



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**CUANTIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE  
AFLATOXINAS EN HÍGADO, MOLLEJA Y  
PECHUGA DE GALLINA DE POSTURA.**

**TESIS**

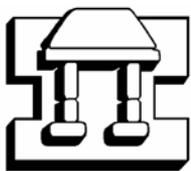
Que para obtener el grado académico de

**LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

presenta

**MARIANA DÍAZ ZARAGOZA**

2007



IZTACALA



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**CUANTIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE  
AFLATOXINAS EN HÍGADO, MOLLEJA Y  
PECHUGA DE GALLINA DE POSTURA.**

**TESIS**

Que para obtener el grado académico de

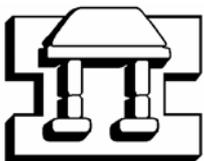
**LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

presenta

**MARIANA DÍAZ ZARAGOZA**

**2007**

**DIRECTORA DE TESIS: DRA. MAGDA CARVAJAL MORENO**



**IZTACALA**

**Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla.**

## DEDICATORIA

*Con mucho amor y cariño a mis padres...*

### **Mariano y Beatriz**

No sólo les dedico mi trabajo de tesis, les dedico los logros acumulados cada día de mi vida y carrera.

**Papá** a tí que me enseñaste que todo objetivo de trabajo, así sea minúsculo, se puede alcanzar aunque las herramientas no sean las adecuadas para hacerlo, sólo debo tener fuerza, razonamiento y sed de triunfar en la vida. A tí, que no te ha importado trabajar y sufrir cansancio, mientras sabes y sientes que Mamá, Alex, José y yo nos encontramos bien. Gracias, soy muy feliz bajo tu protección.

**Mamá**, qué haría sin tí, tú eres el mejor ejemplo de vida a seguir que he tenido, la mujer que nunca se vence, que nunca da marcha atrás después de dar el primer paso hacia el éxito, la esposa que trabaja, de igual manera que Papá, para apoyar a sus hijos. A tí, que siempre has velado por mi bienestar y educación. Gracias por estar siempre a mi lado y darme ánimo para luchar día a día.

A los dos, porque con su ejemplo me han inculcado que sí se puede, me han aconsejado lo mejor posible para seguir adelante y me han enseñado a luchar y trabajar para alcanzar mis objetivos. Gracias porque me han dado todo para ser feliz.

*Por eso y mucho más...*

*...los amo.*

A mis hermanos **José y Alex**.

Al Señor Silverio<sup>†</sup>, que despertó en mí la valentía que me hacía falta para luchar por la excelente decisión de estudiar y recorrer el camino de la biología.

Al profesor que me instruyó que el razonamiento es la herramienta elemental para la adquisición de nuevos conocimientos. Sobre todo, porque me hizo ver que el amor hacia los demás, la sinceridad y la humildad, son valores muy importantes que ningún ser humano debe perder aunque llegue a la cima del éxito, al Dr. Elías Piedra Ibarra.

A mis amigos que durante la carrera estuvieron en las buenas y en las malas junto a mí. Siempre los recordaré y llevaré en mi corazón a pesar del tiempo y la distancia: Erika, Jovana, Lolita, Luisa, Maricela, Rosita y Fernando Niño.

A Dios como pago por la oportunidad de vivir. Ser en el que necesito creer para vencer los obstáculos que se interponen en el camino de la vida.

## AGRADECIMIENTOS

## **A las Personas**

A la Dra. Magda Carvajal, por dirigir mi tesis de licenciatura, apoyarme para su realización e incorporarme a su proyecto de investigación y al laboratorio de Micotoxinas del Instituto de Biología, UNAM. Gracias por enriquecer el proyecto con sus conocimientos y comentarios para hacerlo un trabajo de excelente calidad. Gracias porque siempre tuvo tiempo y respuestas a mis dudas durante este proyecto, pero sobre todo gracias por ser una persona con una calidez humana extraordinaria.

A mis Sinodales del Jurado por la revisión de esta tesis:

Dr. César Mateo Flores Ortiz.  
Biól. Luis Barbo Hernández Portilla.

Dr. Elías Piedra Ibarra.  
M. en C. Gabriel Camarena Gutiérrez

Al Dr. Ignacio Méndez por los análisis estadísticos de alta calidad que realizó con mis datos.

Al MVZ. Ernesto Ávila González por apoyar, en la realización del experimento de aflatoxinas en gallinas, con las instalaciones del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola (CEIEPA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM en Tláhuac, Distrito Federal.

A la Bióloga Nahlleli Civi Chilpa por su ayuda en la obtención de las muestras.

A los profesores Dr. Elías Piedra Ibarra, MC. Rafael Quintanar Zúñiga, MC. Josefina Vázquez Medrano y Dr. César Mateo Flores Ortiz que laboran en el laboratorio de Fisiología Vegetal, Unidad de Biotecnología y Prototipos de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM por su apoyo para mi incorporación al laboratorio de Micotoxinas de IB-UNAM.

## **A las Instituciones**

Al Instituto de Biología por las facilidades en infraestructura, materiales y equipo para la elaboración de mi tesis de licenciatura.

A la Dirección General de Asuntos de Personal Académico (DGAPA) por el financiamiento del trabajo de investigación a través de su Programa de Apoyo de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), con el N° de Proyecto IN225105-2, y por la beca que me otorgó para la realización de esta tesis de Licenciatura.

# ÍNDICE

	CONTENIDO	Páginas
	DEDICATORIA.....	i
	AGRADECIMIENTOS.....	ii
	ÍNDICE.....	iii
	Lista de Cuadros.....	vi
	Lista de Figuras.....	ix
	RESUMEN.....	xii
	ABSTRACT.....	xiii
<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
	<b>I.1. Ganado avícola.....</b>	<b>1</b>
	I.1.1. Importancia de la avicultura en el mundo y en México.....	1
	I.1.2. Anatomía de pollos y gallinas.....	3
	I.1.3. Fisiología del hígado, molleja y pechuga.....	7
	I.1.4. Tipo de alimentación.....	9
	I.1.5. Riesgo de contaminación del alimento por hongos.....	10
	I.1.6. Pérdidas económicas debidas a contaminación por aflatoxinas	11
	<b>I.2. Las aflatoxinas.....</b>	<b>12</b>
	I.2.1. Su importancia en aves de corral.....	12
	I.2.2. Definición.....	13
	I.2.3. Estructura química.....	14
	I.2.4. Propiedades fisicoquímicas (OPS, 1983).....	14
	I.2.5. Biosíntesis.....	15
	I.2.6. Ocurrencia natural.....	18
	I.2.7. Presencia de aflatoxinas en alimentos de aves.....	19
	<b>I.3. Efectos de las aflatoxinas en pollos y gallinas.....</b>	<b>20</b>
	I.3.1. Efectos en hígado.....	20
	I.3.2. Efectos en molleja.....	21
	I.3.3. Efectos en pechuga.....	22
	<b>I.4. Métodos de control.....</b>	<b>23</b>
<b>II.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>
	<b>II.1. General.....</b>	<b>24</b>
	<b>II.2. Particulares.....</b>	<b>24</b>
<b>III.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
	<b>III.1. Diseño experimental.....</b>	<b>25</b>
	III.1.1. Composición del alimento de las gallinas.....	27
	<b>III.2. Análisis químico.....</b>	<b>27</b>
	III.2.1. Comparación de dos métodos químicos (Qian & Yang, 1984 y Koeltzow & Tanner, 1990) para el análisis de AFB <sub>1</sub> en tejidos de gallina.....	27
	III.2.2. Porcentaje de recuperación <i>in vitro</i> de la AFB <sub>1</sub> en tejidos de gallina para valorar los métodos químicos.....	28

<b>ÍNDICE (continuación)</b>		<b>Páginas</b>
III.2.2.1.	Fortificación de los tejidos animales con AFB <sub>1</sub> .....	28
III.2.2.2.	Técnica de Qian & Yang (1984) para la extracción rápida y detección de aflatoxinas en hígado.....	28
III.2.2.3.	Técnica de Koeltzow & Tanner (1990) para la extracción de aflatoxinas, de un gramo de tejido animal, y su concentración con columnas de inmunoafinidad.....	29
III.2.3.	Extracción de aflatoxinas de los tejidos del experimento.....	30
III.2.3.1.	Extracción rápida y detección de aflatoxinas en los hígados, mollejas y pechugas del experimento por el método de Qian & Yang (1984).....	30
III.2.3.2.	Método de extracción de aflatoxinas de los hígados, mollejas y pechugas del experimento concentradas con columnas de inmunoafinidad (Koeltzow & Tanner, 1990).....	31
<b>III.3.</b>	Cuantificación por cromatografía de líquidos de alta resolución.....	32
III.3.1.	Aparatos.....	32
III.3.2.	Reactivos.....	32
III.3.2.1.	Solución isocrática.....	32
III.3.2.2.	Solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS).....	32
<b>III.4.</b>	Proceso.....	33
III.4.1.	Medición de un microgramo (µg/kg) de AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub> , AFM <sub>1</sub> , AFM <sub>2</sub> , AFP <sub>1</sub> y AFL por espectrofotometría.....	33
III.4.2.	Curva de calibración con las diluciones de las aflatoxinas.....	34
<b>III.5.</b>	Metodología del Análisis Estadístico.....	34
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	36
<b>IV.1.</b>	Diseño experimental.....	36
<b>IV.2.</b>	Curvas de calibración de aflatoxinas.....	37
a)	Curva de calibración de AFB <sub>1</sub> . .....	37
b)	Curva de calibración de AFB <sub>2</sub> .....	38
c)	Curva de calibración de AFG <sub>1</sub> .....	39
d)	Curva de calibración de AFG <sub>2</sub> .....	40
e)	Curva de calibración de AFM <sub>1</sub> .....	41
f)	Curva de calibración de AFM <sub>2</sub> .....	42
g)	Curva de calibración de AFP <sub>1</sub> .....	43
h)	Curva de calibración de AFL.....	44
<b>IV.3.</b>	Comparación de los porcentajes de recuperación de los dos métodos químicos para el análisis de AFB <sub>1</sub> en tejidos de aves.....	46
IV.3.1.	Adición de AFB <sub>1</sub> (Fortificación) de los tejidos de aves y su porcentaje de recuperación para la comparación y valoración de las técnicas.....	46
IV.3.2.	Método de Qian & Yang (1984), para la extracción rápida y detección de aflatoxinas en los hígados, mollejas y pechugas para obtener el porcentaje de recuperación.....	46

<b>ÍNDICE (continuación)</b>		<b>Páginas</b>
IV.3.3.	Método de Koeltzow & Tanner (1990) para la extracción y concentración de aflatoxinas de tejido animal, por columnas de inmunoafinidad para obtener el porcentaje de recuperación.....	50
IV.3.4.	Cuantificación de aflatoxinas en los tejidos de gallina del experimento por método de Qian & Yang (1984).....	51
a.1.	Cuantificación de aflatoxinas en hígados de gallinas del experimento con método de Qian & Yang (1984).....	51
a.2.	Resultados del Análisis Estadístico de la presencia de aflatoxinas en hígado por el método de Qian & Yang (1984).....	63
b.1.	Resultados de la cuantificación de aflatoxinas en mollejas de gallinas del experimento.....	75
b.2.	Resultados del Análisis Estadístico de la cuantificación de aflatoxinas en molleja por el método de Qian & Yang, 1984.....	83
c.1.	Resultados de la cuantificación de aflatoxinas en pechugas de gallinas del experimento.....	88
c.2.	Resultados del Análisis Estadístico de aflatoxinas en pechuga por el método de Qian & Yang (1984).....	97
IV.3.5.	Cuantificación de aflatoxinas en los tejidos de gallina del experimento con método de Koeltzow & Tanner (1990).....	112
a.1.	Resultados de la cuantificación de aflatoxinas ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) de los hígados de gallina del experimento con el método de Koeltzow & Tanner (1990).....	113
a.2.	Resultados del Análisis Estadístico de los hígados de gallina con el método de Koeltzow & Tanner (1990).....	114
b.1.	Resultados de la cuantificación de aflatoxinas ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) de las mollejas de las gallinas del experimento con el método de Koeltzow & Tanner (1990).....	116
b.2.	Resultados del Análisis Estadístico de las mollejas de gallina con método de Koeltzow & Tanner (1990).....	117
c.	Cuantificación de aflatoxinas ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) de pechugas de gallinas del experimento con método de Koeltzow & Tanner (1990).....	119
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	130
<b>VI.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	131

