



Aflatoxins, Deoxynivalenol and Zearelenone in maize straw harvested in Tepatitlan, Jalisco state, Mexico

Aflatoxinas, Deoxinivalenol y Zearalenona en rastrojo de maíz cosechado en Tepatitlán, Jalisco, México

Reyes, W.¹, Patricio, S.¹, Pereyra, C.², González, M.L.², Cavaglieri, L.², Dalcerro, A.².

¹Universidad de Guadalajara, Departamento de Salud Pública, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Km 15.5 Carretera a Nogales, Predio Las Agujas, Nextipac, Zapopan. Jalisco, México.

²Universidad Nacional de Río Cuarto, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Exactas, Córdoba, Argentina.

ABSTRACT

There are few reports on the contamination of total aflatoxins (AFs), AFB₁, deoxynivalenol (DON) and zearelenone (ZEA) in maize straw harvested in Mexico; hence, the aim of this study was to determine the concentration of such mycotoxins by immunoassay analytical technique (ELISA) and High-performance liquid chromatography (HPLC) in straw coming from 17 genotypes of white and yellow maize cultivated during 2009 in the municipality of Tepatitlan, Jalisco. Results showed a high percentage of occurrence of total aflatoxins by ELISA (88.2 %) and AFB₁ by HPLC (84 %) with average levels of $7.0 \pm 3.29 \mu\text{g Kg}^{-1}$ and $3.68 \pm 2.91 \mu\text{g Kg}^{-1}$ respectively; DON determination by ELISA method presented 100 % of positive samples, average concentration was $6.04 \pm 3.49 \text{ mg Kg}^{-1}$; regarding the determination of ZEA by ELISA, 98.5 % of positive samples was observed with average levels of $1164.6 \pm 1046.7 \mu\text{g Kg}^{-1}$ and by HPLC 81 % presented average levels of $544.6 \pm 1035 \mu\text{g Kg}^{-1}$, no statistical difference was observed among straw of the different genotypes of maize ($p > 0.05$) in any of the analyzed mycotoxins. It is important to mention that none of the samples exceeded the highest level recommended by the Mexican legislation for aflatoxins in feed for animals ($20 \mu\text{g Kg}^{-1}$), however,

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: June 24th 2015.

Accepted/Aceptado: August 1st 2015.

RESUMEN

Existen pocos reportes sobre la contaminación de aflatoxinas totales (AFs), AFB₁, deoxinivalenol (DON) y zearalenona (ZEA) en rastrojos de maíz cosechados en México, por lo que el objetivo del estudio fue determinar la concentración de dichas micotoxinas mediante las técnicas analíticas de inmunoensayo (ELISA) y cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) en rastrojos procedentes de 17 genotipos de maíz blanco y amarillo cultivados durante 2009 en el municipio de Tepatitlán, Jalisco. Los resultados mostraron alto porcentaje de ocurrencia de aflatoxinas totales por ELISA (88.2 %) y AFB₁ mediante HPLC (84 %) con niveles promedio de $7.0 \pm 3.29 \mu\text{g Kg}^{-1}$ y $3.68 \pm 2.91 \mu\text{g Kg}^{-1}$ respectivamente; la determinación de DON mediante la técnica de ELISA presentó 100 % de muestras positivas, la concentración promedio fue $6.04 \pm 3.49 \text{ mg Kg}^{-1}$; respecto a la determinación de ZEA por ELISA se observó 98.5 % de muestras positivas, con niveles promedio de $1164.6 \pm 1046.7 \mu\text{g Kg}^{-1}$ y por HPLC 81 % presentaron niveles promedio de $544.6 \pm 1035 \mu\text{g Kg}^{-1}$, no se observó diferencia estadística entre rastrojos de los diferentes genotipos de maíz ($p > 0.05$) en ninguna de las micotoxinas analizadas. Destaca mencionar que ninguna de las muestras superaron el nivel máximo recomendado por la legislación mexicana para aflatoxinas en alimentos de animales ($20 \mu\text{g Kg}^{-1}$), sin embargo, 23.5 % (16/68) de las muestras determinadas por HPLC superaron el límite permitido para AFB₁ por la Comunidad Europea ($5 \mu\text{g Kg}^{-1}$); 4.4 % (3/68) superaron los niveles recomendados para DON (12 mg Kg^{-1}); mientras que ZEA mostró 11.8 % (8/68) de muestras detectadas por ELISA y 10.3 % (7/68) por HPLC con niveles que superan los recomendados por la Comisión Europea ($2000 \mu\text{g Kg}^{-1}$), en México no existe regulación para estas micotoxinas.

*Corresponding Author:

Reyes Velázquez Waldina Patricia, Universidad de Guadalajara, Departamento de Salud Pública, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Km 15.5 Carretera a Nogales, Predio Las Agujas, Nextipac, Zapopan. Jalisco, México. Phone: +52(33) 3682 0574 E-mail: waldinareyes2@gmail.com

23.5 % (16/68) of the determined samples by HPLC surpassed the limit allowed for AFB₁ by the European Community (5 µg Kg⁻¹); 4.4 % (3/68) surpassed the levels allowed by DON (12 mg Kg⁻¹); while ZEA showed 11.8 % (8/68) of samples detected for ELISA and 10.3 % (7/68) by HPLC with levels that exceed those recommended by the European Commission (2000 µg Kg⁻¹), there is no regulation in Mexico for these mycotoxins.

KEY WORDS

Maize straw; aflatoxins; deoxynivalenol; zearalenone; ELISA; HPLC.

Introduction

Mycotoxins are secondary metabolites produced by filamentous fungi that exercise adverse effects on the health of humans and animals. It has been documented that ruminants are less susceptible to mycotoxins; however, some metabolites formed from the original toxin in the rumen can be more toxic (Veldman *et al.*, 1992). Susceptibility is increased by the feeds that are generally contaminated by mycotoxins and the stress generated by the technical exploitation system. Mycotoxins of higher impact are aflatoxins (AFs), tricothecenes (DON and toxin T-2) and zearalenone (ZEA); however, ocratoxin A, fumonisins (FBs), toxin PR, roquefortina A and patuline could also be present (Jouany and Diaz, 2008).

Cereals as corn and subproducts aimed to animal consumption with AFs, mainly produced by *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* and *A. nomius* (Creppy, 2002). The main AFs are aflatoxin B₁ (AFB₁), AFB₂, AFG₁, AFG₂, AFM₁ and AFM₂, being AFB₁ the one found in higher proportion and the one attributed with clinical effects (Klich *et al.*, 2000); toxic doses in bovines are related with levels of 300-700 µg Kg⁻¹, causing a decrease in feed consumption and weight gain and immunosuppression (Garret *et al.*, 1968). Deoxynivalenol (DON) is one of the toxins produced by *Fusarium graminearum*, the ability of the microflora of the rumen to perform detoxification allows to transform the metabolite of de-epoxi-DON (Rotter *et al.*, 1996) and reduce toxicity; however, high levels of DON in the diet affect such efficiency. DON is responsible of feed rejection in ruminant animals reducing nutrient absorption, delay in growth and immunosuppression effect (Rotter *et al.*, 1996). Zearalenone (ZEA) is a fusariotoxin considered a non-steroidal estrogen, mainly produced by *Fusarium graminearum* and

PALABRAS CLAVE

Rastrojo de maíz; aflatoxinas; deoxinivalenol; zearalenona; ELISA; HPLC.

