

# UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA



## TESIS DOCTORAL

Evaluación de la exposición a Aflatoxina B1 sobre los parámetros productivos y bioquímicos, y determinación de la curva de excreción de Aflatoxina M1 en leche en ganado caprino

Evaluation of exposure to Aflatoxin B1 on productive and biochemical parameters, and determination of the excretion curve of Aflatoxin M1 in goat milk.

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

**Rafael Mora Medina**

Directores

**M<sup>a</sup> Rosario Moyano Salvago y Nahúm Ayala Soldado**

Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas y  
Toxicología

Programa de doctorado de Biociencias y Ciencias Agroalimentarias

Córdoba, 2 de mayo de 2023

TITULO: *Evaluación de la exposición a Aflatoxina B1 sobre los parámetros productivos y bioquímicos, y determinación de la curva de excreción de Aflatoxina M1 en leche en ganado caprino*

AUTOR: *Rafael Mora Medina*

---

© Edita: UCOPress. 2023  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>  
[ucopress@uco.es](mailto:ucopress@uco.es)

---

**DOCTORANDA/O**

Rafael Mora Medina

**TÍTULO DE LA TESIS:**

Evaluación de la exposición a Aflatoxina B1 sobre los parámetros productivos y bioquímicos, y determinación de la curva de excreción de Aflatoxina M1 en leche en ganado caprino

**INFORME RAZONADO DE LAS/LOS DIRECTORAS/ES DE LA TESIS****(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma)**

El doctorando ha mostrado un gran interés y capacidad de trabajo, actitud que ha mantenido desde el inicio de sus estudios de doctorado. Prueba de ello son los resultados obtenidos directamente derivados del trabajo realizado por el alumno, así como la publicación de un artículo científico en una revista de impacto (primer decil) y diversas comunicaciones a congresos y jornadas científicas.

En cuanto a los objetivos alcanzados, éstos se encuentran dentro de la planificación inicial. En el último periodo, ha estado implicado en la redacción de un artículo con los principales y más concluyentes resultados obtenidos en el desarrollo de su tesis doctoral (Mora-Medina, R., Lora-Benítez, A. J., Molina-López, A. M., Ayala-Soldado, N., & Moyano-Salvago, R. (2023). Effects of chronic low-dose aflatoxin B1 exposure in lactating Florida dairy goats. Journal of Dairy Science. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22704>), publicado en una revista incluida dentro del primer decil en la categoría "AGRICULTURE, DAIRY & ANIMAL SCIENCE" (6/62).

Igualmente, a lo largo de su doctorado ha presentado distintas comunicaciones y ponencias en congresos y jornadas científicas de relevancia nacional e internacional relacionadas con los resultados derivados de su tesis. Igualmente, ha formado parte del comité organizador del XXIV Congreso Español de Toxicología y VII Iberoamericano que tuvo lugar en Córdoba en noviembre del pasado año.

Igualmente, a lo largo de su doctorado ha presentado distintas comunicaciones y ponencias en congresos y jornadas científicas de relevancia nacional e internacional relacionadas con los resultados derivados de su tesis. Igualmente, ha formado parte del comité organizador del XXIV Congreso Español de Toxicología y VII Iberoamericano que tuvo lugar en Córdoba en noviembre del pasado año.

En cuanto a su formación, aunque ha completado todas las actividades obligatorias previstas en su plan de formación, el doctorando ha continuado desarrollando actividades formativas relacionadas con su formación investigadora. Actualmente, se encuentra preparando nuevas comunicaciones, tanto en formato póster, como oral para presentar en las próximas Jornadas Españolas de Toxicología organizadas por la Asociación Española de Toxicología que tendrán lugar el próximo mes de junio en Santiago.

Por ello, consideramos que el doctorando ha mantenido una actitud muy positiva y proactiva de cara a la realización de su tesis doctoral, con una enorme capacidad de adaptación y de resolución de problemas, tal y como ha demostrado a lo largo de su trabajo.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

**Córdoba, a 4 de mayo de 2023**

**Las/los directoras/es**

MOYANO  
SALVAGO  
MARIA ROSARIO  
- 30449826B

Firmado digitalmente  
por MOYANO  
SALVAGO MARIA  
ROSARIO - 30449826B  
Fecha: 2023.05.04  
08:40:55 +02'00'

AYALA  
SOLDADO  
NAHUM -  
75139210G

Firmado digitalmente  
por AYALA SOLDADO  
NAHUM - 75139210G  
Fecha: 2023.05.04  
08:51:00 +02'00'

Fdo.: M<sup>a</sup> del Rosario Moyano Salvago y  
Nahúm Ayala Soldado

*“La belleza de la ciencia es que siempre hay más por descubrir y aprender, nunca nos quedaremos sin preguntas por responder”*

Avi Loeb

## **Agradecimientos**

A mis directores de tesis, Rosario y Nahúm, por darme la oportunidad de realizar esta tesis doctoral. Vuestra orientación, dedicación y paciencia han sido fundamentales para lograr con éxito los objetivos de este trabajo. Agradecer también al resto de profesores del área de Toxicología de la Facultad de Veterinaria. En especial a Antonio, por ser el que me permitió, hace ya unos cuantos años, incorporarme al departamento para hacer mi TFG y con el que he compartido incontables momentos. También quiero agradecer a Toñi, por enseñarme a trabajar dentro de un laboratorio y por compartir muchos momentos.

A mis padres, ya que han sido el pilar de mi vida y lo han dado todo por mí. Por supuesto, agradecer también a mi hermano Antonio, que siempre ha estado apoyándome en los momentos más difíciles y sé que lo estará siempre. Sin el apoyo de estas tres personas no hubiese llegado donde estoy ahora mismo.

A mis abuelos, por su amor incondicional, apoyo y sabiduría, los cuales han sido fundamentales para mi desarrollo como persona. En especial a mi abuelo Rafael, que aunque apenas recuerda quien soy, se le ilumina la cara cuando me ve.

Por último, agradecer a mis amigos y a mi pareja, Alicia, por estar siempre a mi lado y hacerme tan feliz.

A todos, ¡GRACIAS!

## Índice

RESUMEN .....	vii
ABSTRACT .....	viii
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1. Micotoxinas: situación actual e implicaciones en Salud Pública .....	3
2.2. Aflatoxinas.....	5
2.2.1. Antecedentes y evolución histórica .....	5
2.2.2. Química de las aflatoxinas.....	6
2.2.3. Fuentes y vías de exposición .....	7
2.2.4. Legislación referente a las aflatoxinas.....	9
2.2.5. Toxicocinética de la aflatoxina B1 .....	12
2.2.5.1. Absorción y excreción.....	12
2.2.5.2. Metabolismo.....	12
2.2.5.2.1. Metabolismo de fase I .....	13
2.2.5.2.2. Metabolismo de fase II .....	15
2.2.6. Efectos negativos de las aflatoxinas en los rumiantes.....	16
2.2.7. Residuos de aflatoxinas en leche y productos lácteos .....	17
2.2.8. Medidas para reducir o prevenir la exposición a aflatoxinas .....	21
2.3. Modelo caprino en investigación.....	23
3. OBJETIVOS.....	26
4. MATERIAL Y MÉTODOS .....	27
4.1. Instalaciones.....	27
4.2. Animales de experimentación.....	28
4.3. Alimentación.....	29
4.4. Ordeño .....	30
4.5. Diseño experimental .....	31

4.5.1.	Determinación de la concentración de aflatoxina M1 en la leche.....	32
4.5.2.	Determinación de la composición de la leche .....	33
4.5.3.	Muestras sanguíneas y determinación de parámetros bioquímicos.....	34
4.5.4.	Determinación de aflatoxinas en pienso y heno .....	35
4.6.	Análisis estadístico de los datos.....	36
5.	RESULTADOS.....	37
5.1.	Efecto de la administración de aflatoxina B1 sobre la concentración de aflatoxina M1 en la leche.....	37
5.2.	Efecto de la administración de aflatoxina B1 sobre el porcentaje de excreción de aflatoxina M1 en la leche .....	40
5.3.	Efecto de la administración de aflatoxina B1 sobre el consumo de pienso.....	42
5.4.	Efecto de la administración de aflatoxina B1 sobre la producción láctea.....	44
5.5.	Efecto de la administración de aflatoxina B1 sobre la composición de la leche 46	
5.6.	Efecto de la administración de aflatoxina B1 sobre los parámetros bioquímicos 52	
6.	DISCUSIÓN.....	55
6.1.	Concentración de aflatoxina M1 y porcentaje de excreción en leche.....	55
6.2.	Consumo de alimento, rendimiento lechero y composición de la leche.....	60
6.3.	Efecto de la aflatoxina B1 sobre los parámetros bioquímicos.....	62
7.	CONCLUSIONES .....	65
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
9.	ANEXO I.....	79

## Índice de figuras

Figura 1. Estructura química de las principales micotoxinas (Agriopoulou et al., 2020). 4	
Figura 2. Mapas de riesgo de contaminación por aflatoxinas en la cosecha de maíz en 3 escenarios climáticos diferentes, (a) presente, (b) +2 °C y (c) +5 °C. La escala 0–200 se refiere al índice de riesgo por aflatoxinas. Adaptado de (Battilani et al., 2016)... 9	
Figura 3. Descripción general de la biotransformación de la aflatoxina B1. Adaptado de (Eaton et al., 2018). ..... 13	
Figura 4. Gráfico combinado. Producción láctea mundial (barras) y consumo per cápita mundial de leche (línea) durante los años 2011 y 2019. Elaboración propia. Fuente: (FAOSTAT, 2022)..... 19	
Figura 5. Zona de alojamiento de animales del Centro de Experimentación en Nutrición Animal. (A) Vista central de la zona de alojamiento. (B) Mecanismo de autolimpieza. (C) Corrales con cabras de raza Florida. (D) Vista lateral de la zona de alojamiento. .... 28	
Figura 6. Ingredientes y componentes analíticos del pienso granulado. .... 30	
Figura 7. Procedimiento de ordeño. (A) Ordeñadoras portátiles. (B) Ordeño mecánico. (C) Desellado y desecho de los primeros chorros de leche. (D) Limpieza y desinfección de la ordeñadora portátil en el patio exterior..... 31	
Figura 8. Fases, mediciones y toma de muestras del procedimiento experimental..... 32	
Figura 9. Curva de calibración para la CL-EM/EM. .... 33	
Figura 10. Análisis de la calidad de la leche. (A) Muestras de leche en baño de agua para atemperar. (B) Análisis de las muestras de leche en MilkoScan FT120. .... 34	
Figura 11. Curva de excreción de aflatoxina M1 en leche de cabra..... 37	
Figura 12. Gráfico combinado; concentración de aflatoxina M1 en leche (barras) y porcentaje de excreción (líneas) de los grupos T1 (120 µg de aflatoxina B1 al día) y T2 (60 µg de aflatoxina B1 al día) a lo largo del ensayo experimental. .... 41	
Figura 13. Consumo de pienso (g) de cabras expuestas a diferentes dosis de aflatoxina B1; CON 0 µg/día, T1 120 µg/día y T2 60 µg/día. Los datos se muestran de la siguiente forma; la barra en el interior de la caja indica la mediana, el símbolo + indica la media, cada marcador indica el consumo específico de un animal y los bigotes muestran el valor mínimo y máximo. .... 43	
Figura 14. Producción lechera (mL) de cabras expuestas a diferentes dosis de aflatoxina B1; CON 0 µg/día, T1 120 µg/día y T2 60 µg/día. Los datos se muestran de la siguiente forma; la barra en el interior de la caja indica la mediana, el símbolo +	



indica la media, cada marcador indica el consumo específico de un animal y los bigotes muestran el valor mínimo y máximo. ....	45
Figura 15. Porcentaje de grasa en leche de cabras expuestas a diferentes dosis de aflatoxina B1; CON 0 $\mu\text{g}/\text{día}$ , T1 120 $\mu\text{g}/\text{día}$ y T2 60 $\mu\text{g}/\text{día}$ . Los datos se muestran de la siguiente forma; la barra en el interior de la caja indica la mediana, el símbolo + indica la media, cada marcador indica el consumo específico de un animal y los bigotes muestran el valor mínimo y máximo. ....	47
Figura 16. Porcentaje de proteína en leche de cabras expuestas a diferentes dosis de aflatoxina B1; CON 0 $\mu\text{g}/\text{día}$ , T1 120 $\mu\text{g}/\text{día}$ y T2 60 $\mu\text{g}/\text{día}$ . Los datos se muestran de la siguiente forma; la barra en el interior de la caja indica la mediana, el símbolo + indica la media, cada marcador indica el consumo específico de un animal y los bigotes muestran el valor mínimo y máximo. ....	49
Figura 17. Porcentaje de lactosa en leche de cabras expuestas a diferentes dosis de aflatoxina B1; CON 0 $\mu\text{g}/\text{día}$ , T1 120 $\mu\text{g}/\text{día}$ y T2 60 $\mu\text{g}/\text{día}$ . Los datos se muestran de la siguiente forma; la barra en el interior de la caja indica la mediana, el símbolo + indica la media, cada marcador indica el consumo específico de un animal y los bigotes muestran el valor mínimo y máximo. ....	51
Figura 18. Concentración de glucosa, urea y colesterol en el plasma sanguíneo de cabras expuestas diferentes dosis de aflatoxina B1. CON 0 $\mu\text{g}/\text{día}$ , T1 120 $\mu\text{g}/\text{día}$ y T2 60 $\mu\text{g}/\text{día}$ . Los datos se muestran de la siguiente forma; la barra central indica la mediana, los bigotes indican el rango intercuartílico y cada marcador representa el valor de un animal. ....	53
Figura 19. Concentración de albúmina, proteínas totales y globulinas en el plasma sanguíneo de cabras expuestas diferentes dosis de aflatoxina B1. CON 0 $\mu\text{g}/\text{día}$ , T1 120 $\mu\text{g}/\text{día}$ y T2 60 $\mu\text{g}/\text{día}$ . Los datos se muestran de la siguiente forma; la barra central indica la mediana, los bigotes indican el rango intercuartílico y cada marcador representa el valor de un animal. ....	53
Figura 20. Concentración de creatinina y bilirrubina en el plasma sanguíneo de cabras expuestas diferentes dosis de aflatoxina B1. CON 0 $\mu\text{g}/\text{día}$ , T1 120 $\mu\text{g}/\text{día}$ y T2 60 $\mu\text{g}/\text{día}$ . Los datos se muestran de la siguiente forma; la barra central indica la mediana, los bigotes indican el rango intercuartílico y cada marcador representa el valor de un animal. ....	54
Figura 21. Actividad de las enzimas hepáticas ALP, AST y GGT y la colinesterasa de cabras expuestas diferentes dosis de aflatoxina B1. CON 0 $\mu\text{g}/\text{día}$ , T1 120 $\mu\text{g}/\text{día}$ y	

T2 60  $\mu\text{g}/\text{día}$ . Los datos se muestran de la siguiente forma; la barra central indica la mediana, los bigotes indican el rango intercuartílico, cada marcador representa el valor de un animal y el asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ )..... 54

## Índice de tablas

Tabla 1. Estructura química, número CAS, fórmula y peso molecular de las aflatoxinas B1, B2, G1, G2, M1 y M2 (Adaptado de EFSA, 2020).....	7
Tabla 2. Contenidos máximos de aflatoxinas en los productos alimenticios. Adaptado de Reglamento (EU) n° 165/2010. ....	10
Tabla 3. Denominación y dosis de aflatoxina B1 de los diferentes grupos del estudio..	29
Tabla 4. Concentraciones de aflatoxina M1 en la leche ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) de cabras expuestas a diferentes dosis de aflatoxina B1; T1 120 $\mu\text{g}/\text{día}$ y T2 60 $\mu\text{g}/\text{día}$ .....	38
Tabla 5. Estadísticos descriptivos referentes al porcentaje de excreción de aflatoxina M1 en la leche de cabras expuestas a diferentes dosis de aflatoxina B1; T1 120 $\mu\text{g}/\text{día}$ y T2 60 $\mu\text{g}/\text{día}$ . ....	40
Tabla 6. Consumo de pienso (g) de cabras expuestas a diferentes dosis de aflatoxina B1; CON 0 $\mu\text{g}/\text{día}$ , T1 120 $\mu\text{g}/\text{día}$ y T2 60 $\mu\text{g}/\text{día}$ . Los datos se expresan como la media $\pm$ la desviación estándar.....	42
Tabla 7. Producción lechera (mL) de cabras expuestas a diferentes dosis de aflatoxina B1; CON 0 $\mu\text{g}/\text{día}$ , T1 120 $\mu\text{g}/\text{día}$ y T2 60 $\mu\text{g}/\text{día}$ . ....	44
Tabla 8. Porcentaje de grasa en leche de cabras expuestas a diferentes dosis de aflatoxina B1; CON 0 $\mu\text{g}/\text{día}$ , T1 120 $\mu\text{g}/\text{día}$ y T2 60 $\mu\text{g}/\text{día}$ . ....	46
Tabla 9. Porcentaje de proteína en leche de cabras expuestas a diferentes dosis de aflatoxina B1; CON 0 $\mu\text{g}/\text{día}$ , T1 120 $\mu\text{g}/\text{día}$ y T2 60 $\mu\text{g}/\text{día}$ . ....	48
Tabla 10. Porcentaje de lactosa en leche de cabras expuestas a diferentes dosis de aflatoxina B1; CON 0 $\mu\text{g}/\text{día}$ , T1 120 $\mu\text{g}/\text{día}$ y T2 60 $\mu\text{g}/\text{día}$ . ....	50
Tabla 11. Medianas (percentil 25-75) de los parámetros séricos de cabras que recibieron diferentes dosis diarias de aflatoxina B1 (CON = 0, T1 = 120 y T2 = 60 $\mu\text{g}$ ). ....	52

## RESUMEN

En los últimos años ha habido una tendencia creciente en la prevalencia de aflatoxinas en las materias primas destinadas a alimentación animal debido, principalmente, al cambio climático. Además, la ingesta de productos lácteos también se ha visto incrementada de manera notable en las últimas décadas. Ambos hechos han provocado una gran preocupación en la comunidad científica debido a la contaminación de la leche por aflatoxina M1. En este contexto, nuestro objetivo ha sido determinar la transferencia de aflatoxina B1 procedente de la dieta como aflatoxina M1 a la leche de cabra. Además, se ha determinado el posible efecto de la aflatoxina B1 sobre los parámetros productivos y bioquímicos en esta especie animal. Para ello, 18 cabras de raza Florida en lactación tardía se dividieron en 3 grupos ( $n = 6$ ) y fueron expuestas a diferentes dosis diarias de aflatoxina B1 ( $T1 = 120 \mu\text{g}$ ;  $T2 = 60 \mu\text{g}$  y Control =  $0 \mu\text{g}$ ) durante 31 días. La aflatoxina B1 pura se administró 6 h antes de cada ordeño mediante un pellet contaminado artificialmente. Las muestras de leche se tomaron individualmente de manera secuencial. La producción de leche y el consumo de alimento se registraron diariamente y se tomó una muestra sanguínea el último día de exposición. No se detectó aflatoxina M1 en las muestras recogidas previamente al comienzo del estudio, ni durante todo el procedimiento en los animales del grupo control. La concentración media de aflatoxina M1 detectada en la leche ( $T1 = 0.075 \mu\text{g}/\text{kg}$ ;  $T2 = 0.035 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) aumentó significativamente en relación con la cantidad de aflatoxina B1 ingerida. No obstante, la cantidad de aflatoxina B1 ingerida no tuvo influencia sobre el porcentaje de excreción de aflatoxina M1 ( $T1 = 0.066\%$  y  $T2 = 0.060\%$ ), siendo este porcentaje considerablemente inferior al descrito en otros estudios científicos en cabras lecheras. De este modo, concluimos que la concentración de aflatoxina M1 en la leche sigue una relación lineal respecto a la aflatoxina B1 ingerida, y que el porcentaje de excreción no se ve afectado aunque los animales sean expuestos a diferentes dosis de aflatoxina B1. Por otro lado, se determinó que los parámetros productivos tras la exposición crónica a aflatoxina B1 no se ven afectados, revelando cierta resistencia a los efectos tóxicos de este compuesto en las cabras.

**Palabras clave:** aflatoxina B1, aflatoxina M1, caprino, leche, porcentaje de excreción.

## ABSTRACT

In the past few years there has been a growing trend in the prevalence of aflatoxins, attributable to climate change, in substances destined for animal feeding, together with an increase in dairy product consumption. These facts have triggered great concern in the scientific community over milk pollution by aflatoxin M1. Therefore, our study aimed to determine the transfer of aflatoxin B1 from the diet into milk as AFM1 in goats exposed to different concentrations of AFB1, and its possible effect on the production and serological parameters of this species. For this purpose, 18 Florida goats in late lactation were divided into 3 groups (n = 6) and exposed to different daily doses of aflatoxin B1 (T1 = 120 µg; T2 = 60 µg, and control = 0 µg), during 31 d. Pure aflatoxin B1 was administered 6 h before each milking in an artificially contaminated pellet. The milk samples were taken individually in sequential samples. Milk yield and feed intake were recorded daily, and a blood sample was extracted on the last day of exposure. No aflatoxin M1 was detected, either in the samples taken before the first administration, or in the control group ones. The aflatoxin M1 concentration detected in the milk (T1 = 0.075 µg/kg; T2 = 0.035 µg/kg) increased significantly on a par with the amount of aflatoxin B1 ingested. The amount of aflatoxin B1 ingested did not have any influence on aflatoxin M1 carryover (T1 = 0.066% and T2 = 0.060%), these being considerably lower than those described in dairy goats. Thus, we concluded that the concentration of aflatoxin M1 in milk follows a linear relationship with respect to the aflatoxin B1 ingested, and that the aflatoxin M1 carryover was not affected by the administration of different aflatoxin B1 doses. Similarly, no significant changes in the production parameters after chronic exposure to aflatoxin B1 were observed, revealing a certain resistance of the goat to the possible effects of that aflatoxin.

**Key words:** aflatoxin B1, aflatoxin M1, carryover, milk, goat.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las aflatoxinas son consideradas las micotoxinas más importantes a nivel mundial en la alimentación humana y animal debido a su carcinogenicidad y hepatotoxicidad (Strosnider et al., 2006). En este sentido, la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) ha concluido que hay suficiente evidencia en humanos sobre la carcinogenicidad de las aflatoxinas B1, B2, G1, G2 y M1, las cuales pueden causar cáncer de hígado (carcinoma hepatocelular). Dicha carcinogenicidad se produce mediante un mecanismo de acción genotóxico, que implica la activación de un metabolito epóxido, la formación de aductos en el ADN y la modificación del gen supresor de tumores TP53. Por lo tanto, las aflatoxinas están incluidas en el grupo 1 como sustancias carcinogénicas para los humanos (IARC, 2012).

Estas micotoxinas son difuranocumarinas, principalmente producidas por dos especies de *Aspergillus*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, que contaminan los granos y cereales en varias etapas durante la cosecha, el transporte o el almacenamiento de materias primas (Kumar et al., 2017). Además, *Aspergillus flavus*, el principal hongo productor de aflatoxinas, se adapta muy bien a las condiciones cálidas y secas del clima. Por lo que, la Unidad de Riesgos Emergentes de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha considerado que el efecto del cambio climático es un factor determinante en el mayor riesgo de contaminación de aflatoxinas en los cultivos europeos (Battilani et al., 2012, 2016).

La aflatoxina más tóxica es la aflatoxina B1. Esta se transforma biológicamente en el hígado mediante enzimas pertenecientes a la superfamilia del citocromo P450 en varios metabolitos, entre los que se encuentra la aflatoxina M1 (Deng et al., 2018; Rushing y Selim, 2019). En cuanto a la aflatoxina M1, se trata de un metabolito hidroxilado que puede encontrarse en la leche de mamíferos que han ingerido alimento contaminado con aflatoxina B1 (Creppy, 2002). Además de la leche, las aflatoxinas pueden ser excretadas en huevos, orina, semen, bilis y heces (Coppock et al., 2018).

Aunque todas las especies animales son susceptibles a las aflatoxinas, se considera que los rumiantes son menos sensibles que las especies monogástricas debido a los procesos de detoxificación ruminales (Gallo et al., 2015). Debido a su menor susceptibilidad, la principal repercusión de la exposición crónica en estos animales radica en la disminución de sus parámetros productivos y, sobre todo, en la presencia de residuos

en su leche (Mostrom y Jacobsen, 2020). En este contexto, la aflatoxina M1 es termoestable y una vez presente en la leche cruda, es muy poco probable que su concentración se reduzca, a pesar de aplicar tratamientos térmicos rutinarios como la pasteurización o la esterilización (Becker-Algeri et al., 2016). Otro factor clave en la leche de pequeños rumiantes es que no hay un método físico capaz de evitar la unión de la aflatoxina M1 a las proteínas del suero, lo que implica una mayor concentración en el queso (Barbiroli et al., 2007). Esto es especialmente relevante en algunos continentes como Europa, Oceanía y América, donde la producción de queso a partir de leche de cabra es una industria importante (Silanikove et al., 2010).

Según la base de datos estadística corporativa de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAOSTAT), en 2019, la producción mundial de leche alcanzó los 864854 mil toneladas y se estableció un consumo medio per cápita de 70.76 kg/año. La producción de leche cruda de cabra contribuyó con el 23.9% de toda la producción de leche en ese año, siendo Asia y África los principales productores (FAOSTAT, 2022). En vista de la importancia del consumo de leche para el ser humano, se han establecido límites de aflatoxina M1 en este alimento en diferentes legislaciones. En la Unión Europea, los niveles máximos en la leche y los productos lácteos procesados no deben superar los 0.05 µg/kg, reduciendo este límite a 0.025 µg/kg en las preparaciones alimentarias para lactantes y niños pequeños (Comisión Europea, 2010). Además, el nivel máximo de aflatoxina B1 para el pienso compuesto para vacas y terneros lecheros, ovejas y corderos lecheros y cabras y cabritos lecheros se ha limitado a 5 µg/kg (Comisión Europea, 2011). En los Estados Unidos, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) ha fijado un nivel de acción de 0.5 µg/kg en la leche entera, baja en grasa y descremada (FDA, 2005).

La presencia de aflatoxina M1 en muestras de leche ha sido descrita en muchos estudios en los últimos años, evidenciando una alta tasa de incidencia de este contaminante. Aunque las concentraciones en países europeos generalmente se encuentran por debajo del nivel máximo permitido, las altas concentraciones determinadas en países en desarrollo demuestran la necesidad de estudiar, monitorear y controlar la contaminación por aflatoxina M1 (Mollayusefian et al., 2021; Saha Turna y Wu, 2021; Sharafi et al., 2022). No obstante, el comercio internacional y el cambio climático también han hecho que la aflatoxina M1 se convierta en un problema serio en países desarrollados (Frazzoli et al., 2017).

## **2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Micotoxinas: situación actual e implicaciones en Salud Pública**

Las micotoxinas son metabolitos extracelulares producidos por hongos filamentosos que pueden ocasionar una amplia variedad de efectos adversos en los animales y en el ser humano. En general, una amplia variedad de alimentos como los cereales, los frutos secos o los cultivos forrajeros destinados a alimentación animal pueden contener micotoxinas. La contaminación de estos alimentos por los hongos y la producción de micotoxinas puede ocurrir en cualquier etapa productiva, por ejemplo, antes de la recolección o durante el almacenamiento. Factores como la temperatura, la humedad, el pH, la actividad de agua, el tipo de alimento o las interacciones microbianas afectan tanto al crecimiento de los hongos como a la producción de micotoxinas. Aunque existe una amplia variedad de micotoxinas, las de mayor importancia son producidas principalmente por ciertas cepas de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. Estos hongos suelen coexistir en los cultivos agrícolas y, a través de la dieta, la exposición a micotoxinas es común (da Rocha et al., 2014; Lee y Ryu, 2017; Agriopoulou et al., 2020; Eskola et al., 2020).

Actualmente, al menos 400 micotoxinas han sido descubiertas, pero la atención científica se ha centrado principalmente en aquellas que han demostrado ser tóxicas para los seres humanos y los animales. En este sentido, las micotoxinas más relevantes son las siguientes; aflatoxinas, ocratoxinas, citrinina, tricotecenos, fumonisinas, patulina y zearalenona. Aunque estructuralmente son un grupo muy diverso, en su mayoría son sustancias de bajo peso molecular que varían desde simples cadenas con cuatro átomos de carbono hasta moléculas químicas más complejas (Alshannaq y Yu, 2017; Cimbalo et al., 2020). La estructura química de las principales micotoxinas se muestra en la Figura 1.

Park et al. (1999) en su artículo para la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) estimaron que el 25% de los cultivos agrícolas están contaminados con micotoxinas. Recientemente, los datos obtenidos en grandes encuestas sobre la contaminación de micotoxinas por el mundo sugieren una prevalencia mayor a la indicada por la FAO en el año 1999 (Eskola et al., 2020). En este contexto, Streit et al. (2013) analizaron 17.316 muestras de piensos y materias primas para alimentación animal entre los años 2004 y 2011. En su estudio, el 72% de sus muestras contenía al menos una micotoxina y el 38% estaba contaminado con dos o más. Por otro



lado, Kovalsky et al. (2016) analizaron 1113 muestras de piensos, maíz y ensilado de maíz de 44 países durante los años 2012 y 2015. Sus porcentajes de contaminación oscilaron entre 7.1 y 79% para tricotecenos tipo B y 88% para zearalenona. Gruber-Dorninger et al. (2019) determinaron que el 88 % de las 74821 muestras de alimentos y materias primas recolectadas de 100 países entre 2008 y 2017 estaban contaminadas con al menos una micotoxina.

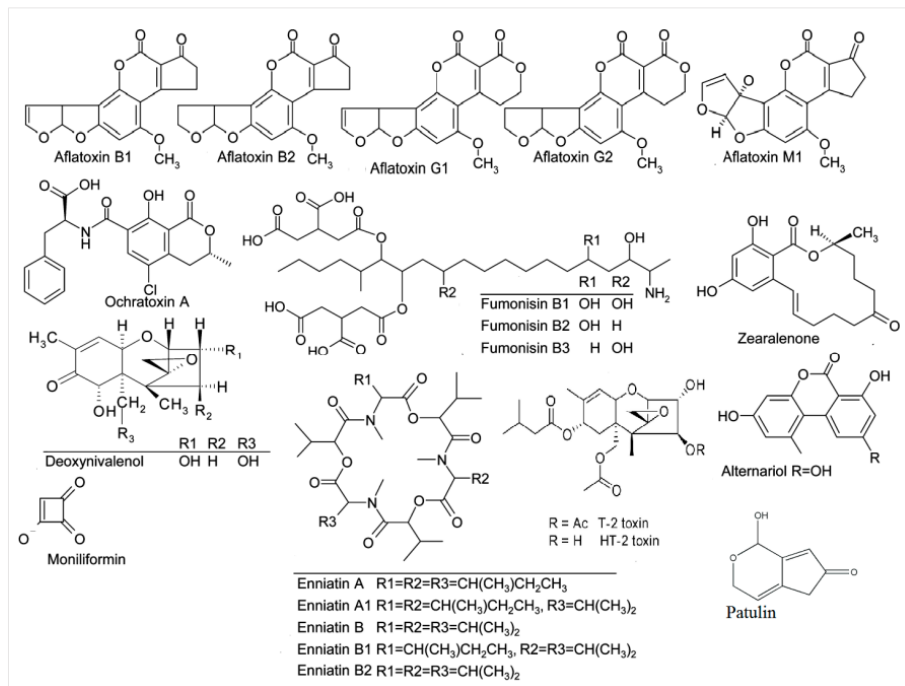


Figura 1. Estructura química de las principales micotoxinas (Agriopoulou et al., 2020).

Los cereales son un pilar básico en la nutrición humana y la mayor demanda de alimentos proteicos provocará la necesidad de producir más cereales para la elaboración de piensos destinados a la alimentación animal (FAO, 2015). Debido a esto, las micotoxinas se encuentran dentro de los contaminantes más importantes para proteger la salud pública en todo el mundo (Wu et al., 2014). Además de su grave influencia sobre la salud humana y animal, hay que destacar su impacto económico negativo sobre la producción de cultivos, la producción ganadera, el procesamiento de alimentos y piensos, la atención sanitaria y el comercio internacional (Wu, 2015; Munkvold et al., 2019). Por otro lado, debido a que las condiciones climatológicas pueden afectar de manera significativa al crecimiento, la distribución y la producción de micotoxinas por los

hongos, el cambio climático podría aumentar el riesgo que las micotoxinas representan para la seguridad de los alimentos y los piensos (Moretti et al., 2019).

A pesar de los esfuerzos para controlar las micotoxinas en el campo y durante el almacenamiento, la contaminación de los alimentos puede ser inevitable e impredecible. Actualmente no hay ningún método disponible para prevenir por completo la contaminación de los alimentos por micotoxinas (Wan et al., 2020). En este contexto, aplicar las medidas correctas previas y posteriores a la cosecha, la selección de cultivos resistentes a hongos, el uso correcto de fungicidas e insecticidas y aumentar la concienciación de los agricultores sobre el impacto de las micotoxinas debe ser parte de un plan integral para asegurar una producción sostenible y evitar la contaminación de los cultivos (Benkerroum, 2020).

