los cambios climáticos (Acosta et al., s.f.).

2.2.6. Principales grupos de micotoxinas

Cuadro No. 1: Micotoxinas más comunes y fuentes de las mismas.

Hongos del Campo	Fusarium sp.	DON (Vomitoxina) Zearalenona (ZEA) Toxina T-2 Fumonisina DAS
Hongos de Almacenamiento	Aspergillus sp.	Aflatoxina (B1, B2, G1, G2) Ocratoxina (OTA) Patulina
	Penicillium sp.	Ocratoxina (OTA) Citrinina Roquefortina Patulina

Fuente: Acosta et al. (s.f.)

2.2.7. Detoxificación ruminal de micotoxinas

Los rumiantes son generalmente más resistentes a la mayoría de las micotoxinas que los animales monogástricos. Este fenómeno se explica por el papel desintoxicante de la población ruminal microbiana (Yiannikoupudis y Jouany, 2002).

Entre otras estrategias, el rumen tiene cierta capacidad natural de detoxificación de micotoxinas, aunque esa capacidad suele depender en forma importante del

“ambiente ruminal” en que ocurra, siendo las variables más importantes pH ruminal y tasa media de pasaje del alimento (Acosta et al., s.f.).

Los protozoarios se consideran como la población microbiana ruminal más importantes en la biodegradación de las micotoxinas. El arranque del proceso de detoxificación en ganado de carne es ocho veces más rápido que en a ganado de leche (Carmona, s.f.).

Generalmente los animales alimentados en forma más intensiva con una mayor ingesta de nutrientes de alta digestibilidad suelen rendir mayores proporciones y mayores cantidades de ácido propiónico y de ácido láctico llevando esto a un rumen más ácido, con menores tasas de crecimiento de algunos grupos bacterianos que son los que preferentemente procesan y desactivan micotoxinas.

La otra variable es el tiempo medio de permanencia del alimento en el rumen (Acosta et al., s.f.).

El cuadro siguiente presenta en forma resumida algunas de las tasas de degradación ruminal reportadas para distintas micotoxinas.

Cuadro No. 2: Bioconversión de micotoxinas en rumen

Micotoxina	Degradación en rumen	No degradado en rumen
Aflatoxina	0 – 42%	58 – 100%
Zearalenona	90% a Zea	% Metabolitos estrogénicos
DON	35% pH dependiente	65%
Ocratoxina	100% ???	?

Fuente: Diaz (2005).

El epitelio del intestino, el hígado y los riñones son el sitio de biotransformación de un gran número de compuestos que implica dos fases de reacciones. La primera fase implica reacciones de reducción, oxidación y la hidrólisis. En los citocromos P450 se encuentran las principales enzimas implicadas en la oxidación. La segunda fase consiste en reacciones de conjugación con moléculas formadas durante la primera fase. Estas reacciones reducen la toxicidad y aumentan la solubilidad en agua de las micotoxinas, lo que facilita su excreción en la orina (y la leche) (Yiannikoupudis y Jouany, 2002).

Otras formas conjugadas solubles en agua, producto de degradación de la aflatoxina B1 y metabolitos no conjugados de esta, son excretadas en el sistema circulatorio sanguíneo y se distribuyen de forma sistémica (Gimeno y Martins, 2011).

2.3. AFLATOXINAS

2.3.1. Generalidades de las aflatoxinas

Son metabolitos secundarios tóxicos de *Aspergillus Spp.*, *A. parasiticus* y *A. flavus*. Las Aflatoxinas causan toxicidades en ganado, animales domésticos, y humanos en todo el mundo (Díaz, 2005). Las aflatoxinas tienen actividad carcinogénica, mutagénica, teratogénica e inmunosupresora en varios tipos de animales (Cast, 2003).

Las aflatoxinas son conocidas desde 1960, cuando en Inglaterra se presentó una epidemia que mató alrededor de 100.000 pavos y patos alimentados con maní infectado con *Aspergillus flavus* proveniente de Brasil. La enfermedad fue llamada como "enfermedad X de los pavos" (Betina, 1989).

Las formas principales de aflatoxinas incluyen a B1, B2, G1 y G2; siendo B1 la más tóxica y común (Díaz, 2005).

Los *Aspergillus* crecen saprofiticamente y los productos alimenticios pueden servir como sustrato. Factores como la temperatura, el pH, la humedad, la luz, la atmósfera del almacenamiento y factores de tipo químico como la presencia de minerales o carbohidratos, así como también la presencia de inhibidores como la lactosa, pueden influir en su crecimiento y producción de aflatoxinas (Fundación Vasca, 2007).

Las Aflatoxinas son producidas con temperaturas desde 12 hasta 40°C, en un pH de 3.5 hasta 8.0 y con actividad óptima de agua alrededor de 0.99 (Betina, 1989).

En animales sus efectos varían con la dosis, longitud de exposición, las especies, la raza, el régimen o estatus nutricional. Teniendo un efecto carcinogénico, teratogénico, hepatogénico y mutagénico en estos, además de ejercer efectos agudos y crónicos dentro del animal (Aydin et al., 2008), puede causar daño en el hígado, cáncer, disminución en la producción de leche, una inmunodepresión y anemia (Sultana y Hanif, 2009).

Cuadro No. 3: Condiciones propicias de producción de micotoxinas por diferentes hongos.

Especie	Temperatura °C		Ph		Actividad agua	
	Rango	Máx. producción	Rango	Máx. producción	Rango	Máx. producción
<i>Aspergillus spp</i>	12 a 40	17 a 23	2,2 a 8,0	5 a 6	0,77 a 0,99	0,82 a 0,99
<i>Fusarium spp</i>	0 a 31	22 a 28	2,0 a 6,0	3 a 4	0,85 a 0,97	0,85 a 0,87
<i>Penicillium spp</i>	-3 a 40	15 a 30	2,1 a 10	5 a 7	0,80 a 0,95	0,80 a 0,86

Fuente: Sweeney y Dobson, citados por Denli y Perez (2006).

Las aflatoxinas son producidas antes y después de la cosecha de cereales, principalmente bajo ciertas condiciones de temperatura, humedad y disponibilidad de nutrientes y pueden ser encontradas en productos agrícolas de regiones tropicales o subtropicales (Fundación Vasca, 2007).

La unión europea (UE) tiene legislación para estas micotoxinas en géneros alimenticios para consumo humano y actualmente admisibles están establecidos en 0.05 microgramos por kilogramo (0.05ppb) para AFM1 en leche cruda, leche para fabricación de productos lácteos y leche tratada térmicamente. En el caso de preparados para lactantes y alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales dirigidos específicamente a los lactantes, la concentración máxima permitida es de 0.025ppb (Official Journal of the European Communities, Official of the European Union, citado por Gimeno, 2005).

En otros países (Australia, Brasil, Holanda, Rumania, Suiza, USA) las concentraciones máximas permitidas en productos lácteos varían entre 0.001 y 0.50 ppb dependiendo del país y del alimento lácteo (Gimeno y Martins, 2011).

En la legislación de Estados Unidos y los países del MERCOSUR se establece un máximo de aflatoxina en leche de 0.5 ppb (Zaviezo, 2011).

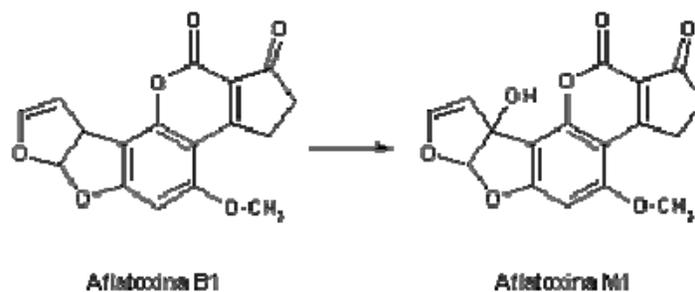
2.3.2. Caracterización química de aflatoxina

Químicamente pertenecen al grupo de derivados de las bisfurano-isocumarinas. Se presume que su síntesis se relaciona con la condensación de una Acetil CoA que reacciona con tres o más grupos malonatos produciendo malonil CoA, que junto con más Acetil CoA van a formar un compuesto policetónico, luego sufriendo ciclización y aromatización para formar antrona y su compuesto oxidado que es el ácido norsolínico; después de otra serie de reacciones puede dar formación a las aflatoxinas (Fundación Vasca, 2007).

2.3.3. Caracterización de la aflatoxina M1

La aflatoxina M1 es el derivado 4-hidroxi de la AFB1 y es excretada en la leche, el paso de AFB1 a la forma de AFM1 está relacionado de manera lineal con la producción de leche. Tanto la AFB1 como la AFM1 son compuestos hepatotóxicos y carcinogénicos y sus efectos sobre la salud pública constituyen una permanente preocupación (Fundación Vasca, 2007).

Figura No. 2: Transformación de aflatoxina B1 en M1



Las aflatoxinas M1 y M2 fueron aisladas de la leche de animales alimentados con alimentos contaminados; la designación con la letra M, proviene de Milk. Mientras que la designación de B, de las aflatoxinas B1 y B2 proviene de la fluorescencia azul (blue) bajo exposición a la luz-UV, mientras que la designación de G, se refiere a la fluorescencia de color verde amarillo (green) de las estructuras relevantes bajo luz - UV. Estas toxinas tienen estructuras similares y forman un grupo único de compuestos heterocíclicos altamente oxigenados y naturales (Díaz, 2005).

Algunos metabolitos conjugados de la AFB1 solubles en agua, son excretados dentro de la bilis y van a las heces. La Glucurono y Sulfoconjugación se producen específicamente en los microsomas de hígado (Retículo Endoplásmico Liso). Estas sustancias altamente hidrofílicas son capaces de oxidar sustancias lipofílicas, formando compuestos denominados “epoxis” los cuales pueden reaccionar con los grupos

nucleofílicos de ADN y de algunas proteínas. Estas reacciones necesitan del Oxígeno y del NADPH (reducido), un átomo de oxígeno se fija sobre el sustrato y el otro es reducido en Agua (el NADP se oxida) (De Luca, s.f.).

Otras formas conjugadas solubles en agua, productos de degradación de la AFB1 y metabolitos no conjugados de ésta, son excretadas en el sistema circulatorio sanguíneo y se distribuyen sistémicamente. Eventualmente esos residuos mencionados van a la leche, huevos, músculo y tejidos comestibles. La AFM1 es uno de esos derivados metabólicos que van a la leche contaminándola (De Luca, s.f.).

La AFM1 es un compuesto potencialmente carcinogénico para el hombre. Su ingestión ha generado preocupación en las autoridades sanitarias debido al alto consumo de leche y productos derivados en la población, especialmente niños (Díaz, 2005).

2.3.4. Aparición de aflatoxina M1 en leche

La AFB1 del alimento que pasa a AFM1 en leche está influenciada por diversos factores nutritivos y fisiológicos, incluyendo la alimentación, los regímenes, la ingestión y la tasa de digestión, la biotransformación animal, la aptitud hepática y la producción de leche. Esto implica que la tasa de absorción de AFB1 y la excreción de AFM1 en leche cambia en cada individuo en el día a día y de un ordeno al siguiente (Fink-Gremmels, 2008).

Ha sido demostrado que en ganado lechero consumiendo ciertas cantidades de aflatoxinas (de 50 a 100 ppb) alguna parte escapará de la degradación ruminal, modificándose y convirtiéndose de aflatoxina B1 a M1 por lo que estas aflatoxinas comenzaran apareciendo en la leche en un lapso de tres días de haber sido ingeridas (Basurto Kuba, s.f.).

Ensayos realizados por Cook et al. (1986) encontraron que los signos clínicos de aflatoxicosis aparecieron entre 24 y 32 horas después de ingerido la AFB1.

La AFB1 y AFM1 alcanzaron máximas concentraciones en el rumen entre las 4 y 8 horas de ingerido y las concentraciones de AFB1 fueron detectadas en el rumen 32 a 72 horas después de ser administradas. La orina contuvo mayores concentraciones de AFM1 que AFB1. Generalmente, la AFM1 alcanzó máximas concentraciones en orina dentro de las 24 horas.

La AFM1 puede ser detectada en leche después de 12 a 24 horas de la ingestión de AFB1. La ocurrencia de AFM1 en leche es transitoria y alcanza un máximo dentro de

los 2 días después del consumo del alimento contaminado. Desapareciendo después de 4-5 días de retirado el alimento (Dragacci et al., 2001).

Según Penadizo y Hangler, citados por Chi y Broomhead (s.f.) una vez que la AFB1 es absorbida en el cuerpo de la vaca, el tiempo para liberar la AFM1 en la leche puede tomar de 5 a 7 días dependiendo de la cantidad y la duración del consumo de AFB1.

Applebaum et al. (1982) no encontraron AFM1 en la leche después de 3-4 días de suspender el suministro de AFB1.

Inicialmente la tasa de transformación por aflatoxinas procedente de piensos contaminados en la leche de vacas lecheras estaba considerada del 1-2%. Estudios recientes en vacas lecheras holandesas en las primeras y últimas etapas de la lactancia que fueron alimentadas con concentraciones bajas de aflatoxinas B1, indicaron la existencia de porcentajes más altos debido a la mayor permeabilidad de las membranas de la célula de los alveolos y las concentraciones más altas de aflatoxina M1 excretada por las vacas con mastitis, también se podía deber a la permeabilidad creciente de las membranas (Fundación Vasca, 2007).

Se sabe que las vacas transforman del 0.3% al 4.8% de la Aflatoxina B1 contenida en el alimento en Aflatoxina M1, con un promedio de biotransformación de 1.7% (Van Egmond, 1989).

La relación entre la cantidad de AFB1 ingerida y la cantidad de AFM1 presente en la leche es muy variable y la transferencia es de alrededor del 0,3-6,2 % de AFB1 en la ración que se transforma en AFM1 y aparece en leche (Creppy, 2002).

Estudios realizados por Pettersson et al. (1989), Veldman et al. (1992); con vacas lecheras de alta producción demostraron porcentajes de 2.6 % 6.2 %. La relación aumenta a medida que aumenta la producción y si los datos de todos los estudios es analizado existe un incremento de aproximadamente 0,1 % por kg de leche obtenido. El valor en término medio en vacas de leche altas (> 25 l / día) es de 2,66% \pm 1.24.

El valor medio de todos los datos es consecuentemente 0.79 \pm 0.38 ng de AFM1 por ppb de AFB1 consumido al día. Las vacas de alta producción de leche aparentemente tienen una excreción mayor con un valor medio de 0.85 \pm 0.34. Se asume que éste es un resultado de una mayor permeabilidad en las membranas plasmáticas de los alvéolos (Veldman et al., 1992).