## LISTA DE CUADROS

CONTENIDO		Páginas
1.	Experimento sobre la adición de la AFB <sub>1</sub> al alimento de las gallinas, el peso inicial de las mismas, y el tipo de tratamiento.....	26
2.	Ingredientes de la fórmula para preparar una tonelada de alimento base para las gallinas.....	27
3.	Pesos moleculares y coeficientes de extinción de cada aflatoxina.....	34
4.	Experimento sobre el paso de la AFB <sub>1</sub> de alimento a tejidos de gallina.....	36
5.	Resumen de los tiempos de retención cromatográficos de las aflatoxinas, bajo las condiciones experimentales.....	37
6.	Resultados de la curva de calibración de AFB <sub>1</sub> .....	38
7.	Resultados de la curva de calibración de AFB <sub>2</sub> .....	39
8.	Resultados de la curva de calibración de AFG <sub>1</sub> .....	40
9.	Resultados de la curva de calibración de AFG <sub>2</sub> .....	41
10.	Resultados de la curva de calibración de AFM <sub>1</sub> .....	42
11.	Resultados de la curva de calibración de AFM <sub>2</sub> .....	43
12.	Resultados de la curva de calibración de AFP <sub>1</sub> .....	44
13.	Resultados de las curva de calibración de AFL.....	45
14.	Recuperación de AFB <sub>1</sub> de los extractos de hígado fortificados por el método de Qian & Yang (1984).....	47
15.	Recuperación de AFB <sub>1</sub> de los extractos de molleja fortificados por el método de Qian & Yang (1984).....	48
16.	Recuperación de AFB <sub>1</sub> de los extractos de pechuga fortificados por el método de Qian & Yang (1984).....	49
17.	Cuantificación del extracto de hígado fortificado con AFB <sub>1</sub> (µg/kg), y concentrado en columnas de inmunoafinidad, por el método de Koeltzow & Tanner (1990).....	50
18.	Cuantificación del extracto de molleja fortificado con AFB <sub>1</sub> (µg/kg), y concentrado en columnas de inmunoafinidad por el método de Koeltzow & Tanner (1990).....	51
19.	Cuantificación del extracto de pechuga fortificado con AFB <sub>1</sub> (µg/kg), y concentrado en columnas de inmunoafinidad por el método de Koeltzow & Tanner (1990).....	51
20 a.	Cuantificación de aflatoxina (µg/kg) en los hígados de gallina del experimento por el método de Qian & Yang (1984).....	52
20 b.	Resumen de la cuantificación de aflatoxinas (µg/kg) en los hígados de gallina del experimento por el método de Qian & Yang (1984).....	62
21.	Resultados del Análisis Estadístico de la cuantificación de AFB <sub>1</sub> (µg/kg) en el hígado por el método de Qian & Yang (1984).....	66
22.	Resultados del Análisis Estadístico de la cuantificación de AFB <sub>2</sub> (µg/kg) en el hígado por el método de Qian & Yang (1984).....	67

**LISTA DE CUADROS (continuación)****Páginas**

23.	Resultados del Análisis Estadístico de la cuantificación de AFG <sub>1</sub> (µg/kg) en el hígado por el método de Qian & Yang (1984).....	69
24.	Resultados del Análisis Estadístico de la cuantificación de AFG <sub>2</sub> (µg/kg) en el hígado por el método de Qian & Yang (1984).....	70
25.	Resultados del Análisis Estadístico de la cuantificación de AFM <sub>1</sub> (µg/kg) en el hígado por el método de Qian & Yang (1984).....	71
26.	Resultados del Análisis Estadístico de la cuantificación de AFP <sub>1</sub> (µg/kg) en el hígado por el método de Qian & Yang (1984).....	73
27.	Resultados del Análisis Estadístico de la cuantificación de AFL (µg/kg) en el hígado por el método de Qian & Yang (1984).....	74
28 a.	Resultados de la cuantificación de aflatoxinas (µg/kg) en mollejas de gallina del experimento por el método de Qian & Yang (1984).....	76
28 b.	Resumen de la cuantificación de aflatoxinas (µg/kg) en las mollejas de gallina del experimento por el método de Qian & Yang (1984).....	82
29.	Resultados del Análisis Estadístico de la cuantificación de AFG <sub>1</sub> (µg/kg) en molleja por el método de Qian & Yang (1984).....	84
30.	Resultados del Análisis Estadístico de la cuantificación de AFG <sub>2</sub> (µg/kg) en molleja por el método de Qian & Yang (1984).....	86
31.	Resultados del Análisis Estadístico de la cuantificación de AFL (µg/kg) en molleja por el método de Qian & Yang (1984).....	87
32 a.	Resultados de la cuantificación de aflatoxinas (µg/kg) en pechuga de gallina del experimento por el método de Qian & Yang (1984).....	89
32 b.	Resumen de la cuantificación de aflatoxinas (µg/kg) en las pechugas de gallina del experimento por el método de Qian & Yang (1984).....	95
33.	Resultados del Análisis Estadístico de la cuantificación de AFB <sub>1</sub> (µg/kg) en pechuga por el método de Qian & Yang (1984).....	98
34.	Resultados del Análisis Estadístico de la cuantificación de AFG <sub>1</sub> (µg/kg) en pechuga por el método de Qian & Yang (1984).....	99
35.	Resultados del Análisis Estadístico de la cuantificación de AFG <sub>2</sub> (µg/kg) en pechuga por el método de Qian & Yang (1984).....	101
36.	Resultados del Análisis Estadístico de la cuantificación de AFM <sub>1</sub> (µg/kg) en pechuga por el método de Qian & Yang (1984).....	102
37.	Resultados del Análisis Estadístico de la cuantificación de AFP <sub>1</sub> (µg/kg) en pechuga por el método de Qian & Yang (1984).....	104
38.	Resultados del Análisis Estadístico de la cuantificación de AFL (µg/kg) en pechuga por el método de Qian & Yang (1984).....	105
39.	Resultados de la cuantificación de aflatoxinas (µg/kg) en hígado de gallinas del experimento por el método de Koeltzow & Tanner (1990).....	113
40.	Prueba no paramétrica de Wilcoxon/ Kruskal-Wallis para conocer las diferencias significativas entre los valores del grupo Control y los tratamientos de AFG <sub>1</sub> .....	114
41.	Resultados del análisis de presencia o ausencia, vía Cuadro de Contingencia de AFG <sub>1</sub> .....	115
42.	Resultados del Análisis Estadístico de la AFG <sub>2</sub> (µg/kg) de mollejas de las gallinas por el método de Koeltzow & Tanner (1990).....	115
43.	Resultados de la cuantificación de aflatoxinas (µg/kg) en mollejas de gallinas del experimento por el método de Koeltzow & Tanner (1990).....	116
44.	Resultados del Análisis Estadístico de la AFB <sub>1</sub> (µg/kg) de mollejas de gallinas por el método de Koeltzow & Tanner (1990).....	117

## LISTA DE CUADROS (continuación)

	<b>Páginas</b>
45. Resultados del Análisis Estadístico de la AFG <sub>1</sub> (µg/kg) de mollejas de gallinas por el método de Koeltzow & Tanner (1990).....	118
46. Resultados del Análisis Estadístico de la AFG <sub>2</sub> (µg/kg) de mollejas de gallinas por el método de Koeltzow & Tanner (1990).....	119
47. Resultados de la cuantificación de aflatoxinas (µg/kg) en pechugas de gallinas del experimento por el método de Koeltzow & Tanner (1990).....	120

## LISTA DE FIGURAS

CONTENIDO	Páginas
1. Anatomía externa de las gallinas. A) Cabeza. B) Plumaje que recubre el cuerpo. C) Zancas.....	3
2. Esqueleto de pollos y gallinas (Castelló <i>et al.</i> , 1989).....	5
3. Músculos superficiales de las gallinas (Castelló <i>et al.</i> , 1989).....	5
4. Vista ventral del hígado de gallina (Castelló <i>et al.</i> , 1989).....	7
5. Estómago de las gallinas. a) Aspecto externo y b) Aspecto interno del proventrículo y molleja (Giavarini, 1971).....	8
6. Aparato digestivo de la gallina, A. Aislado (Card, 1966) B. Disposición topográfica desde el lado izquierdo (Bradley, 1960).....	9
7. Distintas aflatoxinas producidas por especies de <i>Aspergillus</i> (Sweeney & Dobson, 1999).....	14
8. Ruta biosintética de las aflatoxinas.....	17
9. Ruta de biotransformación de AFB <sub>1</sub> (Eaton <i>et al.</i> , 1994 b).....	18
10. Hígado dañado por la contaminación con AFB <sub>1</sub> . A) Hígado control sano, B) Hígado con trazas de AFB <sub>1</sub> , C) Hígado con dosis altas de AFB <sub>1</sub> y mayor decoloración.....	21
11. Hifas del hongo <i>Aspergillus flavus</i> saliendo de aberturas de la molleja.....	22
12. Hemorragias causadas por AFB <sub>1</sub> en pechuga de gallina. A) Con piel. B) Sin piel.....	22
<b>13- 20 Curvas de calibración para:</b>	
13. AFB <sub>1</sub> de 7.8 a 500 µg/kg.....	38
14. AFB <sub>2</sub> de 7.8 a 1000 µg/kg.....	39
15. AFG <sub>1</sub> de 15.6 a 1000 µg/kg.....	40
16. AFG <sub>2</sub> de 7.8 a 1000 µg/kg.....	41
17. AFM <sub>1</sub> de 62.5 a 1000 µg/kg.....	42
18. AFM <sub>2</sub> de 62.5 a 1000 µg/kg.....	43
19. AFP <sub>1</sub> de 15.6 a 1000 µg/kg.....	44
20. AFL de 7.8 a 1000 µg/kg.....	45
21. Cromatogramas de las aflatoxinas encontradas en los hígados de gallinas del grupo Control alimentadas con sorgo sin AFB <sub>1</sub> .....	54-56
22. Cromatogramas de las aflatoxinas encontradas en los hígados de gallinas alimentadas con sorgo contaminado con 30 µg/kg de AFB <sub>1</sub> .....	57-59
23. Cromatogramas de las aflatoxinas encontradas en hígados de gallinas alimentadas con sorgo contaminado con 500 µg/kg de AFB <sub>1</sub> .....	60-61
24. Análisis de Varianza e interacción de los valores transformados de la AFG <sub>1</sub> entre la 1ª y 2ª columna LC-18 del análisis químico de hígado.....	64
25. Análisis de Varianza e interacción de los valores transformados de la AFG <sub>2</sub> entre la 1ª y 2ª columnas LC-18 del análisis de AF de hígado.....	65
26. Comparación de las mediciones promedio de AFB <sub>1</sub> (µg/kg) encontradas por hígado de gallina.....	67

