

Análisis Microbiológico de Hierbas Medicinales y su Contaminación por Especies de *Aspergillus* Toxicogénicas

Victoria SÁNCHEZ, Ana M. GONZÁLEZ & María C. LURÁ *

Cátedra de Microbiología General. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas.
Universidad Nacional del Litoral. Ciudad Universitaria.
Paraje El Pozo. (3000) Santa Fe. Argentina

RESUMEN. Se determinó la carga microbiológica de Hierbas Medicinales que se expenden en la ciudad de Santa Fe, los microorganismos viables fueron caracterizados fenotípicamente y se identificaron las especies de *Aspergillus*. Malva, Poleo, Ruda, Estigma de Maíz, Boldo, Manzanilla y Menta fueron obtenidas, al azar, de diferentes farmacias. Los recuentos microbiológicos, en superficie, para las bacterias mesófilas totales oscilaron entre 2×10^3 y $5,3 \times 10^6$ UFC/g de muestra y para hongos, los valores mínimos y máximos fueron 0 y $1,5 \times 10^6$ UFC/g. Se identificaron siete especies diferentes de *Aspergillus* y una de *Eurotium*. Existió gran variabilidad en la carga microbiana y tipo de microorganismos presentes; los hongos hallados, por su potencial capacidad toxicogénica, podrían representar un peligro para la salud, aún con recuentos dentro de los límites permitidos.

SUMMARY. "Microbiological Analysis of Medicinal Plants and Their Contamination by Toxicogenic *Aspergillus* Species". Microbiological load of medicinal plants expended in Santa Fe city (Argentina) was determined, viable microorganisms were phenotypically characterized and *Aspergillus* species were identified. Mallow, poleo, ruda, corn stigma, boldo, chamomile and mint were randomly obtained from different pharmacies. Microbiological surface counts were carried out. Total aerobic mesophilic bacteria results were between 2×10^3 and 5.3×10^6 CFU/g of sample, and for fungi, minimum and maximum values were 0 and 1.5×10^6 CFU/g, respectively. Seven different *Aspergillus* species and one *Eurotium* specie were identified. Great variability in microbial load and microorganisms, were detected; potential toxicogenic *Aspergillus* species identified could represent a high risk for human health, even when their concentration are under allowed limits.

INTRODUCCION

La herbolaria o medicina tradicional es un método de curación que utiliza hierbas medicinales y que se ha aprovechado durante siglos¹. En los países más necesitados cobra mayor importancia y, a pesar del avance de la tecnología y la generación de nuevos medicamentos, estos preparados naturales, simples de elaborar y de bajo costo, ocupan un lugar en el mercado como medicinas alternativas¹. En la actualidad, su aplicación es cada vez más frecuente y tiene un gran número de adeptos, siendo las infusiones una de las formas más frecuentes de empleo².

Algunas de las plantas que se han procesado y comercializado con fines terapéuticos son: malva (*Malva sylvestris* L.), poleo (*Lippia turbi-*

natai Griseb), ruda (*Ruta chalepensis* L., conocida como Ruda macho), estigma de maíz (*Zea mays* L., conocida como barba de choclo), boldo (*Peumus boldus* Molina), manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.) y menta (*Mentha piperita* L.). Las propiedades de estas hierbas medicinales las hacen aptas para ser elegidas por un gran número de consumidores. Pueden ser utilizadas, entre otras, por sus acciones diuréticas (estigma de maíz), antiespasmódicas (ruda macho) y para aliviar trastornos gastrointestinales (malva, poleo, boldo, manzanilla, menta)³.

Sin embargo, a pesar de sus aspectos beneficiosos pueden encontrarse, en ellas, componentes químicos, microorganismos y/o algunos de sus metabolitos, que podrían generar serios pro-

PALABRAS CLAVE: Contaminación microbiológica, Especies de *Aspergillus*, Hierbas medicinales.
KEY WORDS: *Aspergillus* species, Medicinal plants, Microbiological load.