## **2.2. Aflatoxinas**

### **2.2.1. Antecedentes y evolución histórica**

Dentro de las micotoxinas, las aflatoxinas son consideradas las más importantes a escala mundial en alimentación humana y animal debido a su carcinogenicidad y hepatotoxicidad (Strosnider et al., 2006). Su descubrimiento se remonta a 1960 en Gran Bretaña, donde fueron identificadas como la causa de la misteriosa enfermedad “X” del pavo, en la que más de 100000 aves de corral enfermaron repentinamente y murieron durante los meses de ese año. Estas aves mostraron signos de envenenamiento extremo y su muerte ocurrió en pocos días. Las necropsias realizadas sobre los mismos mostraron inflamación intestinal severa y necrosis hepática. Tras las investigaciones realizadas, se descubrió que los animales habían consumido harina de cacahuete contaminada procedente de Brasil (Blount, 1961). Estudios de laboratorio posteriores utilizando extractos de cultivos de cacahuete contaminados con *Aspergillus flavus* confirmaron la existencia de un principio tóxico capaz de inducir una toxicidad aguda caracterizada por daño hepático masivo en ratas y patos. Poco después, fueron aislados metabolitos purificados con propiedades fisicoquímicas idénticas a las aflatoxinas B1 y G1. En el año 1963, se logró la síntesis total de la aflatoxina B1. Actualmente, las aflatoxinas son un grupo de aproximadamente 20 compuestos (Wu et al., 2014). Las aflatoxinas que más riesgo presentan para la salud pública son las aflatoxinas B (B1 y B2), las aflatoxinas G (G1 y G2) y la aflatoxina M1. No obstante, la aflatoxina M2 también puede ser

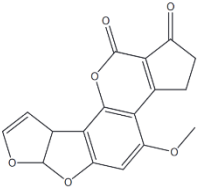
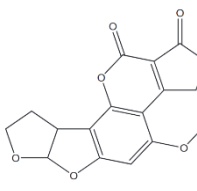
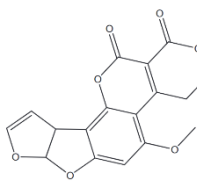
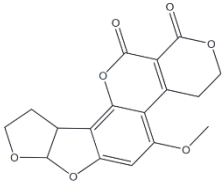
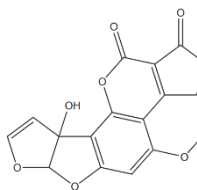
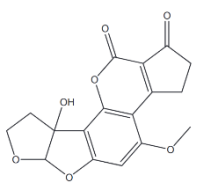
problemática pero los datos para su evaluación de riesgos actualmente son muy limitados (EFSA, 2020).

En el año 2012, en la evaluación llevada a cabo por la IARC, se concluyó que hay suficiente evidencia en humanos sobre la carcinogenicidad de las aflatoxinas B1, B2, G1, G2 y M1. Al respecto, estas aflatoxinas causan cáncer en el hígado (carcinoma hepatocelular). Dicha carcinogenicidad se produce debido a un mecanismo de acción genotóxico que involucra la activación de un metabolito epóxido, la formación de aductos en el ADN y la modificación del gen supresor de tumores TP53. Por ello, las aflatoxinas están dentro del Grupo 1 como sustancias cancerígenas para el ser humano (IARC, 2012). El orden de potencia toxicológica para las aflatoxinas, en base a su mutagenicidad bacteriana y a los efectos hepatocarcinogénicos es el siguiente: aflatoxina B1 > aflatoxina G1 y aflatoxina M1 > aflatoxina B2 y aflatoxina G2. Dicho orden se establece de acuerdo con la presencia (aflatoxina B1, aflatoxina M1 y aflatoxina G1) o ausencia (aflatoxina B2 y aflatoxina G2) de un doble enlace químicamente reactivo que puede convertirse metabólicamente en el epóxido que reacciona fácilmente con el ADN (FAO/WHO, 2018).

### **2.2.2. Química de las aflatoxinas**

Las estructuras químicas de las aflatoxinas B1, B2, G1, G2, M1 y M2 se muestran en la Tabla 1. Estas aflatoxinas forman cristales desde incoloros a amarillo pálido que son intensamente fluorescentes bajo luz ultravioleta. Respecto a las aflatoxinas B y G, son denominadas así por el color de la fluorescencia que emiten; azul (*Blue*) y verde (*Green*). La fluorescencia de las aflatoxinas M es de color azul-violeta (IARC, 2012). Por otro lado, la numeración 1 y 2 dentro de cada grupo hace referencia a su movilidad cromatográfica relativa durante la cromatografía en capa fina (Varga et al., 2009). Estas sustancias son inestables bajo luz ultravioleta en presencia de oxígeno, pH extremo y agentes oxidantes. Respecto a su solubilidad, son insolubles en solventes no polares mientras que son solubles en solventes orgánicos moderadamente polares como el cloroformo y el metanol. En agua su solubilidad es de 10-20 mg/L (IARC, 2012; EFSA, 2020).

Tabla 1. Estructura química, número CAS, fórmula y peso molecular de las aflatoxinas B1, B2, G1, G2, M1 y M2 (Adaptado de EFSA, 2020).

Nombre	Aflatoxina B1	Aflatoxina B2	Aflatoxina G1
Estructura química			
CAS	1162-65-8	7220-81-7	1165-39-5
Fórmula molecular	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>
Peso molecular	312.3 g/mol	314.3 g/mol	328.3 g/mol
Nombre	Aflatoxina G2	Aflatoxina M1	Aflatoxina M2
Estructura química			
CAS	7241-98-7	6795-23-9	6885-57-0
Fórmula molecular	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>
Peso molecular	330.3 g/mol	328.3 g/mol	330.3 g/mol

### 2.2.3. Fuentes y vías de exposición

Las aflatoxinas son producidas fundamentalmente por dos especies de *Aspergillus*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, hongos que se encuentran especialmente en zonas con climas cálidos y húmedos. *Aspergillus flavus* sólo produce aflatoxinas del tipo B, es uno de los hongos más abundantes en el suelo y está ampliamente distribuido. Las condiciones óptimas para su crecimiento se sitúan en un rango de temperaturas entre 28 y 37 °C y una actividad de agua entre 0.90 y 0.99, aunque también puede crecer a temperaturas entre 12 y 48 °C y una actividad de agua inferior de 0.77. Las condiciones óptimas para la producción de aflatoxinas por este hongo son 28-30 °C y una actividad de agua de 0.99, siendo las condiciones críticas 15 °C y 0.83 de actividad de agua. Por otro lado, *Aspergillus parasiticus* produce aflatoxinas B y G, está más adaptado al

ambiente del suelo y su distribución es más limitada. Sus condiciones de temperatura y actividad de agua son similares a las de *Aspergillus flavus* y la producción óptima de aflatoxinas se establece en unas temperaturas entre 24 y 30 °C, con una alta actividad de agua (0.95–0.96) (EFSA, 2007; Klich et al., 2007; Perrone y Gallo, 2017; Coppock et al., 2018). *Aspergillus nomius*, *Aspergillus pseudotamarii*, *Aspergillus bombycis*, *Aspergillus ochraceoroseus* y *Aspergillus australis* también son capaces de producir aflatoxinas, aunque en menor medida (IARC, 2002). Todas las especies aflatoxigénicas de *Aspergillus* comúnmente crecen sobre los desechos de origen vegetal en el suelo y también sobre el estiércol de origen animal. Los insectos y las corrientes de aire propagan las esporas de estos hongos y, comúnmente, contaminan los órganos florales de las plantas o las áreas dañadas por los insectos (Coppock et al., 2018). Respecto a las aflatoxinas M1 y M2, son metabolitos hidroxilados de las aflatoxinas B1 y B2 y pueden encontrarse en los productos lácteos obtenidos del ganado que ha ingerido alimentos contaminados (Creppy, 2002). Aunque generalmente se asocia a estas dos aflatoxinas con la leche, los hongos aflatoxigénicos también pueden liberarlas sobre los sustratos (Coppock et al., 2018).

En la Unión Europea, la exposición a aflatoxinas generalmente se considera que ocurre a partir de materias primas importadas (EFSA, 2007). Concretamente, a través del Sistema de Alerta Rápida para Piensos y Alimentos (RASFF) de la Unión Europea, se generaron 730 notificaciones de contaminación por aflatoxinas entre el año 2016 y 2021. Prácticamente todas las notificaciones generadas por los países europeos se debían a materias primas importadas de países como Egipto, Turquía o Estado Unidos, entre otros (RASFF, 2022). No obstante, *Aspergillus flavus*, el principal hongo productor de aflatoxinas, se adapta muy bien a las condiciones climáticas cálidas y secas. Por ello, la Unidad de Riesgos Emergentes de la EFSA ha considerado al efecto del cambio climático como un factor clave en el mayor riesgo de contaminación por aflatoxinas en los cultivos de maíz en Europa (EFSA, 2012; Battinali et al., 2016). Como podemos observar en la Figura 2, Battinali et al. (2016) demostraron mediante modelado que en unos escenarios climáticos de +2 °C o +5 °C aumentaría de manera drástica el riesgo de contaminación por aflatoxinas en los países europeos, donde el cultivo de maíz es común.

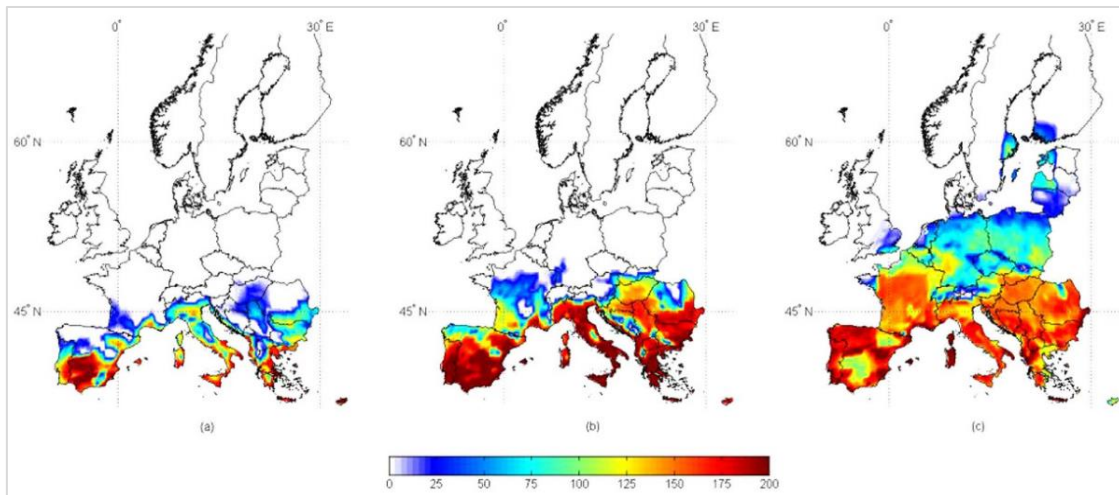


Figura 2. Mapas de riesgo de contaminación por aflatoxinas en la cosecha de maíz en 3 escenarios climáticos diferentes, (a) presente, (b) +2 °C y (c) +5 °C. La escala 0–200 se refiere al índice de riesgo por aflatoxinas. Adaptado de (Battilani et al., 2016).

#### 2.2.4. Legislación referente a las aflatoxinas

En la Unión Europea, el Reglamento (CE) n° 315/93 del Consejo por el que se establecen procedimientos comunitarios en relación con los contaminantes presentes en los productos alimenticios, establece que será necesario establecer tolerancias máximas para contaminantes específicos con el fin de proteger la salud pública. Al respecto, los contenidos máximos de aflatoxinas en los productos destinados a alimentación humana se han armonizado mediante el Reglamento (EU) n° 165/2010 de la Comisión que modifica, en lo que respecta a las aflatoxinas, al Reglamento (CE) n° 1881/2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. Este Reglamento ha establecido los límites para el contenido total de aflatoxinas en los alimentos (la suma de las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2), el de aflatoxina B1 en particular, debido a su mayor toxicidad, y el de aflatoxina M1 en los productos lácteos. Los contenidos máximos en función del producto alimenticio se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Contenidos máximos de aflatoxinas en los productos alimenticios. Adaptado de Reglamento (EU) n° 165/2010.

Aflatoxinas	Productos alimenticios	Contenido máximo (µg/kg)		
		B1	Suma de B1, B2, G1 y G2	M1
1.1	Cacahuets y otras semillas oleaginosas que vayan a someterse a un proceso de selección u otro tratamiento físico antes del consumo humano directo o de su utilización como ingredientes de productos alimenticios, con la excepción de los cacahuets y otras semillas oleaginosas que vayan a molerse para la producción de aceite vegetal refinado.	8	15	-
1.2	Almendras, pistachos y huesos de albaricoque que vayan a someterse a un proceso de selección, u otro tratamiento físico, antes del consumo humano directo o de su utilización como ingredientes de productos alimenticios.	12	15	-
1.3	Avellanas y nueces del Brasil que vayan a someterse a un proceso de selección u otro tratamiento físico antes del consumo humano directo o de su utilización como ingredientes de productos alimenticios.	8	15	-
1.4	Frutos de cáscara arbóreos, salvo los indicados en los puntos 1.2 y 1.3, que vayan a someterse a un proceso de selección u otro tratamiento físico antes del consumo humano directo o de su utilización como ingredientes de productos alimenticios.	5	10	-
1.5	Cacahuets y otras semillas oleaginosas y sus productos transformados destinados al consumo humano directo o a utilizarse como ingredientes en los productos alimenticios, con la excepción de: aceites vegetales crudos destinados a ser refinados y aceites vegetales refinados.	2	4	-
1.6	Almendras, pistachos y huesos de albaricoque destinados al consumo humano directo o a utilizarse como ingredientes de productos alimenticios.	8	10	-
1.7	Avellanas y nueces del Brasil destinadas al consumo humano directo o a utilizarse como ingredientes de productos alimenticios.	5	10	-
1.8	Frutos de cáscara arbóreos, distintos de los indicados en los puntos 1.6 y 1.7, y sus productos transformados destinados al consumo humano directo o a utilizarse como ingredientes de productos alimenticios.	2	4	-
1.9	Frutas pasas que vayan a someterse a un proceso de selección u otro tratamiento físico antes del consumo humano directo o de su utilización como ingredientes de productos alimenticios.	5	10	-
1.10	Frutas pasas y sus productos transformados para el consumo humano directo o su utilización como ingredientes de productos alimenticios.	2	4	-
1.11	Todos los cereales y todos los productos a base de cereales, incluidos los productos de cereales transformados, salvo los productos alimenticios indicados en los puntos 1.12, 1.15 y 1.17.	2	4	-
1.12	Maíz y arroz que vayan a someterse a un proceso de selección u otro tratamiento físico antes del consumo humano directo o de su utilización como ingredientes de productos alimenticios.	5	10	-
1.13	Leche cruda, leche tratada térmicamente y leche para la fabricación de productos lácteos.	-	-	0.05

1.14	Los siguientes tipos de especias: <i>Capsicum spp.</i> (frutas pasas de dicho género, enteras o molidas, con inclusión de los chiles, el chile en polvo, la cayena y el pimentón) <i>Piper spp.</i> (frutos de dicho género, con inclusión de la pimienta blanca y negra) <i>Myristica fragrans</i> (nuez moscada) <i>Zingiber officinale</i> (jengibre) <i>Curcuma longa</i> (cúrcuma) Mezclas de especias que contengan una o varias de estas especias.	5	10	-
1.15	Alimentos a base de cereales transformados y alimentos para lactantes y niños de corta edad.	0.1	-	-
1.16	Preparados para lactantes y preparados de continuación, incluidas la leche para lactantes y la leche de continuación.	-	-	0.025
1.17	Alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales dirigidos específicamente a los lactantes.	0.1	-	0.025

Por otro lado, los contenidos máximos de aflatoxinas en los productos destinados a alimentación animal están recogidos en la Directiva 2003/100/CE por la que se modifica el anexo I de la Directiva 2002/32/CE del Parlamento Europeo y del Consejo sobre sustancias indeseables en la alimentación animal. Debido a la excreción de aflatoxina M1 en la leche, el nivel máximo establecido para alimentación de ganado lechero es más restrictivo en comparación a otros productos destinados a alimentación animal. En este caso, el contenido máximo de aflatoxina B1 en piensos completos para ganado lechero, calculado sobre la base de un contenido de humedad del 12%, se limita a 5 µg/kg.

Un factor crítico en el control de las micotoxinas en general es la gran heterogeneidad en su distribución en los alimentos. Por ello, en la Unión Europea se han establecido unos criterios uniformes para llevar a cabo el muestreo y el análisis de las micotoxinas mediante el Reglamento (CE) nº 401/2006, por el que se establecen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios.

Por último, se han establecido unas condiciones de importación específicas para determinados piensos y productos alimenticios de determinados terceros países en relación con la presencia de aflatoxinas mediante el Reglamento de ejecución (UE) nº 884/2014 de la Comisión, por el que se imponen condiciones especiales a la importación desde determinados terceros países de piensos y alimentos que pueden estar contaminados por aflatoxinas.



## **2.2.5. Toxicocinética de la aflatoxina B1**

### **2.2.5.1. Absorción y excreción**

La aflatoxina B1 se absorbe eficientemente por difusión pasiva en el tracto gastrointestinal y se transfiere principalmente desde el intestino a la sangre portal hepática (Coppock et al., 2018). Estudios en ratas, mostraron que la absorción de aflatoxinas es un proceso muy rápido, que se desarrolla de manera más eficiente en el duodeno y que sigue una cinética de primer orden con una tasa de absorción constante de  $5.84 \pm 0.05 \text{ h}^{-1}$  para la aflatoxina B1 (Kumagai, 1989; Ramos y Hernández, 1996). Respecto a otras vías de absorción, Wei et al. (1970) demostraron que la absorción de aflatoxina B1 a través de la piel también es posible en ratas. Por otro lado, Zarba et al. (1992) indicaron que la inhalación de aerosoles es una vía efectiva de exposición a aflatoxina B1 que desencadena en daño genotóxico en el hígado. Además, Coulombe et al. (1991) demostraron que la retención de aflatoxina B1 es mayor en la tráquea cuando la administración se realiza mediante polvo que mediante aflatoxina B1 aislada, lo que podría ser un factor determinante en la acción cancerígena sobre el sistema respiratorio.

Respecto a la excreción, las aflatoxinas pueden encontrarse en la leche, los huevos, la orina, el semen, la bilis y las heces (Coppock et al., 2018). En humanos, Zarba et al. (1992) estimaron que el porcentaje de excreción de aflatoxina M1 en la leche oscila entre 0.09 y 0.43%. En bovino, una especie de mayor interés en salud pública, el porcentaje de excreción de aflatoxina M1 en la leche se sitúa entre el 2 y el 6.2% (Fink-Gremmels, 2008).

### **2.2.5.2. Metabolismo**

La aflatoxina B1 se metaboliza eficientemente en el hígado en una amplia variedad de metabolitos como se observa en la Figura 3. Hay que destacar que existen diferencias significativas entre especies relativas a las diversas rutas de biotransformación. Debido a que las vías de activación y desintoxicación funcionan de forma simultánea, la relación entre activación y desintoxicación es el factor crítico para establecer la susceptibilidad de las especies a la carcinogénesis y, en menor medida, a la toxicidad aguda de la aflatoxina B1. Para comprender la base toxicológica y las diferencias entre especies se debe examinar cuidadosamente cada paso a lo largo de la biotransformación de la aflatoxina B1 (Eaton et al., 2018).

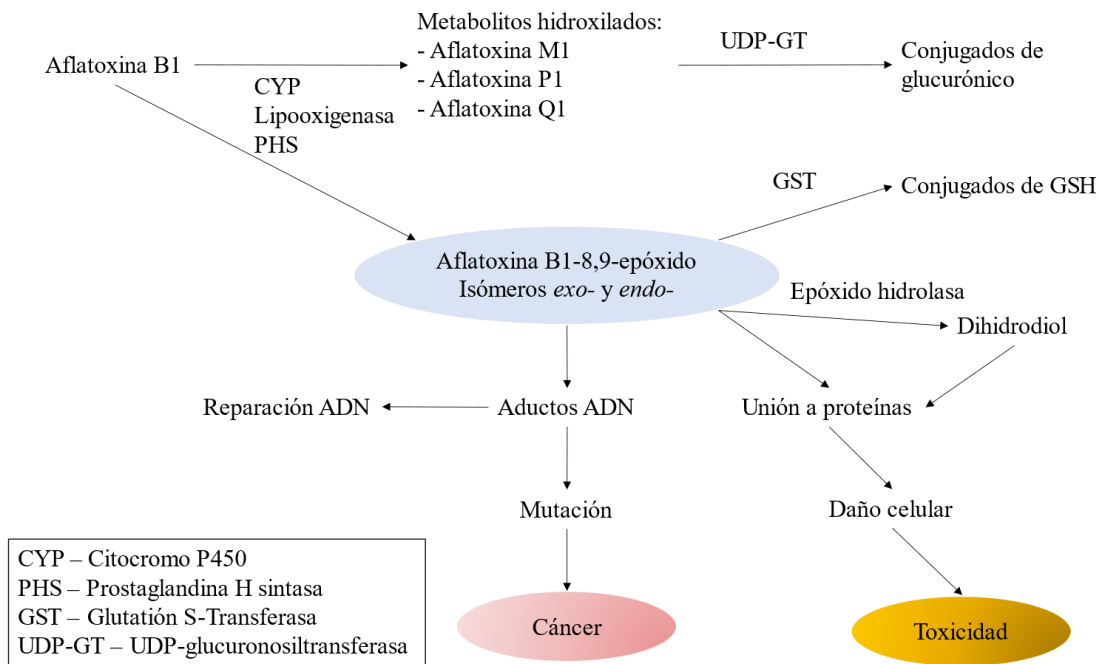


Figura 3. Descripción general de la biotransformación de la aflatoxina B1. Adaptado de (Eaton et al., 2018).

### 2.2.5.2.1. Metabolismo de fase I

La biotransformación de la aflatoxina B1 se produce principalmente por el sistema monooxigenasa de función mixta del citocromo P450 microsomal (CYP) e involucra múltiples isoenzimas CYP que muestran una variación considerable en las características cinéticas entre especies (Coppock et al., 2018; Eaton et al., 2018). Estas enzimas desempeñan un papel fundamental en el metabolismo del 92-96 % de los fármacos, químicos xenobióticos y los esteroides endógenos (Deng et al., 2018). Los metabolitos más importantes derivados de la aflatoxina B1 por la acción de estas enzimas son; la aflatoxina M1, la aflatoxina Q1, la aflatoxina P1 y la aflatoxina B1-8,9-epóxido (Eaton et al., 2018). Excepto este último, los demás metabolitos son menos tóxicos que la aflatoxina B1 (Coppock et al., 2018). Además de la biotransformación por el CYP se han demostrado otras vías independientes para la activación de la aflatoxina B1. Battista y Marnett (1985) demostraron que la prostaglandina H sintasa (PHS) es capaz de oxidar la aflatoxina B1 en aflatoxina B1-8,9-epóxido. Por otro lado, Datta y Kulkarni (1994) evidenciaron que la lipooxigenasa placentaria también es capaz de realizar la epoxidación de la aflatoxina B1.

La activación metabólica de la aflatoxina B1-8,9-epóxido es fundamental en el proceso genotóxico y por lo tanto en la carcinogénesis de estas sustancias (Marchese et al., 2018). En este sentido, la aflatoxina B1-8,9-epóxido surge de la epoxidación del anillo terminal de furano de la aflatoxina B1 (Eaton et al., 2018) y presenta dos isómeros, *endo*-8,9-epóxido y *exo*-8,9-epóxido (Marchese et al., 2018; Rushing y Selim, 2019). Referente a la toxicidad de los isómeros, se ha demostrado que el isómero *exo*- tiene mucha más afinidad por el ADN y es el principal mediador del daño celular (IARC, 2012; Eaton et al., 2018; Rushing y Selim, 2019). El lugar predominante para la formación de aductos en el ADN por el isómero *exo*- es en la posición N7 de la guanina, lo que conlleva la formación del aducto aflatoxina B1-N7-Gua, que a su vez puede transformarse en el aducto aflatoxina B1-FAPY de anillo abierto, más estable y por lo tanto más persistente (EFSA, 2020). En los humanos, esta activación metabólica se lleva a cabo principalmente por las enzimas CYP3A4 y CYP1A2 (Rushing y Selim, 2019). La enzima CYP3A4 genera predominante el isómero *exo*-, mientras que la encima CYP1A2 puede generar ambos isómeros, aunque produce el isómero *endo*- en una proporción mayor (IARC, 2012). Las enzimas CYP3A5 y CYP3A7 presentes en los microsomas hepáticos también desempeñan un papel importante en la epoxidación de la aflatoxina B1 en los humanos. Por otro lado, la enzima CYP2A13 está involucrada en la epoxidación, pero a nivel pulmonar (Deng et al., 2018).

En ratones, las enzimas CYP3A11 y CYP3A13 son las encargadas de la bioactivación de la aflatoxina B1 (Deng et al., 2018). En pavos, la enzima CYP1A5 es la principal responsable de la epoxidación de la aflatoxina B1 a concentraciones ambientalmente relevantes, mientras que la enzima CYP3A4 tiene una baja afinidad en esta especie a dichas concentraciones. De hecho, la relación activación:desintoxicación es de 50:1 (*exo*-8,9-epóxido:aflatoxina M1) (Rawal y Coulombe, 2011), lo que es indicativo de la elevada susceptibilidad de los pavos a estas sustancias. En codornices y pollos, las enzimas hepáticas principalmente implicadas en la epoxidación son la CYP2A6 y, en menor medida, la CYP1A1 (Díaz et al., 2010). En los patos, los estudios de correlación llevados a cabo por Díaz et al. (2010) sugirieron que las enzimas CYP3A4, CYP2A6 y CYP1A1/2 podrían estar involucradas en la epoxidación de la aflatoxina B1 y que el hallazgo de que cuatro enzimas CYP estén involucradas en dicha biotransformación podría explicar la alta sensibilidad de esta especie a las aflatoxinas.

La biotransformación microsomal de la aflatoxina B1 por las enzimas del citocromo P450 también conlleva la formación de metabolitos hidroxilados como la aflatoxina M1, la aflatoxina Q1 y la aflatoxin P1 (Rushing y Selim, 2019). Las aflatoxinas M1 y Q1 son formadas mediante 9 $\alpha$ -hidroxilación y 3 $\alpha$ -hidroxilación de la aflatoxina B1, respectivamente. En el hígado, la aflatoxina M1 es formada mayoritariamente por la enzima CYP1A2, aunque la CYP1A1 también es capaz de sintetizarla. Respecto a la aflatoxina Q1, es predominantemente formada, pero no exclusivamente, por la enzima CYP3A4. La aflatoxina P1 se produce mediante o-desmetilación, aunque no es un metabolito representativo (Eaton et al., 2018).

Al igual que la aflatoxina B1, como se ha comentado anteriormente, la aflatoxina M1 también presenta un doble enlace en la posición 8,9, por lo que este metabolito también es capaz de ser activado por las enzimas CYP hacia la epoxidación (EFSA, 2020). Por ello, es el metabolito hidroxilado más cancerígeno y se ha demostrado que es capaz de inducir tumores en ratas (Hsieh et al., 1984) y en trucha arcoíris (Sinnhuber et al., 1974). Es importante señalar que la aflatoxina M1 se considera un metabolito resultante de la detoxificación de la aflatoxina B1, y que la bioactivación del epóxido se produce en menor medida sobre esta (Marchese et al., 2018). Hsieh et al. (1984) demostraron que la incidencia de carcinomas hepatocelulares inducidos en ratas expuestas a 50 ppb de aflatoxina M1 durante 21 meses es comparable a la inducida por 1-5 ppb de aflatoxina B1. Por lo tanto, la potencia hepatocancerígena de la aflatoxina M1 probablemente se sitúe entre el 2 y el 10% respecto a la aflatoxina B1.

#### **2.2.5.2.2. Metabolismo de fase II**

Referente a los mecanismos de fase II para la eliminación de la aflatoxina B1-8,9-epóxido, la conjugación con glutatión mediante la superfamilia de enzimas GST se define como la principal vía (Pottenger et al., 2014). Al igual que en las enzimas pertenecientes al CYP, también han sido halladas diferencias significativas en la efectividad de las enzimas GST para detoxificar los metabolitos de la aflatoxina B1 entre las diferentes especies (Deng et al., 2018). En este sentido, el grado de conjugación con glutatión sigue este orden; ratón > rata > humano, teniendo este último unas tasas de conjugación comparativamente muy bajas (EFSA, 2007).

La conjugación de glutatión con compuestos cancerígenos hidrofóbicos, como la aflatoxina B1-8,9-epóxido, genera metabolitos más solubles, los cuales son más fáciles de eliminar por las células (Oakley, 2011). En este contexto, el glutatión actúa como antioxidante y tiene muchas funciones en el mantenimiento y la estabilidad de las membranas, además de reducir las especies de oxígeno altamente reactivas producidas a partir del proceso de peroxidación lipídica. Por ello, cuando el glutatión comienza a agotarse, los niveles de especies de oxígeno altamente reactivas aumentan en las células afectadas por las aflatoxinas debido al desacoplamiento de los procesos metabólicos resultantes de la falta de glutatión para la catálisis de  $O_2$  a  $H_2O_2$ , lo que compromete las membranas celulares y potencia el daño de los epóxidos sobre los componentes celulares críticos (ADN, lípidos y proteínas) (Bbosa et al., 2013).

Además de las enzimas GST, también se ha demostrado la hidrólisis de la aflatoxina B1-*exo*-8,9-epóxido espontáneamente o mediante la enzima epóxido hidrolasa (Kelly et al., 2002). Dicha reacción conduce a la formación de un metabolito menos tóxico, denominado dihidrodiol, que se une a los residuos de lisina de las proteínas (Deng et al., 2018). Probablemente varios de los efectos tóxicos agudos de la aflatoxina B1 sean ocasionados por estas reacciones (Eaton et al., 2018).

La aflatoxina M1, la aflatoxina Q1 y la aflatoxina P1 pueden conjugarse con ácido glucurónico y excretarse por las heces y la orina (EFSA, 2020).

#### **2.2.6. Efectos negativos de las aflatoxinas en los rumiantes**

Como se ha comentado anteriormente, la sensibilidad a las aflatoxinas varía entre las diferentes especies. En particular, el eficiente metabolismo ruminal y los procesos de desintoxicación que ocurren en el rumen hacen a los rumiantes menos sensibles a los efectos negativos de las aflatoxinas en comparación con los animales monogástricos (EFSA, 2004; Gallo et al., 2015). De hecho, sólo entre el 2 y el 5% de la aflatoxina B1 ingerida por el ganado vacuno atraviesa los 4 estómagos y llega al intestino (Karlovsky, 1999).

Debido a esta menor susceptibilidad, los signos clínicos en una aflatoxicosis aguda aparecen tras la exposición a concentraciones mucho más elevadas en comparación con los monogástricos. Dichas concentraciones se establecen entre 1.5-2.23 mg y > 50 mg de

aflatoxina B1 por kg de pienso en bovino y en pequeños rumiantes, respectivamente. En la necropsia posterior a un cuadro de aflatoxicosis aguda, se observa necrosis centrolobular y proliferación de los conductos biliares, así como lesiones renales (Miller y Wilson, 1994).

Actualmente, es muy complicado que se produzca una aflatoxicosis aguda en los rumiantes debido a la elevada concentración a la que deben exponerse estos animales. No obstante, los rumiantes ocupan nichos agrícolas muy variados, en los que los animales pueden estar expuestos a las aflatoxinas en condiciones muy diferentes de manera crónica. Es bastante común que los rumiantes sean alimentados con pienso, paja y subproductos contaminados, ensilados mal conservados o forrajes embalados que hayan sido depositados en el campo de forma errónea sobre moho. Estos alimentos potencialmente nocivos son capaces de generar una microbiota ruminal subóptima que puede desencadenar en una capacidad ruminal reducida para desintoxicar las aflatoxinas y ocasionar efectos adversos en los animales (Mostrom y Jacobsen, 2020).

Se ha demostrado que la ingesta crónica de aflatoxinas en los rumiantes está relacionada con los siguientes signos clínicos; reducción del apetito, abortos, disminución del crecimiento, descenso de la producción lechera y daño hepático (Newberne, 1973; Diekman y Greem, 1992; Hussein y Brasel, 2001; Mostrom y Jacobsen, 2020). Debido al daño hepático, las enzimas hepáticas generalmente se elevan y el tiempo de protombina puede prolongarse (Mostrom y Jacobsen, 2020). Por otro lado, también ha sido evidenciado que las aflatoxinas son inmunosupresoras, ya que alteran el sistema inmunológico celular y humoral, lo que hace a los animales más susceptibles a las enfermedades infecciosas, víricas, fúngicas y parasitarias (EFSA, 2004). No obstante, la principal repercusión de la exposición crónica a aflatoxinas en los rumiantes, aparte del descenso de los parámetros productivos, es la presencia de aflatoxina M1 en la leche, lo que representa un riesgo para la salud humana (Gallo et al., 2015; Mostrom y Jacobsen, 2020).

### **2.2.7. Residuos de aflatoxinas en leche y productos lácteos**

La aflatoxina M1 es muy soluble en agua debido a su grupo hidroxilo, lo que permite una rápida excreción a través de la leche (Becker-Algeri et al., 2016). Además, esta aflatoxina es térmicamente estable y una vez está presente en la leche cruda es muy poco probable que su concentración se reduzca aunque se apliquen tratamientos térmicos de rutina como

la pasteurización o la esterilización u otros procedimientos como la evaporación o el secado durante la fabricación de productos lácteos (Assem y Mohamad, 2011; Mollayusefian et al., 2021).

Respecto a la aparición en la leche, la aflatoxina M1 es detectable a las 12 h posteriores a la ingesta de aflatoxinas y, por lo general, no se encuentran trazas de esta aflatoxina a las 72 h tras la retirada de las aflatoxinas de la dieta (Mollayusefian et al., 2021). Por otro lado, ha sido reportado que aproximadamente entre el 0.3 y el 6.2% de la aflatoxina B1 ingerida por los animales puede ser excretada como aflatoxina M1 (Creppy, 2002). Las vacas en lactancia temprana pueden excretar entre 3.8-6.2% y en lactancia tardía, entre 1.8-2.5%. Al respecto, esta disminución en la excreción a lo largo de la lactancia parece estar relacionada con que los bovinos tienen una regulación positiva del metabolismo de la aflatoxina B1 durante la lactancia temprana (Coppock et al., 2018). En ovino, el porcentaje de excreción se sitúa entre 0.11 y 0.33% (Battacone et al., 2003; Battacone et al., 2005). En caprino, son muy pocos los estudios realizados sobre el porcentaje de excreción, Battacone et al. (2012) reportaron un porcentaje de excreción del 0.17% tras aplicar una sola dosis oral de aflatoxina B1.

Otro factor determinante, es que la aflatoxina M1 parece estar predominantemente asociada con la caseína, por lo que la cuajada del queso contiene una mayor concentración que el suero. De hecho, ha sido demostrado que la concentración de aflatoxina M1 es hasta 3 y 5 veces superior en los quesos blandos y duros, respectivamente, en comparación con la concentración en la leche (Prandini et al., 2009). Al respecto, Battacone et al. (2005) observaron que la concentración de aflatoxina M1 en la cuajada depende en gran medida de la concentración de esta en la leche sin procesar y que, aproximadamente, es dos veces superior a la hallada en la leche. Desde la perspectiva de salud pública esto es especialmente relevante en Europa, América u Oceanía, donde la fabricación de queso con leche de cabra es una industria fuertemente desarrollada (Silanikove et al., 2010).