<b>LISTA DE FIGURAS (Continuación)</b>		<b>Páginas</b>
27.	Comparación de las mediciones promedio de AFB <sub>2</sub> (µg/kg) encontradas por hígado de gallina.....	68
28.	Comparación de las mediciones promedio de AFG <sub>1</sub> (µg/kg) encontradas por hígado de gallina. ....	70
29.	Comparación de las mediciones promedio de AFG <sub>2</sub> (µg/kg) encontradas en el hígado de gallina. ....	71
30.	Comparación de las mediciones promedio de AFM <sub>1</sub> (µg/kg) encontradas en el hígado de gallina. ....	72
31.	Comparación de las mediciones promedio de AFP <sub>1</sub> (µg/kg) encontradas en el hígado por gallina.....	74
32.	Comparación de las mediciones promedio de AFL (µg/kg) encontradas en hígado por gallina.....	75
33.	Cromatogramas de las aflatoxinas encontradas en mollejas de gallinas alimentadas con sorgo sin contaminación de AFB <sub>1</sub> o sea grupo Control.....	77-78
34.	Cromatogramas de las aflatoxinas encontradas en mollejas de gallinas alimentadas con sorgo contaminado con 30 µg/kg de AFB <sub>1</sub> .....	79-80
35.	Cromatogramas de las aflatoxinas encontradas en mollejas de gallinas alimentadas con sorgo contaminado con 500 µg/kg de AFB <sub>1</sub> .....	81
36.	Comparación de las mediciones promedio de AFG <sub>1</sub> (µg/kg) encontradas en la molleja por gallina.....	85
37.	Comparación de las mediciones promedio de AFG <sub>2</sub> (µg/kg) encontradas en molleja por gallina.....	87
38.	Comparación de las mediciones promedio de AFL (µg/kg) encontradas en molleja por gallina.....	88
39.	Cromatogramas de las aflatoxinas encontradas en pechugas de gallina alimentadas con sorgo sin AFB <sub>1</sub> ó del grupo Control.....	90-91
40.	Cromatogramas de las aflatoxinas encontradas en pechugas de gallinas alimentadas con sorgo contaminado con 30 µg/kg de AFB <sub>1</sub> .....	92-93
41.	Cromatogramas de las aflatoxinas encontradas en pechugas de gallinas alimentadas con sorgo contaminado con 500 µg/kg de AFB <sub>1</sub> .....	93-94
42.	Comparación de las mediciones promedio de AFB <sub>1</sub> (µg/kg) encontradas en la pechuga por gallina.....	99
43.	Comparación de las mediciones promedio de AFG <sub>1</sub> (µg/kg) encontradas en la pechuga por gallina.....	100
44.	Comparación de las mediciones promedio de AFG <sub>2</sub> (µg/kg) encontradas en la pechuga por gallina.....	102
45.	Comparación de las mediciones promedio de AFM <sub>1</sub> (µg/kg) encontradas en la pechuga por gallina.....	103
46.	Comparación de las mediciones promedio de AFP <sub>1</sub> (µg/kg) encontradas en la pechuga por gallina. ....	105
47.	Comparación de las mediciones promedio de AFL (µg/kg) encontradas en la pechuga por gallina. ....	106
48.	Cantidades promedio de las aflatoxinas identificadas en los hígados del grupo Control y los tratamientos con 30 y 500 µg/kg de AFB <sub>1</sub> .....	108
49.	Cantidades promedio de las aflatoxinas identificadas en las mollejas del grupo Control y los tratamientos con 30 y 500 µg/kg de AFB <sub>1</sub> .....	110
50.	Cantidades promedio de las aflatoxinas identificadas en las pechugas del grupo Control y los tratamientos con 30 y 500 µg/kg de AFB <sub>1</sub> .....	111

**LISTA DE FIGURAS (Continuación)**

**Páginas**

51. Hígados de gallina del experimento realizado con alimento contaminado por una semana. **A:** Hígado control, nótese zonas de color rojo claro sobre el fondo guinda que indica contaminación basal por AF. **B:** Hígado de gallina que ingirió alimento con 30 µg/kg de AFB<sub>1</sub> y **C:** Hígado de gallina que ingirió alimento con 500 µg/kg de AFB<sub>1</sub>.....

126

## RESUMEN

Las aflatoxinas (AF) son metabolitos secundarios producidos por los hongos *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius* que resultan ser contaminantes naturales y peligrosos de diversos granos de cereal como son el maíz y el sorgo, y representan un gran riesgo para la salud humana y animal. Existen cuatro AF principales: AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> y AFG<sub>2</sub>, de las cuales la AFB<sub>1</sub> es la que presenta mayor toxicidad, además es un potente mutágeno y cancerígeno. Estas micotoxinas se consideran las más importantes en la industria avícola, dado que ocasionan pérdidas económicas significativas cuando las aves de corral consumen granos contaminados con AF. El objetivo de esta investigación fue cuantificar e identificar las AF presentes en hígado, molleja y pechuga de gallina de postura, y determinar su método químico de extracción y purificación adecuado. Se utilizaron 25 gallinas raza Hi/Line W36, 121 semanas de edad en segundo ciclo de producción, las cuales fueron distribuidas al azar en tres grupos y colocadas en jaulas individuales. El grupo control constó de 9 gallinas alimentadas con 2 kg diarios de sorgo molido y homogeneizado sin contaminación con AFB<sub>1</sub>. Además hubo dos grupos experimentales de 8 gallinas cada uno, que fueron alimentados con sorgo contaminado con AFB<sub>1</sub>, ya sea en dosis baja (30 µg/kg) ó alta (500 µg/kg). Después de una semana, las gallinas se sacrificaron por dislocación cervical, se les extrajo el hígado, pechuga y molleja. La extracción de las AF se realizó por la Técnica propuesta por Qian & Yang (1984) y por el Método químico de Koeltzow & Tanner (1990) con columnas de inmunoafinidad. La cuantificación de las AF fue determinada por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). De los 3 órganos estudiados, el hígado presentó mayor contaminación y número de AF identificadas, quedando la pechuga y la molleja en segundo y tercer lugar, respectivamente. En el hígado se encontraron AFB<sub>1</sub> (0.7-9.7 µg/kg), AFB<sub>2</sub> (0.06-0.6 µg/kg), AFG<sub>1</sub> (78.7-121.0 µg/kg), AFG<sub>2</sub> (16.2-18.7 µg/kg), AFM<sub>1</sub> (10.3-591.8 µg/kg), AFP<sub>1</sub> (96.2-771.3 µg/kg) y AFL (4.8-12.6 µg/kg), de las cuales AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, AFM<sub>1</sub> y AFP<sub>1</sub> presentaron mayor cantidad. La pechuga fue el segundo tejido en cuanto a contaminación y variedad de AF encontradas, en este tejido se identificaron cantidades pequeñas AFB<sub>1</sub> (18.0 µg/kg), y altas cantidades de AFG<sub>1</sub> (16.1-512.4 µg/kg), AFG<sub>2</sub> (1.4-71.7 µg/kg), AFM<sub>1</sub> (51.9-4,774.6 µg/kg), y AFP<sub>1</sub> (78.9-660.5 µg/kg). El tejido con menor contaminación de los tres analizados fue la molleja, en ella se identificaron trazas de AFG<sub>2</sub> (1.4-1.7 µg/kg), y cantidades altas de AFG<sub>1</sub> (482.3-740.8 µg/kg) y AFL (68.5-456.1 µg/kg). La determinación del método químico adecuado para la cuantificación de AF se estableció al hacer el porcentaje de recuperación de ambos métodos. En ambos métodos químicos se obtuvo un porcentaje de recuperación aceptable, más del 80%, sin embargo, el método de Qian & Yang (1984) posee un límite de detección más bajo, de 0.5 ng/mL, mientras el límite de detección en el método Koeltzow & Tanner (1990) fue de 5 ng/mL para hígado, 2 ng/mL para molleja y 1 ng/mL para pechuga. Se concluye que el mejor método químico fue el de Qian & Yang (1984) para la cuantificación de AF en tejidos de ave, sin embargo, requiere de una modificación para poder llegar a una recuperación de 80% a 90%, la cual consiste en sumar los eluidos de ambas columnas Supelclean LC-18 SPE.

Palabras Clave: Aflatoxinas, Gallinas de postura, Hígado, Molleja, Pechuga.

## ABSTRACT

Aflatoxins (AF) are secondary metabolites produced by strains of the fungi *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* and *A. nomius*, and they turn out to be a natural and dangerous contaminant of several cereal grains such as maize and sorghum. They are a great risk for both human and animal health. There are four important AF: AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> and AFG<sub>2</sub>, from which AFB<sub>1</sub> is the most toxic, and it is considered a potent mutagen and carcinogen. AF are the most important mycotoxins in the broiler industry because they cause great economic losses, when poultry are fed with contaminated grains. The aim of this research was to quantify and identify AF in liver, gizzard and breast of laying hen, and determine the best chemical method for their AF detection. A total of 25 laying hens of 121-week old in a second cycle of egg production, were distributed at random in three experimental groups and placed in individual cages. The control group had 9 hens fed with 2 kg of milled and homogenized clean sorghum, without AFB<sub>1</sub>, every day for one week; and of two treated groups of 8 hens each, fed with contaminated sorghum with a low (30 µg/kg) or a high (500 µg/kg) AF doses. After a week, the hens were killed by cervical dislocation and each liver, gizzard and breast were removed. The extraction method for AF was the one proposed by Qian & Yang (1984), and the chemical method with immunoaffinity columns given by Koeltzow & Tanner (1990). The quantification of AF was achieved by high-performance liquid chromatography (HPLC). The liver was the tissue with higher contamination and number of identified AF, being the breast and the gizzard in second and third places, respectively. The livers had AFB<sub>1</sub> (0.7-9.7 µg/kg), AFB<sub>2</sub> (0.06-0.6 µg/kg), AFG<sub>1</sub> (78.7-121.0 µg/kg), AFG<sub>2</sub> (16.2-18.7 µg/kg), AFM<sub>1</sub> (10.3-591.8 µg/kg), AFP<sub>1</sub> (96.2-771.3 µg/kg) and AFL (4.8-12.6 µg/kg), from which AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, AFM<sub>1</sub> and AFP<sub>1</sub> were obtained in greater amount. The breast was the second tissue as far as AF contamination found. The breast had small amounts of AFB<sub>1</sub> (18.0 µg/kg), and it had high amounts of AFG<sub>1</sub> (16.1-512.4 µg/kg), AFG<sub>2</sub> (1.4-71.7 µg/kg), AFM<sub>1</sub> (51.9-4,774.6 µg/kg), and AFP<sub>1</sub> (78.9-660.5 µg/kg). The gizzard was the organ with less AF contamination. The mycotoxins present in the gizzard were AFG<sub>2</sub> (1.4-1.7 µg/kg) in low amount, and AFG<sub>1</sub> (482.3-740.8 µg/kg) and AFL (68.5-456.1 µg/kg) in higher quantities. The determination of the appropriate chemical method for the quantification of AF settled down when the percentage of recovery of both methods was made. In both chemical methods around 80% of recovery was obtained which is an acceptable recovery. Nevertheless, the method of Qian & Yang (1984) had a lower limit of detection (0.5 ng/mL), while the limit of detection in the chemical method with immunoaffinity columns was of 5 ng/mL for liver, 2 ng/mL for gizzard and 1 ng/mL for chicken breast. In conclusion, the best chemical method for the quantification of AF, was the proposed by Qian & Yang (1984), however, it requires a modification to obtain a recovery of 80 to 90%, which consists of the addition of both AF elutions, from the first and second Supelclean LC-18 SPE columns.

Keywords: Aflatoxins, laying hens, liver, gizzard, breast.

## **I. INTRODUCCIÓN**

### **I.1. Ganado avícola.**

#### **I.1.1. Importancia de la avicultura en el mundo y en México.**

La industria avícola es la rama de la ganadería que estudia a las aves desde el punto de vista económico, ya sea como alimento u ornato, trata de su procesamiento junto con sus derivados (plumas, carne, huevo, etc.), de su reproducción, crecimiento, alimentación y enfermedades para dar a los consumidores productos alimenticios nutritivos (huevos y carne) de calidad superior y de un costo razonable (Jull, 1953).

Los ganados más importantes utilizados para la alimentación son el vacuno, porcino y aviar, pero desde el punto de vista del aporte de proteínas, minerales y vitaminas, las aves son más eficientes para transformar a los alimentos en huevos y carne (Jull, 1953).

La importancia de la avicultura ha ido en aumento en los últimos 25 años, ya que requiere de la generación de muchos empleos para una explotación comercial extensiva, que es la forma de abaratar el producto, ya sea huevo o carne.

En estudios realizados por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), existen de 10,000-10,500 millones de gallinas a nivel mundial (incluyendo gallinas explotadas en sistemas intensivos, extensivos y/o semiextensivos, reposición y desvieje), y la producción anual de huevos para consumo se sitúa oficialmente alrededor de los 48.5-50 millones de toneladas (Buxadé, 2000).