Díaz (2005) informó que la transferencia media de AFB1 en AFM1 es de 1.7%. Con esta figura los autores calcularon que solo 30 ppb de AFB1 en la comida tendrá como resultado 0.5ppb en AFM1 encima de límites en EEUU.

Frobish et al. (1986) observaron que la AFM1 en la leche de vacas lactantes, 12 horas después del consumo de ración contaminada con una transferencia media de 1.74% del total de la AFB1 ingerida en la ración. Patterson et al., 1980 encontraron resultados semejantes en vacas lecheras, observando tasas de transferencia de 2,2 %.

Inicialmente la tasa de transmisión por aflatoxinas procedente de alimentos contaminados en la leche de vacas lecheras estaba considerada del 1-2%.

En vacas lecheras, el paso de AFB1 a la leche en forma de AFM1 está relacionado de manera lineal con la producción de leche (Veldman et al., 1992).

2.4. EFECTOS DE LAS AFLATOXINAS

2.4.1. Efectos de las aflatoxinas en la salud humana

Las aflatoxinas se pueden encontrar como contaminantes naturales en una variedad de géneros alimenticios tales como, cereales y productos de cereales, cacahuates, nueces, almendras, pistachos, avellanas y otros frutos secos, coco, cacao, patatas dulces, manteca de cacahuete, lentejas, bananas, quesos, vinos, especias, leche y derivados (esencialmente la AFB1) y otros géneros alimenticios (Gimeno y Martins, 2011).

La aflatoxina B1 es el agente carcinógeno más potente de entre todas las aflatoxinas; la mayoría de los datos toxicológicos disponibles se relacionan con la aflatoxina B1. En 1988, el IARC colocó la aflatoxina B1 en la lista de agentes carcinógenos humanos, sobre la base de un número importante de estudios epidemiológicos hechos en Asia y África que han demostrado una asociación positiva entre las aflatoxinas y el cáncer primario de hígado (Cornejo y Villarroel, s.f.).

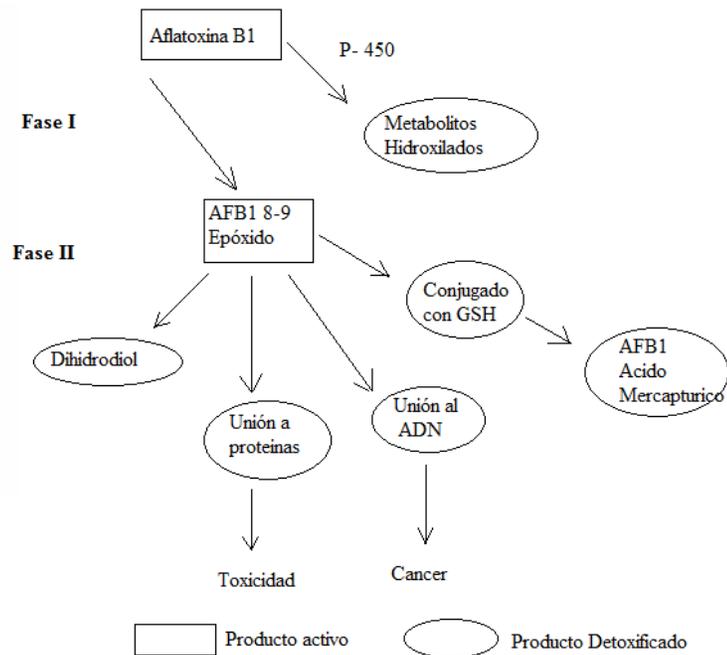
En los seres humanos el síndrome de aflatoxicosis es caracterizado por vómitos, dolor abdominal, edema pulmonar, convulsiones, coma y muerte, con edema cerebral y degeneración grasa del hígado, los riñones y el corazón (Cornejo y Villarroel, s.f.).

También se ha reportado que disminuye la actividad de varias enzimas importantes en la digestión de proteínas de almidón., lípidos y ácidos nucleicos. Es conocido el efecto de la aflatoxina en el metabolismo de la vitamina D, así como también en el de varios minerales como el hierro, fosforo y el cobre (Díaz, 2005).

Además de los efectos carcinogénicos, la aflatoxina y sus metabolitos pueden afectar cualquier órgano. Sin embargo el órgano blanco principal es el hígado.

En la figura, se observa que el compuesto AFB1 puede llegar a conjugarse con proteínas o sufrir hidroxilación o conjugarse con el glutatión (GSH) en el hígado y ser excretado en la orina o en las heces como ácido mercaptúrico, cambiándose con proteínas a los diferentes tejidos y provocando las diferentes clases de intoxicaciones (Fundación Vasca, 2007).

Figura No. 3: Biotransformación de aflatoxinas (Fundación Vasca, 2007).



2.4.2. Efectos de la aflatoxina en los animales

En los animales, existen toda una serie de factores que pueden influenciar (aumentando o disminuyendo) la toxicidad de las micotoxinas, factores tales como la especie y raza de los animales; la concentración de micotoxinas y duración de la contaminación (tiempo que los animales ingieren el alimento contaminado); la nutrición y salud de los animales; la edad y el sexo; las infecciones bacterianas, virales o parasitarias, endotoxinas y enterotoxinas; las condiciones inadecuadas de "habitat" de los animales (temperatura, humedad, ventilación, manejo y otras); los fármacos suministrados, vacunaciones, la presencia de otras micotoxinas y sinergismos o asociaciones entre ellos (Gimeno y Martins, 2011).

Dentro de la micotoxicosis generada por las aflatoxinas podemos definir tres cuadros: clínicos subclínicos y crónicos. El cuadro clínico se caracteriza por el rechazo del alimento como baja en la producción de leche, depresión y agravamiento de cualquier cuadro clínico presente en el ganado. El cuadro subclínico se caracteriza por inmunodepresión. El signo principal es el aumento en la cuenta de células somáticas y falla en el tratamiento de mastitis. Dicha vacas no van a responder al tratamiento de antibióticos intramamarios porque ya están con las defensas bajas. También se exagera una mayor incidencia de otras enfermedades y fallas vacunales ejemplo (IBR-DVB-PI3, clostridiales ect) (Withlow y Hagler, 2007)

El cuadro crónico es desatado por el efecto acumulativo de las aflatoxinas sobre los hepatocitos. Esto provoca el síndrome de hígado graso. Los efectos clínicos son edema y aumento de vacas caídas y débiles. Por otra parte la fase crónica tiene consecuencia inmunosupresora, que favorecen la invasión del organismo por diferentes agentes infecciosos, como *brucella abortus*, *leptospira spp* que afectan directamente la reproducción de los animales (Gimeno, 2011).

2.4.3. Efecto de la aflatoxina en el sistema inmunológico

Los efectos inmunosupresores de las aflatoxinas ya han sido demostrados en animales domésticos y de laboratorio. A pesar de existir un consenso en la inmunotoxicidad, el mecanismo no está completamente esclarecido.

Los efectos que las toxinas ejercen sobre el complemento, el interferón y las concentraciones de las proteínas séricas; son básicamente resultantes de los daños hepáticos que ocasionan y de la disminución en la producción de proteínas. Además de comprometer la formación del interferón y el complemento, se sabe que las aflatoxinas disminuyen la capacidad fagocítica de los macrófagos y la migración de linfocitos y leucocitos. La aflatoxina B1 afecta principalmente los linfocitos T, incluyendo tanto las células T ayudadoras como las T supresoras.

Los efectos de las aflatoxinas sobre las inmunoglobulinas tampoco están bien esclarecidos. Varios estudios indican un decrecimiento de los niveles de IgA e IgG en animales que sufren intoxicación con alimentos con un contenido de más de 0,5 ppb de aflatoxinas. Contrario a lo anterior, otros estudios concluyen que puede existir un aumento de la concentración de inmunoglobulinas como la IgG atribuible al hecho de la incapacidad del hígado lesionado de remover los anticuerpos producidos en el tracto gastrointestinal (Mallmann et al., s.f.).

Las aflatoxinas pueden ciertamente inhibir la síntesis de proteína T-linfocitos y esto está relacionado con uno de los efectos más negativos pertinentes, comprometiendo al sistema inmunológico, especialmente afectando los leucocitos en sangre (Sharma, 1993).

La acción de AFB1 sobre el sistema inmune es muy importante, por lo tanto la presencia de toxinas en sangre a niveles muy bajos altera severamente la protección de las vacunas (bajo efecto inmunitario), así como también, produce un acortamiento en el período de incubación de las enfermedades infecciosas, mayor predisposición a lesiones masivas de IBR, por Stress nutricional e inmunodepresión (De Luca, s.f.).

A vacas lecheras en periodo de lactación que recibieron una dosis oral de AFB1 correspondiente a 0,0003 ppb p.v. /día durante periodos de 12 a 14 días. Esto correspondería a una contaminación de AFB1 en la ración final del orden de 5500 ppb. Las vacas tuvieron problemas de inapetencia, pérdida de peso y disminución en la producción de leche, hubo variaciones enzimáticas significativas durante 1 a 3 semanas después de la ingesta de AFB1. No hubo signos de mastitis aguda, sin embargo, la tasa bacteriana en la leche aumentó durante el consumo de la micotoxina. Los tests de mastitis realizados fueron esencialmente elevados en el periodo posterior a la última administración de la micotoxina (Gimeno, 2011).

2.4.4. Efectos de las aflatoxinas sobre las membranas celulares y el metabolismo energético

Cuando el rodeo se expone a elevadas concentraciones de AFB1 (alimentos con más de 500ppb), se presentan en pocos días signos agudos de intoxicación. El órgano blanco de acción fundamentalmente es el hígado donde se produce una infiltración grasa y necrosis considerable, con muerte celular y pérdidas de funciones esenciales. Se produce una grave inhibición de la síntesis proteica y glucídica (neoglucogénesis casi anulada).

Las funciones de detoxificación (Glucuronoconjugación) están inhibidas, por lo tanto se eleva extremadamente la Bilirrubina Indirecta. La sintomatología más evidente de la intoxicación se encuentra relacionada a un síndrome hepato-renal, con Hiperamonemia, Hipocalcemia-Hipomagnesémica, edemas en extremidades posteriores, vacas caídas en tetania, dolor abdominal, parálisis ruminal, diarreas oscuras a veces con melenas, decúbito esternal y muerte (De Luca, s.f.).

Los signos incluyen, disminución de la producción de leche, del estado corporal, pelo hirsuto y con zonas de depilación fundamentalmente en la zona superior a las pezuñas, edema coronario podal, pododermatitis, verrugas y callos interdigitales (De Luca, s.f.).

Se ha demostrado que las aflatoxinas B1, G1 y M1 afectan la cadena respiratoria en mitocondrias, además de inhibir la ATPasa, lo cual reduce la producción de ATP; además se ha observado que los niveles de glucógeno se reducen (Moss, 1992).

2.4.5. Efecto en la síntesis de biomoléculas

Los resultados son transversiones de guanina a timina, reparación de las lesiones en el ADN, mutaciones y posteriormente formación de tumor (De Luca, s.f.).

Con respecto a los efectos citotóxicos la AFB1 induce la peroxidación lipídica lo cual conduce a un daño oxidativo en los hepatocitos (De Luca, s.f.).

Es evidente que la AFB1 y AFG1 tiene actividad sobre los sistemas enzimáticos que intervienen en la síntesis de los radicales libres y sobre los antioxidantes enzimáticos (Glutación Peroxidasa, Superóxido Dismutasa), y no enzimáticos (Vitamina E, ascorbato, Glutathione) (De Luca, s.f.).

Este estado de origen micotóxico es debido a la ingesta de aflatoxina B1 como esta intoxicación es acumulativa y el depósito se realiza en el lugar de su detoxificación (hígado) es lógico suponer que la agresión de las toxinas desencadena la enfermedad en el hepatocito (De Luca, s.f.).

Las lesiones más características son atrofia del tejido hepático con infiltración de grasa y proliferación de conductos biliares y fibrosis.

2.4.6. Efecto sobre consumo

Según Cook et al. (1986) los cambios en la motilidad del rumen son observados por más pequeña que sea la dosis de AFB1, se señaló que la motilidad del rumen puede ser afectada en concentraciones de aflatoxina menores de 0,0002 ppb. La motilidad alterada del rumen podría atrasar la eliminación de la aflatoxina, pero no afectar la ganancia en peso.

La AFB1 produce una disminución de la motilidad ruminal, disminución grave en el aprovechamiento de la celulosa y disminución sustancial de la producción de Ácidos Grasos Volátiles y amoníaco (De Luca, s.f.).

El efecto negativo de algunas micotoxinas en la alimentación, puede ser debido a cambios en el olor o el sabor de alimentos contaminados. Según Mertens y Watt (1977) el polvo presente en los forrajes desecados asociado con la presencia de esporas de moho, pueden estar involucrados en la disminución de la palatabilidad. Además, hay trastornos metabólicos y gastrointestinales causados por la presencia de micotoxinas que están probablemente implicadas en la reducción del consumo voluntario de alimento.

Se ha demostrado que la AFB1 afecta directamente la utilización de nutrientes por reducción de las sales biliares y la actividad de enzimas digestivas primarias como amilasa, tripsina y lipasa (Bauzá, 2007).

Según Applebaum et al. (1982) proporcionando 0,013 ppb/día de AFB1 (alrededor de 8 microgramos/kg de alimento) para vacas en lactación no afecto el consumo de materia seca.

2.4.7. Efecto de aflatoxina sobre la producción de leche

En el caso del ganado lechero se ha mencionado que 100 ppb de Aflatoxinas pueden reducir la producción de leche sin embargo en este caso el problema está enfocado más sobre los residuos de la Aflatoxina M1 en leche (Patterson y Anderson, 1982).

Concentraciones de AFB1 en la ración final, del orden de 2000 a 2400 ppb suministradas a vacas de 2 años de edad durante 7 meses provocaron graves problemas de hepatotoxicosis y reducción significativa en la producción lechera (Applebaum et al., 1982).

Guthrie (1979) demostró que el ganado lechero en lactación en situaciones de campo consumiendo 120 ppb de aflatoxina disminuía su eficiencia reproductiva y cuando las vacas fueron cambiadas a una dieta libre de aflatoxina, la producción de leche se incremento en más del 25%.

2.4.8. Efecto de la aflatoxina en la actividad reproductiva

Las aflatoxinas también pueden influenciar a la vaca en su actividad reproductiva. El aborto ha estado correlacionado con AFB1 del maní en vacas lecheras comiendo 77ppb de aflatoxina (Ray et al., 1986). El efecto negativo de aflatoxina en la actuación reproductiva de vacas lecheras no es atribuible a una actividad directa sobre el embrión, sino que altera la homeostasis maternal, la disminución de la motilidad del rumen, y la reducción en la respuesta inmune (Casteel, 2006). Por consiguiente hay una falta de nutrientes y de desordenes que directamente interfieren con la actividad ovárica y uterina (Rossi et al., 2009).