Introducción

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos filamentosos que ejercen efectos adversos sobre la salud de humanos y animales. Se ha documentado que los rumiantes son menos susceptibles a las micotoxinas; sin embargo, algunos metabolitos formados en el rumen a partir de la toxina original pueden ser más tóxicos (Veldman *et al.*, 1992). La susceptibilidad se incrementa por los piensos que están generalmente contaminados por micotoxinas así como por el estrés generado por el sistema de explotación tecnificado. Las micotoxinas de mayor impacto son aflatoxinas (AFs), tricothecenos (DON y toxina T-2) y zearalenona (ZEA), sin embargo, la ocratoxina A, fumonisinas (FBs), toxina PR, roquefortina A y patulina también podrían estar presentes (Jouany y Díaz, 2008).

Cereales como el maíz y los subproductos destinados al consumo animal son considerados de alto riesgo por la contaminación con AFs, producidas principalmente por *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius* (Creppy, 2002). Las principales AFs son aflatoxina B₁ (AFB₁), AFB₂, AFG₁, AFG₂, AFM₁ y AFM₂, siendo AFB₁ la que se encuentra en mayor proporción y a la que se atribuyen los efectos clínicos (Klich *et al.*, 2000), la dosis tóxica en bovinos se relaciona con niveles de 300-700 µg Kg⁻¹, ocasionando disminución en consumo de alimento y ganancia de peso e inmunosupresión (Garret *et al.*, 1968). Deoxinivalenol (DON) es una de las toxinas producidas por *Fusarium graminearum*, la habilidad de la microflora del rumen para detoxificar permite transformar el metabolito de-epoxi-DON (Rotter *et al.*, 1996) y reducir la toxicidad, sin embargo altos niveles de DON en la dieta afectan dicha eficiencia. DON es responsable de rechazo del alimento en animales rumiantes reduciendo la absorción de nutrientes, retraso en crecimiento y efectos de inmunosupresión (Rotter *et al.*, 1996). Zearalenona (ZEA) es una fusariotoxina considerada un estrógeno no esteroideo, producida principalmente por *Fusarium graminearum* y *F. culmorum*, esta micotoxina genera disrupción endocrina y es un sustituto de enzimas, lo que ocasiona síntesis e inactivación de hormonas, sus principales metabolitos son α zearalenol y β zearalenol con actividad estrogénica en receptores del útero y glándulas mamarias de animales reproductores (Zinedine *et al.*, 2007).

F. culmorum, this mycotoxin generates endocrine disruption and is an enzyme substitute, which causes synthesis and hormone inactivation, their main metabolites are α zearelenone and β zearelenone with estrogenic activity in uterus receptors and mammary glands of reproductive animals (Zinedine *et al.*, 2007).

AFB₁ exposition in animals intended for dairy production represents a risk to public health since metabolites can be eliminated in milk. Conversion rate of AFB₁ to AFM₁ from feed to milk is 1 to 6 % (Veldman *et al.*, 1992; EFSA, 2004a), both metabolites are considered carcinogenic agents type 1 for humans (IARC, 2002). The European Union establishes as maximum allowed limit of AFB₁ in feed for lactating animals 5 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ (EFSA, 2004a) and 0.05 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ of AFM₁ in raw milk, thermic treated milk and milk for the fabrication of dairy products, while the consumption for lactating children is 0.025 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ (UE, 165/2010). Mexican law considers as maximum allowed levels of AFs in feed of bovines and other lactating species 20 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ (SS, 2009) and 0.5 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ of AFM₁ in raw milk (SS, 2010).

There are few reports published on the elimination of DON and ZEA in milk; however, investigations indicate limited risk of exposition since they appear 100 times in less proportion to AFM₁ in milk (Spahr *et al.*, 1999), the European Union recommends that feed intended for consumption of dairy cattle should not exceed concentrations of 12 mg Kg⁻¹ for DON and 2000 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ for ZEA (EC, 576/2006).

The diets of cows that are high milk producers are mainly constituted by concentrates and foliage in a proportion of 50-70 %, which are produced and processed usually in dairy farms. Foliage include green, dry (straw, hay and stubble) or silages, while concentrates are elaborated with different ingredients that contribute high levels of protein and energy. Nowadays, there are a number of reports on the occurrence of mycotoxins in the ingredients of the concentrates (Placinta *et al.*, 1999); however, information is scarce in foliages, therefore the aim of this study was to evaluate the contamination by AFs, DON and ZEA in maize straw produced in a locality in the State of Jalisco, region where the main livestock exportations in the state are concentrated.

Materials and Methods

At the end of the crop cycle spring-summer 2009 (October 15 to 22), 68 samples of maize straw from

La exposición a AFB₁ en animales destinados a la producción lechera representa un riesgo a la salud pública ya que los metabolitos pueden ser eliminados en la leche. La tasa de conversión de AFB₁ a AFM₁ del alimento a la leche es de 1 a 6 % (Veldman *et al.*, 1992; EFSA, 2004a), ambos metabolitos son considerados agentes carcinogénicos de tipo 1 para humanos (IARC, 2002). La Unión Europea establece como límite máximo permitido de AFB₁ en alimentos para animales lactantes 5 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ (EFSA, 2004a) y 0.05 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ de AFM₁ en la leche cruda, leche tratado térmicamente y leche para la fabricación de productos lácteos, mientras que para consumo de niños lactantes es 0.025 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ (UE, 165/2010). La legislación en México considera como niveles máximos permitidos de AFs en el alimento de bovinos u otras especies lactantes 20 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ (SS, 2009) y 0.5 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ de AFM₁ en leche cruda (SS, 2010).

Existen pocos reportes publicados de la eliminación de DON y ZEA en la leche, sin embargo, las investigaciones indican limitado el riesgo de exposición ya que aparecen en la leche en una proporción 100 veces menor a la AFM₁ (Spahr *et al.*, 1999), la Unión Europea recomienda que alimentos destinados al consumo del ganado lechero no superen concentraciones de 12 mg Kg⁻¹ para DON y de 2000 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ para ZEA (EC, 576/2006).

Las dietas de vacas altas productoras de leche se constituyen principalmente de concentrados y forrajes en una proporción de 50-75 %, los cuales son producidos y procesados usualmente en los establos lecheros. Los forrajes se incluyen verdes, secos (pajas, henos y rastrojos) o ensilados, mientras que los concentrados se elaboran con diferentes ingredientes que aportan altos niveles de proteína y energía. Actualmente existen numerosos reportes de la ocurrencia de micotoxinas en los ingredientes de los concentrados (Placinta *et al.*, 1999), sin embargo en forrajes la información es escasa, por lo que el objetivo del presente estudio fue evaluar la contaminación por AFs, DON y ZEA en el rastrojo de maíz producido en una localidad del estado de Jalisco, región donde se concentran las principales explotaciones pecuarias del estado.