La leche es un alimento muy completo que contiene nutrientes esenciales, como las caseínas, las proteínas presentes en el suero, los lípidos polares, el ácido linoleico, el ácido palmítico, la lactosa y otros constituyentes menores (calcio, fósforo, magnesio y vitamina D), los cuales tienen un valor importante para el crecimiento y el mantenimiento de la salud humana (Iqbal et al., 2015; Zhang et al., 2021).

Según la base de datos estadísticos corporativos FAOSTAT, el consumo per cápita y la producción mundial de leche han ido incrementando de manera considerable en los últimos años como se observa en la Figura 4. En el año 2019, la producción mundial alcanzó las 864854 mil toneladas de leche y el consumo medio per cápita se estableció en 70.76 kg/año. Concretamente, la producción de leche cruda de cabra constituyó el 23.9 % de toda la producción de leche de ese año, un porcentaje nada desdeñable, siendo Asia y África los principales productores (FAOSTAT, 2022).

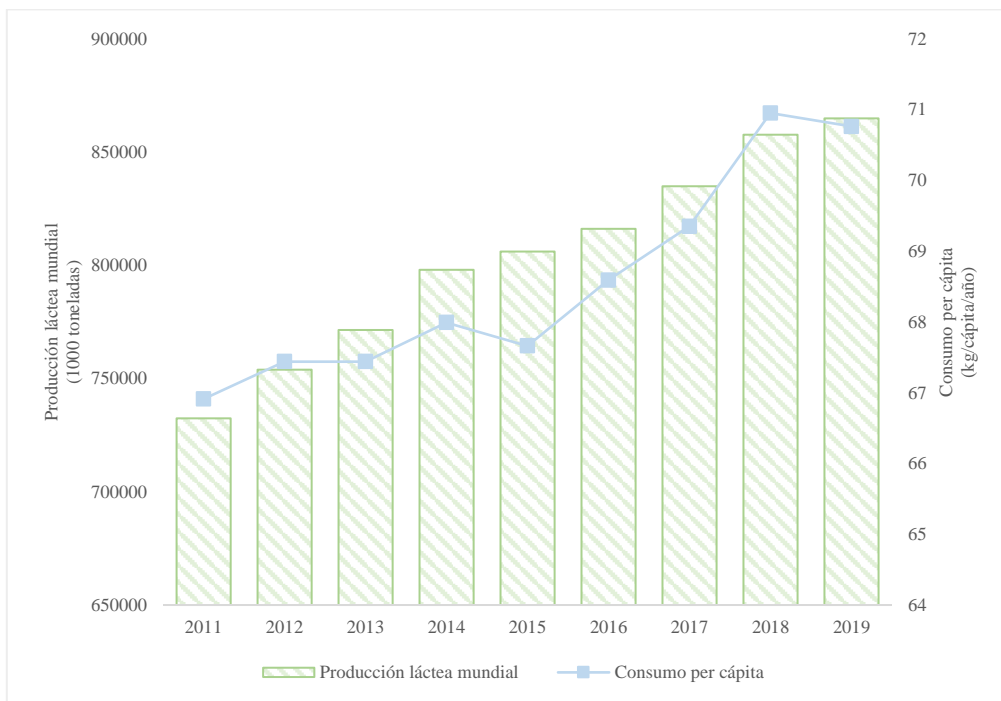


Figura 4. Gráfico combinado. Producción láctea mundial (barras) y consumo per cápita mundial de leche (línea) durante los años 2011 y 2019. Elaboración propia. Fuente: (FAOSTAT, 2022).

Debido al elevado consumo de lácteos y a la toxicidad de la aflatoxina M1, muchos estudios han evaluado la prevalencia de esta sustancia en muestras de leche y productos lácteos a lo largo del mundo. Al respecto, muchos países han reportado niveles de aflatoxina M1 por encima del nivel máximo permitido por la Unión Europea establecido en 0.05 µg/kg, o incluso, por encima del nivel de acción de la FDA establecido en 0.5 µg/kg (FDA, 2005).



En Argelia, Mohammedi-Ameur et al. (2020) analizaron 84 muestras de leche cruda de tres regiones del país. En su estudio, en el 46.43% de las muestras se detectó aflatoxina M1 en un rango de concentraciones de 0.095-0.557  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . En Brasil, Conteçotto et al. (2021) analizaron 30 muestras de leche UHT recolectadas en un centro de educación infantil en Maringá. El 44.11% de las muestras contenía aflatoxina M1 en un rango de concentraciones de 0.15-0.56  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . En Etiopía, Tadesse et al. (2020) analizaron 108 muestras de leche y 72 muestras de queso industrial comprados en mercados del país. El 100% de las muestras presentó aflatoxina M1 y las concentraciones medias fueron 0.835 y 5.58  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para la leche y el queso, respectivamente. En India, Hattimare et al. (2022) analizaron 46 muestras de leche cruda vendidas en mercados minoristas en Chhattisgarh. El 41.3% de estas muestras estaban contaminadas con aflatoxina M1 y la concentración media fue de 0.273  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . En el mismo país, Sharma et al. (2020) evaluaron 150 muestras de leche de la ciudad de Hisar. De estas muestras, 31 excedían el límite de 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . En Irán, la concentración media general de aflatoxina M1 en las 11814 muestras de leche incluidas en los 77 estudios que analizaron Abyaneh et al. (2020) en su revisión sistemática fue de 0.056  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . En Pakistán, Ahmad et al. (2018) analizaron 210 muestras de diferentes tipos de leche de varias áreas de la provincia de Punjab. El 93% de las muestras estaban contaminadas con aflatoxina M1 con una concentración media de 0.192  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . En resumen, muchos países en vías de desarrollo exceden de manera sustancial los límites de la FDA y de la Unión Europea para la aflatoxina M1, lo cual indica el riesgo potencial para la salud humana en aquellas regiones del mundo donde el consumo de leche es elevado. Particularmente los niños, que pueden consumir más leche y son más vulnerables a los efectos adversos de esta aflatoxina, forman el colectivo de más preocupación (Turna y Wu, 2021). Por lo tanto, monitorear y controlar la contaminación por aflatoxina M1 en los productos lácteos destinados a niños es especialmente necesario dada la situación actual en estos países (Sharafi et al., 2022).

En la Unión Europea, la presencia de aflatoxina M1 en leche y productos lácteos también ha sido reportada en varios países. En España, Rubio et al. (2011) analizaron 489 muestras de leche de oveja manchega, 407 muestras recogidas en tanques en las granjas y 82 muestras de silo y cuajada recogidas en queserías del sureste del país. La concentración de aflatoxina M1 encontrada en la leche de los tanques y en los silos se situó entre 0.004-0.005  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 0.006-0.007  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectivamente. No obstante, los valores encontrados en la cuajada se establecieron entre 0.024-0.026  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , valores

mucho más próximos al límite establecido en 0.05 µg/kg. En Italia, De Roma et al. (2017) analizaron 416 muestras de leche de vaca de las regiones de Campania y Calabria. Del total de muestras analizadas, sólo un 12,3% presentó aflatoxina M1 con una concentración media de 0.037 µg/kg. En Portugal, Duarte et al. (2012) analizaron 40 muestras de leche semidesnatada de distintas marcas comercializadas en el país. El 27.5% de esas muestras estaban contaminadas con aflatoxina M1 con una concentración media establecida en 0.023 µg/kg. En Grecia, Tsakiris et al. (2013) analizaron 196 muestras de leche del mercado griego. La aflatoxina M1 fue detectada en el 46.5% de las muestras, pero sólo dos muestras superaron el límite máximo permitido. En Croacia, Bilandžić et al. (2017) analizaron 1618 muestras de leche de vaca de diferentes regiones del país. El rango de concentraciones de aflatoxina M1 halladas se situó entre 0.0009-0.0854 µg/kg. De todas estas muestras, sólo 12 superaron los niveles máximos permitidos.

Por lo general, el nivel de incidencia de aflatoxina M1 en la leche y los productos lácteos en los países desarrollados es menor que en los países en vías de desarrollo. Esta menor incidencia es debida a unas regulaciones más estrictas sobre las materias primas destinadas a alimentación animal y sobre los productos lácteos, así como la implementación de buenas técnicas analíticas (Iqbal et al., 2015). No obstante, en los países económicamente desarrollados, el comercio internacional y, como se ha comentado anteriormente, el cambio climático, hacen que la aflatoxina M1 sea un problema candente que hay que seguir evaluando con el objetivo de asegurar la salud humana, animal y del medio ambiente (Frazzoli et al., 2017).

#### **2.2.8. Medidas para reducir o prevenir la exposición a aflatoxinas**

A lo largo de los años se han desarrollado diferentes estrategias para prevenir el crecimiento de hongos aflatoxigénicos y la prevención de aflatoxinas en las materias primas. En este contexto, han sido evaluados científicamente numerosos métodos físicos y químicos de desintoxicación, pero muy pocos son relevantes y aplicables actualmente (Haque et al., 2020). En cuanto a los métodos químicos, su mecanismo se basa en desactivar y degradar las aflatoxinas mediante la oxidación y/o la hidrólisis del anillo de lactona de las aflatoxinas, o por la oxidación del doble enlace en el anillo de furano terminal. No obstante, los residuos que estos métodos depositan en los alimentos tras su aplicación limitan extremadamente su uso. Por otro lado, los métodos físicos tratan de

eliminar o desactivar las aflatoxinas mediante el calentamiento, la cocción o la radiación. Sin embargo, debido a la baja solubilidad de las aflatoxinas en agua, estos tratamientos son inviables y económicamente ineficientes (Popescu et al., 2022).

En las últimas décadas, se han desarrollado y evaluado distintos aditivos para piensos que actúan de manera dietética postcosecha para reducir la exposición a las aflatoxinas en los animales (Boudergue et al., 2009; Elliot et al., 2019). En este sentido, el Reglamento (CE) n° 1831/2003 sobre los aditivos en alimentación animal fue modificado por el Reglamento (CE) n° 386/2009, y en su Anexo I se añadió una nueva categoría denominada “sustancias para la reducción de la contaminación del alimento por micotoxinas: sustancias que pueden suprimir o reducir la absorción, promover la excreción de micotoxinas o modificar su modo de acción”. Dentro de esta nueva categoría se pueden encontrar dos grandes grupos: agentes biotransformadores y agentes adsorbentes o captadores (Boudergue et al., 2009).

El primer grupo hace referencia al uso de bacterias, levaduras o enzimas, y es considerado una alternativa a los métodos físicos y químicos, ya que su aplicación es menos costosa y, por lo general, son métodos menos agresivos con los alimentos. Desafortunadamente, la gran mayoría de investigaciones que evalúan estos aditivos se centran exclusivamente en la concentración de aflatoxina que logran reducir, sin evaluar el mecanismo implicado en la biodegradación, la toxicidad de los productos resultantes o el valor nutricional de los alimentos (Wielogórska et al., 2016; Ndiaye et al., 2022). Por ello, todavía son necesarios más estudios científicos que evalúen sus mecanismos y su inocuidad.

Respecto a los captadores, son aditivos frecuentemente utilizados en nutrición animal, los cuales reducen parcialmente la absorción de varias micotoxinas, incluidas las aflatoxinas. Su mecanismo de acción consiste en la formación de un complejo captador-micotoxina, el cual es excretado por las heces sin ser absorbido en el tracto gastrointestinal (Kolawole et al., 2022). Por lo tanto, el uso de captadores podría considerarse un método de descontaminación físico, ya que implica la unión entre un compuesto tóxico y el captador (Popescu et al., 2022). Dicha unión puede llevarse a cabo por diferentes tipos de interacciones, como la unión hidrofóbica, los enlaces de hidrógeno, la atracción electrostática o los enlaces de repulsión (Di Gregorio et al., 2014; Vila-Donat et al., 2018). Algunos ejemplos de captadores son el carbón activo, la bentonita, la montmorillonita, el aluminosilicato de calcio y sodio hidratado o la celulosa y los

polisacáridos presentes en las paredes celulares de levaduras y bacterias (Popescu et al., 2022).

Por otro lado, también ha sido demostrado que determinados extractos de plantas, aceites esenciales y especias son resistentes al crecimiento de hongos y pueden tener un efecto protector frente a las micotoxinas, además de incrementar la producción de los animales y mejorar la calidad de los alimentos (Abd El-Hack et al., 2018). Por lo que, su inclusión en los piensos podría ser beneficiosa para mitigar el efecto de las aflatoxinas.

Enfoques más innovadores como la elaboración de nanomateriales con actividad antifúngica, el desarrollo de anticuerpos específicos en las plantas para limitar la distribución de los hongos o la mejora genética de los cultivos son considerados posibles alternativas para el control y la prevención de las micotoxinas en un futuro (Haque et al., 2020).

### **2.3. Modelo caprino en investigación**

Los animales de granja son ampliamente utilizados en investigación científica en estudios relacionados con la cría de animales, las ciencias agrícolas y veterinarias, la seguridad alimentaria y la medicina (Schmidt et al., 2021). Dentro de los animales de granja, la cabra (*Capra hircus*) fue uno de los primeros ungulados domesticados por el ser humano hace aproximadamente 10000 años en el oeste de Asia (Naderi et al., 2008). Por lo general, las cabras son curiosas, muy sociables, fáciles de manejar, se consideran inteligentes, limpias y relativamente resistentes (Fulton et al., 1994). Estas cualidades y su disponibilidad comercial, las hacen un modelo animal conveniente y deseable para proyectos de investigación y de capacitación. Aunque las condiciones laborales difieren en gran medida de los entornos silvestres o agrícolas en los que habitan, la larga historia de domesticación y las técnicas de cría pueden ayudar a desarrollar estrategias para utilizar y cuidar adecuadamente a las cabras en un entorno de investigación (Larsen, 2015). Sus usos en investigación son muy variados e incluyen campos como la ortopedia, la reproducción, las enfermedades infecciosas, los estudios veterinarios, la agricultura, entre otros (Flaherty et al., 2010). En España, el número de usos de cabras fue de 445, 348 y 222 en experimentación animal en los años 2018, 2019 y 2020, respectivamente, según los datos recopilados en el último informe sobre usos de animales en experimentación animal del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA, 2020).

En la actualidad, más de 115 millones de animales se utilizan en todo el mundo en experimentación cada año. Por lo general, la experimentación animal se divide en dos categorías; (I) investigación básica focalizada en investigación biológica y enfermedades humanas y (II) investigación aplicada centrada en el desarrollo de fármacos y pruebas de toxicidad y seguridad. Independientemente de su categorización, la experimentación animales pretende evidenciar o aclarar procesos biológicos para promover la seguridad y la eficacia de los tratamientos (Akhtar, 2015).

En la Unión Europea, el 22 de septiembre de 2010, se publicó la Directiva 63/2010/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos, la cual considera lo siguiente; (I) el bienestar de los animales es un valor consagrado, (II) el cuidado y el uso de animales vivos para fines científicos se rige por los principios establecidos internacionalmente de reemplazo, reducción y refinamiento y (III) debe tratarse a los animales siempre como criaturas sensibles, y su utilización en procedimientos científicos debe restringirse a aquellos ámbitos que benefician en última instancia a la salud humana y animal o al medio ambiente. Por lo tanto, esta nueva directiva supuso un importante avance para garantizar la protección de los animales utilizados en investigación. En España, la transposición de la Directiva 63/2010/UE a nuestra legislación se llevó a cabo mediante el Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

De acuerdo con la Directiva 63/2010, los animales pertenecientes a las especies enumeradas en el anexo I deben criarse específicamente para su uso en experimentos con animales y, por lo tanto, deben obtenerse de criadores y suministradores autorizados. No obstante, los animales de granja no están incluidos en este anexo por lo que generalmente se obtienen directamente de explotaciones ganaderas, lo que resulta en una notable heterogeneidad microbiológica e higiénica (Edwards et al., 2018). Los principales criterios para considerar la evaluación de una granja como proveedor potencial son (FELASA, 2020):

- El tipo de instalaciones y las condiciones de alojamiento de los animales, así como la probabilidad de que el proveedor mantenga un programa de gestión de salud adecuado.
- El historial de salud de la granja y el número y tipo de controles que se realizan.

- Verificar si y con qué frecuencia el criador introduce nuevos animales.
- La cercanía de la explotación con el centro de experimentación donde se usarán los animales.
- La disponibilidad de las instalaciones que permitan la separación de animales en caso de necesidad.
- La comprobación de los medios de transporte de los animales y la duración de la carga y descarga.
- La comunicación clara y transparente y la confianza mutua son esenciales para una buena colaboración.
- La capacidad de entregar el número de animales calificados solicitados en el momento deseado.

### **3. OBJETIVOS**

Debido a la creciente preocupación por la contaminación de aflatoxina M1 en la industria láctea, además de los limitados estudios científicos en cabras, nuestros objetivos fueron:

1. Evaluar la transferencia de aflatoxina B1 de la dieta a la leche como aflatoxina M1 para determinar el porcentaje y la curva de excreción en caprino.
2. Estudiar el posible efecto de una exposición continua de aflatoxina B1 sobre los diferentes parámetros productivos.
  - a) Consumo de pienso.
  - b) Producción lechera.
  - c) Calidad de la leche.
3. Determinar las posibles alteraciones sobre los principales parámetros bioquímicos sanguíneos tras una exposición a aflatoxina B1.

## **4. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **4.1. Instalaciones**

El procedimiento experimental se llevó a cabo en el Centro de Experimentación en Nutrición Animal, perteneciente al departamento de Producción Animal de la Universidad de Córdoba. Referente a su organización, este centro dispone de diferentes secciones para garantizar un buen funcionamiento, mantener unas adecuadas condiciones higiénico-sanitarias y asegurar el bienestar de los animales. Concretamente, dispone de una zona de alojamiento para los animales que consiste en una habitación cerrada dotada de iluminación, aireación y climatización natural y artificial. Para la estabulación de los animales dispone de 24 corrales individuales de 1 x 1.5 m, provistos de comederos y bebederos propios, distribuidos a lo largo de dos pasillos. Los corrales están elevados y tienen el suelo de rejilla para que los excrementos generados por los animales caigan al foso situado debajo de los mismos. Además, cuenta con un sistema mecanizado de autolimpieza que cuando se activa arrastra los excrementos de los animales fuera de la zona de alojamiento hacia un contenedor de residuos.

Por otro lado, estas instalaciones también cuentan con una sección que comunica directamente con la zona de alojamiento y que dispone del instrumental y el material necesario para realizar las múltiples tareas llevadas a cabo durante cualquier procedimiento experimental. Por último, este centro de experimentación cuenta con un patio exterior, un almacén, vestuarios y zonas de aseo. En la Figura 5 se muestran varias imágenes de la zona de alojamiento de los animales.

El protocolo experimental fue autorizado por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Córdoba de acuerdo con la normativa vigente.





Figura 5. Zona de alojamiento de animales del Centro de Experimentación en Nutrición Animal. (A) Vista central de la zona de alojamiento. (B) Mecanismo de autolimpieza. (C) Corrales con cabras de raza Florida. (D) Vista lateral de la zona de alojamiento.

#### 4.2. Animales de experimentación

Para la realización del estudio se emplearon 18 cabras de raza Florida multíparas en lactación tardía (>120 días en lactación), en buen estado de salud y sin historial de enfermedades previas en la granja de origen. Antes de comenzar el ensayo, los animales fueron desparasitados internamente y vacunados frente a enterotoxemia con productos comerciales. Durante el estudio, los animales fueron monitorizados exhaustivamente, teniendo en cuenta su aspecto externo, así como su comportamiento, con el fin de detectar cualquier signo evidente de enfermedad.

Estas 18 cabras se agruparon aleatoriamente en tres grupos de seis animales cada uno, expuestos a dosis de aflatoxina B1 diferentes. La aflatoxina B1 pura (SIGMA, A-

6636, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO) se disolvió en metanol y se utilizó un pellet como vehículo de inoculación a las 6 h previas a cada ordeño. Respecto a la aleatorización de los grupos, se utilizó para que fuesen similares entre sí y que los efectos de los tratamientos se pudiesen comparar de la forma más imparcial posible. Los diferentes grupos se recogen en la Tabla 3.

Tabla 3. Denominación y dosis de aflatoxina B1 de los diferentes grupos del estudio.

<b>Grupo</b>	<b>Dosis de aflatoxina B1</b>
Control (CON)	0 $\mu\text{g}/\text{día}$
Tratamiento 1 (T1)	120 $\mu\text{g}/\text{día}$
Tratamiento 2 (T2)	60 $\mu\text{g}/\text{día}$

### **4.3. Alimentación**

Las cabras fueron alimentadas con pienso granulado comercial elaborado por la empresa INALSA (Ciudad Real). Se estableció una ración de 1350 g/día, ofrecida en un único reparto a primera hora de la mañana. La cantidad sobrante era retirada y pesada al día siguiente para establecer el consumo de pienso diario. El pienso fue formulado específicamente para cubrir las necesidades nutricionales de los animales en el periodo concreto de lactación en el que se encontraban. En la Figura 6 se muestran los ingredientes y los componentes analíticos del pienso. Además de a este pienso, los animales tenían acceso a otro comedero con una ración de 500 g/día de heno, que no fue cuantificada para evaluar el consumo de alimento debido a que generalmente la cantidad sobrante no era posible de contabilizar, ya que los animales la esparcían fuera del comedero. Por último, los animales tenían libre disposición de agua durante todo el estudio experimental.

### COMPOSICIÓN

Cebada, harina de extracción de girasol parcialmente decortinado, yeros, maíz, residuos desecados de destilería, salvado de arroz, torta de presión de palmiste, alimento de gluten de maíz, salvado de trigo, avena, carbonato de calcio, guisantes, cáscaras de habas de soja, harina de extracción de soja tostada, cloruro sódico, bicarbonato de sodio, sales de ácidos grasos de palma y aceite vegetal de palma.

#### COMPONENTES ANALÍTICOS (%)

Proteína bruta: 17%

Grasa bruta: 4,5%

Fibra bruta: 9,5%

Cenizas brutas: 8,4%

Sodio: 0,49%

Figura 6. Ingredientes y componentes analíticos del pienso granulado.

#### 4.4. Ordeño

El ordeño se realizó mediante ordeñadoras portátiles, una vez al día y de manera individual. El procedimiento de ordeño para cada animal se realizó de la siguiente forma; (1) eliminación del tapón sellador del pezón y desecho manual de los primeros chorros de leche, (2) conexión de las copas de ordeño hasta el vaciado de las ubres, (3) retirada de las copas de ordeño y sellado de los pezones con yodo, (4) pesaje de la cantidad de leche producida por animal y, (5) enjuague con agua de la maquinaria para eliminar la contaminación entre individuos. Durante este procedimiento fue fundamental el control y la regulación del vacío que ejercían las pezoneras sobre las ubres para reducir el riesgo de mamitis, además de otras lesiones, que pudiesen afectar al bienestar de los animales y/o alterar los resultados del estudio. Posterior a cada ordeño, se procedía a la limpieza y desinfección de las ordeñadoras portátiles en el patio exterior. La Figura 7 muestra la maquinaria, así como, varias fases dentro del ordeño.



Figura 7. Procedimiento de ordeño. (A) Ordeñadoras portátiles. (B) Ordeño mecánico. (C) Desellado y desecho de los primeros chorros de leche. (D) Limpieza y desinfección de la ordeñadora portátil en el patio exterior.

#### 4.5. Diseño experimental

El procedimiento experimental incluyó un periodo previo de aclimatación de 14 días, necesario para que los animales se adaptaran a las instalaciones y a la nueva dieta. Tras el periodo de aclimatación, la fase experimental duró 34 días con un periodo de exposición desde el día 1 hasta el día 31.

Sobre los animales se realizaron diferentes mediciones y tomas de muestras a lo largo del estudio como queda reflejado en la Figura 8. Las muestras de leche para la determinación de la concentración de aflatoxina M1 se tomaron el último día del periodo de aclimatación y los días 1, 2, 3, 10, 17, 24, 31, 32, 33 y 34 del periodo experimental. En cambio, las muestras para la evaluar la composición de la leche se tomaron sólo los días 3, 10, 17, 24 y 31 del periodo experimental. Además, en los mismos días que para evaluar la composición de la leche se calcularon tanto el consumo de alimento como la producción láctea media para cada animal, que previamente, habían sido anotados

diariamente. Por último, se recogió una muestra sanguínea por venopunción yugular de cada animal el último día de exposición.

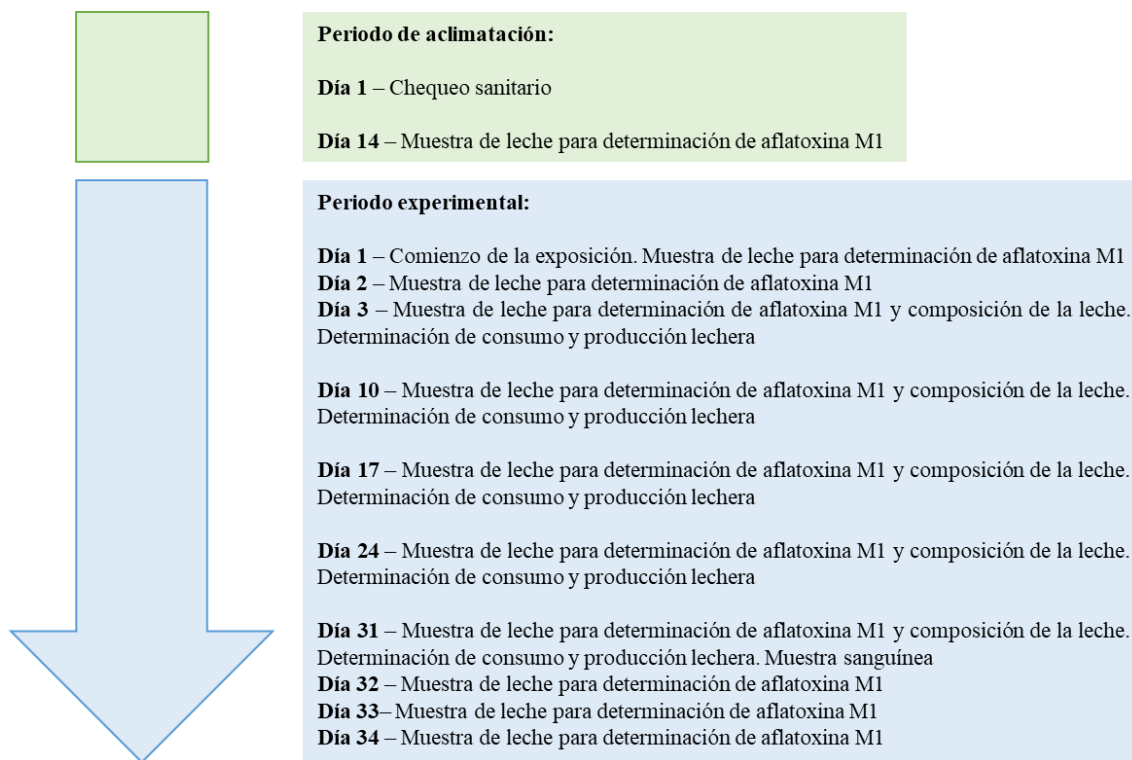


Figura 8. Fases, mediciones y toma de muestras del procedimiento experimental.

Tanto para la determinación de la concentración de aflatoxina M1 como para la evaluación de la composición de la leche se tomaban 100 mL de muestra. Estas muestras eran congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

#### 4.5.1. Determinación de la concentración de aflatoxina M1 en la leche

La concentración de aflatoxina M1 se determinó en el Servicio Centralizado de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba mediante Cromatografía Líquida acoplada a un detector de Espectrometría de Masas en tándem (CL-EM/EM). Esta técnica analítica combina el poder de separación de los componentes de una mezcla de la cromatografía líquida con la gran selectividad, sensibilidad y precisión en la determinación de la masa molecular de la espectrometría de masas, proporcionando tanto

información cualitativa como cuantitativa. Respecto al equipamiento, se utilizó un cromatógrafo Agilent 1200 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE. UU.) equipado con un espectrómetro de masas 3200 QTRAP (Applied Biosystems, AB Sciex, Foster City, CA, EE.UU.). Los componentes de las muestras obtenidos en la cromatografía líquida pasaron al espectrómetro de masas mediante ionización por electropulverización (ESI).

Las concentraciones utilizadas para la obtención de la curva de calibración de la CL-EM/EM fueron 1, 5, 10, 50 y 100  $\mu\text{g/L}$  de aflatoxina M1. Al respecto, la ecuación de regresión obtenida fue:  $y = 358.64x$ ; donde “y” es igual al área y “x” a la concentración de aflatoxina M1 y su coeficiente de determinación ( $R^2$ ) fue 0.9981. En este sentido, el valor  $R^2$  de la prueba estuvo muy próximo a la unidad, por lo tanto, la determinación de la concentración de aflatoxina M1 en las muestras de leche fue prácticamente exacta. La Figura 10 muestra la curva de calibración para la CL-EM/EM.

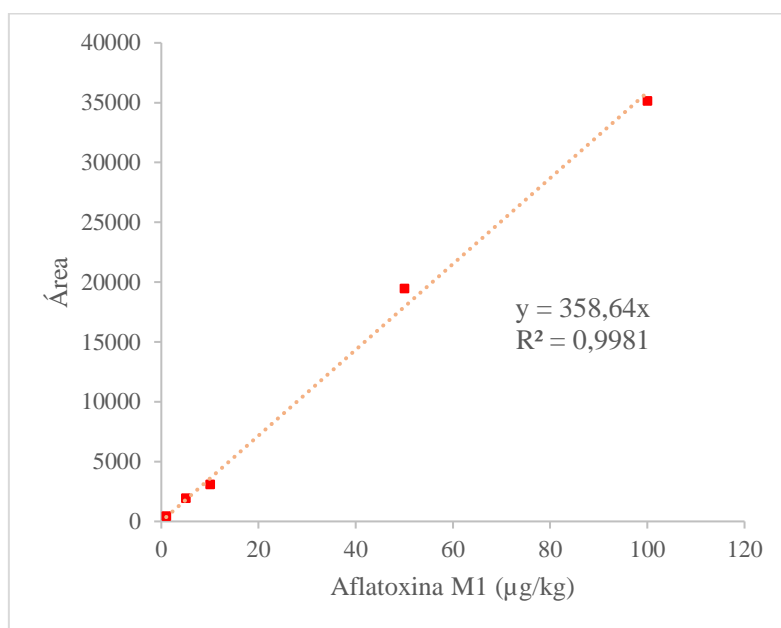


Figura 9. Curva de calibración para la CL-EM/EM.

#### 4.5.2. Determinación de la composición de la leche

Las muestras destinadas a la calidad lechera se analizaron en el Laboratorio Lechero, del departamento de Producción Animal de la Universidad de Córdoba, mediante el analizador lácteo MilkoScan FT120 (Foss Electric, Hillerød, Dinamarca). Previo a su análisis, las muestras de leche almacenadas en frío se atemperaron en un baño de agua a

33°C mientras se agitaban cuidadosamente para homogeneizar la grasa. La Figura 9 muestra el análisis de las muestras de leche en el MilkoScan FT120.

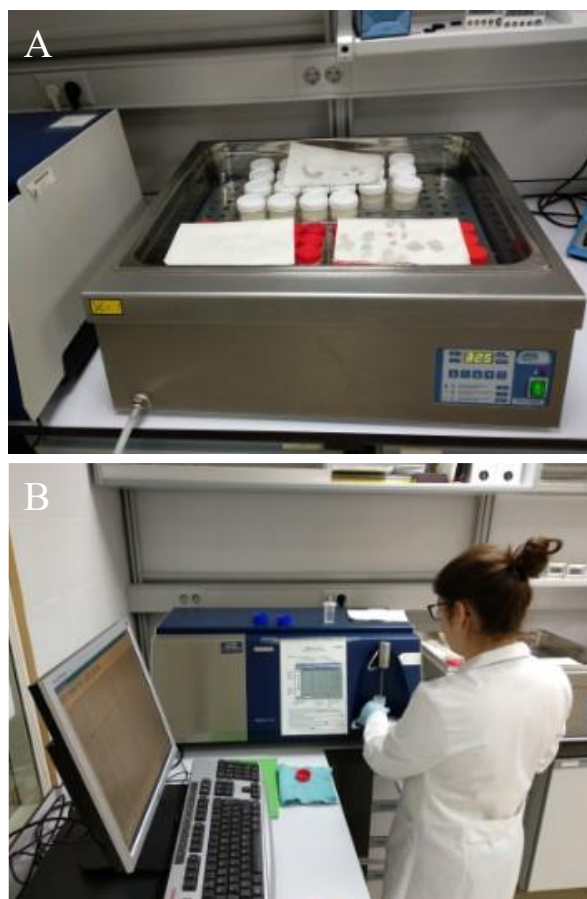


Figura 10. Análisis de la calidad de la leche. (A) Muestras de leche en baño de agua para atemperar. (B) Análisis de las muestras de leche en MilkoScan FT120.

#### 4.5.3. Muestras sanguíneas y determinación de parámetros bioquímicos

Las muestras sanguíneas fueron recogidas en tubos con heparina de sodio y analizadas inmediatamente tras su extracción. Para la obtención del plasma sanguíneo, las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos. Posteriormente, el plasma se analizó con kits colorimétricos comerciales (BioSystems S.A., Barcelona, España) mediante espectrofotometría. Los parámetros bioquímicos que se determinaron fueron los siguientes; glucosa, colesterol, urea, creatinina, proteínas totales, globulinas, bilirrubina, fosfatasa alcalina (ALP) aspartato aminotransferasa (AST) y gamma-glutamil transferasa (GGT).

#### **4.5.4. Determinación de aflatoxinas en pienso y heno**

La ausencia de aflatoxinas en el pienso y en el heno se realizó mediante ELISA (Bio-Shield Aflatoxin Total ES, Prognosis Biotech). Para ello, una cantidad representativa de muestra (pienso o heno) fue molida hasta alcanzar un tamaño de partícula muy pequeño. Tras la molienda, el resultado fue homogeneizado en una bandeja metálica. Posteriormente, fueron tomadas muestras de diferentes áreas de la bandeja hasta alcanzar los 50 g. A esos 50 g se le añadieron 250 mL de metanol al 70%, es decir, una relación 1:5 entre la muestra y el solvente de extracción. La mezcla obtenida fue decantada en un tubo Falcon después de ser filtrada con papel de filtro para obtener entre 20 y 40 mL de solución para testar.