Infertilidad por alteración del ciclo sexual, hiperestrenismo, quistes ováricos y anovulación, muerte embrionaria, abortos durante el primer tercio de la gestación (De Luca, s.f.).

La infertilidad está relacionada a la hepatopatía necrótica lipidótica (hígado graso) la cual conduce a una disminución de la actividad de la Estrinasa microsomal cuya función es la de convertir el 17 Beta Estradiol a Estriol y Estrona, metabolitos poco activos que se eliminan por bilis y orina. Este es el motivo por el cual el estado hiperestrinémico genera infertilidad colectiva (De Luca, s.f.).

2.5. MANEJOS PARA EVITAR LA PRESENCIA DE AFLATOXINAS

El grano debe ser cosechado en el momento adecuado de madurez. Los granos inmaduros o los pasados de madurez son más susceptibles al ataque de hongos. El grano debe ser oreado rápidamente ya que el hongo crece rápidamente y necesita solo unas pocas horas para producir aflatoxinas, especialmente, cuando el grano tiene un alto contenido de humedad y la temperatura es superior a los 25 °C.

Debe evitarse el daño mecánico, sobre vainas y granos, porque predispone al ataque de hongos y formación de aflatoxinas. Una buena regulación de las máquinas cosechadoras evita la recolección excesiva de impurezas (tierra, malezas y otros restos) que favorecen el desarrollo del hongo y producción de aflatoxinas. Finalmente, es muy importante limpiar bien los equipos antes y después de operarlos para eliminar los restos de cosecha, porque constituyen una fuente frecuente de contaminación de aflatoxinas (Armijo, 2009).

2.5.1. Utilización de adsorbentes

El mecanismo de acción más conocido para contra restar las micotoxinas incluye el uso de adsorbentes que cuentan con la capacidad de adsorber (secuestrar) básicamente a las micotoxinas con polaridad (aflatoxinas) en el tracto gastrointestinal de los animales y por lo tanto reducir su bio-disponibilidad (Starkl, 2008).

Los agentes adsorbentes son aquellos compuestos que tienen la finalidad de quelar las micotoxinas, lo cual permite reducir la disponibilidad de las mismas. Los agentes biotransformadores degradan las micotoxinas en metabolitos menos tóxicos. Existen otros compuestos, los cuales tienen la finalidad de proteger contra el daño a nivel celular ocasionado por el consumo de micotoxinas, estos compuestos son clasificados como protectores (Tapia Salazar et al., 2010).

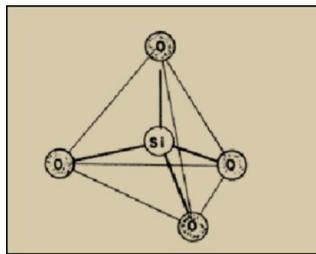
En general hay dos tipos de secuestrantes: los orgánicos y los inorgánicos (Bueno, 2011).

2.5.1.1. Adsorbentes inorgánicos

1- Las arcillas son aquellas sustancias terrosas formadas principalmente por silicatos aluminicos con materia coloidal y trozos de fragmentos de rocas, que se han formado mediante la desintegración química de las rocas aluminicas.

Los silicatos, son el grupo más abundante de los minerales formadores de rocas donde el anión está formado por grupos de silicatos del tipo $(\text{SiO}_4)^{4-}$. Más del 90% de los minerales que forman las rocas son silicatos, compuestos de Silicio y Oxígeno y uno o más iones metálicos. Cada uno de los silicatos tiene como compuesto básico, un ion complejo de forma tetraédrica; este tetraedro consiste en una combinación de un ion de Silicio con cuatro átomos de oxígeno.

Fig. No. 4: Estructura básica de los silicatos (Mitchell, 1993).



Los aluminosilicatos de calcio y sodio (HSCAS), pueden encontrarse de forma natural o mediante el tratamiento térmico de arcillas de calcio (Wang et al., 2008). Estos compuestos contienen moléculas de agua adheridas a un metal central o cristalizado con un metal complejo permitiendo un mayor secuestro de micotoxinas.

2- El carbón activado es un polvo no soluble formado por pirolisis de varios compuestos orgánicos y elaborados por procesos de activación que permite el desarrollo de estructuras altamente porosas. La capacidad secuestrante del carbón activado depende del tamaño del poro, área de superficie, estructura de la micotoxina y la dosis.

3-La tierra de diatomeas es un mineral de origen vegetal formado por la fosilización y acumulación de los esqueletos provenientes de algas unicelulares (Tapia Salazar et al., 2010).

Los adsorbentes inorgánicos enlazan la micotoxina por diferencia de carga. En general estos compuestos corresponden a minerales de arcillas como las zeolitas, colestiramina y otros (Bueno, 2011).

2.5.1.2. Adsorbentes orgánicos

Estos adsorbentes enlazan la toxina en sitios de unión sin que estén relacionados directamente con cargas electroestáticas, y corresponden en general al derivado de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* (β -d-glucanos). Estos productos tienen su acción secuestrante de diversas micotoxinas: aflatoxinas, ochratoxina A, fumonisinas y zeararelonas (Bueno, 2011). La manera en que las micotoxinas se pueden adherir a estos compuestos es por medio de una adsorción física (interacciones débiles de van der Waals y enlaces de hidrógeno, este proceso es fácilmente reversible) y adsorción química o quimiosorción (interacciones fuertes mediante enlace iónico o covalente, es un proceso irreversible ocasionado por un cambio químico en la sustancia original) (Tapia Salazar et al., 2010).

Los adsorbentes orgánicos de micotoxinas incluyen:

1- Fibras micronizadas, estas son obtenidas a partir de diferentes materiales vegetales, tales como cereales (trigo, cebada, avena, etc), cascarilla de chícharo, manzana, bambú, etc. Estas fibras están constituidas principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina.

2- Las bacterias utilizadas principalmente como secuestrantes de micotoxinas son *Lactobacillus* y *Streptococcus* y el mecanismo empleado para secuestrar micotoxinas es mediante enlaces hidrofóbicos donde las micotoxinas se unen a la superficie bacteriana.

3- Polímeros, dentro de estos compuestos tenemos a la colestiramina y la polivinilpirrolidona. La colestiramina es una resina insoluble de intercambio aniónico de amino cuaternario; el cual puede atrapar fuertemente compuestos aniónicos (Tapia Salazar et al., 2010).

El adsorbente utilizado en este caso fue Mycosorb®, formada por glucomanos esterificados (EGM), extraídos de la pared celular de la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), cepa 1026, y también contiene aluminosilicato de sodio. Mycosorb®, liga una amplia gama de las micotoxinas producidas por los hongos.

Las características de un adsorbente de micotoxinas son una baja tasa de inclusión efectiva, debe ser estable a través de una amplia gama de pH (esto es necesario para que la micotoxina se mantenga adherida al adsorbente a lo largo de todo el intestino y sea excretada. Debe tener alta afinidad para adsorber bajas concentraciones de micotoxinas, alta capacidad para adsorber altas concentraciones de la misma, también

debe tener la capacidad de actuar con rapidez antes de que esta sea adsorbida por el torrente sanguíneo. Y por ultimo debe ser un 100% biodegradable (De María et al., 2008).

El uso de adsorbentes causa una reducción en la densidad de nutrientes, y también promueven una capacidad de absorción excesiva que puede conducir a una disminución en la disponibilidad de micro elementos importantes (Karl et al., 2001). Ante este hecho, se puede usar tampones orgánicos, que tienen algunas ventajas sobre inorgánicos (Smith et al., 1994).

2.5.1.3. Agentes biotransformadores de micotoxinas

Los agentes biotransformadores incluyen bacterias, levaduras, hongos y enzimas. Estos biotransformadores pueden estar constituidos de estos microorganismos o de la extracción de algunas enzimas de ellos y que posteriormente son incluidas en el alimento. Para el caso de las bacterias se pueden emplear bacterias anaeróbicas gram-positivas, bacterias aeróbicas gram-positivas y bacterias aeróbicas gram-negativas (Tapia Salazar et al., 2010).

2.5.2. Ejemplos del uso de adsorbentes

En un estudio realizado en la Facultad de Veterinaria de Barcelona por Denli (s.f.) se utilizaron 25 vacas Frisona que consumían una ración contaminada con AFB1 (concentración media de 0,021 ppb). Los resultados indican que la inclusión de AflaDetox en la dieta produjo una reducción del 61,2 % la concentración de AFM1 en leche.

En un ensayo realizado con 20 vacas de primer mes en la segunda lactancia, fueron alimentadas con una dieta base (con una presencia promedio de aflatoxina de 110 ppb). A la mitad de las vacas se les suministró el absorbente Mycosorb a 10g/v/d.

En cuanto a la producción de leche se observó un aumento de 0.45 l/v/d en el grupo tratado con Mycosorb, además de observarse una gran disminución alrededor del 80% inferior en cuanto a la presencia de AFM1 en leche (Devegowda et al., s.f.).

Butkeraitis et al. (2008) evaluaron la eficacia de los adsorbentes de micotoxinas en dos pruebas de campo llevadas a cabo en México. La alimentación del grupo tratado fue suplementada con Toxisorb a razón de 0.4% de la dieta. En comparación con las vacas alimentadas con Toxisorb, (es un secuestrante pero no explica su naturaleza) las del grupo control tuvieron una reducción de 2.38 kg en la producción de leche. Esto representa 726 kg en 305 días de lactancia y 868 kg en un año completo de lactancia.

Las vacas a las que se les suministró Toxisorb tuvieron una concentración de AFM en leche significativamente ($p < 0.001$) más baja en comparación con las vacas del grupo control (0.066 vs. 0.216 ppb).

En un ensayo realizado por Kutz et al. (2009), en vacas Holstein con un promedio de producción de 40 lts de leche en lactancia media en la Universidad de Missouri. El mismo tenía como objetivo determinar la eficacia de 3 adsorbentes; Solis, Novasil Plus (ambos alumnos silicatos cálcico sódicos) y MTB-100 (una pared de levadura basado en *Cerevisiae Saccharomyces*), para reducir los niveles de AFM1 en la leche. El alimento consumido fue en promedio 23 kg de MS, y la concentración de AFB1 suministrada fue de 112 ppb.

El consumo de alimento y la producción de leche no fueron afectados en los tratamientos dietéticos y en promedio se encontraron en torno a 22.29 kg Ms/día y 33.87 lts/día respectivamente, a través de todos los tratamientos. La composición de leche tampoco fue afectada. Comparando con el tratamiento únicamente con AFB1, la excreción AFM1 en leche fue disminuida por la adición de Solis y Novasil Plus. Mientras que la adición de MTB-100 para la disminución de AFB1 no fue efectiva en reducir la AFM1 en leche. El paso de AFB1 de alimento a AFM1 en leche, es calculada de la toma de aflatoxina y el volumen total de leche producida [(la excreción de AFM1/el consumo del AFB1) / 100] promediaron 2.65, 1.48, 1.42, y 2.52 % para el control (ningún adsorbente), Solis, Novasil Plus, y MTB-100, respectivamente (Kutz et al., 2009).

Ramos y Hernández (1997) en un estudio in vitro probando diferentes niveles de adsorbentes (Montmorillonita, silicato de origen natural) con 4 tipos de aflatoxinas en diferentes condiciones de pH y temperatura, comprobaron que con la concentración más baja de arcilla (0,05%) obtuvieron un porcentaje de absorción elevado (78%) y con un nivel de adsorbente del 5%, se obtenían porcentajes de adsorción superiores al 98%.

Winfrey y Allred (1992) ya habían ensayado la bentonita como adsorbente de aflatoxina B1 y encontraron que in vitro y con niveles del 10% podía adsorber hasta el 70% de la toxina.

Todo esto lleva a pensar que la adsorción in vitro de las micotoxinas depende entre varios factores, del tipo de molécula que se quiera eliminar, mientras ensayos *in vivo* la situación es más compleja y depende de la confluencia de variables tales como la matriz alimenticia, pH, tiempo de retención en el sistema digestivo, enzimas digestivas y otras sustancias del tracto gastrointestinal (Pérez et al., 2011).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LOCALIZACION Y DURACION

El ensayo fue realizado en la Unidad de lechería del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Estación Experimental La Estanzuela, localizada sobre la Ruta 50, km. 11 y a 11 km. de la Ruta Nacional No. 1, en el paraje Semillero del departamento de Colonia, en la República Oriental del Uruguay.

El trabajo se inició el 5 de mayo de 2011 finalizando el 15 de junio de 2011. Este período se divide en cinco semanas. La primera semana fue la de acostumbramiento (del 5 de mayo al 12 de mayo de 2011), sin desafío con Micotoxinas ni uso de secuestrantes, y las restantes cuatro semanas son las correspondientes al periodo experimental propiamente dicho. El inicio de cada periodo semanal ocurrió los días jueves en horario PM.

3.2. SELECCIÓN DE ANIMALES

Del rodeo general de la Unidad de Lechería de INIA La Estanzuela se seleccionaron doce vacas lecheras en lactancia media, las mismas se bloquearon por producción de leche media previa al inicio del experimento, peso corporal y edad (número de lactancias), en ese orden de prioridad.

Característica	Media
Producción de leche (l/v/d)	24.7
Peso vivo (Kg/a)	506 ± 56
No. de lactancias	1.92 ± 0.79

Las doce vacas se agruparon en tres bloques homogéneos por producción de leche previa al inicio del experimento, peso corporal y edad en lactancias, y luego cada animal integrante del bloque fue asignado al azar a uno de los cuatro grupos que se asignaron a los tratamientos a evaluar.

3.3. TRATAMIENTOS

El ensayo evaluó cuatro tratamientos con tres repeticiones, durante cuatro períodos de una semana de duración cada uno.

Los tratamientos se describen a continuación:

Tratamiento 1 (Limpio): Dieta base limpia, sin agregado de aflatoxinas ni secuestrantes.

Tratamiento 2 (Sucio): Dieta base con 100 µg/kg de MS de aflatoxinas (AFB1).

Tratamiento 3 (Mycosorb): Dieta base con 100 µg/kg de MS de aflatoxinas (AFB1) + 10 g/v/d de Mycosorb.

Tratamiento 4 (Mycosorb + aluminosilicato): Dieta base con 100 µg/kg de MS de aflatoxinas (AFB1) + 10 g/v/d de Mycosorb y 20 g/v/d aluminosilicato (Biotox).