* Autora a quien dirigir la correspondencia. E-mail: eocalafell@ciudad.com.ar; mclura@fcb.unl.edu.ar

blemas de salud en el consumidor. Entre los microorganismos que pueden estar presentes cobran relevancia los mohos, fundamentalmente aquellos capaces de producir micotoxinas (MTX). Cabe aclarar que la presencia de estos hongos no implica estrictamente que se hallen sus metabolitos secundarios; de igual modo su ausencia no garantiza que el producto esté libre de ellos, puesto que algunos, como las MTX, pueden persistir mucho después de la pérdida de viabilidad del moho productor ⁴.

Aspergillus es uno de los géneros que más frecuentemente se aísla de distintos tipos de alimentos ⁵. Muchas de sus especies producen toxinas, algunas de las cuales son termorresistentes aunque el tratamiento con calor disminuye su nivel de toxicidad. Los teleomorfos relacionados con el género *Aspergillus* se caracterizan por la producción de ascosporos capaces de resistir temperaturas elevadas ⁶, lo que los convierte en un riesgo para los productos pasteurizados ⁵. Existen reportes sobre efectos tóxicos de *Eurotium* spp., aunque no se ha podido determinar qué tipo de toxina producen ⁵.

En Argentina, el Ministerio de Salud y Acción Social de la Nación, a través de la Resolución 144/98, otorgó el marco legal necesario para la reglamentación de los Medicamentos Fitoterápicos (MF), estableciendo normas que estipulan la carga microbiológica límite para las hierbas medicinales ⁷.

En la ciudad de Santa Fe, el 80% de la demanda de hierbas medicinales es cubierta por sólo dos marcas comerciales. El presente trabajo se llevó a cabo con la intención de ampliar el conocimiento acerca de la contaminación microbiológica en las hierbas medicinales comercializadas con mayor frecuencia. Sus objetivos fueron: a) determinar la carga microbiológica (bacterias aerobias mesófilas y hongos) en hierbas medicinales pertenecientes a una de las dos marcas comerciales que se expenden con mayor frecuencia en la ciudad de Santa Fe, b) caracterizar fenotípicamente, mediante estudios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos, los microorganismos viables detectados y c) Identificar las especies de *Aspergillus* presentes en los productos analizados.

MATERIAL Y METODOS

Se trabajó con muestras de diferentes hierbas medicinales, obtenidas en sus envases originales, al azar, de farmacias de la ciudad de Santa Fe. Las hierbas medicinales estudiadas fueron: malva, poleo, ruda, estigma de maíz, boldo,

manzanilla y menta de una misma marca y, en todos los casos, se analizaron dos lotes diferentes. Cada uno de los lotes del producto se denominaron Lote 1 y 2, respectivamente. Las muestras se transportaron manteniendo las condiciones de almacenamiento de las farmacias en las que se adquirieron.

La determinación de la carga microbiana se llevó a cabo mediante recuentos microbiológicos en superficie, según las técnicas estipuladas en Anderson del Rosario ⁸. Los resultados se expresaron como número de unidades formadoras de colonias por cada gramo de muestra (UFC/g). Una vez efectuados los recuentos, se procedió a aislar cada una de las colonias macroscópicamente diferentes. Todas las cepas se conservaron a 4 °C.

La caracterización fenotípica de las bacterias, se llevó a cabo utilizando las pruebas bioquímicas propuestas en Mac Faddin ⁹ y Koneman ¹⁰. La caracterización fenotípica de los mohos aislados se llevó a cabo mediante estudios morfológicos (macro y microscópicos) y fisiológicos, según las técnicas descritas en Pitt *et al.* ⁵ y Piontelli ¹¹. No se identificaron los hongos levaduriformes.

Las especies de *Aspergillus* se identificaron aplicando las claves taxonómicas propuestas por Pitt *et al.* ⁵ y Raper *et al.* ¹².

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Agnese *et al.* ¹³ consideran que el consumo de preparados a partir de plantas medicinales (extractos, tinturas, infusiones, etc.) es una de las prácticas arraigadas en la sociedad argentina. En este trabajo, se analizaron algunas hierbas medicinales fraccionadas y envasadas en un laboratorio habilitado por la autoridad competente y que pueden ser adquiridas en los comercios locales.

En los rótulos de las muestras analizadas no se encontraron indicaciones respecto a su acción farmacológica ni contraindicaciones respecto de su uso y sólo en algunas de ellas se pudo visualizar el número de lote y la fecha de vencimiento.