Tras preparar la solución para testar, se utilizó una placa con 48 pocillos. A los pocillos utilizados se le añadieron 200  $\mu$ L de diluyente matriz con micropipeta. Para testar la concentración de aflatoxinas se añadieron 50  $\mu$ L de reactivo y 50  $\mu$ L de solución para testar, dejando los blancos sólo con la solución matriz. Tras esto, 100  $\mu$ L de cada pocillo fueron transferidos a su respectivo pocillo recubierto con anticuerpo en otra placa. Estos pocillos fueron tapados con una película de sellado y se dejaron incubar 10 min a temperatura ambiente. Mientras tanto, se preparó la solución de lavado de la placa y, para ello, se mezclaron 50 mL de tampón de lavado en el interior de una botella con 950 mL de agua destilada.

Transcurridos los 10 min, se retiró la película de sellado y se procedió al lavado de los pocillos con la solución anteriormente preparada. En los pocillos lavados, se añadieron 100  $\mu$ L de solución reveladora y se volvieron a tapar durante 5 min. Tras esto, se volvió a lavar la placa. De nuevo sobre los pocillos se añadieron 100  $\mu$ L de solución TMB, se volvieron a tapar y se dejaron incubar 5 min a temperatura ambiente sin luz. Después de esto, se añadieron 100  $\mu$ L de solución Stop a cada pocillo y se removieron manualmente durante unos pocos segundos. Finalmente, la densidad óptica para cuantificar la concentración de aflatoxinas fue determinada en un lector de microplacas a 450 nm.



#### 4.6. Análisis estadístico de los datos

El porcentaje de excreción de aflatoxina M1 se calculó de manera individual para cada animal siguiendo la fórmula utilizada por Aazami et al. (2019):

$$\% \text{ excreción aflatoxina M1} = \frac{\text{Concentración aflatoxina M1} \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{kg}} \right) \times \text{Producción láctea} \left( \frac{\text{kg}}{\text{day}} \right)}{\text{Aflatoxina B1 ingerida} (\mu\text{g/día})}$$

Dicha fórmula nos indica que el porcentaje de excreción de aflatoxina M1 es igual a la multiplicación de la concentración de aflatoxina M1 hallada en la leche ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) por la producción láctea de ese animal ( $\text{kg}/\text{día}$ ) dividida por la cantidad de aflatoxina B1 ingerida ( $\mu\text{g}/\text{día}$ ). Como indicaron Battacone et al. (2009) el porcentaje de excreción de aflatoxina M1 en la leche se calculó cuando la presencia de toxina en la leche alcanzó un estado estable (del día 3 al 31 del período de exposición).

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el Software SAS/STAT (SAS Institute Inc., Cary, NC). Se verificó la normalidad de los datos mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y se analizaron siguiendo el siguiente modelo lineal mixto utilizado por Battacone et al. (2003):

$$y_{ijk} = \mu + T_i + P_j + (T \times P)_{ij} + E_k + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:  $y$  = Variable dependiente (concentración de aflatoxina M1, porcentaje de excreción, producción láctea, composición de la leche y consumo de alimento);  $\mu$  = media general;  $T_i$  = efecto fijo de la administración de aflatoxina B1 ( $i = 0, 60, 120 \mu\text{g}$ );  $P_j$  = efecto fijo del tiempo de muestreo ( $j = \text{day}$ );  $E_k$  = efecto aleatorio de cada animal;  $\varepsilon_{ijk}$  = error residual. Dentro del modelo se utilizó el test Tukey como método *post hoc* para la realización de comparaciones múltiples entre grupos. Para la concentración de aflatoxina M1, solo se utilizaron los datos cuando la excreción de aflatoxina era estable (desde el día 3 al día 31).

Debido a la no normalidad en la mayoría de los datos obtenidos sobre los parámetros bioquímicos, se utilizó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis para establecer las diferencias entre los diferentes grupos.

En todos los casos la significancia estadística se estableció para un valor de  $p < 0.05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Efecto de la administración de aflatoxina B1 sobre la concentración de aflatoxina M1 en la leche

Respecto al análisis de las muestras de leche el último día del periodo de aclimatación, no fueron detectadas trazas de aflatoxina M1 en ningún animal. Por otro lado, en ninguna muestra recogida de los animales del grupo control (CON) durante todo el periodo de exposición se detectó aflatoxina M1.

Tras comenzar la exposición a aflatoxina B1, la presencia de aflatoxina M1 fue detectada en todas las muestras de leche tomadas de los grupos T1 y T2. Al respecto, la curva de excreción es mostrada en la Figura 11. En ambos grupos la curva de excreción sigue un patrón similar. En este caso, vemos como aumenta la concentración de aflatoxina M1 durante los dos primeros días hasta alcanzar el pico máximo de excreción a las 78 h. Tras eso, la concentración se mantiene constante mientras que continúa la exposición a aflatoxina B1. Finalmente, cuando la aflatoxina B1 es retirada de la dieta (día 31), la concentración de aflatoxina M1 comienza a descender rápidamente hasta que la leche queda libre a las 78 h aproximadamente.

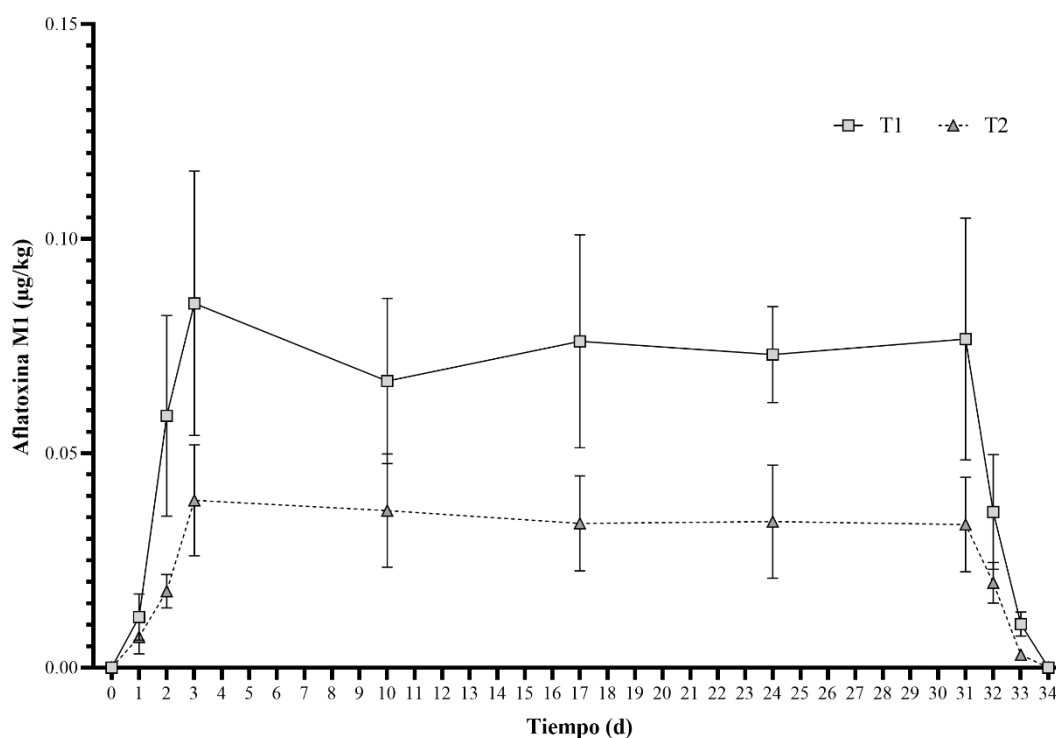


Figura 11. Curva de excreción de aflatoxina M1 en leche de cabra.

Las concentraciones medias generales de aflatoxina M1 cuando la excreción es estable, es decir, desde el día 3 hasta el día 31, fueron  $0.075 \pm 0.023$  y  $0.035 \pm 0.012$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  para los grupos T1 y T2, respectivamente. Los estadísticos descriptivos referentes a la concentración de aflatoxina M1 son mostrados en la Tabla 4. En dicha tabla, el grupo CON no es mostrado debido a la ausencia de aflatoxina M1 en este grupo. Las desviaciones estándar mostradas en la Figura 11 y la Tabla 4, nos indican una amplia variedad entre sujetos de un mismo grupo, lo que justifica introducir el efecto aleatorio de cada individuo dentro del modelo mixto. Al respecto, las concentraciones mínimas y máximas de aflatoxina M1 para los grupos T1 y T2 fueron 0.0429-0.1294 y 0.0184-0.0627  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectivamente. Como podemos observar, la concentración mínima de aflatoxina M1 encontrada en el grupo T1 fue inferior a la máxima encontrada en el grupo T2, por lo que es posible que algún animal expuesto a una dosis inferior pueda excretar más aflatoxina M1 que otro expuesto a una dosis superior en ocasiones concretas.

Tabla 4. Concentraciones de aflatoxina M1 en la leche ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) de cabras expuestas a diferentes dosis de aflatoxina B1; T1 120  $\mu\text{g}/\text{día}$  y T2 60  $\mu\text{g}/\text{día}$ .

Concentración de aflatoxina M1 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )						
Grupo	Día	Media	DS	Mediana	V. Mínimo	V. Máximo
T1	3	0.0849	0.0308	0.0742	0.0567	0.1294
	10	0.0668	0.0192	0.0612	0.0481	0.0971
	17	0.0760	0.0248	0.0685	0.0469	0.1166
	24	0.0729	0.0112	0.0737	0.0590	0.0888
	31	0.0765	0.0282	0.0772	0.0429	0.1075
T2	3	0.0390	0.0129	0.0355	0.0269	0.0627
	10	0.0366	0.0132	0.0311	0.0223	0.0578
	17	0.0336	0.0110	0.0319	0.0189	0.0494
	24	0.0340	0.0132	0.0338	0.0184	0.0528
	31	0.0334	0.0110	0.0309	0.0233	0.0504

Referente al análisis estadístico de los datos, se detectó que el efecto fijo de la dosis de aflatoxina B1 ingerida influye de manera significativa ( $p < 0.01$ ) en la concentración de aflatoxina M1 en la leche. Por el contrario, el efecto fijo del tiempo de exposición ( $p = 0.87$ ) y la interacción de efectos ( $p = 0.70$ ) no influyen de manera

significativa sobre la concentración de ésta en la leche. El análisis *post hoc* mostró que el grupo T1 expuesto a una dosis superior de aflatoxina B1 excreta en la leche de manera significativa ( $p < 0.01$ ) más aflatoxina M1 que el grupo T2 expuesto a una dosis inferior. La relación entre la concentración de aflatoxina M1 en leche y la de aflatoxina B1 ingerida puede ser expresada por la siguiente ecuación:

$$\text{Aflatoxina M1 } (\mu\text{g/kg}) = 0.00063 * \text{Aflatoxina B1 } (\mu\text{g/d});$$

$$\text{SE} = 0.0148; R^2 = 0.81; p < 0.01$$

Para esta ecuación no se encontraron valores significativos para la intersección ( $p = 0.75$ ). Aplicando dicha ecuación, podemos observar que la concentración de aflatoxina M1 aumenta linealmente cuando la ingesta de aflatoxina B1 incrementa.

## 5.2. Efecto de la administración de aflatoxina B1 sobre el porcentaje de excreción de aflatoxina M1 en la leche

Los estadísticos descriptivos referentes al porcentaje de excreción de aflatoxina M1 en la leche de los grupos T1 y T2 a lo largo de los diferentes muestreos realizados durante la fase de exposición se muestran en la Tabla 5. Hay que recordar que el porcentaje de excreción ha sido calculado cuando las concentraciones de aflatoxina M1 se han mantenido estables (desde el día 3 al 31). Al igual que en la Tabla 4, el grupo CON no es mostrado en la Tabla 5, ya que no se ha detectado aflatoxina M1 en este grupo. Respecto al porcentaje medio de excreción, se estableció en 0.0662% para el grupo T1 y 0.0602% para el T2.

Tabla 5. Estadísticos descriptivos referentes al porcentaje de excreción de aflatoxina M1 en la leche de cabras expuestas a diferentes dosis de aflatoxina B1; T1 120 µg/día y T2 60 µg/día.

Porcentaje de excreción de aflatoxina M1						
Grupo	Día	Media	DS	Mediana	V. Mínimo	V. Máximo
T1	3	0.0754	0.0241	0.0683	0.0489	0.1050
	10	0.0594	0.0211	0.0540	0.0368	0.0951
	17	0.0653	0.0243	0.0559	0.0414	0.1078
	24	0.0672	0.0144	0.0642	0.0508	0.0944
	31	0.0635	0.0186	0.0622	0.0393	0.0873
T2	3	0.0686	0.0296	0.0582	0.0512	0.1286
	10	0.0634	0.0215	0.0562	0.0406	0.0949
	17	0.0541	0.0149	0.0547	0.0319	0.0730
	24	0.0594	0.0209	0.0632	0.0326	0.0879
	31	0.0553	0.0160	0.0509	0.0397	0.0749

Del mismo modo que ocurre con la concentración de aflatoxina M1 en la leche, el análisis estadístico de los datos indicó que el efecto fijo de la dosis de aflatoxina B1 influye significativamente ( $p < 0.01$ ) en el porcentaje de excreción y que el factor fijo del tiempo de exposición ( $p = 0.69$ ) y la interacción entre efectos ( $p = 0.59$ ) no tienen significación sobre esta variable. No obstante, el análisis *post hoc* indicó que no existen diferencias significativas ( $p = 0.37$ ) en el porcentaje de excreción entre los grupos T1 y T2 como ocurre en la concentración de aflatoxina M1. En este caso, ambos grupos presentaron diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) respecto al grupo CON. En resumen, el

porcentaje de excreción no se ve afectado por la administración de diferentes dosis de aflatoxina B1 situadas entre 60 y 120  $\mu\text{g}$  al día, pero la concentración de aflatoxina M1 en la leche sí que se ve afectada por esto. En la Figura 12 se muestra un gráfico combinado que ilustra de manera visual este concepto. Por otro lado, también existe una amplia variabilidad en el porcentaje de excreción entre los diferentes sujetos. Al respecto, el porcentaje mínimo detectado independientemente del grupo fue 0.0319% y el máximo llegó a alcanzar el 0.1286%.

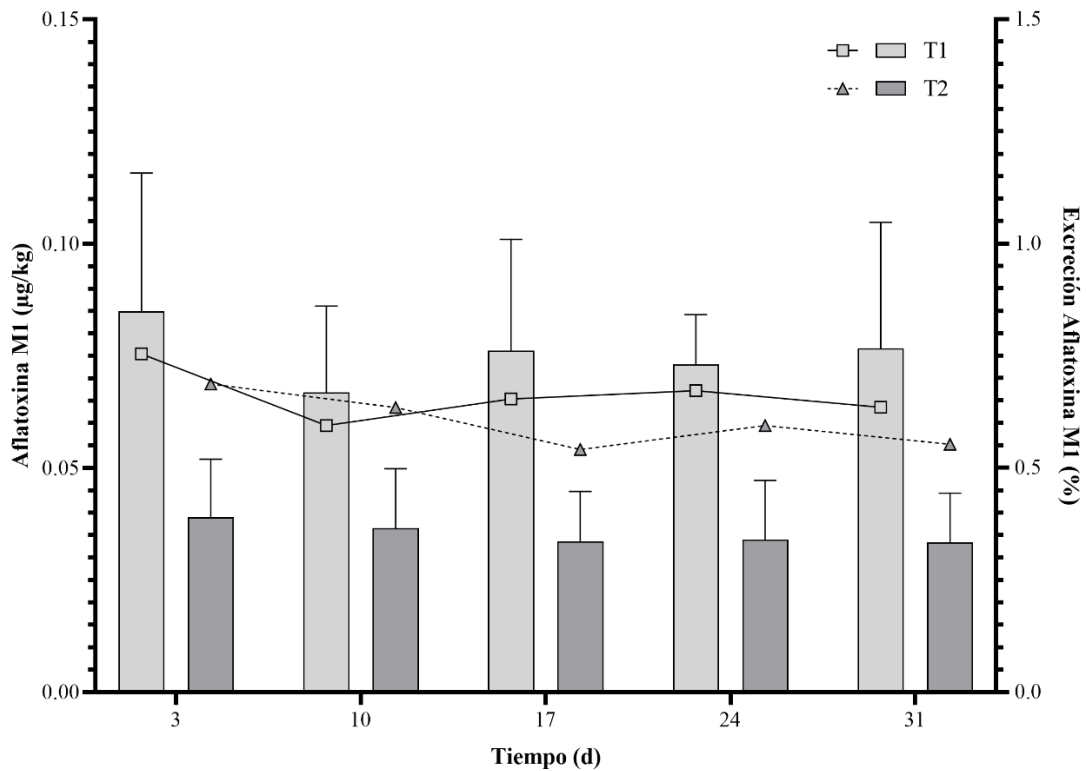


Figura 12. Gráfico combinado; concentración de aflatoxina M1 en leche (barras) y porcentaje de excreción (líneas) de los grupos T1 (120  $\mu\text{g}$  de aflatoxina B1 al día) y T2 (60  $\mu\text{g}$  de aflatoxina B1 al día) a lo largo del ensayo experimental.

### 5.3. Efecto de la administración de aflatoxina B1 sobre el consumo de pienso.

Referente al consumo de alimento, la Tabla 6 recoge los estadísticos descriptivos de los diferentes grupos a lo largo del periodo de exposición. El consumo medio general para los grupos CON, T1 y T2 se estableció en  $1118.9 \pm 88.8$ ,  $1102.9 \pm 76.4$  y  $1115.2 \pm 102.6$  g, respectivamente. Como se puede observar en la Tabla 6, el consumo de alimento fue similar en todos los grupos. De hecho, el análisis estadístico de los datos nos indicó que el efecto fijo de la administración de aflatoxina B1 ( $p = 0.374$ ), el efecto fijo del tiempo de exposición ( $p = 0.071$ ) y la interacción entre ambos efectos ( $p = 0.068$ ) no influyen de manera significativa sobre el consumo de alimento. Específicamente, esto puede observarse de manera gráfica en la Figura 13.

Tabla 6. Consumo de pienso (g) de cabras expuestas a diferentes dosis de aflatoxina B1; CON 0  $\mu\text{g}/\text{día}$ , T1 120  $\mu\text{g}/\text{día}$  y T2 60  $\mu\text{g}/\text{día}$ . Los datos se expresan como la media  $\pm$  la desviación estándar.

Consumo de alimento (g)						
Grupo	Día	Media	DS	Mediana	V. Mínimo	V. Máximo
CON	3	1065.8	62.9	1052.0	994.0	1156.0
	10	1110.0	67.0	1104.5	1014.0	1194.0
	17	1109.3	74.8	1119.0	1022.0	1205.0
	24	1175.2	126.4	1147.0	1037.0	1350.0
	31	1134.3	89.9	1128.0	1034.0	1275.0
T1	3	1099.8	81.0	1095.0	1004.0	1208.0
	10	1131.7	72.9	1153.0	999.0	1205.0
	17	1092.0	89.9	1095.5	937.0	1195.0
	24	1093.7	78.8	1124.0	987.0	1165.0
	31	1097.3	79.5	1112.0	972.0	1205.0
T2	3	1136.3	92.9	1123.0	1041.0	1296.0
	10	1134.2	68.7	1140.0	1049.0	1215.0
	17	1065.3	125.9	1029.0	946.0	1275.0
	24	1130.8	108.7	1140.5	1001.0	1302.0
	31	1109.2	125.6	1103.5	939.0	1275.0

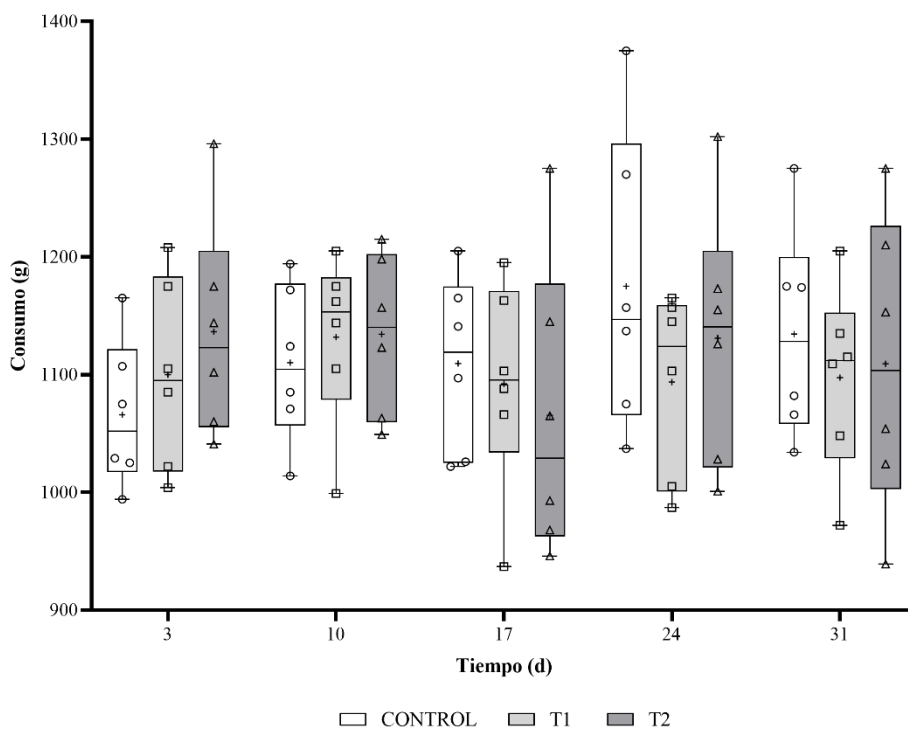


Figura 13. Consumo de pienso (g) de cabras expuestas a diferentes dosis de aflatoxina B1; CON 0 µg/día, T1 120 µg/día y T2 60 µg/día. Los datos se muestran de la siguiente forma; la barra en el interior de la caja indica la mediana, el símbolo + indica la media, cada marcador indica el consumo específico de un animal y los bigotes muestran el valor mínimo y máximo.



#### 5.4. Efecto de la administración de aflatoxina B1 sobre la producción láctea.

Referente a la producción lechera de los animales, la producción media general para los animales de los grupos CON, T1 y T2 se estableció en  $1032.2 \pm 88.4$ ,  $1056.6 \pm 95.9$ ,  $1031.5 \pm 129.3$  mL, respectivamente. En la Tabla 7 se recogen los estadísticos descriptivos referentes a la producción lechera durante el estudio. Hay que destacar que se encontró cierta variabilidad entre individuos independientemente del grupo al que perteneciesen. Al respecto, en la Tabla 7 se puede observar como las diferencias entre los valores mínimos y los valores máximos en ocasiones superan los 250 mL de leche. Independientemente de esta variabilidad individual, el análisis estadístico de los datos indicó que la ingesta de aflatoxina B1 de manera diaria durante 31 días no influye significativamente en la producción lechera. Al respecto, los valores de  $p$  para el efecto fijo de la ingesta de aflatoxina B1, el efecto fijo del tiempo de exposición y la interacción entre ambos fueron 0.160, 0.194 y 0.126, respectivamente. La Figura 14 muestra de manera gráfica la producción lechera de los diferentes grupos durante el estudio.

Tabla 7. Producción lechera (mL) de cabras expuestas a diferentes dosis de aflatoxina B1; CON 0  $\mu\text{g}/\text{día}$ , T1 120  $\mu\text{g}/\text{día}$  y T2 60  $\mu\text{g}/\text{día}$ .

Producción lechera (mL)						
Grupo	Día	Media	DS	Mediana	V. Mínimo	V. Máximo
CON	3	961.6	52.9	956.8	884.9	1024.4
	10	1016.6	79.7	1027.6	901.7	1097.7
	17	1093.5	84.0	1078.9	988.5	1205.3
	24	1062.4	96.2	1050.4	957.3	1200.7
	31	1026.8	66.4	1028.6	932.1	1097.8
T1	3	1079.1	90.8	1058.0	961.0	1197.3
	10	1054.3	100.3	1063.2	918.0	1174.5
	17	1022.9	52.7	1005.5	975.4	1109.3
	24	1101.5	114.7	1066.6	997.3	1276.4
	31	1025.3	116.4	1022.6	898.3	1198.1
T2	3	1052.6	178.3	1077.2	752.5	1230.0
	10	1052.7	146.3	1034.2	865.9	1225.0
	17	985.2	146.2	948.9	818.5	1165.7
	24	1058.8	72.4	1057.2	983.0	1187.4
	31	1008.3	109.4	982.8	892.6	1177.3

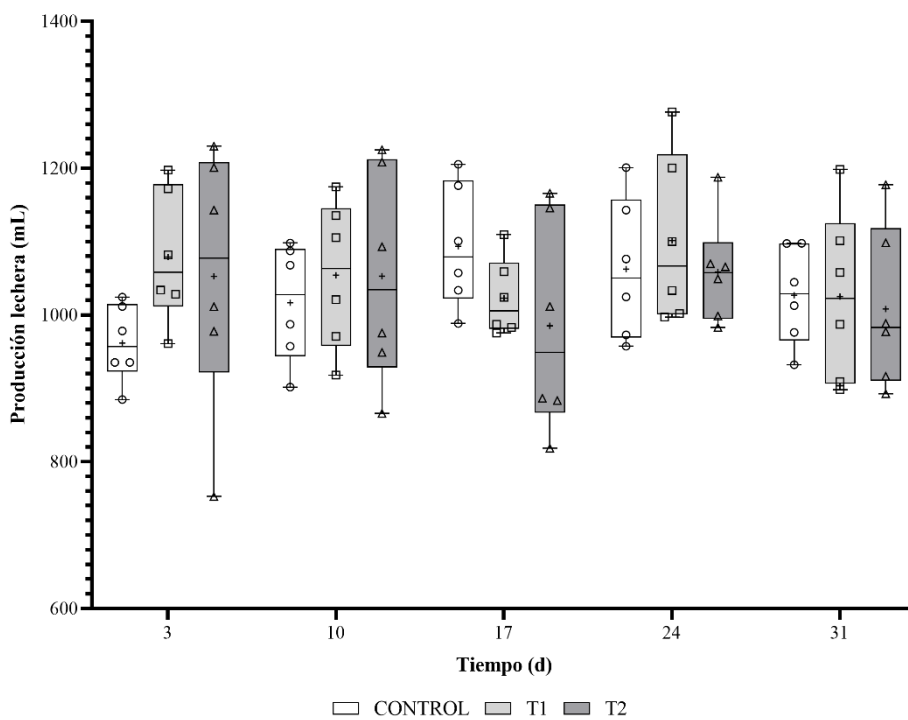


Figura 14. Producción lechera (mL) de cabras expuestas a diferentes dosis de aflatoxina B1; CON 0 µg/día, T1 120 µg/día y T2 60 µg/día. Los datos se muestran de la siguiente forma; la barra en el interior de la caja indica la mediana, el símbolo + indica la media, cada marcador indica el consumo específico de un animal y los bigotes muestran el valor mínimo y máximo.

### 5.5. Efecto de la administración de aflatoxina B1 sobre la composición de la leche

Referente al porcentaje de grasa, la media general para este parámetro en los grupos CON, T1 y T2 fue  $4.867 \pm 0.506$ ,  $4.928 \pm 0.409$ ,  $4.771 \pm 0.399$  %, respectivamente. Los estadísticos descriptivos sobre esta variable se indican en la Tabla 8 y se muestran gráficamente en la Figura 15. El análisis estadístico de los datos no mostró diferencias significativas atribuibles a la ingesta de aflatoxina B1 ( $p = 0.53$ ), al tiempo de exposición ( $p = 0.278$ ) y a la interacción de efectos ( $p = 0.26$ ).

Tabla 8. Porcentaje de grasa en leche de cabras expuestas a diferentes dosis de aflatoxina B1; CON 0  $\mu\text{g}/\text{día}$ , T1 120  $\mu\text{g}/\text{día}$  y T2 60  $\mu\text{g}/\text{día}$ .

Porcentaje de grasa						
Grupo	Día	Media	DS	Mediana	V. Mínimo	V. Máximo
CON	3	4.66	0.34	4.52	4.38	5.17
	10	4.99	0.35	4.93	4.60	5.41
	17	5.12	0.70	5.24	4.26	5.88
	24	4.99	0.57	5.07	4.16	5.83
	31	4.56	0.38	4.49	4.21	5.26
T1	3	4.80	0.53	4.89	4.07	5.51
	10	4.84	0.40	4.97	4.19	5.31
	17	4.95	0.41	5.04	4.38	5.35
	24	5.01	0.53	5.05	4.16	5.58
	31	5.04	0.18	5.04	4.80	5.28
T2	3	4.89	0.51	4.69	4.46	5.67
	10	4.88	0.43	4.91	4.16	5.47
	17	4.64	0.12	4.62	4.52	4.78
	24	4.95	0.42	4.82	4.44	5.61
	31	4.48	0.30	4.47	4.12	4.93

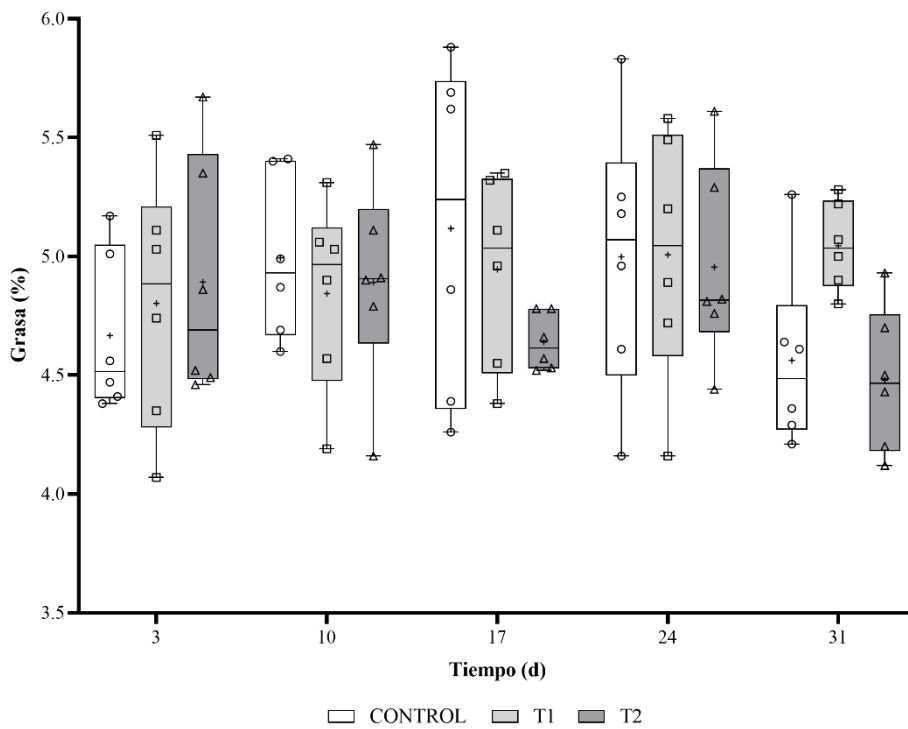


Figura 15. Porcentaje de grasa en leche de cabras expuestas a diferentes dosis de aflatoxina B1; CON 0 µg/día, T1 120 µg/día y T2 60 µg/día. Los datos se muestran de la siguiente forma; la barra en el interior de la caja indica la mediana, el símbolo + indica la media, cada marcador indica el consumo específico de un animal y los bigotes muestran el valor mínimo y máximo.

Con respecto al porcentaje de proteína, los valores promedio generales para esta variable fueron  $3.888 \pm 0.368$ ,  $4.019 \pm 0.357$ ,  $3.906 \pm 0.339$  para los grupos CON, T1 y T2, respectivamente. Por otro lado, los estadísticos descriptivos relativos a este parámetro se exponen en la Tabla 9 y se muestran gráficamente en la Figura 15. Referente al análisis estadístico, no se encontraron diferencias significativas atribuibles a la ingesta de aflatoxina B1 ( $p = 0.29$ ), al tiempo de exposición ( $p = 0.80$ ) y a la interacción de efectos ( $p = 0.67$ ).

Tabla 9. Porcentaje de proteína en leche de cabras expuestas a diferentes dosis de aflatoxina B1; CON 0  $\mu\text{g}/\text{día}$ , T1 120  $\mu\text{g}/\text{día}$  y T2 60  $\mu\text{g}/\text{día}$ .