A los efectos del ensayo fueron utilizados dos secuestrantes de micotoxinas: Mycosorb®; compuesto por glucomananos esterificados, y un secuestrante en base a la mezcla de Mycosorb y un aluminosilicato de origen inorgánico con el nombre comercial de Biotox.

3.4. DISEÑO EXPERIMENTAL

A los efectos de evaluar la eficacia de dos agentes secuestrantes en su capacidad de remover la presencia de Aflatoxina M1 (AflaM1) en leche se utilizó un diseño de cuadrado latino, con 4 tratamientos, 4 períodos de evaluación y 3 repeticiones por tratamiento, según el modelo lineal siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + P_j + R_k + T_i \times P_j + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} observación correspondiente al tratamiento i , en el período j , de la repetición k

μ es el efecto poblacional asociado a la observación Y_{ijk} .

T_i es el efecto del tratamiento i .

P_j es el efecto del período j .

R_k es el efecto de la repetición k .

$T_i \times P_j$ es el efecto de la interacción del tratamiento i y del período j .

ε_{ijk} es el efecto del error aleatorio asociado a la observación Y_{ijk}

Para la separación de medias se utilizó el test de la Mínima Diferencia Significativa.

3.5. ALIMENTOS

La dieta base estuvo compuesta de la misma manera para todos los tratamientos.

La dieta base de todos los tratamientos es la siguiente:

Ingredientes (Kg BF/v/d)	Cantidades/v/d
Ensilaje de Maíz PE	20.00
Heno de Moha	1.00
EGH Maíz	5.00
Ración Comercial	3.00
Expeller de Girasol	4.00
Expeller de Soja	2.00
Afrechillo de Trigo	3.00
Sal común (NaCl)	0.070
Urea	0.070
Carbonato de Ca	0.150
Núcleo Vitamínico/Mineral	0.050
Total (Kg BF/v/d)	38.3

Durante el experimento se utilizaron dos ensilajes de maíz. Uno de ellos fue comprado a una chacra vecina, realizándose el tres de marzo de 2011, cosechado en estado de grano pastoso, con una cosechadora de micropicado. El otro fue realizado en INIA el 30 de diciembre de 2010, el cual no llegó a formar grano por las condiciones climáticas del año en particular, también con cosechadora de micropicado.

Por otra parte el silo de maíz de grano húmedo utilizado fue comprado a ANPL el 23 de marzo de 2011, el cual contenía un 27% de humedad.

Los fardos de moha utilizados se realizaron en INIA el 14 de abril de 2011.

3.6. MANEJO

Las vacas eran ordeñadas dos veces al día; 6:30 y 15:30 horas siendo la duración de éste de 15 minutos. Las mismas se encontraban en un potrero de 2700 m² a 100 metros del tambo, por lo que eran llevadas al mismo a la hora correspondiente del ordeño.

La dieta base era totalmente mezclada y se le adicionaba lo correspondiente a cada tratamiento en forma individualizada, para luego ser ofrecida en comederos individuales. Esta dieta se repartía en dos veces al día; la primera comida era ofrecida luego del ordeño matutino y la restante luego del ordeño vespertino. Las vacas estaban frente al comedero durante ocho horas totales al día; cuatro horas en la mañana y cuatro en la tarde. En ambos casos (mañana y tarde) en 2 periodos de 2 horas cada uno aproximadamente, separados por un periodo de 2 a 3 horas en patio empastado común, con acceso ilimitado a agua de bebida ofrecida en bebedero colectivo.

Durante todo el ensayo se colectó y se pesó una vez al día el alimento rechazado por cada individuo.

Se registró la producción individual de leche de los animales durante todo el período experimental. Se tomaron muestras individuales de leche para analizar contenido de sólidos, recuento de células somáticas los días 5 y 6 de cada una de las semanas experimentales (períodos). Por otra parte se tomaron muestras individuales de leche para determinar la presencia y contenido de AFM1 los séptimos días (7°) de cada semana experimental.

Durante todo el período se tomó una muestra por semana de cada alimento individual y de cada tratamiento para una posterior caracterización nutricional y para determinar posible aporte de aflatoxinas de los alimentos.

3.7. DETERMINACIONES

3.7.1. En los alimentos

Para la determinación del valor nutritivo de los alimentos se tomaron muestras representativas de los mismos los días miércoles de cada semana. Estas muestras fueron remitidas al Laboratorio de Nutrición Animal de INIA La Estanzuela para obtener una caracterización nutricional de los mismos.

Las muestras de silo de planta entera de maíz, fardo de moha y silo de grano húmedo de maíz fueron acondicionadas en una bolsa de nylon de forma hermética y fueron conservadas en freezer a - 18 °C, por ser materiales frescos. Con una porción de la muestra de los ensilajes se realizó la medición de pH usando peachímetro estandarizado con soluciones buffer de 4.0 a 7.0, así como también se determinó el Nitrógeno amoniacal mediante la técnica de Kjeldahl con un equipo kjeltes auto analyzer

Los materiales frescos fueron colocados en la estufa de aire forzado a 60°C durante dos días hasta peso constante, para determinar materia seca parcial. Los restantes alimentos se molieron y analizaron sin previo secado. Luego todas las muestras fueron molidas a maya de 1 mm para la determinación de: materia seca analítica (MSA), proteína cruda (PC), cenizas (C), residuo insoluble en detergente ácido (FDA) y residuo insoluble en detergente neutro (FDN). La metodología utilizada para llegar a estos componentes fue la siguiente:

- Materia seca analítica; según A.O.A.C. (1984).
- Proteína cruda; según Mieres (2004).
- Cenizas; según A.O.A.C. (1984).
- Residuo insoluble en detergente ácido; según Georing y Van Soest (1970).
- Residuo insoluble en detergente neutro; según Georing y Van Soest (1970).

Para la determinación de presencia y niveles de aflatoxinas en los alimentos, las muestras fueron enviadas al Laboratorio Micología de la Facultad de Ciencias-Ingeniería. La técnica utilizada fue ELISA aflatest comercial de la marca Biopharm.

3.7.2. En los animales

3.7.2.1. Producción de leche

Se midió la producción de leche individual de los animales durante todo el período experimental.

El rendimiento de leche es expresado en l/v/día tanto para leche sin corregir como para leche corregida por grasa al 4% (LCG) la cual se calculó según la ecuación:

$$\text{LCG4\%} = (\text{kg Leche} \times 0,4) + (\text{kg Grasa} \times 15) \text{ (Gaines, 1923).}$$

También se calculo la leche corregida por energía y se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{LCE} = (\text{leche kg} \times 0,327) + (\text{kg de grasa} \times 12,95) + (\text{kg de proteína} \times 7,2) \text{ (Gaines, 1938).}$$

3.7.2.2. Componentes de la leche

Los días 5 y 6 de cada semana experimental se obtuvieron muestras individuales de leche de AM y PM. Cada muestra se ingresó al Laboratorio de Calidad de Leche de INIA La Estanzuela para la determinación de grasa, proteína, lactosa, sólidos no grasos y recuento de células somáticas.

Las muestras de leche individuales fueron tomadas por un muestreador automático de la ordeñadora Wesfalia-Surge, homogenizados y luego una muestra se virtió en recipientes de 50 ml; uno en el ordeño de la mañana y otro en el de la tarde.

Para la determinación de los componentes de la leche se utilizó un equipo Bentley 2000 de Bentley Instruments, USA. El método utilizado es IDF Standard 141C:2000.

Para el recuento de células somáticas fue utilizado el equipo Somacount 300 y la metodología utilizada es IDF Standard 148A: 1995 Method C.

3.7.2.3. Contenido de Aflatoxina en leche

Para determinar el contenido de aflatoxina M1 en leche, se tomaron muestras individuales todos los 7° días de cada período experimental y se congelaron a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el final del trabajo. Estas muestras congeladas y debidamente identificadas fueron enviadas al Laboratorio Micología de la Facultad de Ciencias-Ingeniería.

La técnica utilizada en las muestras de leche para la determinación de Aflatoxina M1 fue un test de ELISA comercial de la marca Biopharm AFM1 30/15, con tres repeticiones de cada muestra.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. DESCRIPCION DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES

A continuación se muestran el total de los alimentos ofrecidos en la dieta, composición de la misma y valor nutritivo promedio para las cuatro semanas. También se presenta el total de consumo de materia seca por tratamiento. Vale recordar que la dieta base era la misma para todos los tratamientos.

4.1.1. Dieta ofrecida

Cuadro No.4: Dieta media teórica ofrecida

Ingredientes	kg Base Fresca
Ensilaje de Maíz PE	20,0
Heno Moha	1,0
Ensilaje Grano Húmedo de MAIZ	5,0
Ración Comercial	3,0
Expeller Girasol	4,0
Expeler Soja	2,0
Afrechillo Trigo	3,0
Urea	0,070
Núcleo Mineral, Oligomineral y Vitamínico	0,270
Total (kg /v/d)	38,3

Cuadro No. 5: Dieta media semanal ofrecida real

Ingredientes	kg Base Fresca	Semanas Experimentales			
		B	C	D	E
Ensilaje de maíz PE	19,7	19,48	19,79	19,64	19,69
Heno Moha	0,988	1,00	0,95	1,00	1,00
Ensilaje Grano Húmedo de maíz	5,026	4,96	5,24	4,96	4,95
Ración Comercial	3,000	3,00	3,00	3,00	3,00
Expeler Girasol	4,000	4,00	4,00	4,00	4,00
Expeler Soja	2,000	2,00	2,00	2,00	2,00
Afrechillo Trigo	3,000	3,00	3,00	3,00	3,00
Urea	0,070	0,07	0,07	0,07	0,07
Núcleo mineral, oligomineral y Vitamínico	0,264	0,264	0,264	0,264	0,264
Total (kg/v/d)	38,0	37,8	38,3	37,9	38,0

De los cuadros anteriores se desprende que existió una muy leve variación entre la dieta teórica y la realmente ofrecida en base fresca.

4.1.1.1 Perfil nutricional

En base a valores estándar del Laboratorio de Nutrición Animal de INIA, se estimó el valor nutricional (teórico) de la dieta media ofrecida (Mieres, 2004).

Cuadro No. 6: Perfil nutricional ofrecido teórico

Parámetro	Contenido
Materia Seca%	54,1
Proteína Cruda%	17,2
Fibra Detergente Acido%	19,9
Fibra Detergente Neutro%	32,3
Cenizas Totales%	10,9
ENI (Mcal/kg MS)	1,59

En base al análisis de las muestras de alimentos colectadas semanalmente durante el período experimental, se estimó el valor nutricional medio semanal de las dietas ofrecidas, según aparece en el Cuadro No. 4.

Cuadro No. 7: Perfil medio nutricional ofrecido real

Parámetro	Contenido Promedio	Semanas Experimentales			
		B	C	D	E
Materia Seca%	59,2	55,2	60,1	60,7	60,6
Proteína Cruda%	16,3	17,2	16,1	15,8	16,1
Fibra Detergente Acido%	17,8	16,7	17,0	17,7	19,7
Fibra Detergente Neutro%	32,9	33,3	30,8	32,9	34,8
Cenizas Totales%	5,60	5,49	5,63	5,45	5,68
ENI (Mcal/kg MS)	1,63	1,64	1,64	1,63	1,60

De estos cuadros se puede comprobar que el perfil nutricional de las dietas reales resultó muy similar al teórico.

4.1.2. Dieta consumida

El alimento era ofrecido dos veces al día en mitades iguales y una vez al día se recolectaba el remanente, se pesaba y por diferencia entre ofrecido y remanente se determinaba el alimento desaparecido.

Los valores presentados corresponden a las medias mínimo cuadráticas, para los cuatro tratamientos en las cuatro semanas en que consistió el ensayo.

Cuadro No. 8: Medias de consumo en los distintos tratamientos.

TRATAMIENTO	Limpio	Sucio	Mycosorb	Mycosorb + Biotox	E.E.M	Pr> α
Cons MS (Kg/v/d)	20,6a	20,5a	20,6a	20,5a	1,437	NS

Del cuadro se desprende que no se registraron diferencias estadísticas en los consumos de materia seca, en los distintos tratamientos. No siendo esta variable afectada por la presencia de AFB1 en la dieta. Esto no coincide con lo citado por Jouany (2001) quien observó un efecto negativo de la presencia de micotoxinas en el alimento, pudiéndose deber a cambios en el olor o sabor de los mismos y también causando trastornos metabólicos y gastrointestinales; y como consecuencia de esto se vio reducido el consumo voluntario.

Los resultados tampoco coinciden con lo expuesto por Basurto Kuba (s.f.), Denli (2006), Bouza (2007) los cuales afirman que animales consumiendo alimentos contaminados rechazaban el alimento, con marcada disminución del consumo.

Por otra parte Jobim et al. (2001), Kutz et al. (2009) reportaron que para vacas en lactación, concentraciones de 13 ppm/día de AFB1 y 112 ppb AFB1 respectivamente, no afectaron el consumo de alimento, coincidiendo esto con lo obtenido en nuestro ensayo.

4.2. RESULTADOS DE PRODUCCION

En este apartado se analizarán los datos de producción, composición y calidad de leche, por tratamiento. Así como también se mostrarán los resultados de contenido de aflatoxina en M1 en leche.

Los valores presentados corresponden a las medias mínimo cuadráticas calculados para los cuatro tratamientos en las cuatro semanas en que consistió el ensayo.

En el siguiente cuadro se presentan los datos productivos, de composición y calidad de leche según tratamiento.

Cuadro No. 9: Producción y composición promedio de la leche según tratamiento.

Tratamiento	Limpio	Sucio	Mycosorb	Mycosorb + Biotox	E.E.M	Pr> α
Leche (Lt/v/d)	24,82	26,18	25,86	24,82	3,092	NS
ECM ¹ (Lt/v/d)	29,04	30,05	30,64	29,48	3,336	NS
LCG 4% ² (Lt/v/d)	26,91	27,99	28,54	27,37	3,101	NS
G ³ (%)	4,59	4,47	4,74	4,73	0,678	NS
G (Kg/v/d)	1,13	1,17	1,21	1,16	0,164	NS
P ⁴ (%)	3,52	3,40	3,51	3,57	0,269	NS
P (Kg/v/d)	0,87	0,88	0,90	0,88	0,117	NS
L ⁵ (%)	4,75	4,69	4,62	4,62	0,206	NS
L (Kg/v/d)	1,18	1,23	1,20	1,15	0,160	NS
SNG ⁶ (%)	8,92	8,92	8,80	8,86	0,289	NS
SNG (Kg/v/d)	2,12	2,33	2,27	2,20	0,276	NS
ST ⁷ (%)	13,51	13,39	13,55	13,59	0,758	NS
ST(Kg/v/d)	3,35	3,50	3,49	3,36	0,365	NS
RCS ⁸ (mil/ml)	48,30	204,44	56,90	35,36	251,74	NS
AFM1 ⁹ (ppt)	0c	1627bc	1750b	2088a	334,18	0.0001

¹ECM = Leche Corregida por Energía

²LCG4% = Leche Corregida al 4% de Tenor Graso

³G = Grasa Butirosa

⁴P = Proteínas Lácteas

⁵L = Lactosa

⁶SNG = Sólidos No Grasos

⁷ST = Sólidos Totales

⁸RCS = Recuento de Células Somáticas

⁹AFM1 = Aflatoxina M1

Como resultado general se puede decir que la producción de leche llegó a los 25 lt/v/d, que fue lo planeado con la dieta ofrecida. Los niveles de grasa, proteína y lactosa resultaron acordes a lo esperado según la dieta media ofrecida.