Las cargas microbiológicas, expresadas en UFC/g de muestra, se observan en las Tablas 1 y 2. Todos los recuentos de bacterias aerobias mesófilas efectuados estuvieron comprendidos dentro de los valores estipulados por la legislación vigente (límite permitido para bacterias aerobias mesófilas totales: 10^7 UFC/g ⁷), ya que se encontraron entre 2×10^3 y $5,3 \times 10^6$ UFC/g de muestra. Al respecto, vale la pena remarcar que

Bacterias Aerobias Mesófilas Totales	Malva		Poleo		Ruda		Estigma de Maíz		Boldo		Menta		Manzanilla	
	L 1	L 2	L 1	L 2	L 1	L 2	L 1	L 2	L 1	L 2	L 1	L 2	L 1	L 2
<i>Alcaligenes</i> spp.	SD	5	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD
<i>Enterobacter</i> spp.	SD	SD	3	SD	SD	SD	SD	4	SD	SD	SD	SD	SD	SD
<i>Bacillus</i> spp.	6	6	SD	5	SD	4	5	4	SD	4	SD	4	3	4
Bacilos Gram (+) no identificados	SD	SD	5	SD	4	SD	5	SD	3	SD	5	4	SD	SD
Valores totales en UFC/g	5,3x10 ⁶	3,8x10 ⁶	4,0x10 ⁵	2,4x10 ⁵	7,6x10 ⁴	9,2x10 ⁴	1,3x10 ⁶	8,4x10 ⁴	2,0x10 ³	5,1x10 ⁴	1,1x10 ⁵	8,1x10 ⁴	3,0x10 ³	1,0x10 ⁴

Tabla 1. Recuento Microbiológico de Bacterias Aerobias Mesófilas Totales en Hierbas Medicinales. L1: Lote 1; L2: Lote 2; UFC/g: unidades formadoras de colonias por gramo de muestra; SD: Sin desarrollo; 3: 10³ UFC/g; 4: 10⁴ UFC/g; 5: 10⁵ UFC/g; 6: 10⁶ UFC/g.

estos resultados no son coincidentes con los hallados por Pafumi ¹⁴ y Tantaoui *et al.* ¹⁵, quienes reportaron no sólo recuentos elevados, sino también presencia de *Escherichia coli* y *Salmonella* spp.

Malva presentó la mayor contaminación y boldo y manzanilla fueron las hierbas con recuentos bacterianos más bajos. Los bacilos Gram positivos, en especial el género *Bacillus* (formadores de endoesporos), estuvieron presentes en todas las muestras analizadas, constituyendo, en algunas de ellas, el 100% de la carga bacteriana. Resulta llamativo el hecho de haber detectado una elevada concentración de *Alcaligenes* spp. en una de las muestras de malva, bacteria que al estar viable, podría ser vehiculizada e ingresar por la vía aérea, actuando como agente etiológico de enfermedades infecciosas en pacientes con compromiso inmunológico ¹⁰. Si bien podría pensarse que el agua caliente de la infusión podría hacer perder la viabilidad de la bacteria, Khubeka *et al.* ¹⁶ demostraron que el agua utilizada a 70 °C durante 2 min o a 80 °C durante 1 min, no fue suficiente para eliminar todas las células vegetativas de bacterias presentes en la superficie de naranjas.

En poleo, la proporción de bacterias del género *Enterobacter* spp. se mantuvo dentro de los límites establecidos, mientras que en estigma de maíz su proporción fue ligeramente superior.

A diferencia de los resultados obtenidos con las bacterias, se observó una amplia disparidad en los recuentos de hongos. Los valores mínimos y máximos fueron 0 y 1,5x10⁶ UFC/g de muestra; la única hierba con carga micológica

dentro de los valores permitidos (límite permitido para hongos y levaduras: 10⁴UFC/g⁷) fue poleo (en uno de los lotes no hubo desarrollo fúngico), mientras que en menta sólo L₁ tuvo recuentos < 10⁴ UFC/g.