Porcentaje de proteína						
Grupo	Día	Media	DS	Mediana	V. Mínimo	V. Máximo
CON	3	3.89	0.36	3.88	3.33	4.41
	10	3.69	0.35	3.77	3.14	4.15
	17	3.90	0.51	3.86	3.39	4.76
	24	3.96	0.35	3.92	3.40	4.42
	31	3.99	0.29	3.90	3.70	4.56
T1	3	4.00	0.36	4.13	3.45	4.37
	10	4.01	0.35	4.08	3.48	4.40
	17	3.89	0.34	3.96	3.47	4.29
	24	4.15	0.49	4.08	3.39	4.77
	31	4.02	0.29	3.99	3.72	4.56
T2	3	4.11	0.23	4.11	3.78	4.45
	10	3.84	0.34	3.97	3.27	4.19
	17	4.00	0.21	3.96	3.78	4.41
	24	3.83	0.43	3.91	3.04	4.35
	31	3.74	0.40	3.89	3.20	4.15

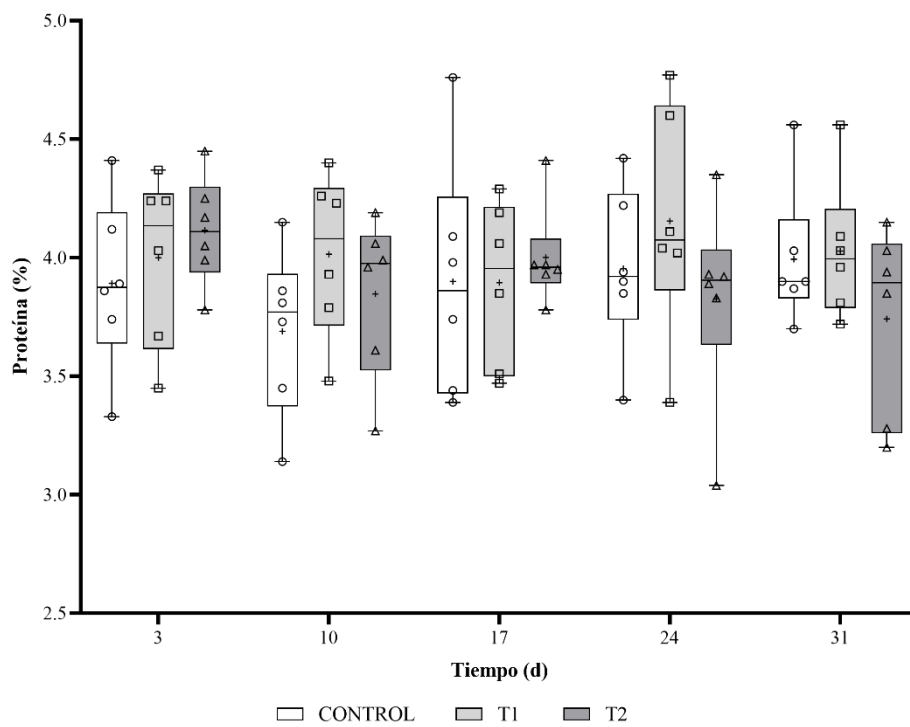


Figura 16. Porcentaje de proteína en leche de cabras expuestas a diferentes dosis de aflatoxina B1; CON 0  $\mu\text{g}/\text{día}$ , T1 120  $\mu\text{g}/\text{día}$  y T2 60  $\mu\text{g}/\text{día}$ . Los datos se muestran de la siguiente forma; la barra en el interior de la caja indica la mediana, el símbolo + indica la media, cada marcador indica el consumo específico de un animal y los bigotes muestran el valor mínimo y máximo.

Por último, los porcentajes medios generales de lactosa fueron  $4.813 \pm 0.269$ ,  $4.825 \pm 0.240$ ,  $4.875 \pm 0.192$  para los grupos CON, T1 y T2, respectivamente. De igual modo que para los porcentajes de grasa y proteína, el análisis estadístico no mostró diferencias significativas en relación con la ingesta de aflatoxina B1 ( $p = 0.64$ ), la duración de la exposición ( $p = 0.42$ ) y la interacción entre efectos ( $p = 0.53$ ). Los estadísticos descriptivos de esta variable se indican en la Tabla 10 y se muestran gráficamente en la Figura 17.

Tabla 10. Porcentaje de lactosa en leche de cabras expuestas a diferentes dosis de aflatoxina B1; CON 0  $\mu\text{g}/\text{día}$ , T1 120  $\mu\text{g}/\text{día}$  y T2 60  $\mu\text{g}/\text{día}$ .

Porcentaje de lactosa						
Grupo	Día	Media	DS	Mediana	V. Mínimo	V. Máximo
CON	3	4.86	0.19	4.83	4.61	5.10
	10	4.67	0.15	4.68	4.53	4.96
	17	4.83	0.28	4.85	4.46	5.21
	24	4.76	0.35	4.61	4.44	5.35
	31	4.93	0.34	4.82	4.60	5.47
T1	3	4.85	0.10	4.88	4.66	4.94
	10	4.81	0.29	4.83	4.30	5.20
	17	4.83	0.34	4.73	4.58	5.49
	24	4.77	0.22	4.79	4.44	5.10
	31	4.86	0.26	4.81	4.52	5.29
T2	3	4.90	0.20	4.87	4.68	5.17
	10	4.88	0.17	4.82	4.72	5.14
	17	4.83	0.21	4.79	4.58	5.11
	24	4.85	0.17	4.80	4.69	5.11
	31	4.92	0.26	4.86	4.54	5.23

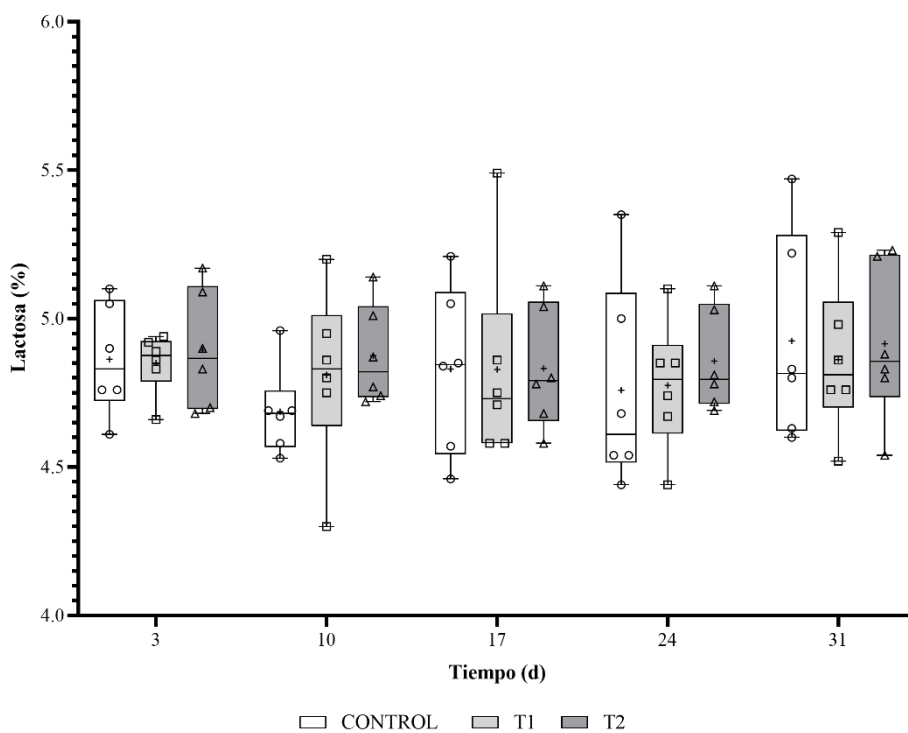


Figura 17. Porcentaje de lactosa en leche de cabras expuestas a diferentes dosis de aflatoxina B1; CON 0 µg/día, T1 120 µg/día y T2 60 µg/día. Los datos se muestran de la siguiente forma; la barra en el interior de la caja indica la mediana, el símbolo + indica la media, cada marcador indica el consumo específico de un animal y los bigotes muestran el valor mínimo y máximo.



## 5.6. Efecto de la administración de aflatoxina B1 sobre los parámetros bioquímicos

Referente a las muestras sanguíneas, en la Tabla 11 se muestran las medianas y los percentiles 25-75 de los parámetros séricos analizados tras la exposición a aflatoxina B1 de cada grupo de estudio durante 31 días. El análisis estadístico mostró la influencia del consumo de aflatoxina B1 sólo sobre la enzima GGT ( $p < 0.01$ ), cuya actividad fue significativamente mayor en los grupos T1 y T2. Las Figuras 18, 19, 20 y 21 muestran las concentraciones en el plasma sanguíneo de los diferentes parámetros bioquímicos determinados en cada grupo.

Tabla 11. Medianas (percentil 25-75) de los parámetros séricos de cabras que recibieron diferentes dosis diarias de aflatoxina B1 (CON = 0, T1 = 120 y T2 = 60  $\mu\text{g}$ ).

Parámetros bioquímicos				
Parámetro	Grupos			<i>p</i>
	CON	T1	T2	
Glucosa (mg/dL)	58.00 (51.25-62.50)	51.00 (50.25-53.25)	57.50 (54.00-58.00)	0.20
Colesterol (mg/dL)	102.50 (96.00-115.75)	97.00 (91.25-104.25)	89.50 (82.75-94.75)	0.10
Urea (mg/dL)	35.00 (31.33-39.95)	34.10 (29.95-38.85)	33.85 (30.20-37.05)	0.85
Creatinina (mg/dL)	0.59 (0.54-0.71)	0.58 (0.55-0.64)	0.60 (0.56-0.65)	0.93
Albúmina (g/dL)	3.61 (3.32-3.87)	3.39 (0.21-3.65)	3.65 (3.42-3.85)	0.82
Proteínas totales (g/dL)	7.30 (7.00-7.38)	7.25 (6.80-7.55)	6.65 (6.53-7.00)	0.32
Globulinas (g/dL)	3.62 (3.05-4.03)	3.57 (3.23-3.90)	3.12 (2.85-3.47)	0.45
Bilirrubina (mg/dL)	0.26 (0.20-0.27)	0.24 (0.21-0.26)	0.22 (0.20-0.26)	0.93
ALP (U/L)	129.50 (116.00-144.50)	101.00 (93.00-114.25)	132.00 (110.25-149.25)	0.39
AST (U/L)	53.00 (49.13-60.03)	47.75 (43.05-52.45)	48.25 (47.23-56.40)	0.48
GGT (U/L)	36.00 (32.00-40.75)	58.00 (54.50-60.75)	50.00 (43.75-52.50)	< 0.01*
Colinesterasa (U/L)	118.50 (95.25-148.50)	85.50 (78.50-102.25)	94.50 (85.50-116.25)	0.33

\*Valor de *p* inferior a 0.05.

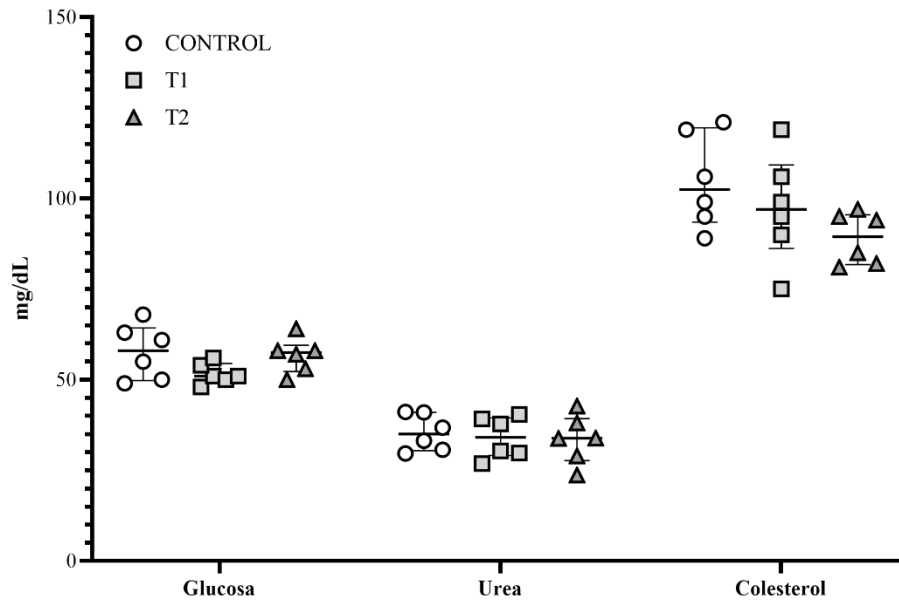


Figura 18. Concentración de glucosa, urea y colesterol en el plasma sanguíneo de cabras expuestas diferentes dosis de aflatoxina B1. CON 0  $\mu\text{g}/\text{día}$ , T1 120  $\mu\text{g}/\text{día}$  y T2 60  $\mu\text{g}/\text{día}$ . Los datos se muestran de la siguiente forma; la barra central indica la mediana, los bigotes indican el rango intercuartílico y cada marcador representa el valor de un animal.

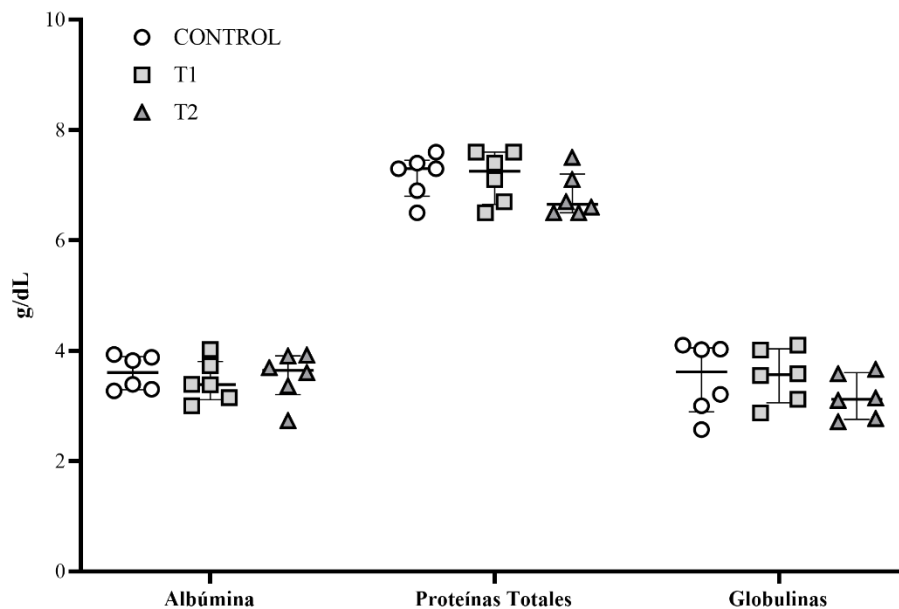


Figura 19. Concentración de albúmina, proteínas totales y globulinas en el plasma sanguíneo de cabras expuestas diferentes dosis de aflatoxina B1. CON 0  $\mu\text{g}/\text{día}$ , T1 120  $\mu\text{g}/\text{día}$  y T2 60  $\mu\text{g}/\text{día}$ . Los datos se muestran de la siguiente forma; la barra central indica la mediana, los bigotes indican el rango intercuartílico y cada marcador representa el valor de un animal.

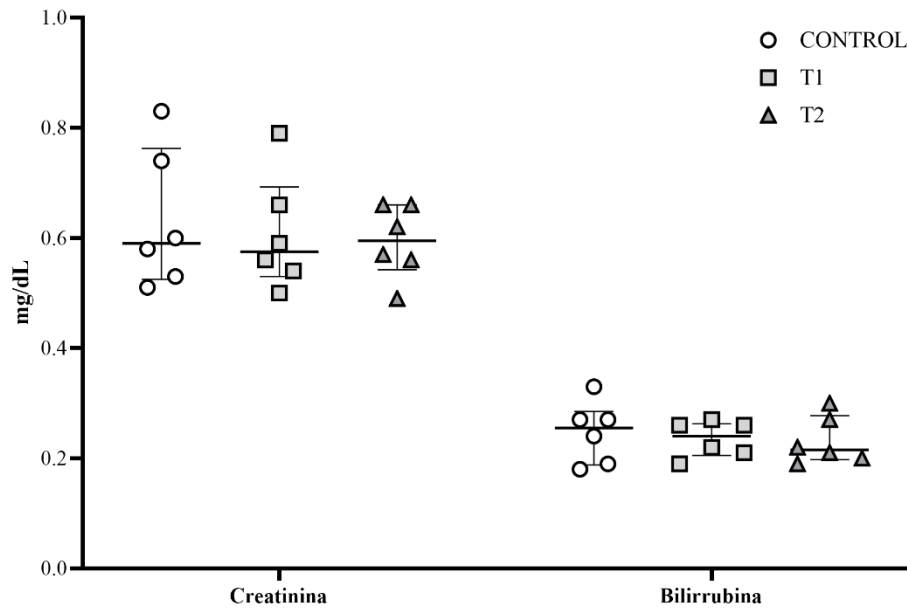


Figura 20. Concentración de creatinina y bilirrubina en el plasma sanguíneo de cabras expuestas diferentes dosis de aflatoxina B1. CON 0  $\mu\text{g}/\text{día}$ , T1 120  $\mu\text{g}/\text{día}$  y T2 60  $\mu\text{g}/\text{día}$ . Los datos se muestran de la siguiente forma; la barra central indica la mediana, los bigotes indican el rango intercuartílico y cada marcador representa el valor de un animal.

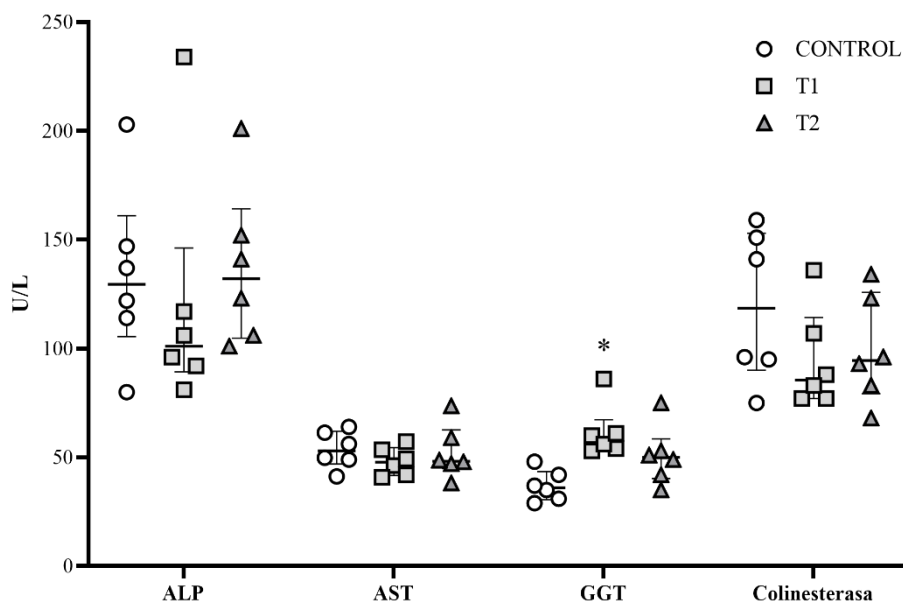


Figura 21. Actividad de las enzimas hepáticas ALP, AST y GGT y la colinesterasa de cabras expuestas diferentes dosis de aflatoxina B1. CON 0  $\mu\text{g}/\text{día}$ , T1 120  $\mu\text{g}/\text{día}$  y T2 60  $\mu\text{g}/\text{día}$ . Los datos se muestran de la siguiente forma; la barra central indica la mediana, los bigotes indican el rango intercuartílico, cada marcador representa el valor de un animal y el asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1. Concentración de aflatoxina M1 y porcentaje de excreción en leche

La rápida presencia de aflatoxina M1 en la leche recogida tras la exposición a aflatoxina B1 concuerda con los resultados obtenidos en estudios previos realizados por otros autores, tanto en ovejas, como en cabras expuestas a una dosis única de AFB1 mezclada con su pienso (Battacone et al., 2003; Battacone et al., 2012). Al respecto, en el estudio llevado a cabo en ovejas, estos autores detectaron la presencia de aflatoxina M1 en todos los animales que fueron expuestos desde el primer ordeño, realizado 6 h después de la exposición. Del mismo modo, determinaron que la aflatoxina M1 también estaba presente en todas las cabras en el primer ordeño realizado tras la exposición. En el segundo caso, el primer ordeño fue realizado justo una hora después de la exposición a aflatoxina B1, por lo que determinaron que la aparición de aflatoxina M1 en la leche se inicia en un periodo de tiempo muy corto. De hecho, su aparición temprana en la leche es debida a la rápida absorción de las aflatoxinas en el tracto intestinal, ya que es posible detectar la aflatoxina M1 en el plasma sanguíneo apenas cinco minutos después de la exposición a aflatoxina B1, como demostraron Gallo et al. (2008) en su estudio en vacas lecheras. Estos autores expusieron a los animales a una mezcla de aflatoxinas (4.9 mg de aflatoxina B1, 1.01 mg de aflatoxina B2, 10.63 mg de aflatoxina G1 y 0.89 mg de aflatoxina G2) contenidas en un bolo oral y determinaron que todas estas aflatoxinas, junto a la aflatoxina M1, son detectables en el plasma sanguíneo a los 5 minutos tras la ingestión del bolo.

Respecto al metabolismo de la aflatoxina B1, Caruso et al. (2009) evidenciaron *in vitro* que la línea celular estabilizada de células del epitelio mamario bovino, BME-UV1, expresa enzimas metabolizadoras y tiene potencial para biotransformar la aflatoxina B1 hacia aflatoxina M1 de manera local en la glándula mamaria. No obstante, aunque es posible que el epitelio mamario pueda biotransformar un pequeño porcentaje de aflatoxina B1, la mayor parte de la aflatoxina M1 deriva de los hepatocitos mediante la biotransformación llevada a cabo por el complejo enzimático P450 (Deng et al., 2018; Rushing y Selim, 2019). Por otro lado, cuando la aflatoxina M1 llega a la glándula mamaria desde la circulación sanguínea, puede excretarse a la leche mediante difusión pasiva. Sin embargo, el transporte activo mediado por el transportador de eflujo de la familia ABC en las células epiteliales de la glándula mamaria probablemente sea una vía de excreción más importante que la difusión pasiva (Min et al., 2021).

Respecto al pico de excreción de aflatoxina M1 en cabras, Battacone et al. (2012) reportaron que se sitúa entre 3 y 6 h después de la exposición a una sola dosis. En nuestro caso, la concentración que hemos determinado en ese periodo de tiempo es relativamente baja. Una posible explicación para esto podría ser que la dosis empleada por estos autores fue muy superior a las utilizadas en este trabajo. Al respecto, en su estudio cada animal recibió 0.8 mg de aflatoxina B1, una dosis aproximadamente 66 veces superior a la empleada por nosotros. El pico de excreción en nuestro estudio se alcanza el día 3 de exposición. Es importante aclarar que al contrario que Battacone et al. (2012) en nuestro estudio se utilizan dosis sucesivas y no una dosis única. Tras esto, la excreción se mantiene estable, es decir, en periodo estacionario, hasta que la exposición finaliza. Finalmente, la leche queda libre de aflatoxina M1 a las 78 h. Generalmente, como se mencionó anteriormente, se considera que la aflatoxina M1 aparece en la leche a las 12 h y que tras eliminar las aflatoxinas de la dieta no se encuentran trazas de esta toxina a las 72 h (Mollayusefian et al., 2021).

En relación con el patrón de excreción, Frobish et al. (1986), quienes expusieron diariamente a aflatoxina B1 a vacas Holstein lactantes, obtuvieron una curva de excreción muy similar a la de este trabajo. En su caso, se evaluó la transferencia de aflatoxina M1 en la leche de vaca durante 264 h. Al igual que nosotros, observan que la concentración de aflatoxina M1 en la leche incrementa rápidamente con el paso de las horas y alcanza el estado estacionario, aproximadamente a las 24 h tras iniciar la exposición. Cuando finalizan la exposición, a las 192 h, observan también como la concentración de aflatoxina M1 comienza a disminuir hasta que la leche queda libre de trazas en las próximas 72 h. Del mismo modo, Diaz et al. (2004) también evaluaron la curva de excreción en vacas Holstein. Estos autores observaron que tras retirar la aflatoxina B1 de la dieta, la leche de las vacas quedaba libre en 72-96 h y que al volver a introducirla, su concentración aumentaba rápidamente en la leche hasta alcanzar el estado estacionario aproximadamente a las 48 h tras el comienzo de la exposición. Tras volver a retirarla, la leche quedaba nuevamente libre en el mismo periodo de tiempo que la primera vez. En ambos estudios el estado estacionario se alcanza más rápido que en este trabajo (24 y 48 h respecto a 72 h). No obstante, Masoero et al. (2007), quienes expusieron a vacas de la misma raza durante 18 días, obtuvieron una curva de excreción similar, pero, en su caso, el estado estacionario se alcanzó más tarde, aproximadamente el día 7 de exposición. Por lo tanto, no parece claro cuando es el momento preciso en el que la concentración de

aflatoxina M1 alcanza el pico máximo de excreción y se mantiene estable mientras dura la exposición a aflatoxina B1.

Como hemos podido observar en los resultados de este estudio, la concentración de aflatoxina M1 en la leche se ve afectada significativamente por la cantidad de aflatoxina B1 ingerida. De este modo, a medida que aumenta la dosis de aflatoxina B1 en la dieta también aumenta linealmente la concentración de aflatoxina M1 en la leche. Además, cuando el estado estacionario es alcanzado, el tiempo de exposición no es una variable influyente. No obstante, el momento de desaparición de la aflatoxina M1 de la leche no se relaciona con la dosis de aflatoxina B1 ingerida, ya que en ambas dosis la leche queda libre de trazas al mismo tiempo. Este tipo de relaciones lineales en la excreción de aflatoxina M1 ya ha sido descrita en la bibliografía científica (Price et al., 1985; Battacone et al., 2003; Battacone et al., 2005). Todos estos autores han establecido diferentes ecuaciones de regresión con el objetivo de predecir la concentración de aflatoxina M1 que puede ser encontrada en la leche en función de la dosis de aflatoxina B1 ingerida. La ecuación elaborada por Price et al. (1985) en vacuno fue la siguiente:  $\text{Aflatoxina M1 } (\mu\text{g/kg}) = 0.0069 + 0.0162 * \text{aflatoxina B1 } (\mu\text{g/d})$  con un  $r^2$  igual a 0.96. En el caso de Battacone et al. (2003; 2005), sus ecuaciones calculadas sobre ovejas fueron:  $\text{Aflatoxina M1 } (\mu\text{g/kg}) = -0.0043 + 0.00136 * \text{aflatoxina B1 } (\mu\text{g/d})$  con un  $r^2$  igual a 0.77 y  $\text{Aflatoxina M1 } (\mu\text{g/kg}) = 0.209 * \text{aflatoxina B1 } (\mu\text{g/kg})$  con un  $r^2$  igual a 0.68, respectivamente. Al igual que en nuestro caso, la intersección nunca fue significativa en estos estudios. Respecto a la capacidad predictiva de estas ecuaciones, podemos observar como la ecuación elaborada por Price et al. (1985) tiene mayor capacidad, ya que su  $r^2$  está muy próximo a la unidad. En cambio, las ecuaciones propuestas por Battacone et al. (2003; 2005) obtienen valores de  $r^2$  inferiores al establecido en este trabajo ( $r^2$  igual a 0.81) por lo que su capacidad predictiva es inferior. No obstante, es importante destacar que los diseños experimentales fueron totalmente diferentes en todos los casos y este hecho puede influir significativamente en los resultados de las ecuaciones de regresión.

Referente al porcentaje de excreción, nuestros resultados indican que no se encuentran diferencias significativas entre los grupos T1 y T2, al contrario que en la concentración de aflatoxina M1. Al igual que nosotros, Veldman et al. (1992) en vacas lecheras y Battacone et al. (2003) en ovejas determinaron que esta variable no es afectada significativamente por la cantidad de aflatoxina B1 ingerida. Concretamente, Veldman et al. (1992) reportaron que el porcentaje de excreción es independiente de la cantidad de

aflatoxina B1 ingerida con un rango de ingesta situado entre 7 y 57 ng de aflatoxina B1 por vaca al día. En el caso de Battacone et al. (2003), fue demostrado que el porcentaje de excreción no es afectado significativamente ni por la cantidad de aflatoxina B1 ingerida ni por el tiempo de exposición. Es importante mencionar que estos autores utilizaron unas dosis muy similares a las empleadas en este estudio (64 y 128 µg de aflatoxina B1).

Sin embargo, también hay estudios científicos que demuestran que la cantidad de aflatoxina B1 ingerida si puede afectar al porcentaje de excreción. Al respecto, los resultados obtenidos por Battacone et al. (2009) mostraron que ovejas expuestas a diferentes dosis de aflatoxina B1 (1.13, 2.30 y 5.03 µg/kg) tuvieron porcentajes de excreción significativamente diferentes (2.90, 1.90 y 1.30). Por lo que, sugirieron que cuando la cantidad de aflatoxina B1 ingerida aumenta los porcentajes de excreción son más bajos. Sobre esto, Frobish et al. (1986) también obtuvieron unos resultados semejantes. En este caso, vacas Holstein de alta producción lechera expuestas a 492, 1144 y 2491 µg al día de aflatoxina B1 obtuvieron porcentajes de excreción de 2.33, 2.13 y 1.94, respectivamente. Por lo tanto, nosotros sugerimos que al menos en un rango de dosis situado entre 60 y 120 µg de aflatoxina B1 al día el porcentaje de excreción no se ve afectado.

Respecto a la influencia del tiempo de exposición sobre el porcentaje de exposición, como se ha mencionado anteriormente, Battacone et al. (2003) demostraron que este no se ve afectado al igual que nosotros. No obstante, los resultados de otros estudios son contradictorios en este sentido. Por una parte, Aazami et al. (2019), quienes expusieron a cabras Saanen a 25 µg de aflatoxina B1 durante 15 días, determinaron que el porcentaje de excreción disminuía con el paso del tiempo. Al respecto, estos autores determinaron unos porcentajes de excreción de 0.29 y de 0.22 los días 3 y 15, respectivamente. Por el contrario, Rao y Chopra (2001), quienes expusieron cabras a una dosis de 100 µg de AFB1 al día, notaron una tendencia creciente en el porcentaje de excreción de aflatoxina M1. En su estudio, notificaron unos porcentajes de excreción de 0.14 y 0.39 los días 3 y 14, respectivamente. Por lo tanto, podemos deducir que la evolución del porcentaje de excreción de aflatoxina M1 en función del tiempo de exposición a aflatoxina B1 no parece conocerse completamente actualmente. Por esto, consideramos que los resultados obtenidos en este trabajo pueden aportar información valiosa respecto a este tema.

Otro resultado clave de este estudio fue el valor medio del porcentaje de excreción obtenido, el cual se estableció aproximadamente en el 0.06%. Este valor es considerablemente más bajo que el reportado anteriormente en caprino en la bibliografía científica. No obstante, existe un vacío de conocimiento al respecto, ya que sólo unos pocos estudios científicos lo han abordado a lo largo de los años. El primer dato documentado al respecto fue aportado por Helferich et al. (1986). Estos autores evaluaron la transferencia de aflatoxina B1 como aflatoxina M1 a la leche de cabra inoculándola por vía oral y por vía intravenosa. Para ello, utilizaron dos animales para la vía oral y dos para la vía intravenosa. En el caso de la vía oral obtuvieron unos porcentajes de excreción de 0.18 y 0.38. Para la vía intravenosa, los porcentajes fueron 0.26 y 0.30, valores relativamente similares a los de la vía oral. Otro estudio que reportó el porcentaje de excreción en caprino fue realizado por Mazzette et al. (2009). Estos autores determinaron el porcentaje de excreción en tres animales que ingirieron una sola dosis de aflatoxina B1 establecida en 0.8 mg. La relación porcentual media entre la aflatoxina B1 ingerida y la aflatoxina M1 determinada en la leche fue del 0.26% con una alta variabilidad individual. Es importante destacar que ambos estudios utilizaron un tamaño muestral muy pequeño (4 y 3 animales, respectivamente) y la variabilidad individual relativa a los porcentajes de excreción es alta, como se ha notificado en este estudio, por lo que estos datos podrían no ser del todo representativos. Por otro lado, el estudio ya mencionado anteriormente realizado por Battacone et al. (2012) indicó un porcentaje de excreción del 0.17%. En este caso también fue utilizado un número de animales pequeño, concretamente 5 cabras. Por último, Rao y Chopra (2001) y Aazami et al. (2019) obtuvieron porcentajes de excreción de 0.14-0.39 y 0.22-0.29, respectivamente, valores que han sido citados anteriormente. Todos los estudios mencionados anteriormente utilizan diferentes condiciones, como diferentes razas y periodos de lactancia, tamaños de muestra y diseños experimentales diferentes, por lo tanto, sugerimos que el menor porcentaje de excreción obtenido en este trabajo y las discrepancias establecidas entre los diferentes ensayos científicos probablemente puedan ser debidas a estos factores. No obstante, aunque en especies diferentes, también se han reportado porcentajes de excreción más bajos en comparación con otros estudios. Al respecto, Battacone et al. (2003) determinaron que el porcentaje de excreción en ovino puede ser del 0.032%.

Comparativamente, los porcentajes de excreción en caprino son considerablemente más bajos que los reportados en vacuno (Fink-Gremmels, 2008). En



la revisión bibliográfica llevada a cabo por Loh et al. (2020) se sugiere que la microbiota ruminal de los pequeños rumiantes tiene una capacidad de detoxificación de la aflatoxina B1 superior a la de los bovinos, basándose en las concentraciones de aflatoxina B1 halladas en la orina y heces, las cuales son más elevadas en ganado vacuno. Referente a esto, Upadhaya et al. (2009), quienes realizaron un estudio comparativo *in vitro* para evaluar las diferencias en la capacidad de degradación de la aflatoxina B1 por el fluido ruminal entre cabras nativas de Corea y novillos Holstein, demostraron que la microbiota ruminal de las cabras tiene una mayor capacidad de degradación que el de los novillos, aproximadamente entre un 10 y un 14%.

Debido a un porcentaje de excreción tan bajo, se puede observar como la ingesta de una dosis de 120  $\mu\text{g}$  de aflatoxina B1, es decir, 24 veces el límite máximo permitido en piensos completos para ganado lechero por la Unión Europea (5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), provoca concentraciones de aflatoxina M1 en leche que superan ligeramente el límite máximo permitido para este residuo (0.05  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Por lo tanto, podemos asegurar que mientras las materias primas destinadas a alimentación animal cumplan con la legislación vigente respecto a la contaminación por aflatoxinas la leche de cabra presentará niveles seguros. Sin embargo, hay que tener en cuenta que, aunque una dosis de 120  $\mu\text{g}$  de aflatoxina B1 parezca muy elevada, esta concentración es ambientalmente relevante. Por ejemplo, Tarazona et al. (2020), en España, determinaron un intervalo de concentraciones de aflatoxina B1 en grano de maíz de 0.87-124.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , cuya concentración más elevada es similar a la dosis más alta empleada en este estudio. Por lo que, aunque parezca un escenario difícil de producirse hay que ser conscientes de ello y seguir aplicando las medidas preventivas y de control apropiadas para garantizar la seguridad alimentaria en beneficio de la salud humana y animal.