No se encontraron diferencias significativas en cuanto a la producción de leche por vaca por día, entre los 4 tratamientos estudiados, al igual que lo expuesto por Kutz et al. (2009) utilizando concentraciones de 112 ppb. No coincidiendo esto con lo mencionado por Withlow y Hagler (s.f.), Applebaum et al. (1982), Arellano (2003) quienes afirman que 433, 100 y 120 ppb respectivamente provocaron disminuciones en la producción de leche.

En el caso del contenido de las proteínas lácteas (P) no se registraron efectos de las dietas contaminadas ni del uso de secuestrantes. Según De Luca la presencia de la micotoxina en dieta puede causar una inhibición de la síntesis proteica haciendo que disminuya la síntesis de proteína en el animal. De todas maneras en este ensayo no se registraron diferencias significativas en este componente entre los tratamientos evaluados.

Con respecto a la producción de grasa butirosa (G) tampoco se registraron diferencias estadísticas entre tratamientos, pero si se observó una leve tendencia a un mayor porcentaje de ésta en el tratamiento limpio, y donde se utilizó la mezcla de Biotox y Mycosorb y también en el tratamiento donde se utilizó Mycosorb. O sea una leve tendencia a la disminución en el tratamiento Sucio, es decir contaminado y sin uso de secuestrante. Según De Luca (s.f.) las aflatoxinas pueden afectar la motilidad del rumen provocando como consecuencia una menor producción de ácidos grasos volátiles traduciéndose en una menor producción de grasa en leche. Esta podría ser la explicación de esa leve tendencia a un menor tenor de grasa del tratamiento sucio.

En cuanto a la leche corregida por grasa (LCG4%) y leche corregida por energía (ECM) tampoco se registraron diferencias entre tratamientos, aunque si existió una leve tendencia a una mayor producción en los tratamientos Sucio y en el tratamiento con Mycosorb respecto del resto. Teniendo esto una relación con la mayor producción de leche de los tratamientos mencionados anteriormente.

En cuanto al contenido de Sólidos Totales (ST), los tratamientos con secuestrantes mostraron una tendencia a un mayor contenido. Esto podría asociarse a un mayor porcentaje de grasa y proteína en la leche. De todas formas para este componente de rendimiento en leche no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados.

Para los componentes Lactosa (L) y Sólidos No Grasos (SNG) no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos. De todas maneras se nota una tendencia a mayor cantidad de éstos sólidos en los tratamientos limpio y sucio. Cabe destacar que no fue encontrada bibliografía que indique un posible efecto de las aflatoxinas sobre estos componentes de la leche.

Para el componente recuento de células somáticas (RCS) no se registraron diferencias significativas entre tratamientos, pero sí se observa una clara tendencia a una disminución del recuento cuando se utilizaron secuestrantes, siendo esta tendencia algo más marcada con la utilización de la mezcla Biotox y Mycosorb. El tratamiento Sucio, mostró una visible tendencia a alto contenido de células somáticas en la leche. El conteo de células somáticas puede ser afectado por la presencia de aflatoxinas, las cuales tienen un efecto sobre el sistema inmunológico haciendo que los animales se encuentren más susceptibles frente a diferentes infecciones (Gimeno, 2011).

En cuanto al contenido de Aflatoxina M1 en leche (AFM1), se encontraron diferencias significativas entre tratamientos. En el tratamiento Limpio no se detectó presencia de AflaM1 en leche. Por otra parte el tratamiento Sucio no difirió significativamente del tratamiento Mycosorb, sin embargo si hubieron diferencias significativas entre estos dos respecto al tratamiento Mycosorb + Biotox. En este último se encontró una mayor concentración de AflaMF1 en leche. Estos resultados no concuerdan con la bibliografía consultada. En un estudio realizado con Devegowda et al. (s.f.), con el absorbente Mycosorb, se observó una disminución de alrededor del 80% en cuanto a la presencia de AflaM1 en leche.

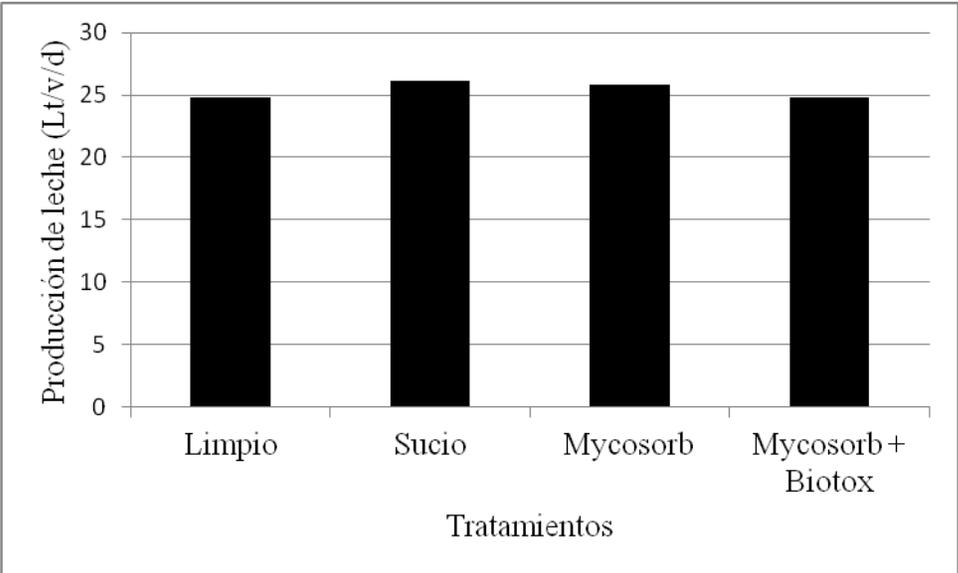
Difiriendo de los resultados obtenidos en nuestro ensayo con el uso de secuestrantes en base a glucomananos esterificados (Mycosorb) y con la mezcla de éste con un aluminosilicato (Mycosorb+ Biotox) los cuales no resultaron efectivos en la disminución de AflaM1 en leche; en un ensayo realizado por Kutz et al. (2009) en el cual se utilizaron 3 adsorbentes diferentes; Solis , Novasil Plus (ambos aluminosilicatos cálcico sódicos) y MTB-100 (una pared de levadura basado en *Cerevisiae Saccharomyces*), todos ellos utilizados al 0,56%. Comparando con el tratamiento únicamente con AflaB1, la excreción de AflaM1 en leche disminuyó por la adición de Solis y Novasil Plus, siendo este tipo de adsorbentes efectivos, mientras que la adición de MTB-100 para la disminución de AflaB1 no resultó efectiva en reducir la AflaM1 en leche.

Cuadro No. 10: Eficiencia de utilización de los nutrientes para producir un litro de leche según tratamiento

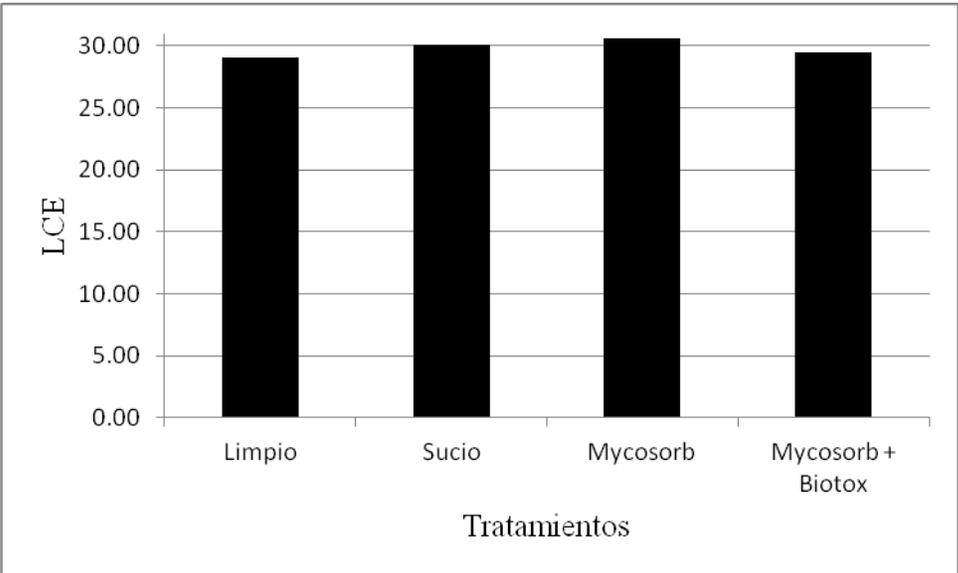
	Limpio	Sucio	Mycosorb	Mycosorb + Biotox
Kg MS/lt LCE	0,71	0,68	0,67	0,70
Kg MS/lt LCG	0,77	0,73	0,72	0,75

En cuanto al análisis podemos decir que para ambos parámetros medidos, no hubieron demasiadas diferencias entre tratamientos por lo cual la presencia de AflaB1 no tuvo efecto, con estas dosis diarias ofrecidas, sobre la utilización de la materia seca y su posterior transformación en leche. Por lo tanto como conclusión podemos decir que la eficiencia energética bruta no resultó afectada por los tratamientos evaluados.

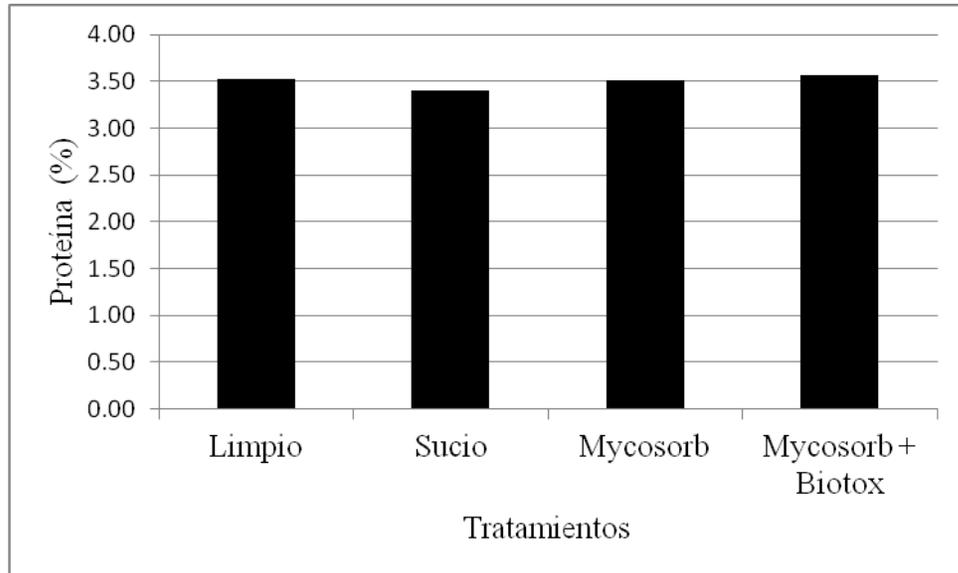
Figura No. 5: Producción de leche según tratamientos



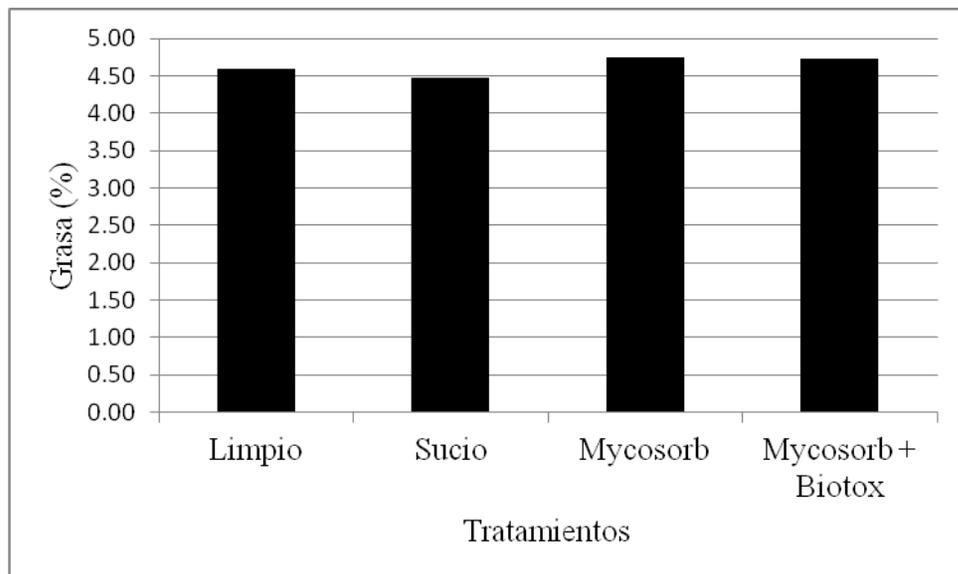
Gráfica No. 6: Leche corregida por energía según tratamientos