Cuando se preparan infusiones de hierbas medicinales, los microorganismos presentes en ellas no necesariamente ingresan al organismo por la vía digestiva ya que los esporos de bacterias y hongos, especialmente estos últimos, pueden hacerlo a través de las vías respiratorias y actuar como alérgenos o como agentes etiológicos de enfermedades infecciosas, fundamentalmente en personas inmunocomprometidas.

Los hongos que producen reacciones alérgicas con mayor frecuencia pertenecen a los géneros *Alternaria*, *Cladosporium* y *Aspergillus* siendo responsables de agudizaciones importantes del asma ¹⁷. En este trabajo manzanilla fue la única hierba en la que no se detectó alguno de estos géneros, a pesar del franco predominio de flora fúngica.

En la Tabla 3 se presentan las especies de *Aspergillus* y teleomorfos relacionados, la fuente a partir de la cual se obtuvieron, la concentración y la proporción correspondiente en que se encontraban en cada lote. No se detectó este género en estigma de maíz, menta y manzanilla. Malva fue la hierba que presentó mayor variedad de especies. A pesar del escaso desarrollo fúngico, en L₁ de poleo se identificó *A. ochraceus* K. Wilh.

Aunque en este trabajo no se determinó su capacidad toxicogénica, casi todos los géneros y/o especies identificados podrían resultar pro-

Hongos Totales	Malva		Poleo		Ruda		Estigma de Maíz		Boldo		Menta		Manzanilla	
	L 1	L 2	L 1	L 2	L 1	L 2	L 1	L 2	L 1	L 2	L 1	L 2	L 1	L 2
<i>Aspergillus</i> spp.	3	5	2	SD	SD	3	SD	SD	4	SD	SD	SD	SD	SD
<i>Eurotium</i> spp.	SD	4	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD
<i>Fusarium</i> spp.	SD	3	SD	SD	SD	SD	SD	4	SD	SD	SD	SD	SD	SD
<i>Mucor</i> spp.	SD	SD	3	SD	SD	3	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD
<i>Penicillium</i> spp.	4	SD	SD	SD	3	4	6	SD	3	2	SD	SD	5	4
<i>Scopulariopsis</i> spp.	SD	SD	SD	SD	SD	4	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD
<i>Alternaria</i> spp.	4	SD	SD	SD	3	SD	SD	4	SD	SD	SD	SD	SD	SD
<i>Curvularia</i> spp.	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	4	SD	SD	SD	SD	SD
<i>Cladosporium</i> spp.	SD	SD	SD	SD	5	SD	SD	4	3	3	3	4	SD	SD
Otros <i>Hyphomycetes dematiáceos</i>	4	SD	SD	SD	SD	SD	4	SD	2	SD	SD	SD	SD	5
Hongos levaduriformes	SD	SD	SD	SD	SD	2	SD	4	SD	SD	SD	SD	SD	SD
Hongos con micelio estéril	3	SD	SD	SD	3	SD	SD	SD	SD	SD	SD	2	SD	SD
Valores totales en UFC/g	1,5x10 ⁵	3,0x10 ⁵	3,0x10 ³		1,3x10 ⁵	2,8x10 ⁴	1,5x10 ⁶	1,7x10 ⁵	6,5x10 ⁴	1,0x10 ⁴	2,0x10 ³	5,3x10 ⁴	5,3x10 ⁵	2,3x10 ⁵

Tabla 2. Recuento Microbiológico de Hongos en Hierbas Medicinales. L1: Lote 1; L2: Lote 2; UFC/g: unidades formadoras de colonias por gramo de muestra. SD: Sin desarrollo; 2: 10² UFC/g; 3: 10³ UFC/g; 4: 10⁴ UFC/g; 5: 10⁵ UFC/g; 6: 10⁶ UFC/g.