Materiales y Métodos

Al término del ciclo de cultivo primavera-verano 2009 (15 al 22 de octubre), fueron obtenidas aleatoriamente 68 muestras de rastrojo de maíz de planta completa, el muestreo se realizó en las parcelas experimentales del

complete plant were obtained randomly; the sampling was made in the experimental parcels of the Centro Universitario de los Altos de la Universidad de Guadalajara (CuAltos) located in the municipality of Tepatitlan, Jalisco. Samples of straw corresponded to 17 genetic materials of corn (4 repetitions of each genotype) grown under a random design of blocks. Studied genotypes corresponded to 4 white maize hybrids of late vegetative cycle (H-318, H-319, H-321, H-358); 7 varieties of yellow maize of free pollination: 6 of early vegetative cycle (1058, 1060, 1065, 1068R, 1069, 1075) and 1 of intermediate early cycle (1071); and 6 improved experimental varieties (CH1x1058, ExpS1xZac, ExpS1xAJ, CrAMA-ZAM, Comp-GUAY and 1463 AMA). Samples were harvested once the physiological maturity of the maize was reached and they were drained in stove at 60 °C during 48 hours; they were after ground in a blade mill at a size of 1 mm diameter of particle (Thomas Arthur H. Co. brand). Samples were conserved at room temperature in polyethylene bottles until their processing. Analytical determinations for AFs, ZEA and DON were performed by ELISA (AgraQuant assay, Romer Labs), while AFB₁ and ZEA were analyzed by HPLC. All samples were analyzed in duplicate.

Determination of Aflatoxins

HPLC Technique for AFB₁: the methodology proposed by Trucksess *et al.*, (1994) for complex matrices was used; performing validation of AFB₁ (Sigma Aldrich Chemical Co. St Louis, Mo) at concentrations of 0.01 ng g⁻¹ and 0.03 ng g⁻¹, obtaining 85 % of recuperation and a variation coefficient of 15 %. Extraction consisted in homogenizing 25 g of sample with 100 mL of acetonitrile:water (84:16 v/v) by constant agitation during 30 min. After, 8 mL of the filtered extract were passed by the column Mycosep 228, 4 mL were evaporated by nitrogen and the dry extract was redissolved with 400 µL of mobile phase. 200 µL of the extract with 700 µL of trifluoroacetic acid/ glacial acetic acid/water (20: 10: 70) were derivatized during 8.5 min at 65 °C in bain-marie. 100 µL of derivatized solution were injected to a column of reverse phase (C18, 250 mm x 4.6 mm, 5 µm. Beckman Coulter, Ultrasphere), connected to a pre-column (C18, 20 mm x 4.6 mm, 5 µm, Phenomenex). The mobile phase consisted of water: acetonitrile:methanol (4:1:1) at a flux of 1.5 mL/min. The lengths of excitation and emission were 360 nm and 440 nm, respectively. AFB₁ detection limit: 3 µg Kg⁻¹. Quantification limit: 5 µg Kg⁻¹. The system consisted of a chromatographer AGILENT 1100 equipped with a bomb (Palo Alto, CA, USA) and a programmable fluorescence detector, connected to a working station AGILENT (ChemStation Rev.a 10.01).

Centro Universitario de los Altos de la Universidad de Guadalajara (CuAltos) ubicadas en el municipio de Tepatitlan, Jalisco. Las muestras de rastrojo correspondieron a 17 materiales genéticos de maíz (4 repeticiones de cada genotipo) sembrados bajo un diseño de bloques al azar. Los genotipos estudiados correspondieron a 4 híbridos de maíz blanco de ciclo vegetativo tardío (H-318, H-319, H-321, H-358); 7 variedades de maíz amarillo de polinización libre: 6 de ciclo vegetativo precoz (1058, 1060, 1065, 1068R, 1069, 1075) y 1 de ciclo intermedio precoz (1071); y 6 variedades experimentales mejoradas (CH1x1058, ExpS1xZac, ExpS1xAJ, CrAMA-ZAM, Comp-GUAY y 1463 AMA). Las muestras fueron cosechadas una vez alcanzada la madurez fisiológica del maíz y se desecaron en estufa a temperatura de 60 °C durante 48 horas, posteriormente se molieron en molino de cuchillas a un tamaño de partícula de 1 mm de diámetro (Marca Thomas Arthur H. Co.). Las muestras se conservaron a temperatura ambiente en frascos de polietileno hasta su procesamiento. Las determinaciones analíticas para AFs, ZEA y DON se realizaron mediante ELISA (AgraQuant Assay, Romer Labs), mientras que por HPLC se determinó la concentración de AFB₁ y ZEA. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado.

Determinación de Aflatoxinas

Técnica de HPLC para AFB₁: se utilizó la metodología propuesta por Trucksess *et al.*, (1994) para matrices complejas. El estándar de AFB₁ fue comprado a Sigma-Aldrich (Chemical Co., St. Louis, MO), realizando la validación de AFB₁ a concentraciones de 0.01 ng g⁻¹ y 0.03 ng g⁻¹ obteniendo 85 % de recuperación y un coeficiente de variación del 15 %. La extracción consistió en homogenizar 25 g de muestra con 100 mL de acetonitrilo:agua (84:16 v/v) mediante agitación constante por 30 min. Posteriormente se pasaron 8 mL del extracto filtrado por la columna Mycosep 228, se evaporaron 4 mL mediante nitrógeno y se redisolvió el extracto seco con 400 µL de fase móvil. Se derivatizaron 200 µL del extracto con 700 µL de solución ácido trifluoroacético/ácido acético glacial/agua (20:10:70) durante 8.5 min a 65 °C en baño María. Se inyectaron 100 µL de solución derivatizada a una columna fase reversa (C18, 250 mm x 4.6 mm, 5 µm. Beckman Coulter, Ultrasphere), conectada a una precolumna (C18, 20 mm x 4.6 mm, 5 µm, Phenomenex). La fase móvil consistió en agua: acetonitrilo:metanol (4:1:1) a un flujo de 1.5 mL min⁻¹. Las longitudes de excitación y emisión fueron de 360 nm y 440 nm respectivamente. Límite de detección de AFB₁: 3 µg Kg⁻¹. Límite de cuantificación: 5 µg Kg⁻¹. El sistema consistió en un cromatógrafo AGILENT 1100 equipado con una bomba

ELISA method: extraction consisted in blending 20 g of the sample with 100 mL of methanol at 70 % during 3 min. After, the extract was filtered in Whatman paper No. 1 and it was adjusted at pH 7. **Assay:** 200 μL of the combined were added to each dilution well, after, 100 μL of standards (0, 4, 20, 40 $\mu\text{g Kg}^{-1}$) or samples were added. 100 μL from the content were transferred to the wells with antibodies to incubate during 15 min. The content of the wells was discarded and washed with deionized water 5 times. After drying the well column, 100 μL of substrate were added to each well and incubated during 5 minutes. After, 100 μL were added to the Stop solution. The measurement of optical densities was made with an ELISA reader using a 450 nm filter and one of reference of 630 nm. Detection limit of total AFs: 3 $\mu\text{g Kg}^{-1}$. Quantification limit: 4 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ (Quantification range: 4-40 $\mu\text{g Kg}^{-1}$).

Determination of DON

ELISA method: the extraction of the sample was made using deionized water (100 mL) to blend with 20 g of sample during 3 min. After, the extract filtered in Whatman paper No.1 was diluted 1:4 with deionized water. The immunoassay test was made using DON standards of 0.25; 1.0; 2.0 and 5.0 mg Kg^{-1} . **Assay:** the procedure was similar to the one developed for total AFs and ZEA. Detection limit: 0.2 mg Kg^{-1} . Quantification limit: 0.25 mg Kg^{-1} (Quantification range: 0.25 – 5.0 mg Kg^{-1}).