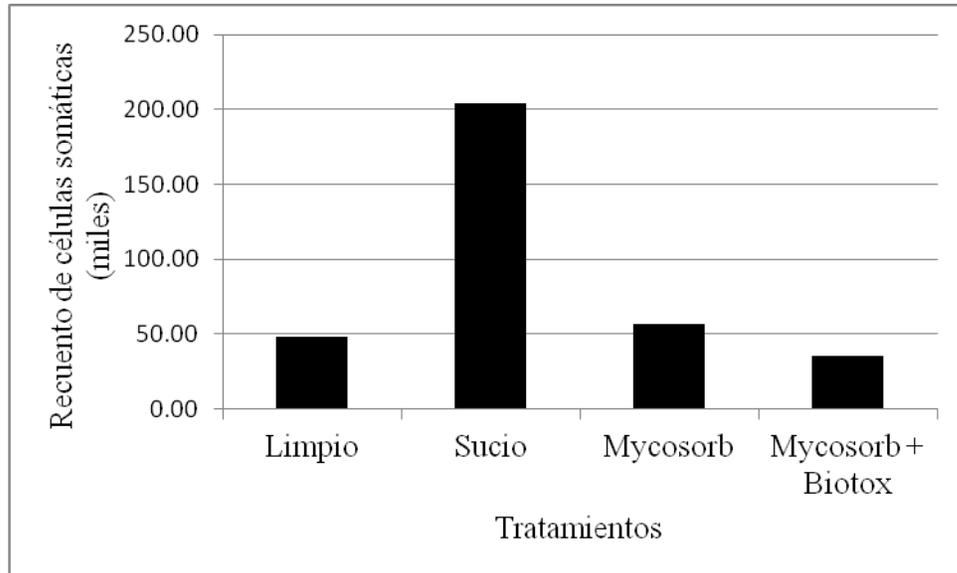
Gráfica No. 7: Porcentaje de proteína según tratamientos



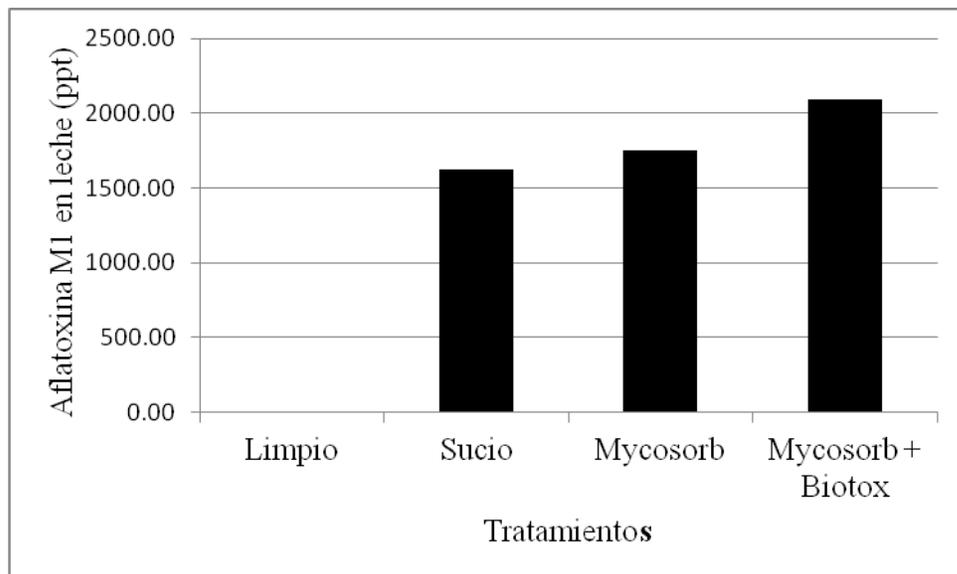
Gráfica No. 8: Porcentaje de grasa según tratamientos



Gráfica No. 9: Recuento de células somáticas en leche según tratamientos.



Gráfica No. 10: Aflatoxina M1 en leche según tratamientos.



4.2.2. AflaB1 total en alimentos y presencia de AflaM1 en leche

En el siguiente cuadro se muestran las medias de cada variable en cada tratamiento y las diferencias significativas presentes en las mismas.

Cuadro No. 11: Aflatoxina presente en alimentos y en leche.

Parámetro	Limpio	Sucio	Mycosorb	Mycosorb + Biotox	E.E.M	Pr>α
AflaB1 alimento (ppb)	10,4	10,4	10,4	10,4	0,000	NS
AflaB1 agregada (ppb)	0b	100a	100a	100a	0,000	<0,001
AflaB1 total en alimento (ppb)	10,4b	110,4a	110,4a	110,4a	0,000	<0,001
AflaM1 leche (ppt)	0c	1.627bc	1.750b	2.088a	334,070	0,0001
Tasa de biotransformacion AFM1/AFB1 (%)	0c	1,88b	1,98ab	2,30a	0,441	<0,05

Con respecto a la variable AflaB1 en alimento, podemos decir que no se registraron diferencias significativas entre tratamientos ya que todos los componentes de la dieta eran suministrados de la misma fuente para todos los tratamientos, por lo cual la AflaB1 presente promedio fue la misma en todos los casos.

En cuanto a la AflaB1 agregada como se puede apreciar en el cuadro, el tratamiento que difiere significativamente es el Limpio respecto a los demás, ya que a éste no se le incorporo AflaB1 a la dieta. También se puede apreciar la misma diferencia significativa en la variable AflaB1 total debido a lo mencionado anteriormente.

En cuanto a la relación de AflaB1 presente en el alimento y la AflaM1 presente en leche podemos decir que se registraron diferencias estadísticas entre los tratamientos. El tratamiento Mycosorb + Biotox registró la mayor proporción encontrada en leche (2,3%), estando por encima de los demás tratamientos, siguiéndole el tratamiento Mycosorb (1,9%), luego el tratamiento Sucio con 1,8% de AflaM1 en leche en relación a la AflaB1 ingerida. De todos modos no se registraron diferencias en la tasa de biotransformación de AflaB1 en AflaM1 entre los tratamientos con secuestrantes, ni entre los tratamientos Sucio y Mycosorb

Se puede observar que con el suministro de 100 ppb en la dieta de AflaB1, esta fue capaz de aparecer en leche, coincidiendo esto con lo citado por Basurto Kuba (s.f.) quién mostró que en ganado lechero consumiendo entre 50-100 ppb AflaB1 alguna parte

escapara de la degradación ruminal y puede biotransformarse en AflaM1 y aparecer en leche.

En este ensayo se obtuvo un rango entre 1,5-2,5% de AflaM1 en leche en relación a la AflaB1 en alimento. Estos valores coinciden con los rangos citados por Denli et al. (s.f.), Chi y Broomhead (s.f.), Frobish et al. (1986), Arellano (2003), Rossi et al. (2009), Fernandes de Olivera et al. (2010).

Ensayos realizados in vivo con aluminosilicato como adsorbente (Bentonita) citados por Pérez et al. (2011), demostraron que la actividad de éste depende también de la matriz alimenticia, principalmente el pH ruminal y el tiempo de retención en el sistema digestivo, además de enzimas digestivas y otras sustancias del tracto gastrointestinal.

Tanto el uso del secuestrante Mycosorb así como la mezcla de Mycosorb + Biotox, no lograron secuestrar la AflaB1 presente en dieta, por lo que se encontró una alta proporción de AflaM1 en leche. No coincidiendo esto con el ensayo realizado por Devegowda et al. (s.f.) donde a vacas de segunda lactancia se les suministró una dieta base con 110 ppb AflaB1, dentro de este a un grupo se le suministró Mycosorb, y se observó una disminución en torno al 80% de AflaM1 en leche.

5. CONCLUSIONES

El uso de Mycosorb a razón de 10 g/v/día y de una mezcla de Mycosorb y Biotox usados a razón de 10 más 20 g/v/día respectivamente, no lograron controlar la aparición de Aflatoxina M1 en leche. El uso de la mezcla de Mycosorb y Biotox presentó la menor efectividad en el control de aparición de Aflatoxina M1 en leche.

El suministro de una dieta base conteniendo 110 ppb de Aflatoxinas no afectó el consumo total de alimento.

La producción media de leche del experimento se situó en el entorno de los 25 L de leche por vaca al día, y ésta no resultó afectada por la presencia de 110 ppb de Aflatoxina en el alimento, ni por la utilización de los secuestrantes Mycosorb o una mezcla de Mycosorb y Biotox. Tampoco resultaron afectadas las producciones medias de leche corregida al 4% de tenor graso (LCG4%) ni la leche corregida por energía (LCE).

Los contenidos de grasa butirosa, proteínas lácteas, lactosa, sólidos no grasos ni sólidos totales resultaron afectados por el suministro de una dieta conteniendo 110 ppb de Aflatoxinas ni por el uso de los secuestrantes Mycosorb o una mezcla de Mycosorb y Biotox.

El recuento de células somáticas en leche no resultó afectado por la presencia de Aflatoxinas en dieta ni por el uso de los secuestrantes Mycosorb o una mezcla de Mycosorb y Biotox.

La tasa media de biotransformación de Aflatoxinas dietarias en Aflatoxina M1 en leche resultó de 1,88; 1,98 y 2,30% para los tratamientos Sucio, Mycosorb y Mycosorb + Biotox respectivamente. Este indicador no resultó afectado por el uso del secuestrante Mycosorb, aunque el uso de la mezcla de Mycosorb y Biotox resultó en la menor eficiencia de control de la presencia de Aflatoxina M1 en leche.

6. RESUMEN

Las Aflatoxinas son los compuestos naturales con mayor poder cancerígeno conocidos, por lo que todas las medidas de eliminación o mitigación de sus efectos son activamente buscados. Con la finalidad de evaluar la capacidad de mitigar o eliminar la presencia de Aflatoxina M1 en leche se planteó en La Estanzuela un trabajo de desafío con micotoxinas en la dieta de vacas lecheras en lactancia media y el uso de dos agentes secuestrantes. Se utilizaron 12 vacas de parición de otoño, y un diseño experimental de Cuadrado Latino con 4 tratamientos y 4 períodos de alimentación controlada de 1 semana de duración cada uno, con 3 repeticiones. Se evaluaron cuatro tratamientos: 1) Limpio, sin agregado de Aflatoxinas a la dieta, 2) Sucio con el agregado de 100 ppb en dieta, 3) Mycosorb, con el agregado de 100 ppb de Aflatoxinas en dieta más 10 g/v/d del agente Mycosorb y 4) Mycosorb + Biotox (Aluminosilicato), con agregado de 100 ppb de Aflatoxina en dieta más el agregado de un agente mezcla de Mycosorb y Biotox a razón de 10 y 20 g/v/d respectivamente. Los niveles de Aflatoxina M1 en leche alcanzaron a los 0; 1,63; 1,75 y 2,09 ppt, para los tratamientos 1 a 4 respectivamente. Ni el Mycosorb ni la mezcla de Mycosorb y Biotox resultaron efectivas para reducir la aparición de Aflatoxina M1 en leche. La mezcla de Mycosorb y Biotox mostró un peor desempeño. El consumo total de alimento, la producción de leche, el contenido de sólidos, el rendimiento de sólidos lácteos ni el recuento de células somáticas resultaron afectados por la presencia de Aflatoxina en el alimento. La tasa de bioconversión de Aflatoxina del alimento en Aflatoxina M1 fue de 1,88; 1,89 y 2,30% para los tratamientos 2, 3 y 4 respectivamente. Mycosorb no redujo esta eficiencia y la mezcla de Mycosorb y Biotox presentó la menor capacidad para reducir esta tasa de bioconversión.

Palabras clave: Aflatoxinas; Secuestrantes.

7. SUMMARY

Aflatoxins are the most carcinogenic natural compounds known, so any procedure or tool for the reduction of its presence in milk is heavily sought by the dairy industry. With the purpose of evaluating the efficiency of two sequestering agents, a feeding trial challenging 12 mid lactation dairy cows was carried out at La Estanzuela. A Latin Square experimental design, testing 4 treatments, 4 weekly controlled feeding periods and 3 replicates was used. Treatments were: 1) Clean, no Aflatoxins added to the basal diet, 2) Contaminated, 100 ppb of added Aflatoxins diet was offered, 3) Mycosorb, a 100 ppb Aflatoxin contaminated diet was offered plus 10 g/c/d Mycosorb added and 4) Mycosorb + Biotox (Aluminosilicate) 100 ppb Aflatoxin contaminated diet plus 10 and 20 g/v/d of Mycosorb and Biotox added respectively were offered. Contents of Aflatoxin M1 in milk were 0; 1,63; 1,75 and 2,09 ppt for treatments 1, 2, 3 and 4 respectively. Mycosorb did not reduce the appearance of Aflatoxin M1 in milk and the mixture of Mycosorb and Biotox had the worst performance. Total dry matter intake, milk yield, milk solids content, milk solids yield and somatic cell count were not affected by the presence of Aflatoxin in the diet or the use of sequestering agents. The bioconversion efficiency of dietary Aflatoxin into Aflatoxin M1 in milk were 1,88; 1,89 and 2,30% for treatments 2, 3 and 4 respectively. Mycosorb was unable to affect the bioconversion efficiency of dietary Aflatoxin into milk Aflatoxin M1 and the mixture of Mycosorb and Biotox showed the worst performance.

Keywords: Aflatoxins; Sequestering agents.