## **6.2. Consumo de alimento, rendimiento lechero y composición de la leche**

En nuestro trabajo, la exposición a aflatoxina B1 no ha provocado efectos negativos sobre los parámetros productivos de las cabras. No obstante, la exposición a aflatoxinas mediante la dieta puede afectar negativamente al rendimiento productivo de los animales. Al respecto, novillos expuestos durante 133 días a una dosis de 16  $\mu\text{g}$  de aflatoxinas por kg de peso corporal presentaron un descenso en la ingesta de alimento. Por otro lado, en novillas primerizas, que ingirieron durante trece meses una dosis de 20  $\mu\text{g}$  de aflatoxinas por kg de peso corporal, se notificó un descenso intermitente en el consumo de alimento. También, terneros de 5 meses expuestos durante 6 semanas a 40, 60 y 80  $\mu\text{g}$  de aflatoxinas

por kg de peso corporal presentaron hiperplasia biliar, reducción de ganancia y descenso del consumo de alimento desde la primera semana de exposición, respectivamente. No obstante, vacas que presentaron un descenso brusco en el consumo de alimento debido a la ingesta de una dosis elevada de aflatoxinas presentaron una recuperación gradual en un plazo de dos semanas (Lynch et al., 1971; Meerdink, 2004). En su estudio, Harvey et al. (1991) observaron que el consumo de una cantidad elevada de aflatoxinas (2.6 mg por kilo de pienso) redujo significativamente la ganancia de peso corporal de corderos en crecimiento.

Otros efectos negativos que afectan propiamente a la producción y calidad de la leche también han sido detectados en varios estudios. En este sentido, Queiroz et al. (2012), quienes expusieron a vacas lecheras Holstein a 75  $\mu$ g de aflatoxina B1 por kg de pienso durante 4 días, observaron niveles más bajos de grasa en la leche, menor concentración de proteína y una tendencia a una menor producción. Por otra parte, Ogunade et al. (2016) reportaron una reducción en el porcentaje de grasa y en la producción de leche de aproximadamente 2.5 kg, cuando las vacas lecheras son expuestas a una dosis de 75  $\mu$ g de aflatoxina B1 por kg de pienso diariamente. Este descenso en el porcentaje de grasa también ha sido descrito por Kourousekos et al. (2012). En su estudio en cabras lecheras, los animales que recibieron 100  $\mu$ g de aflatoxina B1 diariamente durante 35 días presentaron la mayor concentración de aflatoxina M1 y el menor contenido de grasa en su leche, en comparación con el grupo que recibió 50  $\mu$ g de aflatoxina B1. Por esto, concluyeron que el contenido de grasa en la leche se ve afectado negativamente por la administración de aflatoxina B1 en cabras y que este efecto es dependiente de la cantidad ingerida. Sorprendentemente, en nuestro estudio, que utiliza el mismo biomodelo y presenta similitudes, como unas dosis de aflatoxina B1 y un tiempo de exposición parecidos, este efecto negativo sobre el porcentaje de grasa no ha sido evidenciado.

Por el contrario, también hay bastantes estudios que indican que determinadas dosis de aflatoxinas no interfieren en los parámetros productivos de los rumiantes. Por ejemplo, Rodrigues et al. (2019) demostraron que la ingesta diaria de 105.5  $\mu$ g por kg de pienso de una mezcla de aflatoxinas (B1, B2, G1 y G2) no tuvo efecto sobre el consumo de alimento, la producción lechera y la composición, y el recuento de células somáticas de la leche de vaca. Del mismo modo, Kutz et al. (2009) no detectaron cambios ni en la producción de leche ni en el consumo de alimento cuando administraron 112  $\mu$ g de

aflatoxina B1 por kg de pienso a vacas lecheras. También en ganado bovino, Sulzberger et al. (2017) informaron que la exposición a 100 µg de aflatoxina B1 por kilo de pienso durante tres días no es suficiente para alterar la producción de leche, el consumo de alimento y la eficiencia alimenticia. Los estudios citados anteriormente realizados por Battacone et al. (2005) y Frobish et al. (1986) en ovejas y en vacas tampoco indicaron efectos adversos sobre la producción lechera. En la misma situación, ni Kourousekos et al. (2012) ni Battacone et al. (2003) identificaron diferencias significativas atribuibles a la ingesta de aflatoxina B1 en los porcentajes de proteína y lactosa de la leche de cabra y oveja, respectivamente.

El estudio llevado a cabo por Applebaum et al. (1982) aportó información interesante referente a la aparición de efectos adversos relacionados con los parámetros productivos relativos a la intoxicación por aflatoxinas. Estos investigadores evaluaron las diferencias en la aparición de efectos adversos entre la administración de aflatoxina B1 de forma pura e impura. Para ello, expusieron a 6 y 3 vacas Holstein durante 7 días a 13 mg de aflatoxina B1 pura e impura, respectivamente. Hay que destacar que la aflatoxina B1 impura contenía otras aflatoxinas, además de otros metabolitos producidos por *Aspergillus parasiticus*. Curiosamente, la administración de forma pura no disminuyó la producción de leche, mientras que la forma impura sí que lo hizo. Por ello, tal y como indica Jiang et al. (2021) en su revisión bibliográfica, la forma de exposición a las aflatoxinas puede influir en el rendimiento y la salud animal. Por lo que, estudios como el nuestro, que utilizan la aflatoxina B1 de forma pura, pueden subestimar ligeramente la toxicidad de este compuesto, aunque pueden ser realmente valiosos para estudiar la transferencia de aflatoxina M1 a la leche.

En resumen, aunque la aflatoxicosis crónica está asociada con la reducción de los parámetros productivos en los rumiantes (Mostrom y Jacobsen, 2020), se sugiere que al menos un intervalo de dosis situado entre 60 y 120 µg de aflatoxina B1 pura inoculada de manera diaria durante 31 días no es suficiente para inducir efectos adversos relativos al consumo de alimento, el rendimiento lechero y la calidad de la leche.

### **6.3. Efecto de la aflatoxina B1 sobre los parámetros bioquímicos**

Como se refirió en la sección de resultados, los parámetros bioquímicos analizados no presentaron diferencias significativas entre grupos, a excepción de la enzima hepática GGT. Al respecto, la concentración sérica de esta enzima fue más elevada en los grupos

expuestos a aflatoxina B1. De hecho, la ingesta de sustancias hepatotóxicas, como la aflatoxina B1, puede incrementar los niveles séricos de determinadas enzimas debido al daño hepático que producen. En este sentido, estas sustancias son capaces de inducir la necrosis de las células hepáticas debido a la ruptura de las membranas citoplasmáticas, lo que provoca la consecuente diseminación del citosol celular que desencadena una respuesta inflamatoria (Ozer et al., 2008). No obstante, es preciso destacar que la elevación de esta enzima apenas excedió los valores de referencia establecidos para la misma en caprino (20-56 U/L) (Kaneko et al., 2008).

A lo largo de los años se han realizado diferentes estudios para evaluar la patología clínica de la aflatoxicosis en rumiantes. Para evaluar la aflatoxicosis aguda en vacuno, Cook et al. (1986) expusieron a novillas a diferentes dosis orales únicas comprendidas entre 0.2 y 0.8 mg de aflatoxina B1 por kg de peso. Estos autores detectaron un aumento de la actividad sérica de las enzimas AST y la SDH, dicho aumento comenzó a las 8 h tras a la exposición y alcanzó su pico máximo entre las 24 y 48 h para luego descender rápidamente. En este caso, la enzima ALP no se vio afectada. Otro estudio realizado con el mismo objetivo fue realizado por Brucato et al. (1986). En este caso, la dosis empleada fue de 1 mg de aflatoxina B1 por kg de peso. Estos investigadores observaron que la actividad sérica de las enzimas AST y GGT se incrementaba a los dos días. Tras ese tiempo, la actividad de la enzima AST decaía rápidamente pero la de la enzima GGT se mantenía elevada durante un periodo de tiempo prolongado. Tras la exposición crónica a novillos durante 155 días a 400 µg de aflatoxina B1, Helferich et al. (1986) informaron un incremento de la actividad sérica de las enzimas AST, ALP y SDH.

Referente a la patología clínica en los pequeños rumiantes, también han sido realizados diferentes estudios. Al respecto, Clark et al. (1984) expusieron a grupos de 8 cabras de raza mestiza a diferentes dosis de aflatoxina B1 (mg por kg de peso) por vía oral. En este sentido, un grupo recibió 0.1 durante 34 días, otro 0.2 durante 18 días y, el último, recibió 0.4 durante 10 días. Los cambios clinicopatológicos que observaron estos investigadores incluyeron incrementos en el recuento total de glóbulos rojos, la concentración de hemoglobina y bilirrubina y la actividad sérica de las enzimas AST, deshidrogenasa isocítrica (IDH) y ornitina transcarbamilasa (OTC). También informaron de efectos sobre las proteínas totales y la actividad sérica de las enzimas ALT y ALP, aunque indicaron que estos cambios no estaban relacionados con la dosis ni eran indicadores útiles de aflatoxicosis. Para evaluar también el efecto a dosis elevadas de

aflatoxinas, Fernández et al. (2000), quienes intoxicaron a 24 corderos con pienso contaminado con 2 mg por kg de una mezcla de aflatoxinas (83.4% aflatoxina B1, 3.5% aflatoxina B2, 12.3% aflatoxina G1 y 0.8% aflatoxina G2), notificaron una evidente alteración de la respuesta inmunitaria de los animales, lo que consecuentemente les haría más susceptibles a las enfermedades infecciosas y parasitarias. No obstante, no evidenciaron alteraciones en el recuento de glóbulos blancos y glóbulos rojos.

Por otro lado, Triphati et al. (2007) decidieron utilizar una dosis inferior a la propuesta en los estudios anteriormente descritos para estudiar el efecto clinicopatológico en corderos. Para ello, aplicaron una dieta basada en trigo contaminado con 50 µg por kg de aflatoxina B1 durante varias semanas. Sus resultados referentes a la hematología mostraron que el recuento de glóbulos blancos, la hemoglobina y el volumen corpuscular medio no se ven afectados, mientras que el hematocrito aumenta y, los recuentos de neutrófilos y glóbulos rojos, junto a la concentración de hemoglobina celular media disminuyen. En la bioquímica sanguínea, notificaron una disminución lineal de las proteínas totales, la albúmina y las globulinas, además, la concentración de urea y glucosa aumentaron y la actividad de la enzima AST se incrementó lentamente conforme avanzaba su experimento. Teniendo en cuenta que las dosis empleadas en este estudio son relativamente cercanas a las utilizadas en el nuestro y, aunque se trate de especies diferentes y un periodo de tiempo de exposición más amplio, las alteraciones evidencias en el perfil bioquímico notificado en este estudio no han sido evidencias por nosotros.

Generalmente, las enzimas hepáticas que consistentemente son incrementadas en cuadros clínicos de aflatoxicosis son la GGT, la AST y la ALT (en no rumiantes) y la succinato deshidrogenasa (SDH) (Coppock et al., 2018). Es evidente que la dosis y el tiempo de exposición influyen de manera significativa en la aparición de signos clínicos en los animales. No obstante, los resultados obtenidos en nuestro trabajo evidencian la resistencia del ganado caprino frente a la aflatoxina B1.

## 7. CONCLUSIONES

1. La transferencia de aflatoxina B1 procedente de la dieta a la leche de cabra como aflatoxina M1 es un proceso rápido, ya que la aflatoxina M1 es detectable trascurridas 6 horas tras la exposición. No obstante, aunque su aparición es temprana, si la exposición a aflatoxina B1 es mantenida en el tiempo, la concentración de aflatoxina M1 en la leche se verá incrementada hasta alcanzar el pico máximo de excreción el tercer día.
2. Tras alcanzar el pico máximo de excreción, la concentración de aflatoxina M1 en la leche se estabiliza mientras que las cabras sigan expuestas a aflatoxina B1. En caso de interrumpir la exposición, la leche queda libre de aflatoxina M1 en un plazo máximo de 78 horas.
3. La concentración de aflatoxina M1 en la leche está relacionada linealmente con la cantidad de aflatoxina B1 a la que están expuestos los animales. Al respecto, cuando aumenta la dosis de aflatoxina B1 en la dieta, la concentración de aflatoxina M1 en la leche también se incrementa. No obstante, el porcentaje de excreción no se ve afectado y es independiente de la dosis de aflatoxina B1 ingerida.
4. El porcentaje de excreción determinado en este trabajo es considerablemente inferior al descrito previamente en otros trabajos científicos. De hecho, para superar el límite máximo de aflatoxina M1 en la leche establecido por la Unión Europea, las cabras tendrían que ingerir concentraciones muy superiores al límite máximo permitido de aflatoxina B1 en piensos completos para animales lecheros.
5. La administración de unas concentraciones de 60 y 120  $\mu\text{g}$  aflatoxina B1 durante 31 días a cabras lecheras de raza Florida no provocó alteraciones ni en el consumo de alimento ni en la producción lechera. Tampoco fueron observados efectos negativos sobre la composición de la leche.
6. A excepción de un leve incremento en la enzima GGT en los grupos expuestos a aflatoxina B1, el resto de los parámetros bioquímicos no se vieron alterados, lo cual es indicativo de la resistencia del ganado caprino a los efectos adversos de las aflatoxinas.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aazami, M. H., Fathi Nasri, M. H., Mojtahedi, M., & Battacone, G. (2019). Effect of yeast cell wall and (1→3)- $\beta$ -d-glucan on transfer of aflatoxin from feed to milk in Saanen dairy goats. *Animal Feed Science and Technology*, 254, 114191. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.05.014>
- Abd El-Hack, M. E., Samak, D. H., Noreldin, A. E., El-Naggar, K., & Abdo, M. (2018). Probiotics and plant-derived compounds as eco-friendly agents to inhibit microbial toxins in poultry feed: a comprehensive review. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(32), 31971-31986. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3197-2>
- Abyaneh, H. K., Bahonar, A., Noori, N., Yazdanpanah, H., & Shojaee AliAbadi, M. H. (2020). The overall and variations of Aflatoxin M1 contamination of milk in Iran: A systematic review and meta-analysis study. *Food Chemistry*, 310, 125848. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125848>
- Agriopoulou, S., Stamatelopoulou, E., & Varzakas, T. (2020). Advances in Occurrence, Importance, and Mycotoxin Control Strategies: Prevention and Detoxification in Foods. *Foods*, 9(2), 137. <https://doi.org/10.3390/foods9020137>
- Ahmad, M., Awais, M., Ali, S. W., Ali Khan, H. A., Riaz, M., Sultan, A., Shakeel Bashir, M., & Ishtiaq Chaudhry, A. (2018). Occurrence of Aflatoxin M1 in raw and processed milk and assessment of daily intake in Lahore, Multan cities of Pakistan. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 12(1), 18-23. <https://doi.org/10.1080/19393210.2018.1509899>
- Akhtar, A. (2015). The Flaws and Human Harms of Animal Experimentation. *Cambridge Quarterly of Healthcare Ethics*, 24(4), 407-419. <https://doi.org/10.1017/s0963180115000079>
- Alshannaq, A., & Yu, J. H. (2017). Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. *International journal of environmental research and public health*, 14(6), 632. <https://doi.org/10.3390/ijerph14060632>
- Applebaum, R. S., Brackett, R. E., Wiseman, D. W., & Marth, E. H. (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. *Journal of Dairy Science*, 65(8), 1503-1508. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(82\)82374-6](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(82)82374-6)
- Assem, E., Mohamad, A., & Oula, E. A. (2011). A survey on the occurrence of aflatoxin M1 in raw and processed milk samples marketed in Lebanon. *Food Control*, 22(12), 1856-1858. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.04.026>
- Battacone, G., Nudda, A., Cannas, A., Borlino, A. C., Bomboi, G., & Pulina, G. (2003). Excretion of Aflatoxin M1 in Milk of Dairy Ewes Treated with Different Doses of Aflatoxin B1. *Journal of Dairy Science*, 86(8), 2667-2675. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(03\)73862-4](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(03)73862-4)
- Battacone, G., Nudda, A., Palomba, M. F. L., Mazzette, A., & Pulina, G. (2009). The transfer of aflatoxin M1 in milk of ewes fed diet naturally contaminated by

- aflatoxins and effect of inclusion of dried yeast culture in the diet. *Journal of Dairy Science*, 92(10), 4997-5004. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1684>
- Battacone, G., Nudda, A., Palomba, M., Pascale, M., Nicolussi, P., & Pulina, G. (2005). Transfer of Aflatoxin B1 from Feed to Milk and from Milk to Curd and Whey in Dairy Sheep Fed Artificially Contaminated Concentrates. *Journal of Dairy Science*, 88(9), 3063-3069. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(05\)72987-8](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(05)72987-8)
- Battacone, G., Nudda, A., Rattu, S., Decandia, M., & Pulina, G. (2012). Excretion pattern of aflatoxin M1 in milk of goats fed a single dose of aflatoxin B1. *Journal of Dairy Science*, 95(5), 2656-2661. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-5003>
- Battilani, P., Rossi, V., Giorni, P., Pietri, A., Gualla, A., van der Fels-Klerx, H., Booij, C., Moretti, A., Logrieco, A., Miglietta, F., Toscano, P., Miraglia, M., De Santis, B., & Brera, C. (2012). Modelling, predicting and mapping the emergence of aflatoxins in cereals in the EU due to climate change. *EFSA Supporting Publications*, 9(1). <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2012.en-223>
- Battilani, P., Toscano, P., Van der Fels-Klerx, H. J., Moretti, A., Camardo Leggieri, M., Brera, C., Rortais, A., Goumperis, T., & Robinson, T. (2016). Aflatoxin B1 contamination in maize in Europe increases due to climate change. *Scientific Reports*, 6(1), 1-7. <https://doi.org/10.1038/srep24328>
- Battista, J. R., & Marnett, L. J. (1985). Prostaglandin H synthase-dependent epoxidation of aflatoxin B1. *Carcinogenesis*, 6(8), 1227-1229. <https://doi.org/10.1093/carcin/6.8.1227>
- Bbosa, G. S., Kitya, D., Lubega, A., Ogwal-Okeng, J., Anokbonggo, W. W., & Kyegombe, D. B. (2013). Review of the Biological and Health Effects of Aflatoxins on Body Organs and Body Systems. *Aflatoxins - Recent Advances and Future Prospects*. <https://doi.org/10.5772/51201>
- Becker-Algeri, T. A., Castagnaro, D., Bortoli, K., Souza, C., Drunkler, D. A., & Badiale-Furlong, E. (2016). Mycotoxins in Bovine Milk and Dairy Products: A Review. *Journal of Food Science*, 81(3), R544-R552. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13204>
- Benkerroum, N. (2020). Aflatoxins: Producing-Molds, Structure, Health Issues and Incidence in Southeast Asian and Sub-Saharan African Countries. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(4), 1215. <https://doi.org/10.3390/ijerph17041215>
- Bilandžić, N., Varenina, I., Solomun Kolanović, B., Božić Luburić, U., Varga, I., Želježić, B., Cvetnić, L., BeniĆ, M., Tanković, S., & Cvetnić, E. (2017). Occurrence of aflatoxin M1 in raw cow, goat and sheep milk during spring and autumn in Croatia during 2016. *Toxin Reviews*, 36(4), 290-296. <https://doi.org/10.1080/15569543.2017.1306785>
- Blount, W. P. (1961). Turkey "X" disease. *Turkeys*, 9(2), 52-61.
- Boudergue, C., Burel C., Dragacci, S., Favrot, M., Fremy, J., Massimi, C., Prigent, P., Debongnie, P., Pussemier, L., Boudra, H., Morgavi, D., Oswald, I., Perez, A., & Avantaggiato, G. (2009). Review of mycotoxin-detoxifying agents used as feed additives: mode of action, efficacy and feed/food safety. *EFSA Supporting Publications*, 6(9). <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2009.en-22>



- Brucato, M., Sundlof, S. F., Bell, J. U., & Edds, G. T. (1986). Aflatoxin B1 toxicosis in dairy calves pretreated with selenium-vitamin E. *American Journal of Veterinary Research*, 47(1), 179-183.
- Caruso, M., Mariotti, A., Zizzadoro, C., Zaghini, A., Ormas, P., Altafini, A., & Belloli, C. (2009). A clonal cell line (BME-UV1) as a possible model to study bovine mammary epithelial metabolism: metabolism and cytotoxicity of aflatoxin B1. *Toxicon*, 53(4), 400-408. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.12.023>
- Cimbalo, A., Alonso-Garrido, M., Font, G., & Manyes, L. (2020). Toxicity of mycotoxins in vivo on vertebrate organisms: A review. *Food and Chemical Toxicology*, 137, 111161. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111161>
- Clark, J. D., Hatch, R. C., Miller, D. M., & Jain, A. V. (1984). Caprine aflatoxicosis: experimental disease and clinical pathologic changes. *American Journal of Veterinary Research*, 45, 1132-1135.
- Conteçotto, A. C. T., Pante, G. C., Castro, J. C., Souza, A. A., Lini, R. S., Romoli, J. C. Z., Abreu Filho, B. A., Mikcha, J. M. G., Mossini, S. A. G., & Machinski Junior, M. (2021). Occurrence, exposure evaluation and risk assessment in child population for aflatoxin M1 in dairy products in Brazil. *Food and Chemical Toxicology*, 148, 111913. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111913>
- Cook, W.O., Richard, J. L., Osweiler, G. D., & Trampel, D. W. (1986). Clinical and pathologic changes in acute bovine aflatoxicosis: rumen motility and tissue and fluid concentrations of aflatoxins B1 and M1. *American Journal of Veterinary Research*, 47(8), 1817-1825.
- Coppock, R. W., Christian, R. G., & Jacobsen, B. J. (2018). Aflatoxins. *Veterinary Toxicology*, 983-994. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811410-0.00069-6>
- Coulombe, R. A., Huie, J. M., Ball, R. W., Sharma, R. P., & Wilson, D. W. (1991). Pharmacokinetics of intratracheally administered aflatoxin B1. *Toxicology and applied pharmacology*, 109(2), 196-206. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(91\)90168-E](https://doi.org/10.1016/0041-008X(91)90168-E)
- Creppy, E. E. (2002). Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*, 127(1-3), 19-28. [https://doi.org/10.1016/s0378-4274\(01\)00479-9](https://doi.org/10.1016/s0378-4274(01)00479-9)
- da Rocha, M. E. B., Freire, F. D. C. O., Maia, F. E. F., Guedes, M. I. F., & Rondina, D. (2014). Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control*, 36(1), 159-165. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.08.021>
- Datta, K., & Kulkarni, A. P. (1994). Oxidative metabolism of aflatoxin B1 by lipoxygenase purified from human term placenta and intrauterine conceptual tissues. *Teratology*, 50(4), 311-317. <https://doi.org/10.1002/tera.1420500406>
- De Roma, A., Rossini, C., Ritieni, A., Gallo, P., & Esposito, M. (2017). A survey on the Aflatoxin M1 occurrence and seasonal variation in buffalo and cow milk from Southern Italy. *Food Control*, 81, 30-33. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.05.034>
- Deng, J., Zhao, L., Zhang, N. Y., Karrow, N. A., Krumm, C. S., Qi, D. S., & Sun, L. H. (2018). Aflatoxin B1 metabolism: Regulation by phase I and II metabolizing

- enzymes and chemoprotective agents. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 778, 79-89. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2018.10.002>
- Di Gregorio, M. C., Neeff, D. V. D., Jager, A. V., Corassin, C. H., Carão, G. C. D. P., Albuquerque, R. D., Azevedo, A. C. D., & Oliveira, C. A. F. (2014). Mineral adsorbents for prevention of mycotoxins in animal feeds. *Toxin Reviews*, 33(3), 125-135. <https://doi.org/10.3109/15569543.2014.905604>
- Diaz, D. E., Hagler Jr., W. M., Blackwelder, J. T., Eve, J. A., Hopkins, B. A., Anderson, K. L., Jones, F. T., & Whitlow, L. W. (2004). Aflatoxin Binders II: Reduction of aflatoxin M1 in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed. *Mycopathologia*, 157(2), 233-241. <https://doi.org/10.1023/b:myco.0000020587.93872.59>
- Diaz, G. J., Murcia, H. W., Cepeda, S. M., & Boermans, H. J. (2010). The role of selected cytochrome P450 enzymes on the bioactivation of aflatoxin B1 by duck liver microsomes. *Avian Pathology*, 39(4), 279-285. <https://doi.org/10.1080/03079457.2010.495109>
- Diaz, G., Murcia, H., & Cepeda, S. (2010). Cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of aflatoxin B1 in chickens and quail. *Poultry Science*, 89(11), 2461-2469. <https://doi.org/10.3382/ps.2010-00864>
- Diekman, M. A., & Green, M. L. (1992). Mycotoxins and reproduction in domestic livestock1. *Journal of Animal Science*, 70(5), 1615-1627. <https://doi.org/10.2527/1992.7051615x>
- Directiva 2003/100/CE de la Comisión, de 31 de octubre de 2003, por la que se modifica el anexo I de la Directiva 2002/32/CE del Parlamento Europeo y del Consejo sobre sustancias indeseables en la alimentación animal. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L285, 33-37.
- Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L276, 33-79.
- Duarte, S., Almeida, A., Teixeira, A., Pereira, A., Falcão, A., Pena, A., & Lino, C. (2013). Aflatoxin M1 in marketed milk in Portugal: Assessment of human and animal exposure. *Food Control*, 30(2), 411-417. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.08.002>
- Eaton, D. L., Beima, K. M., Bammler, T. K., Riley, R. T., & Voss, K. A. (2018). Hepatotoxic mycotoxins. *Comprehensive toxicology*, 2, 483-521.
- Edwards, G. L., Azain, M. J., & Parks, A. (2018). Agricultural Animals as Biomedical Models: Occupational Health and Safety Considerations. *ILAR Journal*, 59(2), 161-167. <https://doi.org/10.1093/ilar/ily013>
- EFSA. (2004). Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain [CONTAM] related to Aflatoxin B1 as undesirable substance in animal feed. *EFSA Journal*, 2(3), 39. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2004.39>
- EFSA. (2007). Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain [CONTAM] related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and

- pistachios and derived prod. (2007). *EFSA Journal*, 5(3), 446. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2007.446>
- EFSA. (2020). Risk assessment of aflatoxins in food. *EFSA Journal*, 18(3), 6040. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6040>
- Elliott, C. T., Connolly, L., & Kolawole, O. (2019). Potential adverse effects on animal health and performance caused by the addition of mineral adsorbents to feeds to reduce mycotoxin exposure. *Mycotoxin Research*, 36(1), 115-126. <https://doi.org/10.1007/s12550-019-00375-7>
- Eskola, M., Kos, G., Elliott, C. T., Hajšlová, J., Mayar, S., & Krska, R. (2019). Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited 'FAO estimate' of 25%. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(16), 2773-2789. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1658570>
- FAO. (2015). The State of Agricultural Commodity Markets 2015–2016. Trade and food security: Achieving a better balance between national priorities and the collective good. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. Disponible en: <https://www.fao.org/documents/card/es/c/31772b2a-7abc-4acb-b36f-867dc5ed00c7/>
- FAO. (2022). FAOSTAT Online Database. Disponible en: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/FBS>
- FAO/WHO. (2018). Aflatoxins. Safety evaluation of certain contaminants in food: prepared by the eighty-third meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). *WHO Food Additives Series*, 74, 2-280. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/276868>
- FDA. (2005). Compliance Policy Guide 527.400 Whole milk, low fat milk, skim milk-aflatoxin M1. *FDA compliance policy guides*. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/cpg-sec-527400-whole-milk-lowfat-milk-skim-milk-aflatoxin-m1>
- FELASA Working Group on Farm Animals: Berset, C. M., Caristo, M. E., Ferrara, F., Hardy, P., Oropeza-Moe, M., & Waters, R. (2020). Federation of European Laboratory Animal Science Associations recommendations of best practices for the health management of ruminants and pigs used for scientific and educational purposes. *Laboratory Animals*, 55(2), 117-128. <https://doi.org/10.1177/0023677220944461>
- Fernández, A., Hernández, M., Verde, M. T., & Sanz, M. (2000). Effect of aflatoxin on performance, hematology, and clinical immunology in lambs. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 64(1), 53-58.
- Fink-Gremmels, J. (2008). Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: A review. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 25(2), 172-180. <https://doi.org/10.1080/02652030701823142>
- Flaherty, D. C., Hoxha, B., Nelson, S., Sun, J., Gurji, H., Simecka, J. W., Mallet, R. T., Olivencia-Yurvati, A. H., & Daniels, E. Q. (2010). Peri- and intra-operative management of the goat during acute surgical experimentation. *Lab Animal*, 39(3), 80-85. <https://doi.org/10.1038/labana0310-80>

- Frazzoli, C., Gherardi, P., Saxena, N., Belluzzi, G., & Mantovani, A. (2017). The Hotspot for (Global) One Health in Primary Food Production: Aflatoxin M1 in Dairy Products. *Frontiers in Public Health*, 4. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2016.00294>
- Frobish, R., Bradley, B., Wagner, D., Long-Bradley, P., & Hairston, H. (1986). Aflatoxin Residues in Milk of Dairy Cows after Ingestion of Naturally Contaminated Grain. *Journal of Food Protection*, 49(10), 781-785. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-49.10.781>
- Fulton, L. K., Clarke, M. S., & Farris, H. E. (1994). The Goat as a Model for Biomedical Research and Teaching. *ILAR Journal*, 36(2), 21-29. <https://doi.org/10.1093/ilar.36.2.21>
- Gallo, A., Giuberti, G., Frisvad, J., Bertuzzi, T., & Nielsen, K. (2015). Review on Mycotoxin Issues in Ruminants: Occurrence in Forages, Effects of Mycotoxin Ingestion on Health Status and Animal Performance and Practical Strategies to Counteract Their Negative Effects. *Toxins*, 7(8), 3057-3111. <https://doi.org/10.3390/toxins7083057>
- Gallo, A., Moschini, M., & Masoero, F. (2008). Aflatoxins absorption in the gastrointestinal tract and in the vaginal mucosa in lactating dairy cows. *Italian Journal of Animal Science*, 7(1), 53-63. <https://doi.org/10.4081/ijas.2008.53>
- Gruber-Dorninger, C., Jenkins, T., & Schatzmayr, G. (2019). Global Mycotoxin Occurrence in Feed: A Ten-Year Survey. *Toxins*, 11(7), 375. <https://doi.org/10.3390/toxins11070375>
- Haque, M. A., Wang, Y., Shen, Z., Li, X., Saleemi, M. K., & He, C. (2020). Mycotoxin contamination and control strategy in human, domestic animal and poultry: A review. *Microbial Pathogenesis*, 142, 104095. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104095>
- Harvey, R. B., Kubena, L. F., Phillips, T. D., Corrier, D. E., Elissalde, M. H., & Huff W. E. (1991). Diminution of aflatoxin toxicity to growing lambs by dietary supplementation with hydrated sodium calcium aluminosilicate. *American Journal of Veterinary Research*. 52(1):152-156.
- Hattimare, D., Shakya, S., Patyal, A., Chandrakar, C., & Kumar, A. (2021). Occurrence and exposure assessment of Aflatoxin M1 in milk and milk products in India. *Journal of Food Science and Technology*, 59(6), 2460-2468. <https://doi.org/10.1007/s13197-021-05265-4>
- Helferich, W. G., Baldwin, R. L., & Hsieh, D. (1986). [14C]-Aflatoxin B1 Metabolism in Lactating Goats and Rats. *Journal of Animal Science*, 62(3), 697-705. <https://doi.org/10.2527/jas1986.623697x>
- Helferich, W. G., Garrett, W. N., Hsieh, D., & Baldwin, R. L. (1986). Feedlot Performance and Tissue Residues of Cattle Consuming Diets Containing Aflatoxins. *Journal of Animal Science*, 62(3), 691-696. <https://doi.org/10.2527/jas1986.623691x>
- Hsieh, D., Cullen, J., & Ruebner, B. (1984). Comparative hepatocarcinogenicity of aflatoxins B1 and M1 in the rat. *Food and Chemical Toxicology*, 22(12), 1027-1028. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(84\)90160-1](https://doi.org/10.1016/0278-6915(84)90160-1)

- Hussein, H. (2001). Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 167(2), 101-134. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(01\)00471-1](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(01)00471-1)
- IARC. (2002). Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*, 82, 1-556.
- IARC. (2012). Chemical Agents and Related Occupations. A review of Human Carcinogens. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*, 100F, 225-248.
- Iqbal, S., Jinap, S., Pirouz, A., & Ahmad Faizal, A. (2015). Aflatoxin M1 in milk and dairy products, occurrence and recent challenges: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 46(1), 110-119. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.08.005>
- Jiang, Y., Ogunade, I. M., Vyas, D., & Adesogan, A. T. (2021). Aflatoxin in Dairy Cows: Toxicity, Occurrence in Feedstuffs and Milk and Dietary Mitigation Strategies. *Toxins*, 13(4), 283. <https://doi.org/10.3390/toxins13040283>
- Kaneko, J. J., Harvey, J. W., & Bruss, M. L. (2008). Appendixes. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 873-904. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-370491-7.00033-7>
- Karlovsky, P. (1999). Biological detoxification of fungal toxins and its use in plant breeding, feed and food production. *Natural toxins*, 7(1), 1-23. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-7189\(199902\)7:1%3C1::AID-NT37%3E3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-7189(199902)7:1%3C1::AID-NT37%3E3.0.CO;2-9)
- Kelly, E. J., Erickson, K. E., Sengstag, C., & Eaton, D. L. (2002). Expression of Human Microsomal Epoxide Hydrolase in *Saccharomyces cerevisiae* Reveals a Functional Role in Aflatoxin B1 Detoxification. *Toxicological Sciences*, 65(1), 35-42. <https://doi.org/10.1093/toxsci/65.1.35>
- Klich, M. A. (2007). Environmental and developmental factors influencing aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Mycoscience*, 48(2), 71-80. <https://doi.org/10.1007/s10267-006-0336-2>
- Kolawole, O., Siri-Anusornsak, W., Petchkongkaw, A., Meneely, J., & Elliott, C. (2022). The Efficacy of Additives for the Mitigation of Aflatoxins in Animal Feed: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. *Toxins*, 14(10), 707. <https://doi.org/10.3390/toxins14100707>
- Kourousekos, G. D., Theodosiadou, E., Belibasaki, S., Deligiannis, K., Koukoulas, T., Zoulfos, K., & Lymberopoulos, A. G. (2012). Effects of aflatoxin B1 administration on Greek indigenous goats' milk. *International Dairy Journal*, 24(2), 123-129. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.11.006>
- Kovalsky, P., Kos, G., Nährer, K., Schwab, C., Jenkins, T., Schatzmayr, G., Sulyok, M., & Krska, R. (2016). Co-Occurrence of Regulated, Masked and Emerging Mycotoxins and Secondary Metabolites in Finished Feed and Maize—An Extensive Survey. *Toxins*, 8(12), 363. <https://doi.org/10.3390/toxins8120363>