Determination of ZEA

HPLC method: methodology described by Visconti and Pascale (1998) was used. The ZEA standard was bought to Sigma-Aldrich (Chemical Co., St. Louis, MO); stock solutions were prepared with methanol (1 mg mL^{-1}), the experiment of recuperation was developed with free maize (white) samples adding levels of ZEA of 0.1; 0.5; 1.0; 2.0; 4.0 and 10.0 mg g^{-1} and 82 % of average recuperation was reported and variation coefficient of 15 %. For the extraction, 20 g of ground sample with 2 g of KLC and 100 mL of acetonitrile:water (90:10 v/v) were homogenized, keeping agitation for 30 min. Next, the extract was filtered and 10 mL were dissolved with 90 mL of distilled water. The diluted extract was passed through a microfiber glass filter GF/A, then, 10 mL of the extract filtered were passed through a column of immunoaffinity ZearalaTest (Vicam), washing with distilled water twice; ZEA was eluted with 1.5 mL of methanol at 100 %, collecting in vial the extract was evaporated to dryness with nitrogen and redissolved with 250 μL of mobile phase. 100 μL of the extract were injected in a column of reverse phase (C18, 150

(Palo Alto, CA, USA) y detector de fluorescencia programable, conectados a una estación de trabajo AGILENT (ChemStation Rev.a 10.01).

Técnica ELISA: la extracción consistió en licuar 20 g de muestra con 100 mL de metanol al 70 % durante 3 min. Posteriormente el extracto se filtró en papel Whatman No. 1 y se ajustó a pH 7. **Ensayo:** se agregaron 200 μL del conjugado a cada pocillo de dilución, después se añadieron 100 μL de estándares (0, 4, 20, 40 $\mu\text{g Kg}^{-1}$) o de las muestras. Se transfirieron 100 μL del contenido a los pocillos con anticuerpos para incubar por 15 min. Se descartó el contenido de los pocillos y lavaron con agua desionizada durante 5 veces. Después de secar la tira de pocillos se agregaron 100 μL de substrato en cada pocillo e incubó por 5 min. Posteriormente se agregaron 100 μL de la solución Stop para detener la reacción. La medición de las densidades ópticas se realizó con un lector de ELISA utilizando un filtro de 450 nm y uno de referencia de 630 nm. Límite de detección de AFs totales: 3 $\mu\text{g Kg}^{-1}$. Límite de cuantificación 4 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ (Rango de cuantificación: 4-40 $\mu\text{g Kg}^{-1}$).

Determinación de DON

Técnica de ELISA: la extracción de la muestra se realizó utilizando agua desionizada (100 mL) para licuar con 20 g de muestra durante 3 min. Posteriormente se diluyó el extracto filtrado en papel Whatman No. 1 en proporción 1:4 con agua desionizada. La prueba de inmunoensayo se efectuó utilizando estándares de DON de 0.25; 1.0; 2.0 y 5.0 mg Kg^{-1} . **Ensayo:** el procedimiento fue similar al desarrollado para AFs totales y ZEA. Límite de detección: 0.2 mg Kg^{-1} . Límite de cuantificación: 0.25 mg Kg^{-1} (Rango de cuantificación: 0.25 – 5.0 mg Kg^{-1}).

Determinación de ZEA

Técnica de HPLC: se utilizó la metodología descrita por Visconti y Pascale (1998). El estándar de ZEA fue comprado a Sigma-Aldrich (Chemical Co., St. Louis, MO), las soluciones stock se prepararon con metanol (1 mg mL^{-1}), el experimento de recuperación se desarrolló con muestras de maíz libre (blanco) agregando niveles de ZEA de 0.1; 0.5; 1.0; 2.0; 4.0 y 10.0 mg g^{-1} y se reportó 82 % de recuperación promedio y coeficiente de variación del 15 %. Para la extracción se procedió a homogenizar 20 g de muestra molida con 2 g de KCL y 100 mL de acetonitrilo:agua (90:10 v/v), manteniendo en agitación por 30 min. Posteriormente el extracto se filtró y 10 mL se diluyeron con 90 mL de agua destilada. El extracto diluido se pasó a través de filtro microfibra de vidrio GF/A, después 10 mL del extracto filtrado se pasaron a través de una columna de immunoafinidad ZearalaTest (Vicam),

mm x 4.6 mm, 5 μ m, SUPELCO, SUPELCOSIL™ LC-ABZ), connected to a precolumn C. The mobile phase used was methanol:water (70:30) at a flow of 1 mL/min. The system consisted in a chromatographer AGILENT 1100 equipped with a bomb (Palo Alto, CA, USA) and detector of programmable fluorescence, connected to a work station AGILENT (ChemStation Rev.a 10.01). The lengths of excitation and emission were 280 nm and 460 nm, respectively. Detection limit for ZEA: 3 μ g Kg⁻¹. Quantification limit: 5 μ g Kg⁻¹.

ELISA method: extraction was made from 20 g of grounded sample with 100 mL of methanol at 70 % and 4 g of NaCl and blended during 3 min. The filtered extract in Whatman No. 1 was dissolved in a relation 1:5 with methanol at 70 %. **Assay:** 200 μ L from the conjugated was added to each well of dilution and 100 μ L of standards was added (0, 40, 100, 300 and 1000 μ g Kg⁻¹) and the samples. The procedure was similar to the one used with aflatoxins. The measurement of the optical densities was made with an ELISA reader using a 450 nm filter and one of reference of 630 nm. Detection limit: 20 μ g Kg⁻¹. Quantification limit: 40 μ g Kg⁻¹ (Quantification range: 40 – 1000 μ g Kg⁻¹).

Results were contrasted by ANOVA at a significance level of 0.05 and a Tukey test was applied to compare the average levels between white, yellow and improved maize straw; the program Sigma Stat version 3.1 for Windows was used.

Results and Discussion

Table 1 presents the average levels of AFs, DON and ZEA in the samples of maize straw analyzed by ELISA and HPLC. No statistical difference ($p>0.05$) was observed between the different genotypes of white, yellow and improved maize. Total aflatoxins were detected in 88.2 % in samples by ELISA, the average concentration was 7.0 ± 3.29 μ g Kg⁻¹ (range: 1.2-28.2 μ g Kg⁻¹), only one sample surpassed the maximum limit established by the Mexican Normativity (SS, 2009), the higher concentration was present in maize straw from the variety 1071 (12.66 ± 10.45 μ g Kg⁻¹). HPLC, AFB₁ was detected in 84 % of the samples of maize straw, levels fluctuated from 0.22 to 8.5 μ g Kg⁻¹ (average of 3.68 ± 2.91 μ g Kg⁻¹), 23.5 % (16/68) of the samples presented superior levels to those established by European Union (UE, 2010). In Mexico there is

lavando con agua destilada dos veces; ZEA se eluyó con 1.5 mL de metanol al 100 % colectando en vial, el extracto fue evaporado a sequedad con nitrógeno y rediseñado con 250 μ L de fase móvil. Fueron inyectados 100 μ L del extracto en una columna fase reversa (C18, 150 mm x 4.6 mm, 5 μ m, SUPELCO, SUPELCOSIL™ LC-ABZ), conectada a una precolumna (C18, 20 mm x 4.6 mm, 5 μ m, Phenomenex). La fase móvil empleada fue metanol:agua (70:30) a un flujo de 1 mL min⁻¹. El sistema consistió en un cromatógrafo AGILENT 1100 equipado con una bomba (Palo Alto, CA, USA) y detector de fluorescencia programable, conectados a una estación de trabajo AGILENT (ChemStation Rev.a 10.01). Las longitudes de excitación y emisión fueron de 280 nm y 460 nm respectivamente. Límite de detección para ZEA: 3 μ g Kg⁻¹. Límite de cuantificación: 5 μ g Kg⁻¹.