8. BIBLIOGRAFIA

1. ABARCA, M.L.; BERRANDA, H.; BRAGULAT, M.R.; BURDASPAL, P.A.; CABAÑES, F.J.; CARVAJAL, M.; CASTELLA, G.; CATALA, A.I.; CATALA, P.; DRAGASSI, S. FERNANDEZ, M.; FERRER, E.; FONT, G.; GONZALEZ, L.; CARCIA, C.J.; LOPEZ, A.; LORI, G.A.; MAÑEZ, J.; SILLUE, S.M.; MOLOTÓ, J.C.; PASIN, A.; PERALTA, C.E.; RAMOS, A.J.; RESNIK, S.; RIZZO, I.; RUIZ, M.J.; SANCHIS, V.; SORIANO DEL CASTILLO, J.M.; ZAKHIA, N.; ZINEDINE, A. 2007. Micotoxinas en alimentos. (en línea). s.l., Ediciones Díaz de Santos. pp. 3-4. Consultado 26 mar. 2012. Disponible en <http://www.diazdesantos.es/wwwdat/pdf/SP0410003885.pdf>
2. ABBITT, B.; COTTER, S.R.; MURPHY, M.J.; RAY, A.C.; REAGOR, J.C.; ROBINSON, R.M.; WEST, J.E.; WHITFORD, H.W. 1986. Bovine abortion and death associated with consumption of aflatoxin-contaminated peanuts. J. of Amer. VMA. 188 (10): 1187-1188.
3. ACOSTA, Y. M.; MIERES, J. M.; LA MANNA, A. A. s.f. Micotoxinas en alimentos para el ganado; alternativas para la mitigación de efectos adversos y criterios para la utilización más segura de alimentos contaminados. (en línea). s.n.t. pp. 1-4. Consultado 20 dic. 2011. Disponible en http://www.inia.org.uy/estaciones/la_estanzuela/actividades/documentos/micotoxinas_alimento_ganado_y_algunos_criterios_utilizacion_alimentos_contaminados_new.pdf
4. AGRIOS, G. N. 2005. Plant pathology. 5th. ed. s.l., Elsevier. pp. 412-417.
5. ANDERSON, J.G.; LEWIS, C.W.; SMITH, J.E.; SOLOMONS, G.L. 1994. Mycotoxins in human health. Brussels, s.e. s.p.
6. APPLEBAUM, R.; BRACKETT, R.; WISEMAN, D.; MARTH, E. 1982. 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. 141: 1504-1508.
7. ARELLANO, J. L. 2003. Métodos de determinación, identificación y control de micotoxinas en ingredientes para la nutrición animal. (en línea). México, s.e. s.p. Consultado 30 abr. 2012. Disponible en <http://www.engormix.com/MA-micotoxinas/articulos/metodos-determinacion-identificacion-control-t300/p0.htm>

8. ARMIJO, C.; CALDERON, J. 2009. Esquema de acciones para evitar, controlar y desinfectar productos de hongos y aflatoxinas. (en línea). Rev. Per. Quím. Ing. Quím. 12 (2): 15-24. Consultado 20 dic. 2011. Disponible en http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/publicaciones/ing_quimica/v12_n2/pdf/a03v12.pdf
9. ASSOCIATION OF THE OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). 1984. Official methods of analysis of the Association of Official Agricultural Chemical. 14th. ed. Washington, D.C. 1102 p.
10. AYDIN, A.; GUNSEN, U.; DEMIREL, S. 2008. Total aflatoxin B1 and ochratoxin A levels in Turkish wheat flour. J. Food and Drug Analysis. 16(2): 48-53.
11. BASURTO KUBA, V.M. s.f. Micotoxinas en becerras. (en línea). s.l., Promote Country Manager Cargill Animal Nutrition. pp. 1 - 12. Consultado 30 abr. 2012. Disponible en <http://cofocalec.org.mx/admin/uploads/files/MICOTOXINAS%20EN%20BECERRAS.pdf>
12. BAUZA, R. 2007. Las Micotoxinas, una amenaza constante en la alimentación animal. (en línea). s.n.t. pp. 21 - 28. Consultado 30 abr. 2012. Disponible en http://www.fagro.edu.uy/~suinos/apoyo_prod/alimentacion/Bauza,2007_Micotoxinas.pdf
13. BETINA, V. 1989. Mycotoxins; chemical, biological and environmental aspects. Amsterdam, Elsevier. v.9, pp. 114-120.
14. BUENO, D. J. 2011. Utilización de secuestrantes de micotoxinas. (en línea). s.n.t. s.p. Consultado 19 abr. 2012. Disponible en http://www.wattagnet.com/Utilización_de_secuestrantes_de_micotoxinas.html
15. BUTKERAITIS, P.; DOS SANTOS, I.; RODRIGUEZ, V. 2008. El efecto de las micotoxinas en rumiantes. (en línea). s.n.t. pp. 1 - 4. Consultado 30 abr. 2012. Disponible en <http://www.produccion-animal.com.ar>
16. CARMONA, G. s.f. Mitos y realidades sobre las micotoxinas en el ganado lechero. (en línea). s.n.t. pp. 1 - 16. Consultado 30 abr. 2012. Disponible en http://www.miganaderia.com/index.php?option=com_content&view=arti

[cle&id=4:mitos-y-realidades-sobre-las-micotoxinas-en-el-ganado-lechero&catid=1:biblioteca&Itemid=36](#)

17. CEPEDA, A.; CAMEAN, A. M.; HERRERA, A.; MARTINEZ, M. R.; PASEIRO, P.; BIESA, P. 2011. Informe del comité científico de la Agencia Española de Seguridad alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación al efecto de la población española de la derogación de la normativa nacional sobre límites máximos permitidos para las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en alimentos. (en línea). s.n.t. pp. 27 - 42. Consultado 30 abr. 2012. Disponible en http://www.gencat.cat/salut/acsa/html/ca/dir2949/aflatoxinas_6_final.pdf
18. CHI, F.; BROOMHEAD, J. Micotoxinas y vacas lecheras. Una revisión para productores de leche. (en línea). Chicago, Amlan Internacional. pp. 1 - 10. Consultado 18 abr. 2012. Disponible en http://www.amlan.com/spanish/downloads/WP_Dairy_SP.pdf
19. CORNEJO, J.; VILLAROEL, O.; Antecedentes generales sobre las aflatoxinas y otras micotoxinas y elementos a tener en cuenta para el diseño de prácticas de cultivo y elaboración de nueces. (en línea). s.n.t. pp. 1- 33. Consultado 20 dic. 2011. Disponible en <http://www.minsal.gob.cl/portal/url/item/72fd6274dad8792ee04001011f0109e4.pdf>
20. COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY (CAST). 1989. Mycotoxins; economic and health risks. Ames, Iowa. 200 p. (Task Force Report no. 116).
21. _____. 2003. Mycotoxins; risks in plant, animal, and human systems. Ames, Iowa. 200 p. (Task Force Report no. 139).
22. DE LUCA, L.J. s.f. Micotoxinas. (en línea). Buenos Aires, Laboratorios Burnet. Catedra de Producción Láctea. pp. 1 - 6. Consultado 26 abr. 2012. Disponible en <http://www.engormix.com/MA-micotoxinas/articulos/micotoxinas-laboratorios-burnet-t464/255-p0.htm>
23. _____. 2002. Micotoxicosis. (en línea). Buenos Aires, Laboratorios Burnet. s.p. Disponible en <http://www.produccion-animal.com.ar>
24. DE MARIA, P.; MAURIS, V.; POSE, H.; SABBIA, J. 2008. Micotoxinas en ganado lechero; manual práctico. Montevideo, s.e. pp. 8-14.

25. DE MENDIBURU, F. 2007. Cuadrado latino. (en línea). s.n.t. s.p. Consultado 17 abr. 2012. Disponible en <http://tarwi.lamolina.edu.pe/~fmendiburu/index-filer/academic/design/Latino.pdf>
26. DENLI, M.; BLANDON, J.C.; SALADO, S.; PEREZ, J.F.; CALSAMIGLIA, S. s.f. Efecto de un adsorbente de micotoxinas (Afladetox) en la ración de vacas lecheras sobre la concentración de aflatoxina M1 en la leche. (en línea). Barcelona, s.e. 3 p. Consultado 20 dic. 2011. Disponible en http://www.aida-itea.org/jornada38/nutricion/alimentacion_vacuno/pa_i-3_denli.pdf
27. _____.; PEREZ, J.F. 2006. Contaminación por micotoxinas en los piensos; efectos, tratamiento y prevención. (en línea). In: Concurso de Especialización FEDNA (22º, 2006, Barcelona). Textos. Barcelona, s.e. pp. 1 - 17. Consultado 30 abr. 2012. Disponible en http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/intoxicaciones/72-06CAP_I.pdf
28. DEVEGOWDA, G.; MURTHY, T.N.K.; RAMESH, A. s.f. Mejoramiento de la producción de leche modulado por mycosorb® y disminución del residuo de aflatoxina M1 en vacas lecheras. (en línea). Bangalore, s.e. s.p. Consultado 18 abr. 2012. Disponible en <http://www.knowmycotoxins.com/es/documents/BovinosMycosorb-Devegowda-SP.pdf>
29. DÍAZ, D. 2005. The Mycotoxin blue book. Nottingham, Nottingham University Press. 349 p.
30. DRAGACCI, S.; GROSSO, F. 2001. Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography for determination of aflatoxin M1 in liquid milk. J of AOAC Int. 84 (2): 437-443.
31. FERNANDES DE OLIVEIRA, C. A.; SOARES, L.; FAGUNDES, H.; ROSIN, R. E.; FERNANDES, A. M. 2010. Determinación de afla B1 en raciones y afla m1 en la leche en establecimientos lecheros del estado de San Pablo. (en línea). San Pablo, s.e. pp. 221 - 225. Consultado 13 may. 2012. Disponible en http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20612010000500034&script=sci_arttext
32. FUNDACION VASCA PARA LA FUNDACION ALIMENTARIA (ELIKA). 2007. Aflatoxina M1 en leche. (en línea). s.n.t. s.p. Consultado 19 abr. 2012. Disponible en

[http://www.elika.net/datos/riesgos/Archivo_EU10/informe%20aflatoxina M1%20ene%2007.pdf](http://www.elika.net/datos/riesgos/Archivo_EU10/informe%20aflatoxina%20M1%20ene%2007.pdf)

33. GAINES, W. L.; DAVIDSON, F. A. 1923. Relation between percentage fat content and yield of milk. Correction of milk yield for fat content. (en línea). Urbana, University of Illinois. Agricultural Experiment Station. s.p. Consultado 4 jun. 2012. Disponible en <https://www.ideals.illinois.edu/bitstream/2142/3304/1/relationbetweenp00gain.pdf>
34. GEORING, H. K.; VAN SOEST, P.L. 1970. Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications). Washigton, D. C., U.S. Government Printing Office. s.p. (Agriculture Handbook no. 379).
35. GIMENO, A. 2005. Aflatoxina M1 en la Leche. Riesgos para la Salud Pública, prevención y control.(en línea). Miami, FL, s.e. Consultado 30 abr.2012. Disponible en <http://www.engormix.com/MA-micotoxinas/articulos/aflatoxina-leche-riesgos-salud-t372/p0.htm>
36. _____; MARTINS, M.L. 2011. Micotoxinas y micotoxicosis en animales y humanos. (en línea). 3ª. ed. Miami, FL, s.e. Consultado 30 abr. 2012. Disponible en <http://specialnutrients.com/pdf/book/3%20edicion%20MICOTOXINAS%20LR%20Secure.pdf>
37. GUTHRIE, L.D. 1979. Effects of Aflatoxin in corn on production and reproduction in dairy cattle. J Dairy Sci. 62 (abstr.):134.
38. HUSSAIN, I.; ANWAR, J. 2007. A studie on contamination of aflatoxin M1 in raw milk in the punjab province of Pakistan. (en línea). F Control. 19 (4): 393-395. Consultado 10 may. 2012. Disponible en <Http://www.sciencedirect.com.proxy.timbo.org.uy:443/science/journal/09567135/19/4>
39. JOBIM, C.C.; GONÇALVES, G.D.; SANTOS, G.T. 2001. Qualidade sanitária de grãos e de forragens conservadas “versus” desempenho animal e qualidade de seus produtos. (en línea). In: Simpósio sobre Produção e Utilização de Forragens Conservadas (2001, Maringá). Trabalhos apresentados. s.n.t. pp. 242-261. Consultado 18 abr. 2012. Disponible en <http://www.nupel.uem.br/desempenho.pdf>

40. JOUANY, J. P. 2001. The impact of mycotoxins on performance and health of dairy cattle. (en línea). *In: Alltech's Annual Symposium (17th., 2001, Nottingham). Proceedings. Champanelle, s.e. s.p. Consultado 18 abr. 2011.*
Disponible en
<http://www.cabi.org/cabdirect/FullTextPDF/2006/20063209790.pdf>
41. KARL, A., DAWSON, J.E., KUDUPOJE, M. 2001. Understanding the adsorption characteristics of yeast cell wall preparations associated with mucotoxin binding. *In: Alltech's Annual Symposium (17th., 2001, Nottingham). Proceedings. Champanelle, s.e. pp. 169-181.*
42. KUTZ, R.E.; SAMPSON, J.D.; POMPEN, L.B.; LEDOUX, D.R.; SPAIN, J.N. VAZQUEZ-AÑON, M. 2009. Efficacy of solis, novasil plus, and MTB-100 to reduce aflatoxin M1 levels in milk of early to mid lactation dairy cows fed aflatoxin B1. *J. Dairy Sci. 92 :3959–3963.*
43. MALLMAN, C. A.; DILKIN, P.; TYSKA, D.; MALLMAN, A .O. s.f. Micotoxinas, inmunidad y conceptos de control. (en línea). s.n.t. pp. 1 - 9. Consultado 26 abr. 2012. Disponible en
http://www.lamic.ufsm.br/papers/micotoxinas_mallman-AMEVEA.pdf
44. MERTENS, D.R.; WATT. R.D. 1977. Acute aflatoxicosis in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci. 60 (Suppl. 1):153-154.*
45. MIERES, J.M. 2004. Guía para la alimentación de ruminates. Montevideo, INIA. pp. 2-65 (Serie Técnica no. 142).
46. MOSS, M.O. 1992. Secondary metabolism and food intoxication-moulds. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl. 73:80–88.*
47. PATERSON, D.S.P.; ANDERSON, P.H. 1982. Recent Aflatoxin feeding experiments in cattle. *Vet. Rec. 110: 60.*
48. PEREZ HERNADEZ, J. F.; DENLI, M. 2011. Evaluación de un adsorbente de micotoxinas de nueva generación como aditivo en el pienso se animales en renta. (en línea). Barcelona, Universidad Autónoma de Barcelona. pp. 73-74. Consultado 31 may. 2012. Disponible en
<http://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/48521/jcbm1de1.pdf?sequence=1>

49. RAMOS, A.; HERNANDEZ, E. 1997. Adsorción in vitro de aflatoxinas mediante la utilización de compuestos adsorbentes montmorillonita. *Rev. Iberoam. Micol.* 14:72-77.
50. RODRIGUEZ, M.; SALA, A.; SALAZAR, P. s.f. Aflatoxinas. (en línea). s.l., Universidad de Los Andes. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Cátedra de Toxicología. s.p. Consultado 21 mar. 2012. Disponible en <http://webdelprofesor.ula.ve/farmacia/lunajr/escuela/aflatoxina.ppt>
51. ROSSI, F.; RIGHI, F.; FUOCHI, S.; QUARANTELLI, A. 2009. Effects of mycotoxins on fertility of dairy cow. (en línea). *Ann. Fac. Medic. Vet. di Parma.* 29: 153 -166. Consultado 10 may. 2012. Disponible en <http://www.unipr.it/arpa/facvet/annali/2009/rossi.pdf>
52. RUBI, M C.; SHARLLI, M. C. s.f. Uno de los principales retos actuales, en el ámbito mundial es la producción de alimentos libres de micotoxinas. (en línea). s.n.t. pp. 1 - 36. Consultado 30 abr. 2012. Disponible en http://cdigital.dgb.uanl.mx/te/1080124368/1080124368_02.pdf
53. SHARMA, R. 1993. Immunotoxicity of mycotoxins. *J of Dairy Sci.* 76: 892-897.
54. STARKL, V. 2008. Biotransformación, adsorción, bioprotección; tres estrategias combinadas garantizan el éxito en el control de micotoxinas. (en línea). s.n.t. s.p. Consultado 19 abr. 2012. Disponible en <http://www.engormix.com/MA-micotoxinas/articulos/biotransformacion-adsorcion-bioproteccion-tres-t2110/251-p0.htm>
55. SULTANA, N.; HANIF, N. Q. 2009 Mycotoxin contamination in cattle feed and feed ingredient. (en línea). Rawalpindi, Romer Labs. pp. 211-213. Consultado 8 may. 2012. Disponible en http://www.pvj.com.pk/pdf-files/29_4/211-213.pdf
56. TAPIA SALAZAR, M.; GARCIA PEREZ, O. D.; LOPEZ, M. N; RICQUE-MARIE, D.; VILLARREAL-CAVAZOS, D.; CRUZ-SUAREZ, L. E. s.f. Usos de secuestrantes para disminuir la toxicidad de micotoxinas en alimentos para acuicultura. Programa Maricultura. (en línea). México, Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas. pp. 514 - 546. Consultado 18 abr. 2012. Disponible en http://www.uanl.mx/utilerias/nutricion_acuicola/X/archivos/20-MireyaTapia.pdf
57. VAN EGMOND, H. P. 1989. *Mycotoxins in dairy products.* London, Elsevier. pp. 1-10.