La producción avícola representa alrededor del 4 % de la producción mundial de alimentos de origen animal. Asia, con casi 7,000 millones de gallinas ponedoras (69 %), se constituye en el área más importante, seguida por Europa con 1,400 millones de gallinas, con un 14 % del total (Buxadé, 2000). En un nivel de producción global mundial, Asia, ocupa el primer lugar (56 %), después Europa (19.5 %) Estados Unidos de Norteamérica (14.5 %), Sudamérica (5.6 %), África (3.7%) y por último Oceanía (0.5%) (Trujillo, 2003).

El desarrollo de la actual producción avícola en general y de la avicultura de postura en particular, puede contribuir a resolver la hambruna mundial, ya que el incremento de la población mundial es preocupante. La población mundial actual es

de 6,100 millones de personas y se calcula que para el año 2050 podría aumentar en un 50%, y alcanzar la cifra de 9,300 millones de habitantes (ONU, 2002), presentando dificultades técnicas, de organización y de estructura para ofrecer suficientes alimentos a los pueblos sub-desarrollados principalmente.

En México la avicultura ha sido una de las actividades que más desarrollo ha tenido desde hace 25 años (Alonso & Domínguez, 1997), representando el 57% del consumo de proteína animal en la dieta. Este desarrollo se ha dado porque las aves producen proteínas animales de bajo costo. En 2005, México contó con una parvada de más de 130 millones de gallinas ponedoras, 243 millones de pollos y 865 mil pavos por ciclo que representan un 5.4 % de la producción mundial (UNA, 2005).

La avicultura mexicana en 2005, aportó el 0.76% en el Producto Interno Bruto (PIB) total, el 16.57% en el PIB agropecuario y el 44.17% en el PIB pecuario. También se produjeron cerca de 2.5 millones de toneladas de carne de pollo, muy por encima de las demás carnes, la producción de huevo fue de 2.3 millones de toneladas y la de pavo 13,840. De esta manera, el sector avícola mexicano participa con el 63.2% de la producción pecuaria nacional; 33% aporta la producción de pollo, 30.1% la producción de huevo y 0.20% la producción de pavo (UNA, 2005).

El 90% de la producción de carne de pollo durante 2004 se concentró en 10 estados del centro del país, de ellos Veracruz, Querétaro, Aguascalientes, Jalisco, y la Comarca Lagunera agrupan el 49% de la producción.

La comercialización de la carne de pollo en México se da por canal, tipo de presentación y distribución: vivo en 28%, rosticero 26%, mercados públicos 26%, en supermercados 7%, en partes el 10% y productos de valor agregado 4% (UNA, 2005). La carne de pollo y gallina, así como de huevo, son consumidos en gran cantidad por la población mexicana. Por lo que se refiere al pollo, México se ubica en el sexto lugar a nivel mundial registrando un consumo por persona cercano a los 24.2 kg (UNA, 2005).

La producción de huevo en los últimos 10 años creció a un ritmo anual de 4.1%. El 97% de la producción de huevo en México durante 2005, se produjo en 7 Estados localizados cerca de los centros de consumo, el 81% lo produjeron Puebla, Jalisco, Sonora y la Región Lagunera (UNA, 2005).

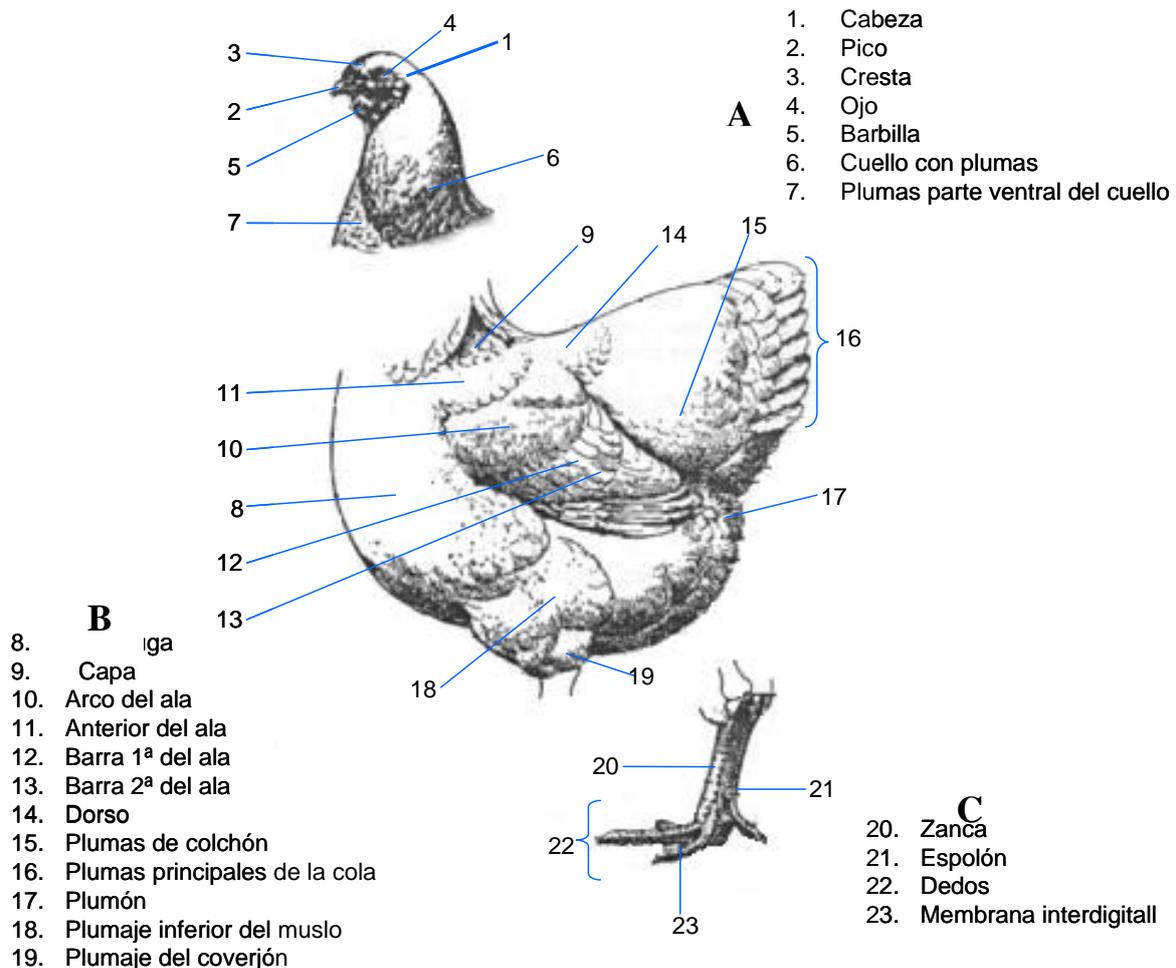
En México, las importaciones de huevo y sus productos de 2004 a 2005 se incrementaron en 40.6% en promedio anual, y nuestro país es el principal consumidor de huevo fresco en el mundo. En 2005 el consumo *per capita* de huevo

por habitante en México fue de 21.52 kg al año y en China de 20.11 kg (UNA, 2005). En el 2005, la avicultura generó 1,072,000 empleos, de los cuales 178,000 son directos y 892,000 indirectos, cabe destacar que el 60 % de los empleos los genera la rama avícola de pollo, el 38% la de huevo y sólo un 2% la de pavo.

### I.1.2. Anatomía de pollos y gallinas.

El pollo es un vertebrado de sangre caliente, con un alto grado de metabolismo y temperatura corporal variable. Los pollitos de un día de edad tienen una temperatura de 39°C que aumenta gradualmente después de los cuatro días, alcanzando su máximo normal a los 10 días de edad. El promedio de temperatura en el ave adulta oscila entre los 40.6° y los 41.7°C (North, 1982).

La cabeza de pollos y gallinas, está compuesta por una cresta, cuyo tamaño se relaciona con el desarrollo de las gónadas y la intensidad de la luz, sea natural o artificial; ojos, párpados, anillo de los ojos, barbilla y pico (**Figura 1A**).



**Figura 1: Anatomía externa de las gallinas. A) Cabeza. B) Plumaje que recubre el cuerpo. C) Zancas (North, 1982).**

Los pollos y gallinas están casi completamente cubiertos de plumas, lo que los diferencia de otros vertebrados (**Figura 1B**). Las plumas están compuestas principalmente por una proteína llamada queratina. Las aves adultas poseen un método de renovación de plumas, mediante desgaste de las mismas, lo que hace que sean quebradizas o eliminadas una vez al año, proceso conocido como pelecha, consistente en la eliminación de las plumas viejas y desarrollo de nuevas.

Las zancas (**Figura 1C**) y la mayor parte de las patas están cubiertas con escamas de varios colores, que dependen de los pigmentos carotenoides de la dieta (North, 1982).

La mayoría de los pollos están cubiertos por piel delgada, desprovista de glándulas, con excepción de la glándula uropigia, localizada en la parte superior de la cola. Debido a la ausencia de glándulas sudoríparas, es imposible que el ave pierda humedad debido al sudor. La piel tiene textura diferente en algunas partes del cuerpo y la intensidad del color depende de la cantidad y tipo de xantofilas en la dieta (North, 1982).

En los pollos y gallinas el esqueleto del cuello es largo y de libre movimiento, pero la otra parte de la columna vertebral es rígida, compuesta de muchos huesos unidos. Varias de las vértebras torácicas están unidas para formar una base firme para las alas y sus músculos. La quilla es pesada. El hueso de la cadera está solidificado al íleon y los pélvicos no están unidos en forma vertical. Las alas corresponden a los brazos y manos del hombre, igual que las patas (**Figura 2**). La mayoría de los huesos son ligeros y muy fuertes (Castelló *et al.*, 1989).

Los músculos que mueven las alas, se encuentran adheridos a la quilla del esternón, que también sostienen los órganos vitales de la cavidad abdominal. Los pollos están dotados de músculos blancos y rojos, que corresponden a carne clara y oscura, la actividad del músculo determina su color, siendo más oscuros los de las patas que los de la pechuga ya que el ave camina más que vuela (**Figura 3**).

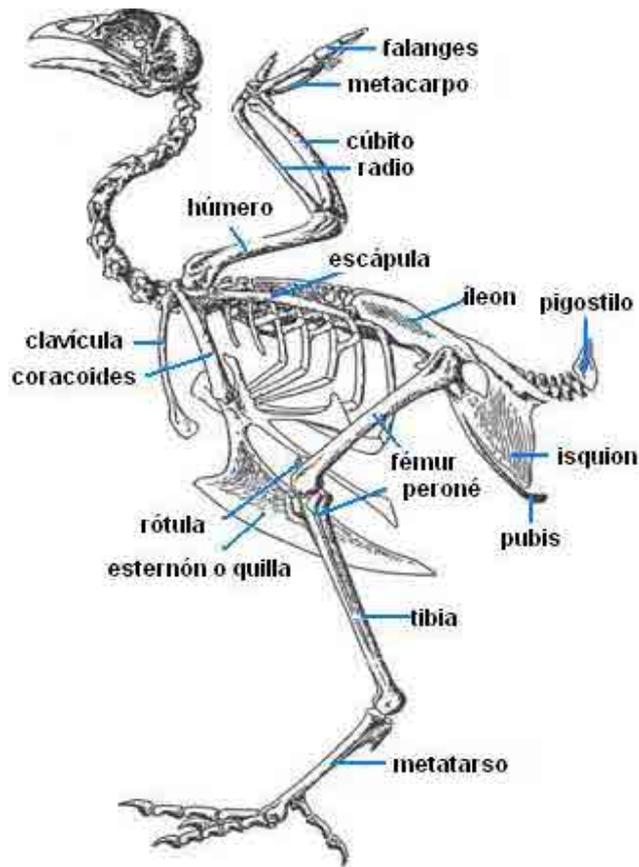


Figura 2: Esqueleto de pollos y gallinas (Castelló *et al.*, 1989).