Técnica de ELISA: la extracción se realizó a partir de 20 g de muestra molida con 100 mL de metanol al 70 % y 4 g de NaCl y se licuó por 3 min. El extracto filtrado en Whatman No. 1 se diluyó 1:5 con metanol al 70 %. **Ensayo:** se agregó 200 μ L del conjugado a cada pocillo de dilución y se añadió 100 μ L de estándares (0, 40, 100, 300 y 1000 μ g Kg⁻¹) y de las muestras. El procedimiento fue similar al utilizado con aflatoxinas. La medición de las densidades ópticas se realizó con un lector de ELISA utilizando un filtro de 450 nm y uno de referencia de 630 nm. Límite de detección: 20 μ g Kg⁻¹. Límite de cuantificación: 40 μ g Kg⁻¹. (Rango de cuantificación: 40 – 1000 μ g Kg⁻¹).

Los resultados fueron contrastados mediante ANOVA a un nivel de significancia de 0.05 y se aplicó la prueba de Tukey para comparación de los niveles promedio entre rastrojos de maíz blanco, amarillo y de tipo mejorado; se utilizó el programa Sigma Stat versión 3.1 para Windows.

Resultados y Discusión

La tabla 1 presenta los niveles promedio de AFs, DON y ZEA en las muestras de rastrojo de maíz analizadas mediante ELISA y HPLC. No se observó diferencia estadística ($p>0.05$) entre los distintos genotipos de maíz blanco, amarillo o de tipo mejorado. Aflatoxinas totales fueron detectadas en 88.2 % de las muestras mediante ELISA, la concentración promedio fue 7.0 ± 3.29 μ g Kg⁻¹ (rango: 1.2-28.2 μ g Kg⁻¹), solo una muestra superó el límite máximo establecido por la Normatividad Mexicana (SS, 2009), la mayor concentración se presentó en el rastrojo de maíz procedente de la variedad 1071 (12.66 ± 10.45 μ g Kg⁻¹). Mediante HPLC se detectó AFB₁ en 84 % de las muestras de

Table 1.
Average levels of aflatoxins, deoxynivalenol and zearalenone detected by HPLC and ELISA in maize straw

Tabla 1.
Niveles promedio de aflatoxinas, deoxinivalenol y zearalenona detectados mediante HPLC y ELISA en el rastrojo de maíz

	Aflatoxins (mg Kg ⁻¹)		Zearalenone (mg Kg ⁻¹)		Deoxynivalenol (mg Kg ⁻¹)
	ELISA *	HPLC **	ELISA	HPLC	ELISA
	Average ± DE	Average ± DE	Average ± DE	Average ± DE	Average ± DE
White maize					
H-318	7.76 ± 0.42	3.64 ± 3.81	608.10 ± 677.3	167.5 ± 103.08	6.02 ± 1.96
H-319	8.28 ± 1.02	3.53 ± 2.85	312.86 ± 298.4	127.5 ± 125.80	4.92 ± 2.77
H-321	9.55 ± 2.23	3.64 ± 3.56	609.97 ± 951.9	2065 ± 2641.13	6.73 ± 4.94
H-358	9.91 ± 4.39	3.94 ± 2.61	3898.80 ± 3015.1	642.5 ± 978.04	5.72 ± 2.03
Yellow maize					
1058	8.39 ± 4.72	2.08 ± 1.1	147.10 ± 129.4	Nd	4.03 ± 2.34
1060	8.57 ± 6.73	1.58 ± 2.0	718.25 ± 318.8	260 ± 216.80	3.75 ± 1.28
1065	10.36 ± 3.38	1.85 ± 2.53	2831.90 ± 4657.9	1900 ± 1808.79	3.66 ± 1.43
1068R	5.74 ± 3.13	4.44 ± 2.58	513.32 ± 256.6	75 ± 67.58	6.44 ± 2.85
1069	7.64 ± 1.62	0.78 ± 0.90	522.02 ± 574.7	180 ± 92.01	6.62 ± 2.63
1071	12.66 ± 10.45	2.79 ± 1.43	920.0 ± 504.6	282.5 ± 353.87	5.80 ± 2.65
1075	8.1 ± 1.41	3.87 ± 2.59	2592.8 ± 3186.3	342.5 ± 384.05	8.54 ± 4.22
Improved					
CHIH1058	3.56 ± 3.07	3.42 ± 2.45	922.47 ± 620.9	637.5 ± 979.74	6.46 ± 2.91
EXPS1XZAC	9.16 ± 4.60	3.28 ± 3.29	1110.77 ± 549.1	192 ± 35.0	6.29 ± 4.72
EXPS2XAJ	7.15 ± 5.62	3.55 ± 2.32	378.55 ± 275.9	Nd	6.13 ± 2.28
CrAMAZAM	2.93 ± 5.20	1.73 ± 2.77	1175.50 ± 899.0	940 ± 1023.33	9.17 ± 9.12
COMGUAY	3.33 ± 4.15	2.02 ± 2.08	1955.41 ± 2059.3	1231.25 ± 1150.65	6.99 ± 2.09
1463AMA	0.30 ± 0.60	4.0 ± 1.89	499.97 ± 369.8	106.25 ± 107.65	5.47 ± 2.63
Percentage (positive/totals)	88.2% (60/68)	84% (57/68)	98.5% (67/68)	81% (55/68)	100% (68/68)
Average/Technique	7.0 ± 3.29	3.68 ± 2.91	1164.6 ± 1046.7	544.6 ± 1.035	6.04 ± 3.49

*Total aflatoxins **AFB1 DE: standard deviation; Nd: non-detected.

*Aflatoxinas totales **AFB1 DE: desviación estándar; Nd: no detectado.

no maximum level allowed for AFB₁, which should be revised by the legislation since this metabolite is responsible of the main toxicological effects and the presence of the metabolite AFM₁ in milk represents a risk to public health (Fink-Gremmels, 2008). A previous study made in the region of "Los Altos de Jalisco" during 2008 showed contamination with AFs in 92.5 % in rations of bovines producers of milk (range: 4.82 to 24.89 µg Kg⁻¹), 80 % of the milk samples presented AFM₁ in average levels of 0.023 µg L⁻¹ (Reyes *et al.*, 2009), while in the maize silage concentration of AFs fluctuated from 12.5 to 15.7 µg Kg⁻¹, in addition to reporting co-occurrence with other mycotoxins (Reyes-Velázquez *et al.*, 2008).