58. VAN SOEST, P. J. 1963. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. J. Assoc. Official Agr Chem. 46 (5): 829.
59. VELDMAN, A. 1992. Effect of sorbentia on carry-over of aflatoxin from cow feed to milk. Milchwissenschaft. 47: 777-780.
60. WALLACE HAYES, A. 1981. Mycotoxin teratogenicity and mutagenicity. Boca Raton, FL, CRC. pp. 44 - 46.
61. WANG, P.; AFRIYIE-GYAWU, E.; TANG, Y.; JOHNSON, N.; XU, L.; TANG, L.; HUEBNER, H.; ANKRAH, N.-A.; OFORI-ADJEI, D.; ELLIS, R.W.; JOLLY, P.; WILLIAMS, J.; WANG, J.-S.; PHILLIPS, T.D. 2008. NovaSil clay intervention in Ghanaians at high risk for aflatoxicosis; II. Reduction in biomarkers of aflatoxin exposure in blood and urine. F Add. and Cont. 25: 622-634.
62. WHITLOW, L.W.; HAGLER, W. M. s.f. An association of mycotoxins with production, health and reproduction in dairy cattle and guidelines for prevention and treatment. (en línea). s.n.t. pp. 401 - 419. Consultado 2 may. 2012. Disponible en <http://en.engormix.com/MA-mycotoxins/articles/association-mycotoxins-production-health-t702/DL%20-p0.htm>
63. WINFREE, R.; ALLRED, A. 1992. Bentonite reduces measurable aflatoxin B1 in fish feed. Progr.F-Cult. 54:157-162.
64. YIANNIKOURIS, A.; JOUANY, J.P. 2002. Les mycotoxines dans les aliments des ruminants, leur devenir et leurs effets chez l'animal. (en línea). INRA Prod. Anim. 15(1): 3-16. Consultado 19 abr. 2012. Disponible en http://www6.inra.fr/.../Prod_Anim_2002_15_1_01.pdf
65. ZAVIEZO, D. 2011. Micotoxinas. Impacto productivo y riesgos de residuos en producción lechera. (en línea). Puerto Varas, s.e. s.p. Consultado 5 jun. 2012. Disponible en http://www.feednews.cl/neo_2011/pdf/pv/6%20DOUGLAS%20ZAVIEZO-%20Micotoxinas%20Produccion-Residuos%20Leche%2011-11%20DZ.pdf

9. ANEXOS

ANOVAS de Tratamientos

Procedimiento GLM

Información de nivel de clase

Clase	Niveles	Valores
Trat	4	Limpio Myco_Bio Mycosorb Sucio
Semana	4	B C D E
Rep	3	1 2 3

Número de observaciones leídas	48
Número de observaciones usadas	48

ANOVAS de variable dependiente: Leche

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	17	345.8274542	20.3427914	2.13	0.0343
Trat	3	17.8785083	5.9595028	0.62	0.6055
Semana	3	10.2778250	3.4259417	0.36	0.7835
Trat*Semana	9	78.0512583	8.6723620	0.91	0.5319
Rep	2	239.6198625	119.8099312	12.53	0.0001
Error	30	286.8386708	9.5612890		
Total correcto	47	632.6661250			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Mlk Media
0.546619	12.16358	3.092133	25.42125

ANOVAS de variable dependiente: Leche corregida por energía (ECM)

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	17	450.5771418	26.5045378	2.38	0.0183
Trat	3	17.4188623	5.8062874	0.52	0.6707
Semana	3	30.1468770	10.0489590	0.90	0.4513
Trat*Semana	9	166.6366783	18.5151865	1.66	0.1423
Rep	2	236.3747242	118.1873621	10.62	0.0003
Error	30	333.9367263	11.1312242		
Total correcto	47	784.5138681			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	ECM Media
0.574339	11.19537	3.336349	29.80116

ANOVAS de variable dependiente: Leche corregida por grasa al 4% (LCG4)

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	17	516.0728251	30.3572250	3.16	0.0029
Trat	3	18.1628113	6.0542704	0.63	0.6017
Semana	3	17.7433674	5.9144558	0.61	0.6107
Trat*Semana	9	186.4030533	20.7114504	2.15	0.0558
Rep	2	293.7635931	146.8817966	15.27	<.0001
Error	30	288.5843167	9.6194772		
Total correcto	47	804.6571418			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	LCG4 Media
------------	----------	----------	------------

0.641357 11.19634 3.101528 27.7012

ANOVAS de variable dependiente: Grasa

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	17	12.87675417	0.75745613	1.64	0.1138
Trat	3	0.60021667	0.20007222	0.43	0.7300
Semana	3	0.22781667	0.07593889	0.16	0.9192
Trat*Semana	9	11.55896667	1.28432963	2.79	0.0167
Rep	2	0.48975417	0.24487708	0.53	0.5931
Error	30	13.81911250	0.46063708		
Total correcto	47	26.69586667			

R-cuadrado Coef Var Raiz MSE G Media
 0.482350 14.65353 0.678702 4.631667

ANOVAS de variable dependiente: Grasa (kg)

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	17	1.34059158	0.07885833	2.92	0.0050
Trat	3	0.03965562	0.01321854	0.49	0.6919
Semana	3	0.04431823	0.01477274	0.55	0.6537
Trat*Semana	9	0.71394651	0.07932739	2.94	0.0126
Rep	2	0.54267122	0.27133561	10.06	0.0005
Error	30	0.80944801	0.02698160		
Total correcto	47	2.15003959			

R-cuadrado Coef Var Raiz MSE Gkg Media
 0.623519 14.05319 0.164261 1.168850

ANOVAS de variable dependiente: Proteína

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	17	4.73102708	0.27829571	3.85	0.0006
Trat	3	0.17777292	0.05925764	0.82	0.4933
Semana	3	0.55737292	0.18579097	2.57	0.0728
Trat*Semana	9	0.98515208	0.10946134	1.51	0.1883
Rep	2	3.01072917	1.50536458	20.82	<.0001
Error	30	2.16927083	0.07230903		
Total correc	47	6.90029792			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	P Media
0.685626	7.683411	0.268903	3.499792

ANOVAS de variable dependiente: Proteína (kg)

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	17	0.14103322	0.00829607	0.61	0.8594
Trat	3	0.00619144	0.00206381	0.15	0.9281
Semana	3	0.07184796	0.02394932	1.75	0.1772
Trat*Semana	9	0.04684553	0.00520506	0.38	0.9350
Rep	2	0.01614830	0.00807415	0.59	0.5599
Error	30	0.40963545	0.01365452		
Total correcto	47	0.55066868			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Pkg Media
0.256113	13.24567	0.116853	0.882194

ANOVAS de variable dependiente: Lactosa

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	17	2.15144792	0.12655576	2.97	0.0045
Trat	3	0.12718958	0.04239653	0.99	0.4089
Semana	3	0.02678958	0.00892986	0.21	0.8891
Trat*Semana	9	0.58260208	0.06473356	1.52	0.1868
Rep	2	1.41486667	0.70743333	16.59	<.0001
Error	30	1.27920000	0.04264000		
Total correcto	47	3.43064792			
R-cuadrado		Coef Var	Raiz MSE	L Media	
		0.627126	4.420739	0.206495	4.671042

ANOVAS de variable dependiente: Lactosa (kg)

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	17	1.27736070	0.07513886	2.92	0.0050
Trat	3	0.04297632	0.01432544	0.56	0.6473
Semana	3	0.03791327	0.01263776	0.49	0.6907
Trat*Semana	9	0.25976347	0.02886261	1.12	0.3776
Rep	2	0.93670764	0.46835382	18.22	<.0001
Error	30	0.77115972	0.02570532		
Total correcto	47	2.04852042			
R-cuadrado		Coef Var	Raiz MSE	Lkg Media	
		0.623553	13.45337	0.160329	1.191737

ANOVAS de variable dependiente: Sólidos no grasos

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	17	2.57894583	0.15170270	1.81	0.0755
Trat	3	0.10770833	0.03590278	0.43	0.7340
Semana	3	0.81007500	0.27002500	3.22	0.0365
Trat*Semana	9	0.75327500	0.08369722	1.00	0.4618
Rep	2	0.90788750	0.45394375	5.42	0.0098
Error	30	2.51297917	0.08376597		
Total correcto	47	5.09192500			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	SNG Media
0.506478	3.260651	0.289424	8.876250

ANOVAS de variable dependiente: Sólidos no grasos (kg)

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	17	2.52028553	0.14825209	1.94	0.0542
Trat	3	0.13362143	0.04454048	0.58	0.6301
Semana	3	0.21229277	0.07076426	0.93	0.4393
Trat*Semana	9	0.75258590	0.08362066	1.10	0.3945
Rep	2	1.42178542	0.71089271	9.32	0.0007
Error	30	2.28778530	0.07625951		
Total correcto	47	4.80807083			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	SNGkg Media
0.524178	12.24879	0.276151	2.254519

ANOVAS de variable dependiente: Sólidos totales

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	17	12.84159167	0.75538775	1.32	0.2483
Trat	3	0.27575833	0.09191944	0.16	0.9223
Semana	3	1.65647500	0.55215833	0.96	0.4234
Trat*Semana	9	10.11609167	1.12401019	1.96	0.0811
Rep	2	0.79326667	0.39663333	0.69	0.5088
Error	30	17.21820000	0.57394000		
Total correcto	47	30.05979167			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	ST Media
0.427202	5.608476	0.757588	13.50792

ANOVAS de variable dependiente: Sólidos totales (kg)

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	17	5.89493877	0.34676110	2.60	0.0106
Trat	3	0.23703871	0.07901290	0.59	0.6241
Semana	3	0.44088504	0.14696168	1.10	0.3628
Trat*Semana	9	1.60960858	0.17884540	1.34	0.2571
Rep	2	3.60740644	1.80370322	13.55	<.0001
Error	30	3.99345816	0.13311527		
Total correcto	47	9.88839694			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	STkg Media
0.596147	10.65762	0.364850	3.423370

ANOVAS de variable dependiente: Recuento de células somáticas

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	17	1216930.598	71584.153	1.13	0.3737
Trat	3	226328.9879	75442.9960	1.19	0.3300
Semana	3	171182.5104	57060.8368	0.90	0.4525
Trat*Semana	9	579162.1033	64351.3448	1.02	0.4501
Rep	2	240256.9963	120128.4981	1.90	0.1678
Error	30	1901113.102	63370.437		
Total correcto	47	3118043.700			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	RCS Media
0.390287	291.8665	251.7349	86.25000

ANOVAS de variable dependiente: AflaM1

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	17	43036609.65	2531565.27	22.67	<.0001
Trat	3	31232216.71	10410738.90	93.22	<.0001
Semana	3	4867446.02	1622482.01	14.53	<.0001
Trat*Semana	9	6551200.41	727911.16	6.52	<.0001
Rep	2	385746.51	192873.26	1.73	0.1950
Error	30	3350361.38	111678.71		
Total correcto	47	46386971.03			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	AflaM1 Media
0.927774	24.46249	334.1837	1366.106

ANOVAS de variable dependiente: Consumo de materia seca

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	17	90.0062607	5.2944859	2.56	0.0118
Error	30	62.0062393	2.0668746		
Total correcto	47	152.0125000			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	CMS Media
0.592098	6.991674	1.437663	20.56250

Fuente	DF	Cuadrado de Tipo I SS	la media	F-Valor	Pr > F
Trat	3	0.13416667	0.04472222	0.02	0.9956
Semana	3	32.35083333	10.78361111	5.22	0.0051
Trat*Semana	9	9.42083333	1.04675926	0.51	0.8581
Rep	2	48.10042735	24.05021368	11.64	0.0002

ANOVAS de variable dependiente: Afla Alimento

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	17	470.2956810	27.6644518	Infin	<.0001
Trat	3	0.0000000	0.0000000	.	.
Semana	3	470.2956810	156.7652270	Infin	<.0001
Trat*Semana	9	0.0000000	0.0000000	.	.
Rep	2	0.0000000	0.0000000	.	.
Error	30	0.0000000	0.0000000		
Total correcto	47	470.2956810			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	AflaAl Media
1.000000	0	0	10.3752

ANOVAS de variable dependiente: Afla Agregada

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	17	90000.00000	5294.11765	Infin	<.0001
Trat	3	90000.00000	30000.00000	Infin	<.0001
Semana	3	0.00000	0.00000	.	.
Trat*Semana	9	0.00000	0.00000	.	.
Rep	2	0.00000	0.00000	.	.
Error	30	0.00000	0.00000		
Total correcto	47	90000.00000			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	AflaAgr Media
1.000000	0	0	75.00000

ANOVAS de variable dependiente: Afla Total

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	17	90470.29568	5321.78210	Infin	<.0001
Trat	3	90000.00000	30000.00000	Infin	<.0001
Semana	3	470.29568	156.76523	Infin	<.0001
Trat*Semana	9	0.00000	0.00000	.	.
Rep	2	0.00000	0.0000	.	.
Error	30	0.00000	0.00000		
Total correcto	47	90470.29568			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	AflaT Media
1.000000	0	0	85.37525

ANOVAS de variable dependiente: Eficiencia Afla

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	17	55.91429381	3.28907611	16.94	<.0001
Trat	3	39.12441268	13.04147089	67.15	<.0001
Semana	3	4.45523644	1.48507881	7.65	0.0006
Trat*Semana	9	9.55167829	1.06129759	5.46	0.0002
Rep	2	2.78296641	1.39148320	7.16	0.0029
Error	30	5.82627502	0.19420917		
Total correcto	47	61.74056883			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Eficiencia Afla Media
0.905633	28.61688	0.440692	1.539971