- Kumagai, S. (1989). Intestinal absorption and excretion of aflatoxin in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 97(1), 88-97. [https://doi.org/10.1016/0041-008x\(89\)90057-4](https://doi.org/10.1016/0041-008x(89)90057-4)
- Kutz, R., Sampson, J., Pompeu, L., Ledoux, D., Spain, J., Vázquez-Añón, M., & Rottinghaus, G. (2009). Efficacy of Solis, NovasilPlus, and MTB-100 to reduce aflatoxin M1 levels in milk of early to mid lactation dairy cows fed aflatoxin B1. *Journal of Dairy Science*, 92(8), 3959-3963. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2031>
- Larsen, G. (2015). A reliable ruminant for research. *Lab Animal*, 44(9), 337-337. <https://doi.org/10.1038/labon.846>
- Lee, H. J., & Ryu, D. (2017). Worldwide Occurrence of Mycotoxins in Cereals and Cereal-Derived Food Products: Public Health Perspectives of Their Co-occurrence. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(33), 7034-7051. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04847>
- Loh, Z. H., Ouwerkerk, D., Klieve, A. V., Hungerford, N. L., & Fletcher, M. T. (2020). Toxin Degradation by Rumen Microorganisms: A Review. *Toxins*, 12(10), 664. <https://doi.org/10.3390/toxins12100664>
- Lynch, G., Shalkop, W., Jacoby, N., Smith, D., & Miller, R. (1971). Responses of Dairy Calves to Oral Doses of Aflatoxin. *Journal of Dairy Science*, 54(11), 1688-1698. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(71\)86090-3](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(71)86090-3)
- MAPA. (2020). Informe sobre usos de animales en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. Disponible en: [https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/informe2020\\_tcm30-580003.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/informe2020_tcm30-580003.pdf)
- Marchese, S., Polo, A., Ariano, A., Velotto, S., Costantini, S., & Severino, L. (2018). Aflatoxin B1 and M1: Biological Properties and Their Involvement in Cancer Development. *Toxins*, 10(6), 214. <https://doi.org/10.3390/toxins10060214>
- Masoero, F., Gallo, A., Moschini, M., Piva, G., & Diaz, D. (2007). Carryover of aflatoxin from feed to milk in dairy cows with low or high somatic cell counts. *Animal*, 1(9), 1344-1350. <https://doi.org/10.1017/s1751731107000663>
- Mazzette, A., Decandia, M., Acciaro, M., Fenu, A., Dias Francesconi, A. H., & Battacone, G. (2009). Excretion of Aflatoxin M1 in milk of goats fed diet contaminated by Aflatoxin B1. *Italian Journal of Animal Science*, 8, 631-633. <https://doi.org/10.4081/ijas.2009.s2.631>
- Meerdink, G. L. (2004). Mycotoxins. *Clinical Veterinary Toxicology*, 231-282.
- Miller, D. M., & Wilson, D. M. (1994). Veterinary diseases related to aflatoxins. *The toxicology of aflatoxins*, 347-364.
- Min, L., Fink-Gremmels, J., Li, D., Tong, X., Tang, J., Nan, X., Yu, Z., Chen, W., & Wang, G. (2021). An overview of aflatoxin B1 biotransformation and aflatoxin M1 secretion in lactating dairy cows. *Animal Nutrition*, 7(1), 42-48. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2020.11.002>
- Mohammedi-Ameur, S., Dahmane, M., Brera, C., Kardjadj, M., & Ben-Mahdi, M. H. (2020). Occurrence and seasonal variation of aflatoxin M1 in raw cow milk

- collected from different regions of Algeria. *Veterinary World*, 13(3), 433-439. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.433-439>
- Mollayusefian, I., Ranaei, V., Pilevar, Z., Cabral-Pinto, M. M., Rostami, A., Nematollahi, A., Khedher, K. M., Thai, V. N., Fakhri, Y., & Mousavi Khaneghah, A. (2021). The concentration of aflatoxin M1 in raw and pasteurized milk: A worldwide systematic review and meta-analysis. *Trends in Food Science & Technology*, 115, 22-30. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.06.033>
- Moretti, A., Pascale, M., & Logrieco, A. F. (2019). Mycotoxin risks under a climate change scenario in Europe. *Trends in Food Science & Technology*, 84, 38-40. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.008>
- Mostrom, M. S., & Jacobsen, B. J. (2020). Ruminant Mycotoxicosis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 36(3), 745-774. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2020.08.011>
- Munkvold, G. P., Arias, S., Taschl, I., & Gruber-Dorninger, C. (2019). Mycotoxins in Corn: Occurrence, Impacts, and Management. *Corn*, 235-287. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811971-6.00009-7>
- Naderi, S., Rezaei, H. R., Pompanon, F., Blum, M. G. B., Negrini, R., Naghash, H. R., Balkız, Z., Mashkour, M., Gaggiotti, O. E., Ajmone-Marsan, P., Kence, A., Vigne, J. D., & Taberlet, P. (2008). The goat domestication process inferred from large-scale mitochondrial DNA analysis of wild and domestic individuals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(46), 17659-17664. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804782105>
- Ndiaye, S., Zhang, M., Fall, M., Ayessou, N. M., Zhang, Q., & Li, P. (2022). Current Review of Mycotoxin Biodegradation and Bioadsorption: Microorganisms, Mechanisms, and Main Important Applications. *Toxins*, 14(11), 729. <https://doi.org/10.3390/toxins14110729>
- Newberne, P. M. (1973). Chronic aflatoxicosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 163(11), 1262-1267.
- Oakley, A. (2011). Glutathione transferases: a structural perspective. *Drug Metabolism Reviews*, 43(2), 138-151. <https://doi.org/10.3109/03602532.2011.558093>
- Ogunade, I., Arriola, K., Jiang, Y., Driver, J., Staples, C., & Adesogan, A. (2016). Effects of 3 sequestering agents on milk aflatoxin M1 concentration and the performance and immune status of dairy cows fed diets artificially contaminated with aflatoxin B1. *Journal of Dairy Science*, 99(8), 6263-6273. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-10905>
- Ozer, J., Ratner, M., Shaw, M., Bailey, W., & Schomaker, S. (2008). The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology*, 245(3), 194-205. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2007.11.021>
- Park, D. L., Njapau, H., & Boutrif, E. (1999). Minimizing risks posed by mycotoxins utilizing the HACCP concept. *Food Nutrition and Agriculture*, 49-54.
- Perrone, G., & Gallo, A. (2016). Aspergillus Species and Their Associated Mycotoxins. *Methods in Molecular Biology*, 33-49. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6707-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6707-0_3)

- Pickova, D., Ostry, V., Toman, J., & Malir, F. (2021). Aflatoxins: History, Significant Milestones, Recent Data on Their Toxicity and Ways to Mitigation. *Toxins*, 13(6), 399. <https://doi.org/10.3390/toxins13060399>
- Popescu, R. G., Rădulescu, A. L., Georgescu, S. E., & Dinischiotu, A. (2022). Aflatoxins in Feed: Types, Metabolism, Health Consequences in Swine and Mitigation Strategies. *Toxins*, 14(12), 853. <https://doi.org/10.3390/toxins14120853>
- Pottenger, L. H., Andrews, L. S., Bachman, A. N., Boogaard, P. J., Cadet, J., Embry, M. R., Farmer, P. B., Himmelstein, M. W., Jarabek, A. M., Martin, E. A., Mauthe, R. J., Persaud, R., Preston, R. J., Schoeny, R., Skare, J., Swenberg, J. A., Williams, G. M., Zeiger, E., Zhang, F., & Kim, J. H. (2014). An organizational approach for the assessment of DNA adduct data in risk assessment: case studies for aflatoxin B1, tamoxifen and vinyl chloride. *Critical Reviews in Toxicology*, 44(4), 348-391. <https://doi.org/10.3109/10408444.2013.873768>
- Prandini, A., Tansini, G., Sigolo, S., Filippi, L., Laporta, M., & Piva, G. (2009). On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food and Chemical Toxicology*, 47(5), 984-991. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.10.005>
- Price, R. L., Paulson, J., Lough, O. G., Gingg, C., & Kurtz, A. G. (1985). Aflatoxin Conversion by Dairy Cattle Consuming Naturally-Contaminated Whole Cottonseed. *Journal of Food Protection*, 48(1), 11-16. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-48.1.11>
- Queiroz, O., Han, J., Staples, C., & Adesogan, A. (2012). Effect of adding a mycotoxin-sequestering agent on milk aflatoxin M1 concentration and the performance and immune response of dairy cattle fed an aflatoxin B1-contaminated diet. *Journal of Dairy Science*, 95(10), 5901-5908. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-5287>
- Ramos, A. J., & Hernández, E. (1996). In situ absorption of aflatoxins in rat small intestine. *Mycopathologia*, 134(1), 27-30. <https://doi.org/10.1007/bf00437049>
- Rao, S., & Chopra, R. (2001). Influence of sodium bentonite and activated charcoal on aflatoxin M1 excretion in milk of goats. *Small Ruminant Research*, 41(3), 203-213. [https://doi.org/10.1016/s0921-4488\(01\)00216-4](https://doi.org/10.1016/s0921-4488(01)00216-4)
- RASFF (2022). RASFF Portal disponible en: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=SearchForm&cleanSearch=1>
- Rawal, S., & Coulombe, R. A. (2011). Metabolism of aflatoxin B1 in Turkey liver microsomes: The relative roles of cytochromes P450 1A5 and 3A37. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 254(3), 349-354. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.05.010>
- Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. *Boletín Oficial del Estado*, 34, 11370-11421.
- Reglamento (CE) nº 1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2003, sobre los aditivos en la alimentación animal. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L268, 29-43.



- Reglamento (CE) n° 386/2009 de la Comisión, de 12 de mayo de 2009, que modifica el Reglamento (CE) n° 1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo estableciendo un nuevo grupo funcional de aditivos para piensos. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L118, 66.
- Reglamento (CE) n° 401/2006 de la Comisión, de 23 de febrero de 2006, por el que se establecen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L70, 12-34.
- Reglamento (CEE) n° 315/93 del Consejo, de 8 de febrero de 1993, por el que se establecen procedimientos comunitarios en relación con los contaminantes presentes en los productos alimenticios. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, L37, 1-3.
- Reglamento (EU) n° 165/2010 de la Comisión, de 26 de febrero de 2010, que modifica, en lo que respecta a las aflatoxinas, el Reglamento (CE) n° 1881/2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L50, 8-12.
- Reglamento de Ejecución (UE) n° 884/2014 de la Comisión, de 13 de agosto de 2014, por el que se imponen condiciones especiales a la importación desde determinados terceros países de piensos y alimentos que pueden estar contaminados por aflatoxinas y se deroga el Reglamento (CE) no 1152/2009. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L242, 4-19.
- Rodrigues, R., Rodrigues, R., Ledoux, D., Rottinghaus, G., Borutova, R., Averkieva, O., & McFadden, T. (2019). Feed additives containing sequestrant clay minerals and inactivated yeast reduce aflatoxin excretion in milk of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 102(7), 6614-6623. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-16151>
- Rubio, R., Licón, C., Berruga, M., Molina, M., & Molina, A. (2011). Short communication: Occurrence of aflatoxin M1 in the Manchego cheese supply chain. *Journal of Dairy Science*, 94(6), 2775-2778. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-4017>
- Rushing, B. R., & Selim, M. I. (2019). Aflatoxin B1: A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods. *Food and Chemical Toxicology*, 124, 81-100. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.11.047>
- Schmidt, T., Ferrara, F., Poblath, A. M., & Jeuthe, S. (2021). Large Farm Animals Used for Research Purposes: A Survey on Purchase, Housing and Hygiene Management. *Animals*, 11(8), 2158. <https://doi.org/10.3390/ani11082158>
- Sharafi, K., Matin, B. K., Omer, A. K., Mansouri, B., Soleimani, H., Fattahi, N., Sharafi, H., & Kiani, A. (2022). A worldwide systematic literature review for aflatoxin M1 in infant formula milk: Human health risk assessment by Monte Carlo simulation. *Food Control*, 134, 108681. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108681>
- Sharma, H., Jadhav, V. J., & Garg, S. R. (2019). Aflatoxin M1 in milk in Hisar city, Haryana, India and risk assessment. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 13(1), 59-63. <https://doi.org/10.1080/19393210.2019.1693434>

- Silanikove, N., Leitner, G., Merin, U., & Prosser, C. (2010). Recent advances in exploiting goat's milk: Quality, safety and production aspects. *Small Ruminant Research*, 89(2-3), 110-124. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.12.033>
- Sinnhuber, R. O., Lee, D., Wales, J. H., Landers, M. K., & Keyl, A. C. (1974). Hepatic Carcinogenesis of Aflatoxin M1 in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) and Its Enhancement by Cyclopropene Fatty Acids. *Journal of the National Cancer Institute*, 53(5), 1285-1288. <https://doi.org/10.1093/jnci/53.5.1285>
- Streit, E., Naehrer, K., Rodrigues, I., & Schatzmayr, G. (2013). Mycotoxin occurrence in feed and feed raw materials worldwide: long-term analysis with special focus on Europe and Asia. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(12), 2892-2899. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6225>
- Strosnider, H., Azziz-Baumgartner, E., Banziger, M., Bhat, R. V., Breiman, R., Brune, M. N., DeCock, K., Dilley, A., Groopman, J., Hell, K., Henry, S. H., Jeffers, D., Jolly, C., Jolly, P., Kibata, G. N., Lewis, L., Liu, X., Lubber, G., McCoy, L., . . . Wilson, D. (2006). Workgroup Report: Public Health Strategies for Reducing Aflatoxin Exposure in Developing Countries. *Environmental Health Perspectives*, 114(12), 1898-1903. <https://doi.org/10.1289/ehp.9302>
- Sulzberger, S., Melnichenko, S., & Cardoso, F. (2017). Effects of clay after an aflatoxin challenge on aflatoxin clearance, milk production, and metabolism of Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 100(3), 1856-1869. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11612>
- Tadesse, S., Berhanu, T., & Woldegiorgis, A. Z. (2020). Aflatoxin M1 in milk and milk products marketed by local and industrial producers in Bishoftu town of Ethiopia. *Food Control*, 118, 107386. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107386>
- Tripathi, M. K., Mondal, D., & Karim, S. A. (2007). Growth, haematology, blood constituents and immunological status of lambs fed graded levels of animal feed grade damaged wheat as substitute of maize. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 92(1), 75-85. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2007.00712.x>
- Tsakiris, I. N., Tzatzarakis, M. N., Alegakis, A. K., Vlachou, M. I., Renieri, E. A., & Tsatsakis, A. M. (2013). Risk assessment scenarios of children's exposure to aflatoxin M1 residues in different milk types from the Greek market. *Food and Chemical Toxicology*, 56, 261-265. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.02.024>
- Turna, N. S., & Wu, F. (2021). Aflatoxin M1 in milk: A global occurrence, intake, & exposure assessment. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 183-192. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.093>
- Upadhaya, S. D., Sung, H. G., Lee, C. H., Lee, S. Y., Kim, S. W., Cho, K. J., & Ha, J. K. (2009). Comparative study on the aflatoxin B1 degradation ability of rumen fluid from Holstein steers and Korean native goats. *Journal of Veterinary Science*, 10(1), 29. <https://doi.org/10.4142/jvs.2009.10.1.29>
- Varga, J., Frisvad, J., & Samson, R. (2009). A reappraisal of fungi producing aflatoxins. *World Mycotoxin Journal*, 2(3), 263-277. <https://doi.org/10.3920/wmj2008.1094>

- Veldman, A., Meijjs, J. A. C., Borggreve, G. J., & Heeres-van der Tol, J. J. (1992). Carry-over of aflatoxin from cows' food to milk. *Animal Science*, 55(2), 163-168. <https://doi.org/10.1017/s0003356100037417>
- Vila-Donat, P., Marín, S., Sanchis, V., & Ramos, A. (2018). A review of the mycotoxin adsorbing agents, with an emphasis on their multi-binding capacity, for animal feed decontamination. *Food and Chemical Toxicology*, 114, 246-259. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.02.044>
- Wan, J., Chen, B., & Rao, J. (2020). Occurrence and preventive strategies to control mycotoxins in cereal-based food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(3), 928-953. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12546>
- Wei, R. D., Liu, G. X., & Lee, S. S. (1970). Uptake of aflatoxin B1 by the skin of rats. *Experientia*, 26(1), 82-83. <https://doi.org/10.1007/bf01900406>
- Wielogórska, E., MacDonald, S., & Elliott, C. (2016). A review of the efficacy of mycotoxin detoxifying agents used in feed in light of changing global environment and legislation. *World Mycotoxin Journal*, 9(3), 419-433. <https://doi.org/10.3920/wmj2015.1919>
- Wu, F. (2015). Global impacts of aflatoxin in maize: trade and human health. *World Mycotoxin Journal*, 8(2), 137-142. <https://doi.org/10.3920/wmj2014.1737>
- Wu, F., Groopman, J. D., & Pestka, J. J. (2014). Public Health Impacts of Foodborne Mycotoxins. *Annual Review of Food Science and Technology*, 5(1), 351-372. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030713-092431>
- Zarba, A., Himieleski, R., Hemenway, D. R., Jakab, G. J., & Groopman, J. D. (1992). Aflatoxin B1 – DNA adduct formation in rat liver following exposure by aerosol inhalation. *Carcinogenesis*, 13(6), 1031-1033. <https://doi.org/10.1093/carcin/13.6.1031>
- Zarba, A., Wild, C. P., Hall, A. J., Montesano, R., Hudson, G. J., & Groopman, J. D. (1992). Aflatoxin M1 in human breast milk from The Gambia, West Africa, quantified by combined monoclonal antibody immunoaffinity chromatography and HPLC. *Carcinogenesis*, 13(5), 891-894. <https://doi.org/10.1093/carcin/13.5.891>
- Zhang, X., Chen, X., Xu, Y., Yang, J., Du, L., Li, K., & Zhou, Y. (2021). Milk consumption and multiple health outcomes: umbrella review of systematic reviews and meta-analyses in humans. *Nutrition & Metabolism*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12986-020-00527-y>

## 9. ANEXO I

Mora-Medina, R., Lora-Benítez, A. J., Molina-López, A. M., Ayala-Soldado, N., & Moyano-Salvago, R. (2023). Effects of chronic low-dose aflatoxin B1 exposure in lactating Florida dairy goats. *Journal of Dairy Science*. 106(5), 3641–3649. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22704>



## Effects of chronic low-dose aflatoxin B<sub>1</sub> exposure in lactating Florida dairy goats

Rafael Mora-Medina,\*<sup>ORCID</sup> Antonio Jesús Lora-Benítez,\*<sup>ORCID</sup> Ana María Molina-López,†<sup>ORCID</sup>  
Nahúm Ayala-Soldado,††<sup>ORCID</sup> and Rosario Moyano-Salvago‡<sup>ORCID</sup>

Department of Anatomy and Comparative Pathology and Toxicology, UIC Zoonosis y Enfermedades Emergentes ENZOEM, University of Córdoba, Campus de Rabanales, Faculty of Veterinary Medicine, Darwin Building, 14071 Córdoba, Spain

### ABSTRACT

In the past few years there has been a growing trend in the prevalence of aflatoxins, attributable to climate change, in substances destined for animal feeding, together with an increase in dairy product consumption. These facts have triggered great concern in the scientific community over milk pollution by aflatoxin M<sub>1</sub>. Therefore, our study aimed to determine the transfer of aflatoxin B<sub>1</sub> from the diet into milk as AFM<sub>1</sub> in goats exposed to different concentrations of AFB<sub>1</sub>, and its possible effect on the production and serological parameters of this species. For this purpose, 18 goats in late lactation were divided into 3 groups (n = 6) and exposed to different daily doses of aflatoxin B<sub>1</sub> (T1 = 120 µg; T2 = 60 µg, and control = 0 µg), during 31 d. Pure aflatoxin B<sub>1</sub> was administered 6 h before each milking in an artificially contaminated pellet. The milk samples were taken individually in sequential samples. Milk yield and feed intake were recorded daily, and a blood sample was extracted on the last day of exposure. No aflatoxin M<sub>1</sub> was detected, either in the samples taken before the first administration, or in the control group ones. The aflatoxin M<sub>1</sub> concentration detected in the milk (T1 = 0.075 µg/kg; T2 = 0.035 µg/kg) increased significantly on a par with the amount of aflatoxin B<sub>1</sub> ingested. The amount of aflatoxin B<sub>1</sub> ingested did not have any influence on aflatoxin M<sub>1</sub> carryover (T1 = 0.066% and T2 = 0.060%), these being considerably lower than those described in dairy goats. Thus, we concluded that the concentration of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk follows a linear relationship with respect to the aflatoxin B<sub>1</sub> ingested, and that the aflatoxin M<sub>1</sub> carryover was not affected by the administration of different aflatoxin B<sub>1</sub> doses. Similarly, no significant changes in

the production parameters after chronic exposure to aflatoxin B<sub>1</sub> were observed, revealing a certain resistance of the goat to the possible effects of that aflatoxin.

**Key words:** aflatoxin B<sub>1</sub>, aflatoxin M<sub>1</sub>, carryover, mycotoxins

### INTRODUCTION

Aflatoxins are considered the most important mycotoxins worldwide in animal and human feeding due to their carcinogenicity and hepatotoxicity (Strosnider et al., 2006). In this respect, the International Agency for Research on Cancer (IARC) has concluded that there is sufficient evidence in humans of the carcinogenicity of the aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, and M<sub>1</sub>, which can cause liver cancer (hepatocellular carcinoma). That carcinogenicity is produced by a genotoxic action mechanism, involving the activation of an epoxide metabolite, DNA adduct formation, and the modification of the tumor suppressor gene *TP53*. Thus, aflatoxins are included in group 1 as cancerigenous substances for humans (IARC, 2012).

These mycotoxins are difuranocoumarins, mainly produced by 2 species of *Aspergillus*, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*, which contaminate grain and cereals at several stages during harvesting, transport, or the storage of raw materials (Kumar et al., 2017). In addition, *A. flavus*, the principal aflatoxin-producing fungus, adapts itself very well to warm, dry, climate conditions. Therefore, the European Food Safety Authority's Unit for Emerging Risks (EFSA) has considered the effect of climate change to be a key factor in the greater risk of aflatoxin pollution in European crops (Battilani et al., 2012, 2016).

The most toxic aflatoxin is B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>). This becomes biotransformed in the liver by means of enzymes belonging to the cytochrome P450 superfamily into various metabolites, among which is aflatoxin M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>; Deng et al., 2018; Rushing and Selim, 2019). With respect to AFM<sub>1</sub>, this is a hydroxylated metabolite that can be found in mammal milk which have ingested

Received August 27, 2022.

Accepted November 17, 2022.

\*These authors contributed equally to this work.

†Corresponding authors: [nahum.ayala@uco.es](mailto:nahum.ayala@uco.es) and [ft2molola@uco.es](mailto:ft2molola@uco.es)

‡These authors contributed equally to this work.

some AFB<sub>1</sub>-contaminated feed (Creppy, 2002). In addition to milk, aflatoxins can be excreted in eggs, urine, semen, bile, and feces (Coppock et al., 2018).

Although all animal species are susceptible to aflatoxins, ruminants are regarded as being less sensitive than monogastric species due to ruminal detoxification processes (Gallo et al., 2015). Because of their lesser susceptibility, the chief repercussion of chronic exposure in these animals lies in the decline in their production parameters and, above all, in the presence of residues in their milk (Mostrom and Jacobsen, 2020). In this sense, AFM<sub>1</sub> is thermally stable and, once it is present in raw milk, it is highly unlikely that its concentration will be reduced, in spite of applying routine heat treatments such as pasteurization or sterilization (Becker-Algeri et al., 2016). Another key factor in small ruminant milk is that there is no physical method capable of preventing the binding of AFM<sub>1</sub> to whey proteins, which implies a higher AFM<sub>1</sub> concentration in cheese (Barbiroli et al., 2007). This is especially relevant in some continents such as Europe, Oceania, and America because cheese production from goat milk is a significant industry (Silanikove et al., 2010).

According to the corporative statics database of the Organization for Agriculture and Food of the United Nations (FAOSTAT), in 2019, the world milk production reached 864,854 thousand tons, and the mean consumption per capita was established at 70.76 kg/yr. The production of raw goat milk contributed 23.9% of all milk production in that year, being Asia and Africa the main producers (FAOSTAT, 2022). In view of the importance to humans of consuming milk, AFM<sub>1</sub> limits in this food have been established in different legislations. In the European Union, the maximum AFM<sub>1</sub> levels in milk and processed dairy products must not exceed 0.05 µg/kg, reducing this limit to 0.025 µg/kg in infants and follow-on food preparations (European Commission, 2010). In addition, the maximum level of AFB<sub>1</sub> for compound feed for dairy cattle and calves, dairy ewes and lambs, and dairy goats and kids has been limited to 5 µg/kg (European Commission, 2011). In the United States, the Food and Drug Administration (FDA) has fixed an action level of 0.5 µg/kg in whole, low-fat, skim milk (US FDA, 2005).

The presence of AFM<sub>1</sub> in milk samples has been described in many studies in the past few years, thus evidencing a high incidence rate of this pollutant. Although concentrations in European countries are generally found below the maximum level permitted, the high concentrations and the degree of effect in developing countries demonstrate the need to study, monitor and control AFM<sub>1</sub> contamination (Mollayusefian et al., 2021; Saha Turna and Wu, 2021; Sharafi et al., 2022). However, international trade and the climate change

have made AFM<sub>1</sub> also become a serious problem in developed countries (Frazzoli et al., 2017).

With the growing concern for AFM<sub>1</sub> in the dairy industry, in addition to the limited scientific studies on goats, we have considered that investigating the AFM<sub>1</sub> excretion dynamics for the milk of this species would be of great importance. Additionally, the repercussions of climate change on the concentration of aflatoxin in feed materials destined for animal feeding mark the target for studying the possible influence of chronic exposure to AFB<sub>1</sub> on production parameters in goats.

## MATERIALS AND METHODS

### *Housing and Ethical Considerations*

The experimental phase of the study was carried out in the Small Ruminant Experimental Unit at Córdoba University (Spain), a center registered as an establishment for the employment of animals for experimentation and other scientific purposes. All the applicable national, international, or institutional guidelines for the care and use of those animals were followed. All procedures complied with the instructions of the Animal Experimentation Committee at Córdoba University, following the indications of Directive 2010/63/EU (European Parliament, 2010).

### *Animals, Feeding, and Milking*

Eighteen Florida breed goats in late lactation (>120 d in lactation) were used. They had a mean weight of 64.83 ± 3.12 kg, and were stabled individually so that one animal only could access to its food and drink troughs. They were fed with a ration of concentrate (protein: 17%; fat: 4.5%; fiber: 9.5%, and ash: 8.4%) established at 1,350 g/animal per d, and they had access to hay and water ad libitum. The absence of aflatoxins in concentrate and hay was determined by ELISA (Bio-Shield Aflatoxin Total ES, Prognosis Biotech). Regarding milking, the goats were mechanically milked individually using a portable milking machine at 1200 h. Concentrate intake was measured daily by weighing the amount left over from the previous day. Hay intake was not accounted. Milk yield also was measured daily by weighing the milk amount produced for every goat.

### *Experimental Design*

The animals were randomly allocated to 3 groups (n = 6) exposed to different concentrations of AFB<sub>1</sub> [T1 = 120 µg/AFB<sub>1</sub> per d; T2 = 60 µg/AFB<sub>1</sub> per d; and control (CON) = 0 µg/AFB<sub>1</sub> per d]. These concentrations were chosen because they are environmentally relevant.

For example, Tarazona et al. (2020) determined a range of AFB<sub>1</sub> in maize kernel in Spain at 0.87 to 124.1 µg/kg. Pure AFB<sub>1</sub> (Sigma-Aldrich, A6636) was dissolved in methanol and administered by means of an artificially contaminated pellet, 6 h before each milking session. According to Battacone et al. (2012) the average AFM<sub>1</sub> concentration in goat milk is higher at 3 and 6 h after the AFB<sub>1</sub> administration in a single dose with respect to others times. The contaminated pellet was placed directly into the oral cavity of each goat. Previously, the remaining amount of feed from the previous day had been removed and a new ration had been added. The experimental phase lasted 34 d, with an exposure time of 31 d. Previously, the animals spent 14 d in the facilities to acclimatize themselves. The health status of animals was monitored constantly during both periods.

### Milk Composition Samples and Analysis

Once milking was finished and the amount of milk produced by each goat was weighed, 100-mL homogenized sample from each animal was taken to determine milk's composition (% protein, % fat, and % lactose). These samples were taken on the day before the first AFB<sub>1</sub> administration; on d 3 of exposure; and every 7 d successively up to the exposure end (d 31). The samples were stored at -18°C until their analysis.

The milk composition were ascertained with the MilkoScan FT120 (Foss Electric) milk analyzer in the Milk Control Laboratory, Faculty of Veterinary Medicine, at Córdoba University. Before their analysis, frozen milk samples were tempered in a 33°C water bath while carefully stirring to homogenize the fat.

### AFM<sub>1</sub> in Milk and Analysis

To determine the AFM<sub>1</sub> excretion curve in milk, following the same mechanic, other 100-mL milk samples from each animal were taken the same days as for analyzing the milk composition. However, in this case, the first 2 and the last 3 d of the experimental phase were also sampled. These samples were frozen too until their posterior analysis when the study ended.

The AFM<sub>1</sub> in milk was determined in the Mass Spectrometry and Chromatography Unit of the Central Research Support Service at Córdoba University, by liquid chromatography coupled to a Tandem Mass Spectrometry detector (LC-MS/MS), following the protocol described by Pallarés et al. (2021). For this purpose, an Agilent 1200 chromatograph (Agilent Technologies), equipped with a 3200 QTRAP mass spectrometer (Applied Biosystems, AB Sciex), was deployed. The components of the samples obtained in the liquid chro-

matography were moved to the mass spectrometer by electrospray ionization.

### Biochemical Parameters

The blood samples were extracted by jugular venipuncture into heparinized tubes on the last day of exposure and analyzed to find out their biochemical profile. Those samples were centrifuged at 1,400 × *g* for 10 min at 25°C to obtain the blood plasma. The plasma samples were analyzed with commercial colorimetric kits (BioSystems S.A.) by spectrophotometry. The biochemical parameters determined were glucose, cholesterol, urea, creatinine, total proteins, globulins, bilirubin, alkaline phosphatase, aminotransferase aspartate, and gamma-glutamyl transferase (**GGT**).

### Data Analysis

The AFM<sub>1</sub> carryover was calculated individually for each animal, following the formula used by Aazami et al. (2019):

$$\text{AFM}_1 \text{ carryover} = \frac{[\text{AFM}_1 \text{ concentration } (\mu\text{g}/\text{kg}) \times \text{milk production } (\text{kg}/\text{d})]}{[\text{AFB}_1 \text{ ingested } (\mu\text{g}/\text{d})]} \times 100.$$

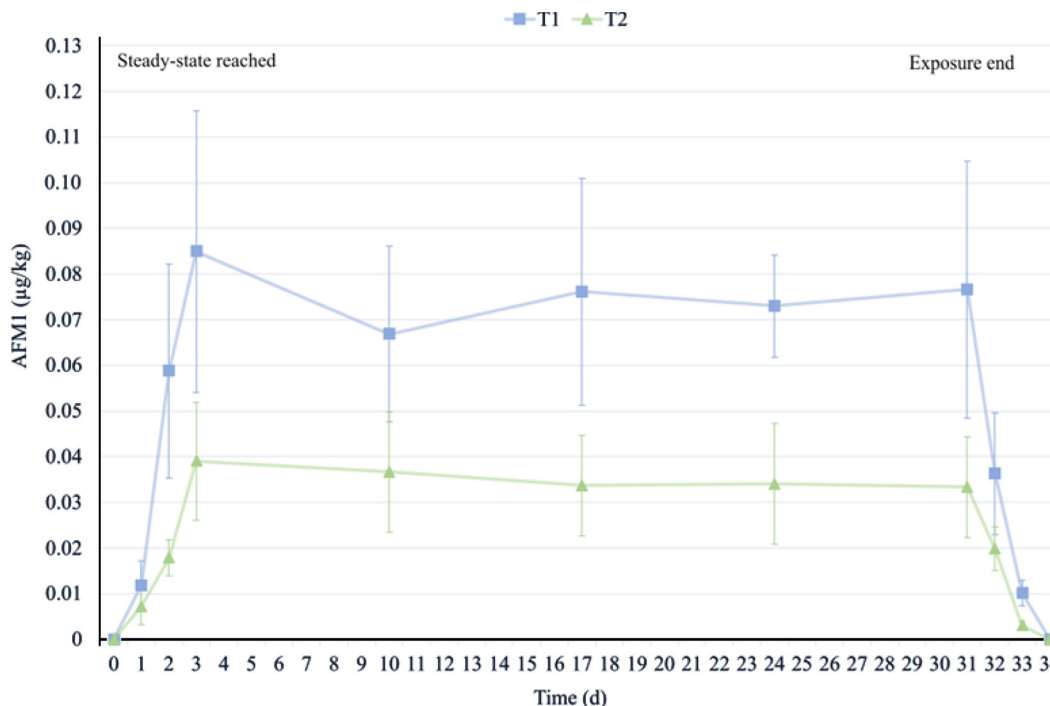
As in Battacone et al. (2009), the carryover of AFM<sub>1</sub> in milk was calculated when the toxin output in milk reached a steady state (from d 3 to 31 of the exposure period).

The statistical analysis of the data were carried out with SAS/STAT Software (version 15.2; SAS Institute Inc.). The normality of the data was verified by the Kolmogorov-Smirnov test, and they were analyzed following the mixed linear model reported by Battacone et al. (2003):

$$y_{ijk} = \mu + T_i + P_j + (T \times P)_{ij} + E_k + \varepsilon_{ijk},$$

where *y* = dependent variable (AFM<sub>1</sub> concentration, carryover, milk yield, milk composition and feed intake);  $\mu$  = general mean;  $T_i$  = fixed effect of the dose of AFB<sub>1</sub> (*i* = 0; 60; 120 µg);  $P_j$  = fixed effect of the exposure time (*j* = day);  $E_k$  = random effect of each animal; and  $\varepsilon_{ijk}$  = residual error. The Tukey test was used as a post hoc method. For milk yield, milk composition and feed intake only data in exposure phase (d 1 to 31) were used. Regarding AFM<sub>1</sub> concentration, only steady-state (d 3 to 31) data were used.