Worldwide, there are diverse reports on the concentration of aflatoxins in bovine feeding, amongst which those performed during 10 years (1995-2004) in Portugal stand out, period in which there was low occurrence of AFB₁ found with levels of 5.1 to 74 µg Kg⁻¹, 6.2 % (62/374) of the samples surpassed the limit allowed by the European Union (Martins *et al.*, 2007). Research in Kenia during 2006-2007 showed 86 % of positive samples of AFB₁ in cow feed, from which 67 % exceeded the established by the legislation (5 µg Kg⁻¹), detecting AFM₁ in 72 % of milk samples, 20 % exceeded the limit allowed by the FAO/WHO in 1992 (Kang'ethe *et al.*, 2009). In Tunisia, from 2008 to 2010, reports indicated high occurrence of AFB₁ in feed for bovine, 84.4 % of the samples presented average levels of 18.7 ± 1.4 µg Kg⁻¹, 22.4 % of the samples surpassed the limit allowed by the European Union, observing AFB₁ in plasma and transference of AFM₁ to milk (Abbés *et al.*, 2012). In ingredients and manufactured feed in diverse regions of Turkey, AFB₁ was present in average levels of 3.37 µg Kg⁻¹ and 2.82 µg Kg⁻¹ in the feed of bovines producers of milk and beef, respectively; maize grain (average 58 µg Kg⁻¹) and dry grain of distillery (70 µg Kg⁻¹) presented the higher contamination with values that exceeded the limits allowed by regulation in Turkey, apart from detecting AFM₁ in samples of milk in a range of 2.48 to 18.93 ng Kg⁻¹ (Oruc *et al.*, 2012). Posterior studies in Turkey showed the presence of AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂ in 26.3, 7.89, 5.26 and 5.26 %, respectively, in feed for bovine, sheep, goats and chicken, level for AFB₁ showed a range of 0 to 3.31 µg Kg⁻¹ (Bilal *et al.*, 2014).

Regarding the detection of DON in maize straw, it was only determined by ELISA, finding 100 % of positive samples of 1.74 to 22.44 mg Kg⁻¹ (average 6.04 ±

rastrajo de maíz, los niveles fluctuaron de 0.22 a 8.5 µg Kg⁻¹ (promedio de 3.68 ± 2.91 µg Kg⁻¹), el 23.5 % (16/68) de las muestras presentaron niveles superiores a los establecidos por la Unión Europea (UE, 2010). En México no se tiene nivel máximo permitido para AFB₁, lo cual debe ser revisado por la legislación ya que este metabolito es responsable de los principales efectos toxicológicos y la presencia del metabolito AFM₁ en la leche representa un riesgo a la salud pública (Fink-Gremmels, 2008). Previo estudio realizado en la región de "los Altos Jalisco" durante 2008 mostró contaminación con AFs en 92.5 % en raciones de bovinos productores de leche (rango: 4.82 a 24.89 µg Kg⁻¹), 80 % de las muestras de leche presentaron AFM₁ en niveles promedio de 0.023 µg L⁻¹ (Reyes *et al.*, 2009), mientras que en ensilado de maíz la concentración de AFs fluctuó de 12.5 a 15.7 µg Kg⁻¹, además de reportarse co-ocurrencia con otras micotoxinas (Reyes-Velázquez *et al.*, 2008).

A nivel mundial existen diversos reportes de la concentración de aflatoxinas en alimentos de bovinos, entre los que destacan los efectuados durante 10 años (1995-2004) en Portugal, período en que se encontró baja ocurrencia de AFB₁ con niveles de 5.1 a 74 µg Kg⁻¹, 6.2 % (62/374) de las muestras superaron el límite permitido por la Unión Europea (Martins *et al.*, 2007). Investigaciones en Kenia durante 2006-2007 mostraron 86 % de muestras positivas a AFB₁ en alimentos de vacas, de las cuales 67 % excedieron lo establecido por la legislación (5 µg Kg⁻¹), detectándose AFM₁ en 72 % de muestras de leche, 20 % superaron el límite recomendado por la FAO/OMS en 1992 (Kang'ethe *et al.*, 2009). En Túnez de 2008 a 2010 los reportes indicaron alta ocurrencia de AFB₁ en alimentos para bovinos, 84.4 % de las muestras presentaron niveles promedio de 18.7 ± 1.4 µg Kg⁻¹, 22.4 % de las muestras sobrepasaron el límite permitido por la Unión Europea, observándose AFB₁ en plasma y transferencia de AFM₁ a la leche (Abbés *et al.*, 2012). En ingredientes y alimentos manufacturados en diversas regiones de Turquía, AFB₁ se presentó en niveles promedio de 3.37 µg Kg⁻¹ y 2.82 µg Kg⁻¹ en el alimento de bovinos productores de leche y carne respectivamente, el grano de maíz (promedio: 58 µg Kg⁻¹) y los granos secos de destilería (70 µg Kg⁻¹) presentaron la mayor contaminación con valores que sobrepasaron el límite permitido por la regulación en Turquía, además de detectarse en muestras de leche AFM₁ en un rango de 2.48 a 18.93 ng Kg⁻¹ (Oruc *et al.*, 2012). Posteriores estudios en Turquía demostraron la presencia de AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ en 26.3, 7.89, 5.26 y 5.26 % respectivamente en alimentos de bovinos, borregos, cabras y pollos, los niveles para AFB₁ mostraron un rango de 0 a 3.31 µg Kg⁻¹ (Bilal *et al.*, 2014).

3.49 mg Kg⁻¹), 4.4 % of the samples (3/68) surpassed the maximum limit recommended for DON (12 mg Kg⁻¹) in subproducts of maize aimed to animal consumption (EC, 576/2006). About the presence of ZEA in maize straw, determinations by ELISA showed 98.5 % of positive samples, detected levels were 4.6 to 9758 µg Kg⁻¹ (average 1164.6 ± 1046.7 µg Kg⁻¹), 11.8 % of the sample of straw analyzed (8/68) exceeded the limit recommended of ZEA (2000 µg Kg⁻¹) in subproducts of maize for animal consumption. Detection by HPLC showed 81 % of the samples as positive, detected levels were 20 to 5800 µg Kg⁻¹ (average 544.6 ± 1035 µg Kg⁻¹), 10.3 % of the samples of straw analyzed (7/68) surpassed the maximum level recommended by the European Union. In Jalisco state, reported studies in maize silage (Reyes-Velázquez *et al.*, 2008) showed contamination with AFs, FBs, DON, ochratoxin A and ZEA, showing DON 1.4–6.7 mg Kg⁻¹ and ZEA (168–482 µg Kg⁻¹) the highest concentration, which coincides with other research at a worldwide level (Driehuis *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2012; Oruc *et al.*, 2012; Bilal *et al.*, 2014).

It is frequent to find co-occurrence of DON and ZEA in foliage. In maize silage evaluated in the state of North Carolina (USA) in a period from 1989 to 1997, DON exceeded 50 µg Kg⁻¹ in 66 % of the samples and the levels of ZEA were higher than 70 µg Kg⁻¹ in 30 % of the samples (Witlow and Hagler, 2005). In Holland, during 2002 to 2004, incidence of DON and ZEA in maize silage was high, 72 % of the samples presented DON levels higher than 250 µg Kg⁻¹ and 49 % of the same detected ZEA on 25 µg Kg⁻¹ (Driehuis *et al.*, 2008). In Turkey, researchers reported contamination of AFB₁, DON and ZEA in raw material and finished feed for animals, AFB₁ was detected in 100 % of the samples with average levels of 8.26 ± 2.19 µg Kg⁻¹, 75 % were positive to DON and 33 % to ZEA with average levels of 2.5 mg Kg⁻¹ and 110 µg Kg⁻¹ respectively; determinations were made by ELISA (Oruc *et al.*, 2012). Monitoring made in Poland from 2006 to 2009 showed DON values of 409 to 14470 ng g⁻¹ in cereals, silage and balanced feed and ZEA from 292 to 603 ng g⁻¹ in cereals and 116 to 1150 ng g⁻¹ in silage; determinations were made by HPLC (Grajewski *et al.*, 2012). Infection in field of *F. graminearum* in maize crop has shown invariable contamination by DON and ZEA, while in wheat crop it is usually observed high levels of DON and low levels of ZEA or absence of it (EFSA, 2004b).