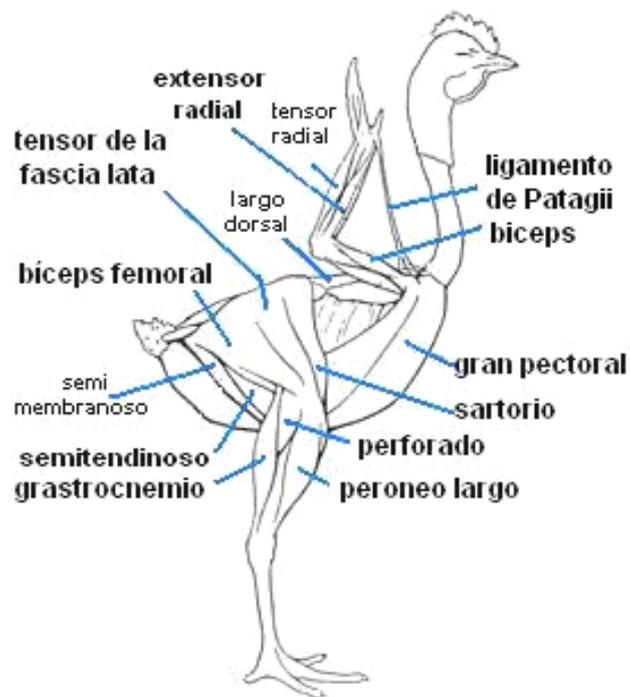


Figura 3: Músculos superficiales de las gallinas (Castelló *et al.*, 1989).

Haciendo una comparación del aparato respiratorio de pollos con el de mamíferos, se observa que los pulmones del pollo son chicos, sin embargo se complementan con los sacos aéreos y los huesos neumáticos. Las aves tienen cuatro pares de sacos aéreos, que son torácicos o bien abdominales, más el saco interclavicular. El aire se mueve libremente hacia adentro y afuera de los pulmones y sacos aéreos, pero los pulmones funcionan como un mecanismo de enfriamiento durante la respiración al exhalar agua en forma de vapor (North, 1982).

El aparato urinario consta de los riñones que están colocados en la parte postero-inferior de los pulmones. Un uréter conecta a cada riñón con la cloaca. La orina de los pollos es principalmente ácido úrico.

La sangre está compuesta de eritrocitos, leucocitos, plasma fluido, sales y otros compuestos químicos. En las aves los eritrocitos presentan núcleo central, que proceden mayoritariamente de la médula ósea, donde se forman por medio de la hematopoyesis (Castelló *et al.*, 1989).

El sistema nervioso de los pollos les permite que los sentidos del oído y la vista se encuentren bien desarrollados, son capaces de distinguir veinte colores, aunque el olfato es de baja magnitud. La capacidad de las papilas gustativas los capacita para gustar ciertos sabores, lo que determina el tipo de alimento que consumen cuando tienen libertad (Romer & Parsons, 1981).

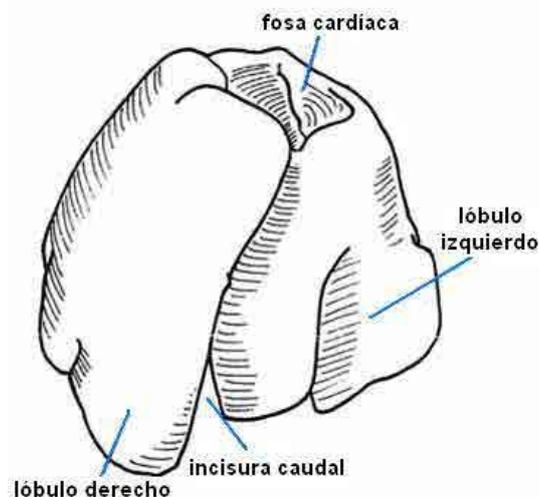
El aparato reproductor del macho consta de dos testículos, que se localizan en la parte dorsal de la cavidad abdominal. Los conductos espermáticos transportan el líquido seminal de los testículos a la papila sexual, localizada en la parte dorsal de la cloaca y de ahí al órgano de copulación localizado en el mismo lugar. Mientras el aparato reproductor de las hembras consta de un par de ovarios y con sus oviductos, de los cuales sólo funcionan los del lado izquierdo (Romer & Parsons, 1981).

El ovario se compone de folículos que le dan la característica de un racimo de uvas, fijado a la pared dorsal del abdomen al riñón izquierdo. El oviducto equivale a las trompas uterinas de los mamíferos, y constituye todo el tracto genital femenino que va del ovario a la cloaca. El oviducto conduce al ovocito, esté o no fecundado hacia la cloaca, además de agregarle diferentes sustancias como: nutrientes, membranas y un cascarón (Romer & Parsons, 1981).

### I.1.3. Fisiología del hígado, molleja y pechuga.

El hígado es un órgano digestivo complementario, ya que está asociado íntimamente a la digestión, dado que sus secreciones se vierten al intestino y ayudan al procesamiento del material alimenticio (North, 1982). Anatómicamente ocupa una posición central, abajo de la hipófisis xifoidea del esternón y en la parte alta del abdomen. Este órgano está formado por dos grandes lóbulos diferenciados; el lóbulo izquierdo es algo más reducido que el derecho y presenta un surco central que lo divide en dos porciones (**Figura 4**). La superficie interior o visceral presenta el hilio vascular, la vesícula biliar (junto al lóbulo derecho) y los conductos císticos y colédoco, que desembocan en el intestino al final del duodeno (Castelló *et al.*, 1989).

Entre las funciones hepáticas está el secretar la bilis ó ácido biliar, que al entrar en la última parte del duodeno, ayuda a la digestión (North, 1982), particularmente a la hidrólisis total de las grasas, previamente saponificadas por medio de la enzima pancreática *esteapsina* (Castelló *et al.*, 1989).

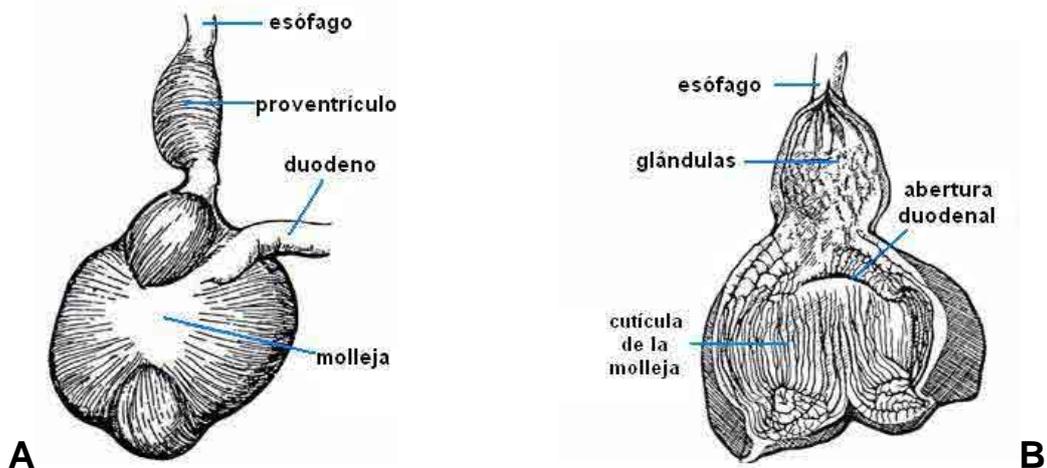


**Figura 4: Vista ventral del hígado de gallina (Castelló *et al.*, 1989).**

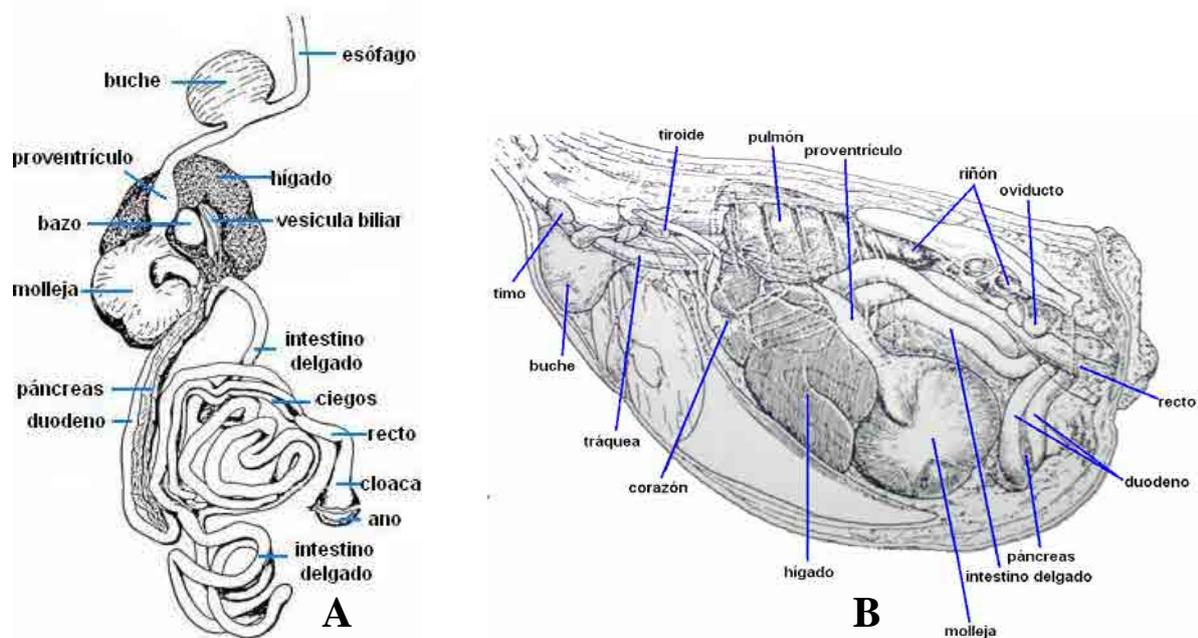
La molleja, también llamada estómago muscular, se adhiere a la porción caudal del proventrículo, está cubierta por los dos lóbulos hepáticos, en su extremo anterior, y está limitada con la parte superior del intestino delgado (North, 1982). Es grande y ocupa la mayor parte de la mitad izquierda de la cavidad abdominal. Su forma es redondeada con sus lados aplanados (**Figura 5A**). La pared está constituida por dos músculos principales: la capa córnea y la túnica muscular que son capaces de desarrollar gran fuerza, y que están unidos a ambos lados por una

aponeurosis de aspecto blanco-azulado, la parte de la pared gástrica desprovista de aponeurosis está ocupada por dos músculos intermedios. La túnica muscular está formada por dos parejas de músculos que rodean a la cavidad gástrica (Castelló *et al.*, 1989). La molleja está recubierta interiormente por una mucosa de abundantes pliegues, sobre la cual se extiende una capa córnea formada por el endurecimiento de la secreción de las glándulas del epitelio (**Figura 5B**). Esta mucosa contiene glándulas bien desarrolladas que segregan HCl (ácido clorhídrico) y pepsina, lo que le confiere una reacción ácida (pH de 4.06) (Hoffmann & Volker, 1969).

La actividad motora de la molleja es de carácter rítmico, de modo que aparece una contracción de los dos músculos principales asimétricos que se presionan mutuamente, por lo que disminuye su longitud en el sentido de su eje mayor al mismo tiempo que gira algo. De este modo los alimentos situados entre ambos músculos resultan fuertemente comprimidos y simultáneamente aplastados y molidos (Hoffmann & Volker, 1969). Cuando la molleja está vacía permanece inactiva, pero una vez que el alimento entra, empiezan las contracciones musculares. Entre más grandes sean las partículas de alimento más rápidas son las contracciones. Por lo general, la molleja contiene algún material abrasivo, como arena, piedras, grava, etc., que reducen de tamaño o desintegran a las partículas de alimento para que puedan pasar dentro del tubo intestinal. Cuando entran en la molleja materiales de textura fina éstos salen en cuestión de minutos, pero si el alimento es grueso, permanecen en la molleja durante varias horas (North, 1982).