Especies identificadas	Origen ¹	UFC/g ²	% ³
<i>Aspergillus flavus</i> Link	Malva (L1)	1,0x10 ³	0,02
<i>A. ochraceus</i> K. Wilh	Malva (L2)	4,8x10 ⁴	1,17
	Poleo (L1)	1,0x10 ³	0,25
<i>A. niger</i> Tiegh. <i>nom. cons.</i>	Malva (L2)	7,0x10 ³	0,17
<i>A. fumigatus</i> Fresen	Malva (L1)	3,3x10 ²	0,006
	Boldo (L1)	7,7x10 ³	11,49
<i>A. candidus</i> Link	Boldo (L1)	1,3x10 ⁴	19,40
<i>A. niveus</i> Blochwitz	Malva (L2)	6,7x10 ³	0,16
	Ruda (L2)	2,5x10 ³	2,08
<i>A. sydowii</i> (Bainier & Sartory) Thom & Church	Malva (L2)	1,5x10 ⁵	3,66
<i>Eurotium amstelodami</i> L. Mangin	Malva (L2)	7,3x10 ⁴	1,78

Tabla 3. Especies de *Aspergillus* y teleomorfos relacionados presentes en Hierbas Medicinales. ¹Origen: fuente a partir de la cual se aisló el hongo, entre paréntesis se especifica el lote; ²UFC/g: unidades formadoras de colonias por cada gramo de muestra; ³porcentaje de la especie en la carga microbiana; L1: Lote 1; L2: Lote 2.

ductores de MTX. Es importante mencionar, que se ha demostrado la presencia de MTX tanto dentro como sobre la superficie de los esporos o conidios y en consecuencia, la vía respiratoria podría ser potencialmente más peligrosa que la digestiva. Este hecho se ve agravado porque cuando las MTX son inhaladas, la dosis requerida para causar un efecto particular es un orden de magnitud menor que cuando es administrada a través del tracto digestivo ¹⁷.

Si bien los estudios de incidencia de hongos toxicogénicos en hierbas medicinales no son demasiados, existen algunos informes que vale la pena comentar. Por ejemplo, la presencia de *A. flavus* Link y/o sus toxinas (aflatoxinas), termoestables y resistentes a la desecación, ha sido demostrada como uno de los hallazgos más frecuentes en hierbas medicinales ^{15,18-20}; Tantaoui-Elaraki *et al.* demostraron que, a pesar de que *A. ochraceus* K. Wilh. estaba en menor concentración, más del 50% de las cepas eran productoras de ocratoxina A (OTA) ¹⁵.

Coincidentemente con lo demostrado por otros autores en este trabajo se detectaron, además de las especies de *Aspergillus* ya nombradas, *A. niger* Tiegh. nom. Cons ^{19, 20}, *A. fumigatus* Fresen. ²⁰ y *A. candidus* Link ²⁰.

A. niger Tiegh. nom. cons. usualmente es considerado como un hongo benigno; sin embargo, su capacidad de producir OTA supone un riesgo inesperado para la salud humana y animal, puesto que es una especie ampliamente utilizada en la industria alimenticia y posee el status GRAS ("generally recognized as safe") de la FDA ^{5,21}. También ha sido descrito ²² como productor de malformina, toxina de reconocida actividad antibiótica y citotóxica.

A. fumigatus Fresen produce toxinas del grupo tremorgénico y gliotoxina. Poco ha sido publicado sobre la importancia de estas toxinas en los alimentos. Sin embargo, la gliotoxina es importante en la invasión de los pulmones de animales y pájaros ^{5, 23}.

Cepas de *A. terreus* Thom, *A. niveus* Blochwitz y *A. oryzae* (Ahlburg) Cohn han sido descritas como productoras de citrinina ⁴.

Eurotium amstelodami L. Mangin, detectado únicamente en malva, se considera, al igual que la mayoría de las especies de ese género, como un hongo benigno ⁵.

La presencia del resto de los géneros identificados, coincide con lo descrito por otros autores: *Penicillium* ¹⁸⁻²⁰, *Scopulariopsis* (sólo se aisló de ruda) ^{19, 20}, *Fusarium* ¹⁸⁻²⁰, *Cladosporium* ^{19,20}, *Alternaria* ^{19,20}, *Curvularia* (identificado en boldo) ^{19,20} y *Mucor* ^{19,20}.

CONCLUSIONES

Todas las muestras estudiadas presentaron desarrollo de microorganismos. Existió gran variabilidad en cuanto a la carga microbiana y tipo de microorganismos presentes. No obstante, no se detectó *Escherichia coli* en ninguna de las muestras analizadas.