Due to the non-normality in most of the data obtained on the biochemical parameters, the nonpara-



**Figure 1.** Aflatoxin M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) concentration in the milk of groups T1 (120 µg/d of aflatoxin B<sub>1</sub>) and T2 (60 µg/d of aflatoxin B<sub>1</sub>) throughout the study.

metric Kruskal-Wallis test was employed to establish the differences between the different groups. In this case, the data were presented as the median (25th–75th percentile). In all the cases, statistical significance was established for a value of  $P < 0.05$ . The data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author.

## RESULTS AND DISCUSSION

### AFM<sub>1</sub> in Milk and Carryover

In the samples before exposure, no AFM<sub>1</sub> traces were detected in any case. Nor was AFM<sub>1</sub> found in the milk of goats belonging to the CON group during the whole experimental time. In groups T1 and T2, AFM<sub>1</sub> was detected from d 1 to 33. In these groups, at d 34 the milk was free of AFM<sub>1</sub>. The AFM<sub>1</sub> concentration pattern in the milk of groups T1 and T2 is shown in Figure 1.

The presence of AFM<sub>1</sub> in the milk collected after AFB<sub>1</sub> exposure agreed with the results obtained in previous studies made by other authors, both in goats and in ewes exposed to a single dose of AFB<sub>1</sub> mixed with their feed (Battacone et al., 2003, 2012). In fact, its early appearance in the milk was due to the rapid absorption of the aflatoxins in the intestinal tract because it is possible to detect AFM<sub>1</sub> in blood

plasma at scarcely 5 min after exposure to AFB<sub>1</sub>, as was demonstrated by Gallo et al. (2008) in their study on cows. Although, it is possible that bovine mammary epithelial cells can metabolize AFB<sub>1</sub> into AFM<sub>1</sub> in a tiny percentage (Caruso et al., 2009), most of AFM<sub>1</sub> is derived from hepatocytes (Deng et al., 2018; Rushing and Selim, 2019). When AFM<sub>1</sub> reaches the mammary gland from blood circulation, it is able to excrete into milk via passive diffusion. However, the active transport mediated by efflux transporter of the ABC-family in the epithelial cells of mammary gland could probably be more important than passive diffusion (Min et al., 2021).

In Figure 1, it can be observed how AFM<sub>1</sub> reaches its maximum peak on d 3 and the excretion is stable until d 31, when the exposure ends. After exposure, no traces of AFM<sub>1</sub> are found at 78 h. Battacone et al. (2012) reported that AFM<sub>1</sub> can be found in goat milk 1 h after the AFB<sub>1</sub> administration. In their study, the average AFM<sub>1</sub> concentration in goat milk was higher at 3 and 6 h after a single AFB<sub>1</sub> dose. In our case, in the first 6 h the AFM<sub>1</sub> concentration was low, it could be explained because they used much higher doses than us. Although it is possible to detect AFM<sub>1</sub> before, it is generally detectable at 12 h after the ingestion of aflatoxins and no traces of it are found 72 h after the removal of aflatoxins from the diet (Mollayusefian et



**Table 1.** Effect of the intake of different doses of aflatoxin B<sub>1</sub> [AFB<sub>1</sub>; T1 = 120 µg/d, T2 = 60 µg/d, and CON (control) = 0 µg/d] on the concentration of aflatoxin M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) in the milk, and its carryover in Florida goats<sup>1</sup>

Parameter	Group			SEM	P-value <sup>2</sup>		
	CON	T1	T2		Treatment	Time	Interaction
AFB <sub>1</sub> (µg/d)	0	120	60	—	—	—	—
AFM <sub>1</sub> (µg/kg)	0 <sup>a</sup>	0.075 <sup>b</sup>	0.035 <sup>c</sup>	0.0036	<0.001	0.871	0.703
Carryover <sup>3</sup> (%)	0 <sup>a</sup>	0.066 <sup>b</sup>	0.060 <sup>b</sup>	0.0361	<0.001	0.696	0.596

<sup>a-c</sup>Means within a row with different superscripts significantly differ ( $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup>Data shown belong to steady-state period (d 3 to 31).

<sup>2</sup>Treatment = AFB<sub>1</sub> doses; Time = exposure time; Interaction = treatment × time interaction.

<sup>3</sup>Carryover = percentage of AFB<sub>1</sub> which turns into AFM<sub>1</sub> and is excreted in the milk.

al., 2021). Frobish et al. (1986), in dairy cows, reported that, at 24 h after exposure to AFB<sub>1</sub>, the mean AFM<sub>1</sub> concentrations were already near to being stationary. Also in cows, Diaz et al. (2004) observed similar dynamics given that the AFM<sub>1</sub> concentration was in a steady state after approximately 48 h. Both studies reached steady state before us. However, Masoero et al. (2007), who also observed that AFM<sub>1</sub> appeared quickly in milk, determined that the steady state was reached later, between d 7 and 12 after AFB<sub>1</sub> intake.

In the steady state, the mean concentrations of AFM<sub>1</sub> determined for groups T1 and T2 were of  $0.075 \pm 0.023$  µg/kg and  $0.035 \pm 0.012$  µg/kg, respectively (Table 1). Also, the minimum and maximum values were of 0.042–0.129 for group T1 and 0.018–0.062 for group T2. The results of the statistical analysis made with the mixed linear model showed the significant influence of the effect of the AFB<sub>1</sub> dose ingested ( $P < 0.01$ ) on the AFM<sub>1</sub> concentration in the milk, whereas no significant differences were found for the exposure time and the interaction between effects (Table 1). The post hoc analysis indicated that group T1, exposed to a higher dose of AFB<sub>1</sub>, excreted significantly more AFM<sub>1</sub> than group T2, that was exposed to a lower dose ( $P < 0.01$ ). Nevertheless, it is possible that an animal exposed to a lower AFB<sub>1</sub> concentration may excrete more AFM<sub>1</sub> than another one exposed to a higher concentration, in specific situations because the maximum AFM<sub>1</sub> concentration determined for group T2 established at 0.063 µg/kg was higher than the minimum concentration for T1, at 0.042 µg/kg.

Furthermore, whereas AFM<sub>1</sub> excretion is stable, we determined a positive linear relationship between the AFB<sub>1</sub> ingested and the AFM<sub>1</sub> concentration in milk. This type of relationship has already been described previously by other authors (Price et al., 1985; Battacone et al., 2003, 2005). This relationship can be expressed by the following equation:

$$\text{AFM}_1 (\mu\text{g/kg}) = 0.00063 \times \text{AFB}_1 (\mu\text{g/d});$$

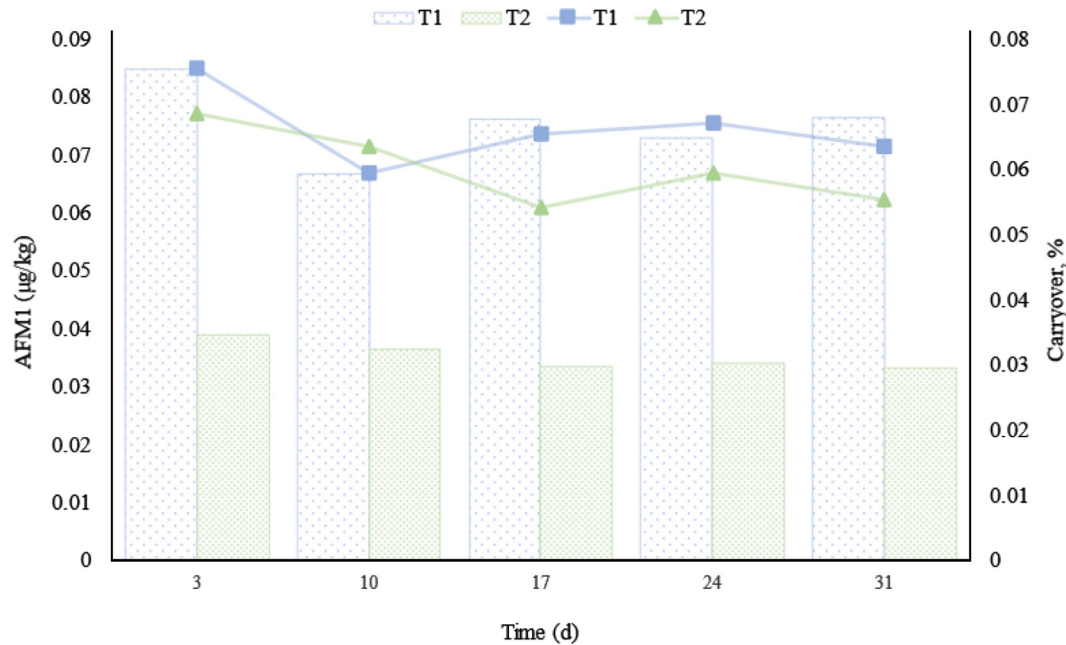
$$\text{SE} = 0.0148; R^2 = 0.81; P < 0.01.$$

For this equation, no significant values were found for the intersection ( $P = 0.75$ ).

The mean AFM<sub>1</sub> carryovers are shown in Table 1. These values were  $0.066 \pm 0.020\%$  and  $0.060 \pm 0.021\%$  for groups T1 and T2, respectively. It is also important to highlight that there was a certain variability between the animals in the carryover regardless of the group because the minimum percentage detected was established at 0.032% and the maximum was as high as 0.129%.

The same as happened with the AFM<sub>1</sub> concentration in the milk, the statistical analysis demonstrated that the AFB<sub>1</sub> dose had a significant effect, although there were no significant differences in the exposure time or in the interaction between effects. However, the post hoc analysis did not show any significant differences ( $P = 0.37$ ) in the carryover between groups T1 and T2 as it happened with AFM<sub>1</sub> concentration. In this case, both groups presented significant differences ( $P < 0.01$ ) with respect to the CON group. The dynamics of the carryover and the AFM<sub>1</sub> concentration throughout the study in groups T1 and T2 is shown in Figure 2.

The same as us, Veldman et al. (1992), in dairy cows, and Battacone et al. (2003) in ewes, determined that this variable is not significantly affected by the dose of AFB<sub>1</sub> ingested. However, it also has been described that the carryover of AFB<sub>1</sub> into AFM<sub>1</sub> decreased significantly as the AFB<sub>1</sub> intake increased (Battacone et al., 2009). Frobish et al. (1986) exposed high-producing cows to 492, 1,144, and 2,491 µg/d of AFB<sub>1</sub> and determined that the carryover decreased when the AFB<sub>1</sub> dose increased (2.33, 2.13, and 1.94%, respectively). Thus, we could suggest that at least in range of intake from 60 to 120 µg/d of AFB<sub>1</sub> in goats, the carryover is not affected by these doses. In our study, the exposure time was also not significant such as Battacone et al. (2003) reported. Nevertheless, the results of other studies are contradictory in this regard. Aazami et al.



**Figure 2.** Aflatoxin M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) concentration in milk (bars) and carryover (lines) in groups T1 (120 µg/d of aflatoxin B<sub>1</sub>) and T2 (60 µg/d of aflatoxin B<sub>1</sub>) during the steady state.

(2019), who exposed Saanen breed goats daily to 25 µg of AFB<sub>1</sub>/kg of feed, detected a decline in the AFM<sub>1</sub> carryover as their study progressed (from 0.29 to 0.22). On the contrary, Rao y Chopra (2001), who exposed goats to a dose of 100 µg of AFB<sub>1</sub> daily, notified a rising tendency in the AFM<sub>1</sub> carryover (from 0.14 to 0.39). Thereby, the carryover dynamics through the time does not seem to be clarify.

The carryovers obtained in this study were lower than those described by other authors in milking goats: 0.18 to 0.38% (Helferich et al., 1986), 0.22 to 0.29% (Aazami et al., 2019), 0.26% (Mazzette et al., 2009), and 0.17% (Battacone et al., 2012). These studies used different conditions, such as different breeds or lactating periods, so we suggest that, perhaps, these factors could explain this lower carryover. In cows, the carryover is much higher, which is placed at between 2% and 6.2% (Fink-Gremmels, 2008). In this regard, the presence of AFB<sub>1</sub> in the cows' urine and feces is also higher compared with that of small ruminants, which suggests that the latter had a higher ruminal microbiota detoxification activity (Loh et al., 2020). Indeed, Upadhaya et al. (2009) demonstrated in vitro that the ruminal fluid of native Korean goats was capable of degrading approximately 11% more AFB<sub>1</sub> than that of young Holstein steers. Due to such a low carryover, it can be seen how the administration of 120 µg of AFB<sub>1</sub> (i.e., a concentration that is 24 times the maximum limit permitted in complete

feed for dairy animals by the European Union, 5 µg/kg) triggers AFM<sub>1</sub> concentrations in milk that slightly exceed the maximum limit for this residue, established at 0.05 µg/kg.

### Feed Intake, Milk Yield, and Composition

The data referring to feed intake, milk yield, and milk composition during the exposure phase are shown in Table 2. The statistical analysis of the data did not reveal any significant differences between the various groups. Therefore, these parameters were not seen to be affected by the ingestion of these AFB<sub>1</sub> doses during the exposure period.

Regarding feed intake and milk yield, Sulzberger et al. (2017) reported in cows that 100 µg of AFB<sub>1</sub>/kg DMI did not affect these parameters. Similarly, Rodrigues et al. (2019) showed that feeding 105.5 µg/kg DMI of a aflatoxins mixture (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, and G<sub>2</sub>) did also not affect milk yield and feed intake. Kutz et al. (2009) did not detected changes in DMI and milk yield when 112 µg of AFB<sub>1</sub>/kg DMI was fed to dairy cows. In fact, cow and ewe milk production does not seem to be affected by AFB<sub>1</sub> consumption (Frobish et al., 1986; Battacone et al., 2005). Though chronic aflatoxicosis is associated with a reduction in performance parameters (Mostrom and Jacobsen, 2020), it is suggested that the dose range and the exposure time used were not enough to decrease these parameters.

**Table 2.** Effect of the ingestion of different doses of aflatoxin B<sub>1</sub> [AFB<sub>1</sub>; T1 = 120 µg/d, T2 = 60 µg/d, and CON (control) = 0 µg/d] on feed intake, milk yield, and composition of the milk of Florida goats<sup>1</sup>

Parameter	Group			SEM	P-value <sup>2</sup>		
	CON	T1	T2		Treatment	Time	Interaction
Feed intake (g)	1,118.933	1,102.900	1,115.167	11.604	0.374	0.071	0.068
Milk yield (mL)	1,032.183	1,056.617	1,031.527	14.664	0.160	0.194	0.126
Protein (%)	3.886	4.019	3.906	0.045	0.289	0.802	0.667
Fat (%)	4.867	4.928	4.771	0.053	0.532	0.278	0.260
Lactase (%)	4.813	4.825	4.875	0.028	0.638	0.421	0.532

<sup>1</sup>Data shown belong to exposure phase (d 1 to 31).

<sup>2</sup>Treatment = AFB<sub>1</sub> dose; Time = exposure time; Interaction = treatment × time interaction.

With respect to milk composition, Kourousekos et al. (2012) determined a negative relationship between the content in fat and the AFM<sub>1</sub> concentration. In their study on dairy goats, the animals receiving 100 µg/d AFB<sub>1</sub> presented the highest concentration of AFM<sub>1</sub> and the lowest fat content in their milk, in comparison with the group that received 50 µg/d AFB<sub>1</sub>. In our work, with a dose of AFB<sub>1</sub> and a very similar duration, we did not observe that negative relationship. In the same context, neither did Kourousekos et al. (2012) or Battacone et al. (2003) identify any significant differences attributable to AFB<sub>1</sub> intake in protein and lactose percentages.

### Biochemical Parameters

Table 3 compiles the medians and the percentiles (25th to 75th) of the serum parameters analyzed. The statistical analysis revealed the influence of the intake of AFB<sub>1</sub> on the enzyme GGT ( $P < 0.01$ ). In this respect, the activity of that enzyme was significantly higher in groups T1 and T2 than in group CON. In the rest of the parameters analyzed, no significant differences were found between groups.

The increase in the concentration and activity of the serum enzymes is a sign of liver damage. The liver enzymes most consistently described in cases of

**Table 3.** Effect of the ingestion of different aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) doses [T1 = 120 µg/d, T2 = 60 µg/d, and CON (control) = 0 µg/d] on the serum parameters of Florida breed goats<sup>1</sup>

Parameter <sup>2</sup>	Group			P-value
	CON	T1	T2	
Glucose (mg/dL)	58.00 (51.25–62.50)	51.00 (50.25–53.25)	57.50 (54.00–58.00)	0.20
Cholesterol (mg/dL)	102.50 (96.00–115.75)	97.00 (91.25–104.25)	89.50 (82.75–94.75)	0.10
Urea (mg/dL)	35.00 (31.33–39.95)	34.10 (29.95–38.85)	33.85 (30.20–37.05)	0.85
Creatinine (mg/dL)	0.59 (0.54–0.71)	0.58 (0.55–0.64)	0.60 (0.56–0.65)	0.93
Albumin (g/dL)	3.61 (3.32–3.87)	3.39 (0.21–3.65)	3.65 (3.42–3.85)	0.82
Total proteins (g/dL)	7.30 (7.00–7.38)	7.25 (6.80–7.55)	6.65 (6.53–7.00)	0.32
Globulins (g/dL)	3.62 (3.05–4.03)	3.57 (3.23–3.90)	3.12 (2.85–3.47)	0.45
Bilirubin (mg/dL)	0.26 (0.20–0.27)	0.24 (0.21–0.26)	0.22 (0.20–0.26)	0.93
ALP (U/L)	129.50 (116.00–144.50)	101.00 (93.00–114.25)	132.00 (110.25–149.25)	0.39
AST (U/L)	53.00 (49.13–60.03)	47.75 (43.05–52.45)	48.25 (47.23–56.40)	0.48
GGT (U/L)	36.00 (32.00–40.75)	58.00 (54.50–60.75)	50.00 (43.75–52.50)	<0.01
Cholinesterase (U/L)	118.50 (95.25–148.50)	85.50 (78.50–102.25)	94.50 (85.50–116.25)	0.33

<sup>1</sup>Mean values and 25th to 75th percentiles in parentheses.

<sup>2</sup>ALP = alkaline phosphatase; AST = aspartate aminotransferase; GGT = gamma-glutamyl transferase.

aflatoxicosis are: GGT, aminotransferase aspartate, alkaline phosphatase (in nonruminants), and succinate dehydrogenase (Coppock et al., 2018). In our study the enzyme GGT increased significantly in groups T1 and T2, with respect to the CON group. However, this increase barely exceeds the reference values for this enzyme in goats (20–56 U/L; Kaneko et al., 2008).

## CONCLUSIONS

The AFM<sub>1</sub> concentration found in Florida goats' milk followed a linear relationship with the AFB<sub>1</sub> ingested; however, the AFM<sub>1</sub> carryover was not affected by the administration of different AFB<sub>1</sub> doses, that carryover being lower than the one described previously by other authors in this species. Therefore, to exceed the maximum limit of AFM<sub>1</sub> in milk established by the EU, the goats would have to ingest much higher concentrations of AFB<sub>1</sub> than the maximum limit permitted, in complete feed for dairy animals. In the same context, the daily administration of AFB<sub>1</sub> during 31 d at concentrations of 60 and 120 µg, did not significantly affect either the feed intake, or the milk yield, or the milk composition or biochemical parameters of the animals exposed, which would indicate a certain resistance on the part of the goat to the possible effects of that aflatoxin.

## ACKNOWLEDGMENTS

This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors. The authors have not stated any conflicts of interest.

## REFERENCES

- Aazami, M. H., M. H. Fathi Nasri, M. Mojtahedi, and G. Battacone. 2019. Effect of yeast cell wall and (1→3)-β-D-glucan on transfer of aflatoxin from feed to milk in Saanen dairy goats. *Anim. Feed Sci. Technol.* 254:114191. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.05.014>.
- Barbiroli, A., F. Bonomi, S. Benedetti, S. Mannino, L. Monti, T. Cattaneo, and S. Iametti. 2007. Binding of aflatoxin M<sub>1</sub> to different protein fractions in ovine and caprine milk. *J. Dairy Sci.* 90:532–540. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)71536-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71536-9).
- Battacone, G., A. Nudda, A. Cannas, A. C. Borlino, G. Bomboi, and G. Pulina. 2003. Excretion of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk of dairy ewes treated with different doses of aflatoxin B<sub>1</sub>. *J. Dairy Sci.* 86:2667–2675. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73862-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73862-4).
- Battacone, G., A. Nudda, M. Palomba, A. Mazzette, and G. Pulina. 2009. The transfer of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk of ewes fed diet naturally contaminated by aflatoxins and effect of inclusion of dried yeast culture in the diet. *J. Dairy Sci.* 92:4997–5004. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1684>.
- Battacone, G., A. Nudda, M. Palomba, M. Pascale, P. Nicolussi, and G. Pulina. 2005. Transfer of aflatoxin B<sub>1</sub> from feed to milk and from milk to curd and whey in dairy sheep fed artificially contaminated concentrates. *J. Dairy Sci.* 88:3063–3069. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72987-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72987-8).
- Battacone, G., A. Nudda, S. P. G. Rassa, M. Decandia, and G. Pulina. 2012. Excretion pattern of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk of goats fed a single dose of aflatoxin B<sub>1</sub>. *J. Dairy Sci.* 95:2656–2661. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-5003>.
- Battiliani, P., V. Rossi, P. Giorni, A. Pietri, A. Gualla, H. J. van der Fels-Klerx, C. J. H. Booij, A. Moretti, A. Logrieco, F. Miglietta, P. Toscano, M. Miraglia, B. De Santis, and C. Brera. 2012. Modeling, predicting, and mapping the emergence of aflatoxins in cereals in the EU due to climate change. *EFSA J.* 9:223E. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2012.EN-223>.
- Battiliani, P., P. Toscano, H. J. Van der Fels-Klerx, A. Moretti, M. Camardo Leggeri, C. Brera, A. Rortais, T. Goumperis, and T. Robinson. 2016. Aflatoxin B<sub>1</sub> contamination in maize in Europe increases due to climate change. *Sci. Rep.* 6:24328. <https://doi.org/10.1038/srep24328>.
- Becker-Algeri, T. A., D. Castagnaro, K. Bortoli, C. Souza, D. A. Drunkler, and E. Badiale-Furlong. 2016. Mycotoxins in bovine milk and dairy products: A review. *J. Food Sci.* 81:R544–R552. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13204>.
- Caruso, M., A. Mariotti, C. Zizzadoro, A. Zaghini, P. Ormas, A. Altafini, and C. Belloli. 2009. A clonal cell line (BME-UV1) as a possible model to study bovine mammary epithelial metabolism: Metabolism and cytotoxicity of aflatoxin B<sub>1</sub>. *Toxicol.* 53:400–408. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2008.12.023>.
- Coppock, R. W., R. G. Christian, and B. J. Jacobsen. 2018. Chapter 69 - Aflatoxins. Pages 983–994 in *Veterinary Toxicology*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811410-0.00069-6>.
- Creppy, E. E. 2002. Update of survey, regulation, and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol. Lett.* 127:19–28. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(01\)00479-9](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(01)00479-9).
- Deng, J., L. Zhao, N.-Y. Zhang, N. A. Karrow, C. S. Krumm, D.-S. Qi, and L.-H. Sun. 2018. Aflatoxin B<sub>1</sub> metabolism: Regulation by phase I and II metabolizing enzymes and chemoprotective agents. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 778:79–89. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2018.10.002>.
- Diaz, D. E., W. M. Hagler Jr., J. T. Blackwelder, J. A. Eve, B. A. Hopkins, K. L. Anderson, F. T. Jones, and L. W. Whitlow. 2004. Aflatoxin binders II: Reduction of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed. *Mycopathologia* 157:233–241. <https://doi.org/10.1023/B:MYCO.0000020587.93872.59>.
- European Commission. 2010. Commission REGULATION 2010/165/EC of 26 February 2010 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. *Off. J. Eur. Commun. L.* 50:8–12.
- European Commission. 2011. Commission Regulation 574/2011 of 16 June 2011 amending Annex I to Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council as regards maximum levels for nitrite, melamine, Ambrosia spp. and carry-over of certain coccidiostats and histomonostats and consolidating Annexes I and II thereto. *Off. J. Eur. Commun. L.* 159:7–24.
- European Parliament. 2010. Directive 2010/63/EU of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *OJEU. L.* 276: 33–79.
- FAOSTAT. 2022. FAOSTAT Online Database. Accessed Aug. 2, 2022. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/FBS>.
- Fink-Gremmels, J. 2008. Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: A review. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 25:172–180. <https://doi.org/10.1080/02652030701823142>.
- Frazzoli, C., P. Gherardi, N. Saxena, G. Belluzzi, and A. Mantovani. 2017. The hotspot for (global) one health in primary food production: Aflatoxin M<sub>1</sub> in dairy products. *Front. Public Health* 4:294. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2016.00294>.
- Frobish, R. A., B. D. Bradley, D. D. Wagner, P. E. Long-Bradley, and H. Hairston. 1986. Aflatoxin residues in milk of dairy cows after ingestion of naturally contaminated grain. *J. Food Prot.* 49:781–785. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-49.781>.
- Gallo, A., G. Giuberti, J. Frisvad, T. Bertuzzi, and K. Nielsen. 2015. Review on mycotoxin issues in ruminants: occurrence in forages, effects of mycotoxin ingestion on health status and animal per-

- formance and practical strategies to counteract their negative effects. *Toxins (Basel)* 7:3057–3111. <https://doi.org/10.3390/toxins7083057>.
- Gallo, A., M. Moschini, and F. Masoero. 2008. Aflatoxins absorption in the gastro-intestinal tract and in the vaginal mucosa in lactating dairy cows. *Ital. J. Anim. Sci.* 7:53–63. <https://doi.org/10.4081/ijas.2008.53>.
- Helferich, W. G., R. L. Baldwin, and D. P. H. Hsieh. 1986. [<sup>14</sup>C]-Aflatoxin B<sub>1</sub> metabolism in lactating goats and rats. *J. Anim. Sci.* 62:697–705. <https://doi.org/10.2527/jas1986.623697x>.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). 2012. Chemical Agents and Related Occupations. A review of Human Carcinogens. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk to Humans. Vol. 100 F. International Agency for Research on Cancer.
- Kaneko, J. J., J. W. Harvey, and M. L. Bruss. 2008. Appendixes. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals* 873–904. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370491-7.00033-7>.
- Kourousekos, G. D., E. Theodosiadou, S. Belibasaki, K. Deligiannis, T. Koukoulas, K. Zouflos, and A. G. Lymberopoulos. 2012. Effects of aflatoxin B<sub>1</sub> administration on Greek indigenous goats' milk. *Int. Dairy J.* 24:123–129. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.11.006>.
- Kumar, P., D. K. Mahato, M. Kamle, T. K. Mohanta, and S. G. Kang. 2017. Aflatoxins: A global concern for food safety, human health, and their management. *Front. Microbiol.* 7:2170. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02170>.
- Kutz, R. E., J. D. Sampson, L. B. Pompeu, D. R. Ledoux, J. N. Spain, M. Vázquez-Anón, and G. E. Rottinghaus. 2009. Efficacy of Solis, NovasilPlus, and MTB-100 to reduce aflatoxin M<sub>1</sub> levels in milk of early to mid lactation dairy cows fed aflatoxin B<sub>1</sub>. *J. Dairy Sci.* 92:3959–3963. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2031>.
- Loh, Z. H., D. Ouwerkerk, A. V. Klieve, N. L. Hungerford, and M. T. Fletcher. 2020. Toxin degradation by rumen microorganisms: A review. *Toxins (Basel)* 12:664. <https://doi.org/10.3390/toxins12100664>.
- Masoero, F., A. Gallo, M. Moschini, G. Piva, and D. Diaz. 2007. Carryover of aflatoxin from feed to milk in dairy cows with low or high somatic cell counts. *Animal* 1:1344–1350. <https://doi.org/10.1017/S1751731107000663>.
- Mazzette, A., M. Decandia, M. Acciaro, A. Fenu, A. H. Dias Francesconi, and G. Battacone. 2009. Excretion of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk of goats fed diet contaminated by aflatoxin B<sub>1</sub>. *Ital. J. Anim. Sci.* 8(sup2):631–633. <https://doi.org/10.4081/ijas.2009.s2.631>.
- Min, L., J. Fink-Gremmels, D. Li, X. Tong, J. Tang, X. Nan, Z. Yu, W. Chen, and G. Wang. 2021. An overview of aflatoxin B<sub>1</sub> biotransformation and aflatoxin M<sub>1</sub> secretion in lactating dairy cows. *Anim. Nutr.* 7:42–48. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2020.11.002>.
- Mollayusefian, I., V. Ranaei, Z. Pilevar, M. M. S. Cabral-Pinto, A. Rostami, A. Nematollahi, K. M. Khedher, V. N. Thai, Y. Fakhri, and A. Mousavi Khaneghah. 2021. The concentration of aflatoxin M<sub>1</sub> in raw and pasteurized milk: A worldwide systematic review and meta-analysis. *Trends Food Sci. Technol.* 115:22–30. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.06.033>.
- Mostrom, M. S., and B. J. Jacobsen. 2020. Ruminant mycotoxicosis: An update. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 36:745–774. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2020.08.011>.
- Pallarés, N., H. Berrada, J. Tolosa, and E. Ferrer. 2021. Effect of high hydrostatic pressure (HPP) and pulsed electric field (PEF) technologies on reduction of aflatoxins in fruit juices. *Lebensm. Wiss. Technol.* 142:111000. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111000>.
- Price, R. L., J. H. Paulson, O. G. Lough, C. Gingg, and A. G. Kurtz. 1985. Aflatoxin conversion by dairy cattle consuming naturally-contaminated whole cottonseed. *J. Food Prot.* 48:11–15. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-48.1.11>.
- Rao, S. B. N., and R. C. Chopra. 2001. Influence of sodium bentonite and activated charcoal on aflatoxin M<sub>1</sub> excretion in milk of goats. *Small Rumin. Res.* 41:203–213. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(01\)00216-4](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(01)00216-4).
- Rodrigues, R. O., R. O. Rodrigues, D. R. Ledoux, G. E. Rottinghaus, R. Borutova, O. Averkieva, and T. B. McFadden. 2019. Feed additives containing sequestrant clay minerals and inactivated yeast reduce aflatoxin excretion in milk of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 102:6614–6623. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-16151>.
- Rushing, B. R., and M. I. Selim. 2019. Aflatoxin B<sub>1</sub>: A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods. *Food Chem. Toxicol.* 124:81–100. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.11.047>.
- Saha Turna, N., and F. Wu. 2021. Aflatoxin M<sub>1</sub> in milk: A global occurrence, intake, & exposure assessment. *Trends Food Sci. Technol.* 110:183–192. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.093>.
- Sharafi, K., B. K. Matin, A. K. Omer, B. Mansouri, H. Soleimani, N. Fattahi, H. Sharafi, and A. Kiani. 2022. A worldwide systematic literature review for aflatoxin M<sub>1</sub> in infant formula milk: Human health risk assessment by Monte Carlo simulation. *Food Control* 134:108681. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108681>.
- Silanikove, N., G. Leitner, U. Merin, and C. G. Prosser. 2010. Recent advances in exploiting goat's milk: Quality, safety, and production aspects. *Small Rumin. Res.* 89:110–124. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.12.033>.
- Strosnider, H., E. Azziz-Baumgartner, M. Banziger, R. V. Bhat, R. Breiman, M.-N. Brune, K. DeCock, A. Dilley, J. Groopman, K. Hell, S. H. Henry, D. Jeffers, C. Jolly, P. Jolly, G. N. Kibata, L. Lewis, X. Liu, G. Luber, L. McCoy, P. Mensah, M. Miraglia, A. Misore, H. Njapau, C.-N. Ong, M. T. K. Onsongo, S. W. Page, D. Park, M. Patel, T. Phillips, M. Pineiro, J. Pronczuk, H. S. Rogers, C. Rubin, M. Sabino, A. Schaafsma, G. Shephard, J. Stroka, C. Wild, J. T. Williams, and D. Wilson. 2006. Workgroup report: Public health strategies for reducing aflatoxin exposure in developing countries. *Environ. Health Perspect.* 114:1898–1903. <https://doi.org/10.1289/ehp.9302>.
- Sulzberger, S. A., S. Melnichenko, and F. C. Cardoso. 2017. Effects of clay after an aflatoxin challenge on aflatoxin clearance, milk production, and metabolism of Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 100:1856–1869. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11612>.
- Tarazona, A., J. V. Gómez, F. Mateo, M. Jiménez, D. Romera, and E. M. Mateo. 2020. Study on mycotoxin contamination of maize kernels in Spain. *Food Control* 118:107370. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107370>.
- Upadhaya, S. D., H. G. Sung, C. H. Lee, S. Y. Lee, S. W. Kim, K. J. Cho, and J. K. Ha. 2009. Comparative study on the aflatoxin B<sub>1</sub> degradation ability of rumen fluid from Holstein steers and Korean native goats. *J. Vet. Sci.* 10:29–34. <https://doi.org/10.4142/jvs.2009.10.1.29>.
- US FDA (Food and Drug Administration). 2005. CPG Sec. 527.400 Whole milk, lowfat milk, skim milk - Aflatoxin M<sub>1</sub>. Accessed Aug. 1, 2022. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/cpg-sec-527400-whole-milk-lowfat-milk-skim-milk-aflatoxin-m1>.
- Veldman, A., J. A. C. Meijjs, G. J. Borggreve, and J. J. Heeres-van der Tol. 1992. Carry-over of aflatoxin from cows' food to milk. *Anim. Sci.* 55:163–168. <https://doi.org/10.1017/S0003356100037417>.

## ORCID

- Rafael Mora-Medina  <https://orcid.org/0000-0001-6525-3381>  
 Antonio Jesús Lora-Benítez  <https://orcid.org/0000-0001-7098-8606>  
 Ana María Molina-López  <https://orcid.org/0000-0002-2645-7303>  
 Nahúm Ayala-Soldado  <https://orcid.org/0000-0003-4534-7545>  
 Rosario Moyano-Salvago  <https://orcid.org/0000-0003-4705-0307>