**Figura 5: Estómago de las gallinas. a) Aspecto externo y b) Aspecto interno del proventrículo y molleja (Giavarini, 1971).**



**Figura 6: Aparato digestivo de la gallina, A. Aislado (Card, 1966) B. Disposición topográfica desde el lado izquierdo (Bradley, 1960).**

En las aves existen músculos de gran valor por su volumen y funciones, los cuales constituyen la carne. Entre los músculos de mayor importancia para las aves destinadas al consumo se encuentran los pectorales, en sus modalidades de gran pectoral, mediano pectoral y pequeño pectoral, que en su conjunto conforman la pechuga. Los tres pectorales se encuentran implantados a cada lado del esternón que completa la parte inferior de la caja torácica de las gallinas (**Figura 3**). El esternón está constituido por la quilla, la cual forma una concavidad y es base de tres prolongaciones laminares denominadas proceso costal, proceso lateral externo y proceso lateral interno, dejando entre sí unas escotaduras unidas por unas membranas fibro-cartilaginosas. El borde interior de la quilla termina en una punta cartilaginosa denominada apéndice xifoide (**Figura 2**) (Castelló *et al.*, 1989).

#### **I.1.4. Tipo de alimentación.**

En la alimentación avícola, la energía disponible está expresada en unidades de energía metabolizable, que es la porción de la energía dietética que está disponible en el ave para la producción de carne, huevos, mantenimiento de la temperatura del cuerpo y otras funciones vitales (Neumann, 2001).

El sector avícola utiliza en gran parte los granos para alimentar a las gallinas, ya que éstas lo prefieren al ser el alimento que más se ajusta a su anatomía interna; aunque también comen verduras y alimentos orgánicos de animales, como carne, sangre, pescado, insectos, etc. (Clotet, 1990).

El maíz y el sorgo son los granos más empleados en la alimentación de las gallinas. Por su valor nutritivo y por lo fácil que las gallinas los ingieren, resultan un alimento de primer orden, adecuado para los animales en crecimiento.

El trigo es un grano que contiene más proteínas y menos grasa que el maíz. El inconveniente que presenta este grano es su elevado precio, por lo que a las gallinas sólo se les da el triguillo o granza, que son los granos de trigo pequeños que no son empleados para siembra o molturación y proceden de la limpieza del trigo que se utiliza en la industria harinera (Clotet, 1990).

La avena, molida hasta harina, es ideal para las gallinas, y es dos veces más nutritiva que el trigo, además de contener sales minerales, lo que da a las aves vigor, suavidad y brillo a las plumas.

La cebada es utilizada para engorda de las gallinas por su precio accesible y alto contenido energético, muchas veces se utiliza para sustituir la mitad del maíz de la dieta.

El trébol y alfalfa, son las mejores leguminosas como alimento para gallinas, siendo valiosas por las sales minerales que poseen y favorecer la postura (Clotet, 1990).

Los alimentos de origen animal también se deben incluir dentro de la dieta de las gallinas por su riqueza proteica, que alcanza una proporción del 65 %, aunque su empleo debe restringirse a 10 g diarios por gallina. Existen diversas clases de productos, entre ellos harina de pescado, huesos, conchillas de ostras, sangre, aceite de hígado de bacalao y leche desgrasada en polvo (Clotet, 1990).

#### **I.1.5. Riesgo de contaminación del alimento por hongos.**

Las micotoxinas son metabolitos secundarios de hongos filamentosos que incluyen especies de *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Claviceps*, etc. producidos en la etapa final del crecimiento de una colonia fúngica y actúan para su defensa o metabolismo, aunque no se conoce la verdadera función en el organismo que las produce (Obrian *et al.*, 2003; Bianchi Del *et al.*, 2005; García & Heredia, 2006).

Hay que prevenir la contaminación de los alimentos con micotoxinas, ya que éstas causan grave toxicidad tanto en animales, como en seres humanos.

Los hongos requieren condiciones ambientales que favorezcan su crecimiento, tales como una concentración de oxígeno > 20%, pH entre 6.0 y 7.0, temperatura superior a 20° C y humedad relativa de 20% a 41%. La contaminación de los alimentos por micotoxinas puede variar según las condiciones geográficas, climáticas, almacenamiento, procesamiento y manejo. Algunos productos alimenticios son sustratos más aptos que otros para el crecimiento de los hongos y producción de toxinas (Jordan & Pattison, 1996).

La contaminación de alimentos vegetales y balanceados por micotoxinas, se puede dar antes o después de la cosecha, durante el almacenaje, [transporte](#), procesamiento o en el momento de ser utilizados en [alimentación](#), siendo un problema común para la industria avícola (Bennett & Klich, 2003). Las micotoxinas al encontrarse en productos forrajeros como cereales (maíz, sorgo, cebada, trigo, harina de arroz), en oleaginosas como harina de semillas algodón, maní y de otras leguminosas, reducen la producción de los cultivos y causan pérdidas económicas (Jordan & Pattison, 1996; Gqaleni *et al.*, 1996; García & Heredia, 2006).

Las micotoxinas más comunes encontradas en los alimentos son las aflatoxinas (AF), entre ellas la aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) que es la más tóxica; la zearalenona, toxina T-2, deoxinivalenol (vomitoxina), ocratoxina A, fumonisina y patulina. Otras micotoxinas importantes son nivalenol, citrinina, esterigmatocistina, ácido fusárico, ácidos penicílico y ciclopiazónico (Bennett & Klich, 2003).

Tanto en la agricultura orgánica, como en la convencional son necesarias buenas prácticas agrícolas, de manipulación y de almacenamiento, para reducir al mínimo el riesgo de desarrollo de mohos y de contaminación por micotoxinas.

#### **I.1.6. Pérdidas económicas debidas a contaminación por aflatoxinas.**

Los granos y alimentos vulnerables al crecimiento de hongos y a la presencia de aflatoxinas (AF), representan un peligro considerable para las aves de corral y sus productos derivados (Calnek *et al.*, 1997). Las pérdidas biológicas y económicas causadas por el rechazo de granos contaminados son enormes. Pero son más importantes las pérdidas no detectadas, debido a la reducción de la productividad en la explotación de animales (Charmley *et al.*, 1995).

Los niveles de AF, de 60 a 800 ppm, reportados en la contaminación de los alimentos, originan efectos significativos y variables sobre el decremento del peso corporal de las aves de corral (Sodhi *et al.*, 2005). El consumo de alimentos contaminados con AF, de 50 a 200 ppm ocasiona alta mortalidad en las granjas avícolas (Oğuz *et al.*, 2000; Abdolamir-Allameh *et al.*, 2005).

## **I.2. Las aflatoxinas**

### **I.2.1. Importancia en aves de corral.**

Las AF son las micotoxinas más importantes en la industria avícola al ocasionar pérdidas significativas, ya que son consumidas, en los granos de cereal, por las aves de corral (Salyi, 1999; Oğuz *et al.*, 2000). Las aves de corral jóvenes son más susceptibles a la contaminación por AF que las aves adultas, esto se debe a la falta de sistema enzimático hepático que es requerido para degradar las AF (Cheeke & Shull, 1985). Existen diferencias entre las especies de aves, los patos son 10 veces más sensibles que los pollos, y los pavos tienen una respuesta intermedia (Jordan & Pattison, 1996).

Los mayores efectos económicos de la aflatoxicosis en las aves son el decremento del crecimiento, la conversión pobre de los alimentos a carne, leche y huevos (Verma *et al.*, 2004; Sodhi *et al.*, 2005), y altos índices de mortalidad en las granjas avícolas, con lo que baja significativamente el valor de los granos como alimento para las aves y como producto de exportación (Bennett & Klich, 2003). Altos niveles de AF (>10.0 ppm) pueden ser mortales para las aves de corral y niveles bajos dan efectos crónicos (Jordan & Pattison, 1996).

Los pollos y gallinas que han ingerido cantidades >1.0 ppm de AF, pueden desarrollar una aflatoxicosis que se manifiesta por una inmunodepresión, que trae un marcado decremento en la resistencia a infecciones como salmonelosis, coccidiosis, enfermedades en la Bolsa de Fabricio (Bursa de Fabricius) y candidiasis, así como falta de pigmentación (Jordan & Pattison, 1996; Mavarez *et al.*, 2005). Estas deficiencias se presentan porque las AF afectan el sistema inmune al inhibir la síntesis de proteínas (Verma *et al.*, 2004) e interactuar con las rutas metabólicas de lípidos y carbohidratos (Quist *et al.*, 2000). Las gallinas de postura intoxicadas con cantidades >2.0 ppm de AF, tienen un decremento en la producción de huevos y el empolle de los mismos se reduce (Jordan & Pattison, 1996). La AFB<sub>1</sub> acumulada en

los órganos reproductivos se transfiere a los huevos y a la progenie empollada (Calnek *et al.*, 1997).

La vida media de la AFB<sub>1</sub> en gallinas es de 67 horas, y la mayor cantidad se excreta por la bilis y el intestino, pero el aflatoxicol (AFL) y las AF hidrolizadas como las aflatoxinas M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) y B<sub>2a</sub> (AFB<sub>2a</sub>) se presentan en huevos durante 7 días o más (Calnek *et al.*, 1997). El AFL y las AFM<sub>1</sub> y AFB<sub>2a</sub>, también son un riesgo potencial para la salud humana porque pueden presentarse en alimentos derivados de gallinas y pollos, y pueden intoxicar al ser ingeridos (Oliveira *et al.*, 2003).

### I.2.2. Definición.

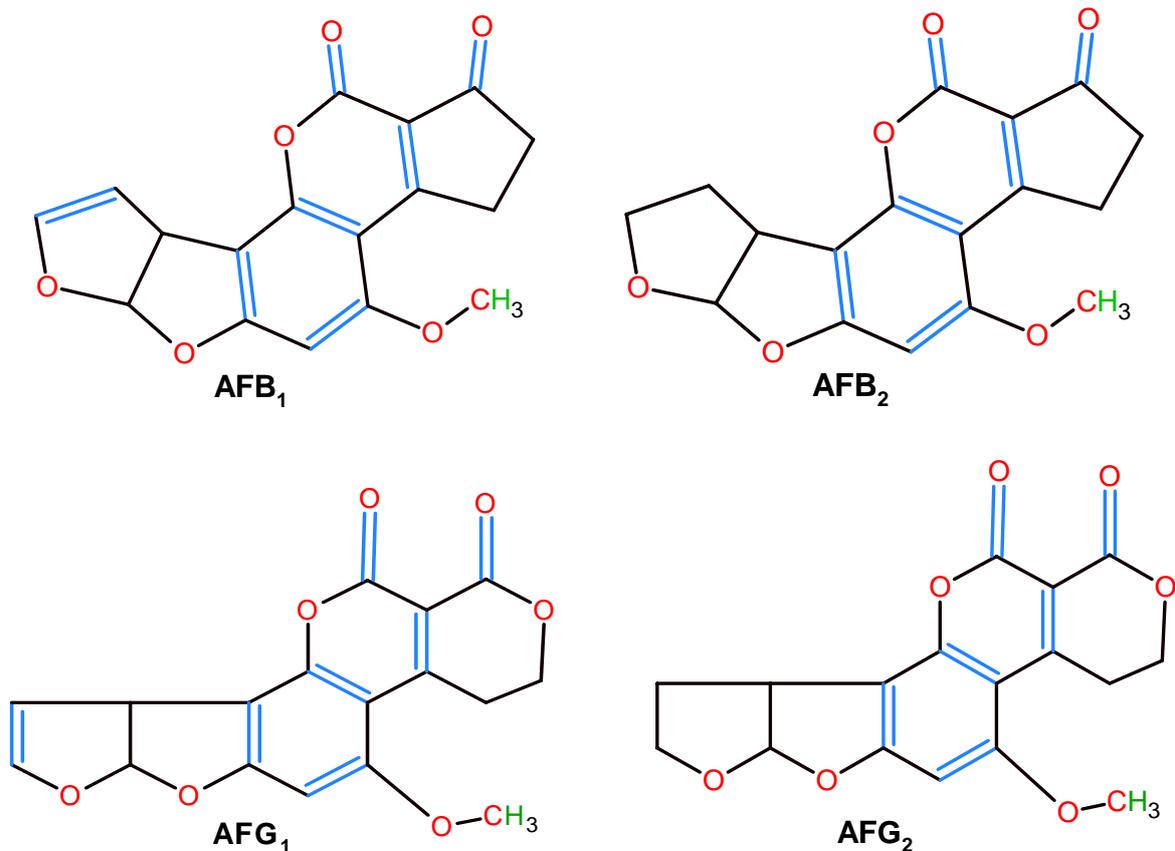
Las AF son un grupo de alrededor de 16 metabolitos secundarios derivados de las furanocumarinas (Bhatnagar *et al.*, 2003). Son producidos principalmente por los mohos *Aspergillus flavus*, y *A. parasiticus*; en particular, *Aspergillus flavus* es un hongo contaminante de cereales. *A. bombycis*, *A. ochraceoroseus* y *A. nomius*, también son especies que producen AF, pero no son encontradas frecuentemente (Bennett & Klich 2003; García & Heredia, 2006; Mohanamba *et al.*, 2002; Sweeney & Dobson, 1999).