Respecto a la detección de DON en el rastrojo de maíz, solo se determinó mediante ELISA, encontrándose 100 % de muestras positivas con niveles de 1.74 a 22.44 mg Kg⁻¹ (promedio 6.04 ± 3.49 mg Kg⁻¹), 4.4 % de las muestras (3/68) superaron el límite máximo recomendado para DON (12 mg Kg⁻¹) en subproductos de maíz destinados a consumo animal (EC, 576/2006). En cuanto la presencia de ZEA en el rastrojo de maíz, las determinaciones por ELISA mostraron 98.5 % de muestras positivas, los niveles detectados fueron de 4.6 a 9758 µg Kg⁻¹ (promedio 1164.6 ± 1046.7 µg Kg⁻¹), 11.8 % de las muestra del rastrojo analizado (8/68) superaron el nivel máximo recomendado de ZEA (2000 µg Kg⁻¹) en subproductos de maíz para consumo animal. La detección mediante HPLC mostró 81 % de muestras positivas, los niveles detectados fueron de 20 a 5800 µg Kg⁻¹ (promedio 544.6 ± 1035 µg Kg⁻¹), 10.3 % de las muestras del rastrojo analizado (7/68) superaron el nivel máximo recomendado por la Unión Europea. En el estado de Jalisco los estudios reportados en ensilado de maíz (Reyes-Velázquez *et al.*, 2008) mostraron contaminación con AFs, FBs, DON, ocratoxina A y ZEA, mostrando la mayor concentración DON (1.4–6.7 mg Kg⁻¹) y ZEA (168–482 µg Kg⁻¹), lo cual coincide con otras investigaciones a nivel mundial (Driehuis *et al.*, 2008; Dong-Ho *et al.*, 2014; Oruc *et al.*, 2012; Bilal *et al.*, 2014).

Es frecuente encontrar co-ocurrencia de DON y ZEA en forrajes. En ensilado de maíz evaluado en el estado de Carolina del Norte (USA) en un periodo de 1989 a 1997 DON excedió 50 µg Kg⁻¹ en 66 % de las muestras y los niveles de ZEA fueron mayores de 70 µg Kg⁻¹ en 30 % de las muestras (Witlow y Hagler, 2005). En Holanda durante 2002 a 2004 la incidencia de DON y ZEA en ensilado de maíz fue elevada, el 72 % de las muestras presentó niveles de DON mayores a 250 µg Kg⁻¹ y 49 % de las mismas detectaron ZEA sobre 25 µg Kg⁻¹ (Driehuis *et al.*, 2008). En Turquía los investigadores reportaron contaminación de AFB₁, DON y ZEA en materias primas y alimentos terminados para animales, AFB₁ se detectó en 100 % de las muestras con niveles promedio de 8.26 ± 2.19 µg Kg⁻¹, 75 % fueron positivas a DON y 33 % a ZEA con niveles promedio de 2.5 mg Kg⁻¹ y 110 µg Kg⁻¹ respectivamente, las determinaciones se realizaron mediante ELISA (Oruc *et al.*, 2012). El monitoreo realizado en Polonia de 2006 a 2009, mostró valores de DON de 409 a 14470 ng g⁻¹ en cereales, ensilados y alimentos balanceados y ZEA de 292 a 603 ng g⁻¹ en cereales y de 116 a 1150 ng g⁻¹ en ensilados, las determinaciones fueron por HPLC (Grajewski *et al.*, 2012). La infección en campo de *F. graminearum* en el cultivo de maíz ha demostrado invariablemente contaminación por DON y ZEA, mientras que en el cultivo de trigo por lo general se observan altos niveles de DON y usualmente bajos de ZEA o ausencia de la misma (EFSA, 2004b).

Conclusions

Maize straw harvested during 2009 in Tepatitlán, Jalisco, Mexico, showed high percentage of AFs, DON and ZEA, average levels detected were under de tolerable limits of Mexican normativity; however, high frequency of reported contamination in the studied zone require a systemic control in field and storage, and research that evaluate the security of the ingredients and products aimed to human and animal feeding.

Acknowledgements

This study is part of the project "Evaluation of mycotoxicology of subproducts aimed to animal feeding", which was made by project CYTED 109AC0371 IBEROAMERICA.

References

- Abbés, S., Salah-Abbés, J.B., Bouraoui, Y., Oueslati, S. and Oueslati, R. 2012. Natural occurrence of aflatoxins (B₁ and M₁) in feed, plasma and raw milk of lactating dairy cows in Beja, Tunisia, using ELISA. *Food Additive and Contaminants. Part B.* 5(1): 11-15. https://www.researchgate.net/publication/262000320_Natural_occurrence_of_aflatoxins_B-1_and_M-1_in_feed_plasma_and_raw_milk_of_lactating_dairy_cows_in_Beja_Tunisia_using_ELISA
- Bilal, T., Aksakal, D.H., Sünnecti, S., Keser, O. and Eseceli, H. 2014. Detection of aflatoxin, zearalenone and deoxinivalenol in some feed and feedstuffs in Turkey. *Pakistan Veterinary Journal* 34(4): 459-463. http://www.pvj.com.pk/pdf_files/34_4/459-463.pdf
- Creppy, E.E. 2002. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters* 127: 19-28. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378427401004799>
- Dong-Ho K., In-Hye L., Woo-Hyun, D., Woo-Seon, N., Hua, L., Han-Sub, J. and Han-Sub, J. 2014. Incidence an levels of deoxinivalenol, fumonisins and zearalenone contaminants in animal feed used in Korea in 2012. *Toxins* 6: 20-32. <http://www.mdpi.com/2072-6651/6/1/20>
- Driehuis, F., Spanjer, M.C., Scholten, J.M. and Giffel M.C. 2008. Occurrence of mycotoxins in maize, grass and wheat silage for dairy cattle in Netherlands. *Food Additives and Contaminants: Part B* 1(1): 41-50. <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/19393210802236927?journalCode=tfab20>
- EFSA European Food Safety Authority. 2004a. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in Food Chain on a request from Commission related to aflatoxin B₁ as undesirable substance in animal feed. *EFSA Journal* 39: 1-27.
- EFSA European Food Safety Authority. 2004b. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in Food Chain on a request from Commission related to Zearalenone as undesirable substance in animal feed. *EFSA Journal* 2004 989: 1-35.
- European Commission. 2006. Commission Recommendation of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding (2006/576/EC) *Official Journal of European Union L.* 229: 7-9. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32006H0576>
- FAO/WHO. Food and Agricultural Organization/Wold Health Organization. 1992. Standards Programme. *Codex Alimentarius Commission, Alinorm* 93/12. <https://www.google.com.mx/webhp?sourceid=chrome>

Conclusiones

El rastrojo de maíz cosechado durante 2009 en Tepatitlán, Jalisco, México mostró alto porcentaje de AFs, DON y ZEA, los niveles promedio detectados se mantuvieron dentro de los límites tolerables por la normatividad mexicana, sin embargo, la alta frecuencia de la contaminación reportada en la zona estudiada requiere de un control sistémico en campo y almacenamiento, así como investigaciones que evalúen la seguridad de los ingredientes y productos destinados a la alimentación humana y animal.