La contaminación fúngica detectada podría implicar un riesgo para la salud, aún cuando sus recuentos se encuentren dentro de los límites permitidos, ya que las especies fúngicas presentes y/o sus metabolitos pueden ser inhalados y/o ingeridos, ocasionando cuadros alérgicos, ETA o infecciones sistémicas.

Los resultados obtenidos ponen en evidencia deficiencias en la calidad higiénico-sanitaria de las muestras analizadas.

Agradecimientos. Este trabajo se enmarcó dentro de un proyecto CAI+D subsidiado con fondos de la Universidad Nacional del Litoral.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Sesia, P. (1992) "*Medicina tradicional, herbolaria y salud*", CIESAS, México (IWO).
2. Acosta de la Luz, L. (1998) "*Las plantas aromáticas y medicinales, alternativa terapéutica y socioeconómica de los países en desarrollo*". Universidad de la Habana. Cuba, en línea, disponible en: <http://www.herbotecnia.com.ar/c-articu-005.html>.
3. Alonso, J.R. (1998) "*Tratado de fitomedicina. Bases clínicas y farmacológicas*", ISIS Ed., Buenos Aires.
4. Yoshizawa, T (2000) "General view on Mycotoxins", en "*Micotoxin inspection in food. Textbook for group training course*" (Hyogo International Centre, ed.), Japan International Cooperation Agency, págs.1-40.
5. Pitt, J.I. & A.D. Hocking (1999) "*Fungi and food spoilage*", Aspen Publishers Inc., Gaithersburg, Maryland.
6. Guarro, J. & A.M.Stchigel (1999) *Clin. Microbiol. Rev.* **12**: 454-500.
7. ANMAT (1999) "*Disposición 2673/99*". República Argentina.
8. Anderson Del Rosario, P. (1992) "*Microbiología alimentaria. Metodología analítica para alimentos y bebidas*", Ed. Díaz de Santos S.A., España.
9. Mac Faddin, J.F. (1980) "*Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*", Ed. Médica Panamericana S.A., Buenos Aires.
10. Koneman, E.W., S.D. Allen, W.M. Janda, P.C. Schreckenberger & W.C. Winn Jr (1997) "*Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*", Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.

11. Piontelli, E. (1998) *"Introducción al estudio de los hongos de importancia médico-veterinaria. Conceptos ecológicos y taxonómicos básicos"*, Cátedra de Micología, Escuela de Medicina. Universidad de Valparaíso, Chile.
12. Raper, K.B. & D.L. Fennell (1965) *"The genus Aspergillus"*, Williams and Wilkins Co., Baltimore.
13. Agnese, M., S. Montoya Núñez, G., Ortega, M. Casado & J. Cabrera (2001) *"Aspectos regulatorios sobre medicamentos fitoterápicos. Farmacognosia"*, Boletín informativo N° 10, Departamento de Farmacia. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.
14. Pafumi, J. (1986) *J. Food Protection* **49**: 958-63.
15. Tantaoui-Elaraki, A. & Bartine, H. (1994) *Microbiologie-Aliments-Nutrition* **12**: 211-16.
16. Kubheka, L.C., Mosupye, F.M. & A. Von Holy (2001) *Food Control* **12**: 127-31.
17. Piecková, E. & Z. Jesenská (1999) *Ann. Agric. Environ. Med.* **6**: 1-11.
18. Abeywickrama, K. & G.A. Bean (1991) *Mycopathologia* **113**: 187-90.
19. Asís, N.H., Y.A. Youssef, M.Z. El-Fouly & L.A. Moussa (1998) *Bol. Bull. Acad. Sin.* **39**: 279-85
20. García, S., F. Iracheta, F. Galván & N. Heredia (2001) *J. Food Protection* **64**: 99-103.
21. Abarca, M.L., M.R. Bragulat, G. Castellá, F. Accensi & F.J. Cabañes (2000) *Rev. Iberoam. Micol.* **17**: S63-S68.
22. Cole, R. & R. Cox (1981) *"Handbook of toxic fungal metabolites"*, Academic Press, New York.
23. Ramo Moreno, C., S.E. Martínez Valdés & A.R. Olivares Cervantes (2002) *Téc. Pecú Méx.* **40**: 139-48, en línea, disponible en: <http://www.tecnicapecuaria.org/trabajos/200212173831.pdf>