Se trata de hongos toxígenos, capaces de desarrollarse en gran variedad de sustratos, pudiendo contaminar los alimentos cuando son cultivados, procesados, transformados o almacenados en condiciones adecuadas que favorezcan el desarrollo fúngico. El crecimiento de estos hongos y la producción de toxinas dependen de muchos factores ambientales. Existen cuatro principales AF: B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>), G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>) y G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>) (Bhatnagar *et al.*, 2003; Sodhi *et al.*, 2005).

Las AF son potentes mutágenos y cancerígenos al ser ingeridas por las aves de corral (Oğuz *et al.*, 2000). La enfermedad causada por AF se llama **aflatoxicosis** y cuando se consumen niveles medios a altos se producen **efectos agudos** como: hemorragias, diarreas, daños en hígado, edema, alteración en la digestión, en el metabolismo de los alimentos, y en ocasiones la muerte. Cuando se consumen niveles bajos a moderados de AF se producen **efectos crónicos**: baja absorción de los alimentos, crecimiento lento, baja respuesta a vacunas pues bajan las defensas, cáncer, inmunodepresión, síndrome de Reye, hepatitis, cirrosis y problemas renales (Bennett & Klich, 2003).

### I.2.3. Estructura química.

Las AF son bis-dihidrofurano-cumarinas, y se les nombra B y G según los colores con que fluorescen, ya sea azul (= **B**lue) o verde (= **G**reen) bajo la luz UV en cromatografía de capa fina (Sweeney & Dobson, 1999). La estructura química de las AF de tipo B se caracteriza por un anillo ciclopentanol y las AF de tipo G por un anillo de lactona (**Figura 7**). Las AFB<sub>2</sub> y AFG<sub>2</sub> tienen un anillo bisfuranil saturado y las AFB<sub>2a</sub> y AFG<sub>2a</sub> tienen una estructura bisfuranil hidratada (Bhatnagar *et. al.*, 2003).



**Figura 7:** Distintas aflatoxinas producidas por especies de *Aspergillus* (Sweeney & Dobson, 1999).

### I.2.4. Propiedades fisicoquímicas (OPS, 1983).

Las AF exhiben una intensa fluorescencia cuando son expuestas a luz UV de onda larga. Esto permite detectar las AF a concentraciones extremadamente bajas (alrededor de 0.5 ng o menos por mancha en cromatografías de capa fina). Las AF son solubles en disolventes no polares o medianamente polares como el cloroformo y metanol, especialmente en dimetilsulfóxido, e insolubles en agua.

Las AF son termo-resistentes y estables a temperaturas elevadas hasta 260°C la AFB<sub>1</sub> y llegando a 320°C la AFM<sub>1</sub>. Sin embargo, son inestables cuando se les expone a la luz, particularmente a la radiación UV. Las AF en cloroformo y en benceno son estables por muchos años si se mantienen en lugar oscuro y frío.

Las AF resisten la cocción, fermentación, pasteurización, ultrapasteurización y la nixtamalización. Sin embargo, pueden ser destruidas con un tratamiento drástico, como el calentamiento en autoclave en presencia de amoníaco ó hipoclorito.

La presencia del anillo de lactona en la estructura de las AF las hace susceptibles a la hidrólisis alcalina (De longh *et al.*, 1962). Cuando las AF se ponen en contacto con un pH alcalino (pH 8-12), el anillo de lactona se abre y se pierde la fluorescencia, esto hace pensar que no hay AF, sin embargo el anillo de lactona se cierra con un pH ácido (1-3 pH), y al regresar a un pH neutro, flourece otra vez. La presencia de proteínas, el pH y la duración de tratamiento pueden modificar los resultados (Beckwith *et al.*, 1975; Moctezuma, 2002). Si el tratamiento alcalino es leve, la acidificación invertirá la reacción, reconstituyendo la AF original.

#### **I.2.5. Biosíntesis.**

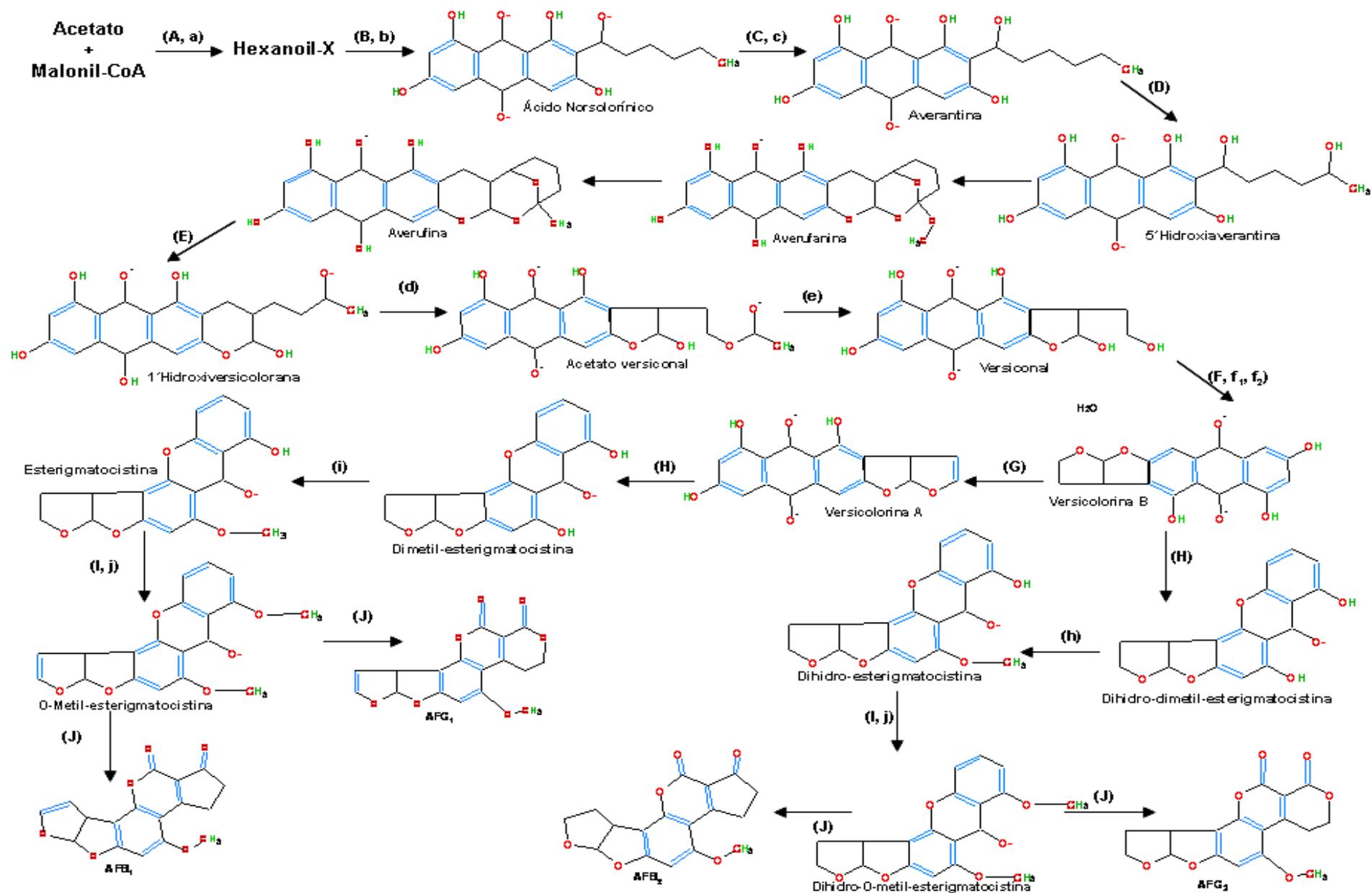
La biosíntesis de AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> y AFG<sub>2</sub> es un proceso controlado por 20 reacciones enzimáticas (Yu *et al.*, 2000). Los genes activos en la biosíntesis de las AF están agrupados en una región de 70 Kb del ADN de *A. flavus* y *A. parasiticus*, bajo control del gen regulatorio *afIR* (Chang *et al.*, 1993) y el gen *aflJ* (Meyers *et al.*, 1998).

La síntesis de AF (**Figura 8**) ocurre a través de una serie de reacciones de oxido-reducción. La biosíntesis comienza con la conversión de acetato y malonil CoA a una unidad iniciadora hexanoil, por el producto de dos genes de lipasa sintetasa (*fas-1* y *fas-2*), la unidad iniciadora hexanoil es extendida por un policétido sintetasa (*pksA*) a ácido norsolorínico (NOR), que es el primer producto estable de la ruta (Bhatnagar *et al.*, 2003; Sweeney & Dobson, 1999).

La conversión de NOR a averantina (AVN) involucra una deshidrogenasa, codificada por el gen *nor-1* ó *nor-A*. Los pasos catalíticos en la conversión de averufina (AVR) a versicolorina B (VERB) no se han asignado genes específicos del conglomerado, pero se cree que los posibles candidatos son *cypX*, *moxY* y *avfA*. La cetoreductasa (*ver1*) y mono-oxigenasa (*verA*) son requeridas para la conversión de

versicolorina A (VERA) a dimetil-esterigmatocistina (DMST), a partir de aquí la ruta se bifurca y se presenta la conversión de DMST a AFB<sub>1</sub>, AFG<sub>1</sub> por un lado, y por el otro la conversión de O-metil-esterigmatocistina (OMST) ó dihidro-O-metil-esterigmatocistina (DHOMST) a AFB<sub>2</sub> y AFG<sub>2</sub>, donde se requiere la presencia de un NADPH-dependiente mono-oxigenasa (*ordA*). La formación de las toxinas G involucra una enzima adicional codificada por *ordB* (Bhatnagar *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2000).

A continuación presentamos dos figuras, una acerca de la ruta biosintética de las AF (**Figura 8**) y otra de la ruta de biotransformación de la AFB<sub>1</sub> (**Figura 9**), con objeto de precisar tanto los cambios que van ocurriendo a las AF, como las enzimas y genes involucrados.



**Figura 8: Ruta biosintética de las aflatoxinas.** Enzimas involucradas: (a) lipasa sintetasa, (b) policétido sintetasa, (c) ácido norsolorínico reductasa, (d) acetato hemicetal versiconal reductasa, (e) estereasa, (f<sub>1</sub>) versicolorina B sintetasa, (f<sub>2</sub>) versiconil ciclasa, (g) desaturasa, (h) O-metiltransferasa (MT-II), (i) O-metiltransferasa, (j) O-metiltransferasa (MT-I). Genes involucrados: (A) *fas-1A* y *fas-2A*, (B) *pkA*, (C) *nor1*, *norA*, (D) *avnA*, (E) *avl* (*avf1B* y *avf1W*), (F) *vbs*, (G) *verB*, (H) *ver1A* y *af1S*, (I) *omtA* y (J) *ord1*. (Trail et al., 1995; Minto & Townsend, 1997; Bennett et al., 1997).