Agradecimientos

El presente estudio forma parte del proyecto "Evaluación micotoxicológica de subproductos destinados a la alimentación animal", el cual se realizó bajo el marco del proyecto CYTED 109AC0371 IBEROAMERICA.

- [instant&ion=1&espy=2&ie=UTF-8#q=FAO%2FWHO.+Food+and+Agricultural+Organization%2FWold+Health+Organization.+1992.+Standards+Programme.+Codex+Alimentarius+Commission%2C+Alinorm+93%2F12](#)
- Fink-Gremmels, J. 2008. Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: A review. *Food Additives and Contaminants* 25(2): 172-180.
- Garret, W.N. Heitman Jnr, H. and Booth, A.N. 1968. Aflatoxin toxicity in beef cattle. *Proceedings of Society of Experimental Biology and Medicine* 12: 188-190.
- Grajewski, J., Blajet-Kosicka, A., Twaruzek, M. and Kosicki, R. 2012. Occurrence of mycotoxins in Polish animal feed in years 2006-2009. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 96: 870-877. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0396.2012.01280.x/abstract>
- IARC. 2002. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. Summary of data reported and evaluation. IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk to humans. Vol. 82. *International Agency for Research on Cancer*, Lyon. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK326619/>
- Jouany, J.P. and Díaz, D.E. 2008. Effects of mycotoxins in ruminants. The mycotoxin Blue Book, Nottingham University Press 295-321 pp.
- Kang'ethe, E.K. and Lang'a, K.A. 2009. Aflatoxin B₁ and M₁ contamination of animal feeds and milk from urban center in Kenya. *African Health Sciences* 9(4): 218-226. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3074399/>
- Klich, M., Mullaney, E., Daly, C. and Cary, J. 2000. Molecular and Physiological aspects of aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis by *Aspergillus tamarii* and *A. ochraceoseus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 53: 605-609. <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs002530051664>
- Martins, H.M., Mendes, G.M.M. and d'Almeida, B.F.M. 2007. Occurrence of aflatoxin B₁ in dairy cow's feed over 10 years in Portugal (1995-2004). *Revista Iberoamericana de Micología* 24: 69-71. <http://www.reviberoammi-col.com/2007-24/069071.pdf>
- Oruc, H.H., Türkmen, I.I., Sorucu, A. and Arslan, E. 2012. Determination of various mycotoxin concentrations in the feed-stuffs and feed produced by feed manufacturer in Turkey. *Kafkas University Veterinary Fakültesi Dergisi* 18(4): 633-638 pp. http://vetdergi.kafkas.edu.tr/extdocs/2012_4/633-638.pdf
- Placinta, C.M., D'Mello, J.P.F. and MacDonald, A.M.C. 1999. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology* 7: 21-37. [http://www.animalfeed-science.com/article/S0377-8401\(98\)00278-8/abstract](http://www.animalfeed-science.com/article/S0377-8401(98)00278-8/abstract)
- Reyes-Velázquez, W.P., Isaías, V.H.E., Rojo F., Jimenez-Plasencia, C., De Lucas E.P., Hernández-Góborá, J. and Ramírez-Álvarez, A. 2008. Occurrence of fungi and mycotoxins in corn silage, Jalisco State, Mexico. *Revista Iberoamericana de Micología* 25: 182-185. https://www.researchgate.net/publication/23250918_Occurrence_of_fungi_and_mycotoxins_in_corn_silage_Jalisco_State_Mexico
- Reyes, W.P.R., Patricio, M.S., Isaías, V.H.E., Nathal, V.M.A., De Lucas, P.E. and Rojo F. 2009. Aflatoxinas totales en raciones de bovinos y AFM₁ en leche cruda obtenida en establos del estado de Jalisco, México. *Técnica Pecuaria México* 47(2): 223-230. <http://www.tecnicapecuaria.org.mx/trabajos/200904021084.pdf>
- Rotter, B.A., Prelusky, D.B. and Pestka, J.J. 1996. Toxicology of deoxinivalenol (vomitoxin). *Journal of Toxicology Environmental* 48(1): 1-34. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8637056>
- Sphar, U., Walther, B. and Sieber, R. 1999. Occurrence of mycotoxins in feeds and carry over into milk. *Mitteilungen Lebensmittel Hygiene* 90: 575-609.
- SS. Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana. NOM-247-SSA1-2008. 2009. Productos y Servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Disposiciones y Especificaciones Sanitarias. Diario Oficial de la Federación. México D.F. 27 de julio de 2009. http://dof.gob.mx/nota_detalle_popup.php?codigo=5100356
- SS. Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana. NOM-243-SSA1-2010. 2010. Productos y Servicios. Leche, Formula Láctea, Producto Lácteo combinado y derivados Lácteos. Disposiciones y Especificaciones Sanitarias. Métodos de Prueba. Diario Oficial de la Federación. México D.F. 27 de septiembre de 2010. http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5160755&fecha=27/09/2010
- Trucksess, M.W., Stack, M.E., Nesheim, S., Albert, R.H. and Romer, T.R. 1994. Multifunctional column coupled with liquid chromatography for determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in corn, almonds, brazil nuts, peanuts, and pistachio nuts: collaborative study. *Journal of AOAC International* 77(6): 1521-1521. <http://europepmc.org/abstract/med/7819761>

- U.E. Reglamento (UE) N° 165/2010 de la Comisión de 26 de febrero de 2010 que modifica, en la 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 de 27/02/2010, 8-12 pp. <http://www.senasa.gob.pe/senasa/wp-content/uploads/2014/12/Se-fijan-limites-de-aflatoxinas-en-Capsicum-spp.pdf>
- Veldman, V.A., Meijs, J.A.C., Borggreve, G.J. and Heeres van der Tol J.J. 1992. Carryover of aflatoxin from cows' food to milk. *Animal Production* 55: 163-168. <http://journals.cambridge.org/action/displayFulltext?type=1&fid=7389152&jid=ASC&volumeId=55&issueId=02&aid=7389144>
- Visconti, A. and Pascale, M. 1998. Determinations of zearalenone in corns by means of immunoaffinity clean-up and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* 815: 133-140. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967398002969>
- Whitlow, L.W. and Hagler, W.M. Mycotoxins: a review of dairy concerns. In: Jordan E. editor. Proceedings of the 2005 Mid-South Ruminant Nutrition Conference. Dallas (TX): *Animal Nutrition Council* 47-58 pp.
- Zinedine, A., Soriano, J.M., Molto, J.C. and Mañes, J. 2007. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. *Food Chemical Toxicology* 45: 1-18. <http://know-the-cause.com/downloads/Zinedine2007Zearealone.pdf>

Cite this paper/Como citar este artículo: Reyes, W., Patricio, S., Pereyra, C., González, M.L., Cavaglieri, L., Dalcero, A. (2016). Aflatoxins, Deoxynivalenol and Zearalenone in maize straw harvested in Tepatitlan, Jalisco state. *Revista Bio Ciencias* 4(1): 3-14. <http://editorial.uan.edu.mx/BIOCIENCIAS/article/view/197/239>