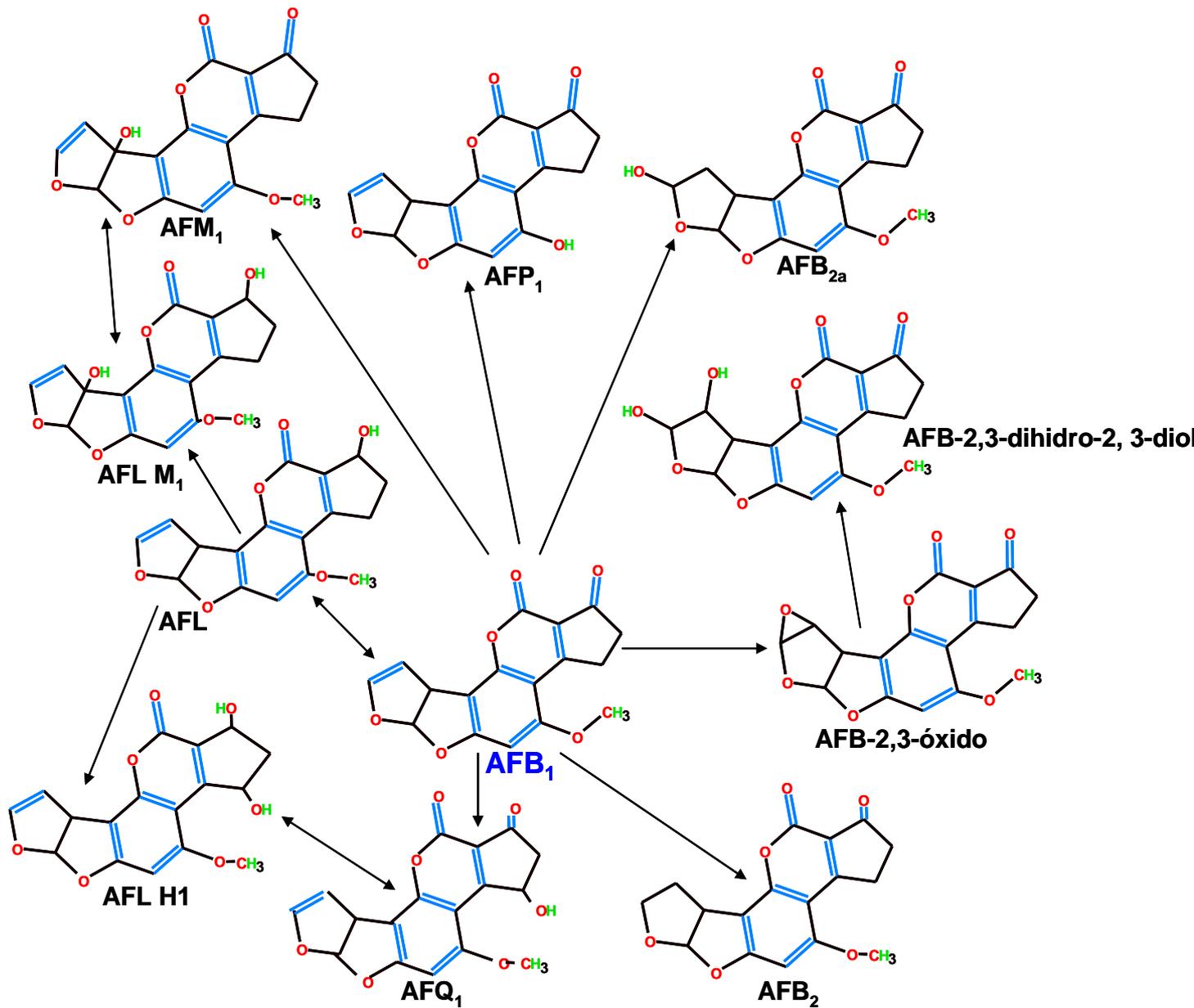


Figura 9: Ruta de biotransformación de AFB<sub>1</sub> (Eaton *et al.*, 1994 b).

### I.2.6. Ocurrencia natural.

La contaminación de los alimentos por AF es un fenómeno natural y frecuente, a nivel de campo o de almacenamiento de los granos en países tropicales y subtropicales (Santuario *et al.* 1999), estas condiciones climáticas (temperatura de 30-35° C y humedad relativa de 20% a 41%), estimulan el crecimiento de los hongos. Asimismo, la producción de AF se incrementa por el estrés de las plantas al ser dañadas por insectos, por la sequía, la baja nutrición o el retraso de la cosecha (Jordan & Pattison, 1996).

Sin embargo, la mayoría de las veces la contaminación del alimento por AF se lleva a cabo en las tolvas de almacenamiento de las granjas, en particular si la cosecha ha estado mojada. También, porque las AF están presentes en las camas de las aves de corral y el polvo de los locales (Gordon & Jordan, 1985).

Como es muy frecuente la contaminación de los alimentos con AF, la Secretaría de Salud de México ha establecido dos Normas Oficiales para la regulación de AF en granos y cereales. La Norma Oficial NOM-188-SSA1-2002, establece el máximo nivel de AF permitidas en cereales destinados para consumo humano y animal, así como los requerimientos sanitarios para el transporte y almacenamiento de los productos. El nivel permitido para AF totales en humanos es de 20 µg/kg, y cuando se excede este nivel de tolerancia, los granos y cereales sólo pueden ser utilizados para alimento animal. En estos casos, el límite máximo permitido para pollos de engorda es de 20 µg/kg, aunque se acepta ganado porcino de 100-200 µg/Kg y demás ganado de 100-300 µg/Kg (Secretaría de Salud, 2002).

### **I.2.7. Presencia de aflatoxinas en alimentos de aves.**

Cuando los hongos *A. flavus* y *A. parasiticus*, invaden y crecen sobre diferentes cultivos en el campo, tales como maíz, nueces, cacahuates, algodón, soya y sorgo, la contaminación resultante con AF frecuentemente hace que los cultivos no sean óptimos para el consumo humano ni animal (Charmley *et al.*, 1995; Mohanamba *et al.*, 2002; Ratnavanthi & Sashidhar, 2003; Vardon, 2003; Sudershan *et al.*, 2004; Flores *et al.*, 2006; García & Heredia, 2006).

En Colombia se realizó un trabajo para establecer la frecuencia y distribución de AF en la producción de sorgo. Las muestras de sorgo recolectadas inmediatamente después de la cosecha no presentaron niveles detectables de AF, mientras que las muestras de sorgo almacenado durante 6 meses en bodegas y silos comerciales presentaron incidencia de AFB<sub>1</sub> (contenido promedio de 5.1 µg/kg). No obstante, los resultados indicaron que el sorgo analizado no constituía una amenaza para la salud pública y la producción pecuaria, al encontrarse las AF por debajo del límite de tolerancia establecido mundialmente (20 µg/kg) (Abadia-Serna *et al.*, 1997).

En Botswana, África, el sorgo y el maíz son base de la elaboración de alimentos para la población humana y los animales. Se analizaron estos dos cereales para detectar micotoxinas, y de las muestras totales de sorgo analizadas, se encontraron en 40 % de AF de 0.1 a 60 µg/kg, mientras el maíz no presentó AF (Siame *et al.*, 1998).

La presencia de AFB<sub>1</sub> fue determinada en diferentes granos de consumo humano y animal en Cuba. Entre los granos analizados se situaban el cacahuete y el sorgo, los cuales mostraron el más alto porcentaje de contaminación por AFB<sub>1</sub>. El cacahuete con el 40.4% de las muestras contaminadas y del sorgo el 83.3 %, indican que en este país los niveles de AFB<sub>1</sub> en cacahuete y sorgo constituyen un gran riesgo para la salud pública humana y animal (Escobar & Sánchez-Regueiro, 2002).

En Pakistán se analizó la AFB<sub>1</sub> en los ingredientes para alimentos destinados a las aves de corral. Se analizaron un total de 3,230 muestras de ingredientes de origen animal y vegetal, las cuales se situaron en un rango de contaminación de 13 µg/kg a 78 µg/kg (Bhatti *et al.*, 2001). Un trabajo similar se hizo en Bangladesh, donde se muestreó alimento para gallinas de diferentes granjas. En dichos alimentos el contenido de AF varió de 0 a 98 µg/kg (Khan *et al.*, 2005).

### **I.3. Efectos de las aflatoxinas en pollos y gallinas.**

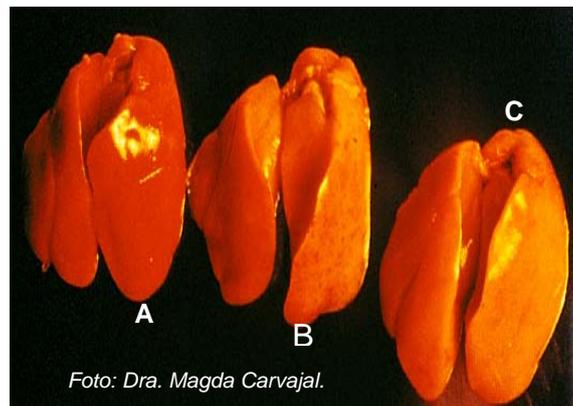
#### **I.3.1. Efectos en hígado.**

El hígado es el primer órgano dañado cuando las aves de corral son alimentadas con AFB<sub>1</sub> (Begum *et al.*, 2001; Bennett & Klich, 2003; Eaton & Groopman, 1994a), y presenta decoloración y consistencia grasa por la aflatoxicosis (**Figura 10**). En casos agudos el hígado se encuentra congestionado, puede tener un color amarillo parduzco, ocre o moteado, con hemorragias multilocales (Calnek *et al.*, 1997; Bahrami, 2004; Bianchi Del *et al.*, 2005), estar agrandado y tener degeneración hidrópica (Ortatatli & Oğuz, 2001; Sapkota *et al.*, 2005; Giacomini *et al.*, 2006).

Cuando las aves se recuperan, la palidez y dureza del hígado progresan hacia una cirrosis completa. A nivel histológico, el hígado muestra

degeneración de las células parenquimatosas, necrosis de las regiones perisinusoidales, hiperplasia y proliferación de los conductos biliares, fibrosis y los hepatocitos presentan un nucleolo prominente. Inflamación por basófilos, hepatocitos regenerativos, heterófilos y células mononucleares se da en zonas portales (Calnek, 1997; Gordon & Jordan, 1985; Jordan & Pattison, 1996; Bhanuprakash *et al.*, 2006).

Cuando los pollos y gallinas son contaminados por AF, la actividad enzimática de la amino-aspartato-transferasa (AAS) y la amino-alanina-transferasa (AALT) aumenta (Oğuz *et al.*, 2002; Nath & Sarma, 2005). La interferencia de las AF en el metabolismo de los lípidos es la causa del deterioro de triglicéridos del hígado, por lo que se presenta una reducción de ellos en el suero (Quist *et al.*, 2000; Altintas *et al.*, 2003; Eraslan *et al.*, 2005).

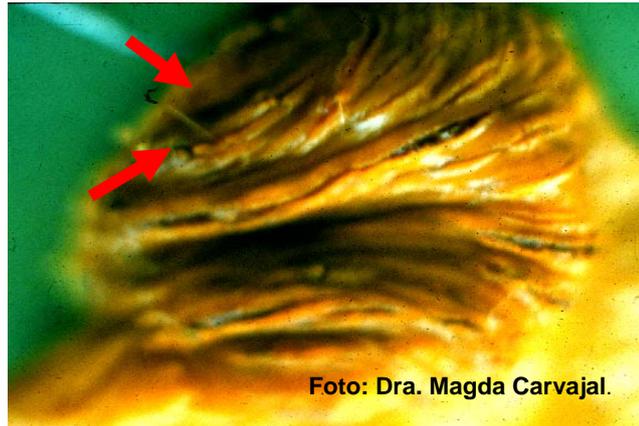


**Figura 10: Hígado dañado por la contaminación con aflatoxina B<sub>1</sub>. A) Hígado control sano, B) Hígado con trazas de aflatoxina B<sub>1</sub>, C) Hígado con dosis altas de aflatoxina B<sub>1</sub> y mayor decoloración.**

### **I.3.2. Efectos en molleja.**

El contacto directo del proventrículo y la molleja con las AF, durante el proceso digestivo, causan irritación e inflamación de los mismos, que al hincharse aumentan los pesos relativos de estos órganos (**Figura 11**) (Huff & Doerr, 1981; Goher *et al.*, 2004; Sapkota *et al.*, 2005). Estudios de aflatoxicosis realizados en gallinas, indican que el peso de la molleja y el proventrículo se incrementan significativamente sólo con dosis altas de aflatoxinas (5 µg/g o más). Sin embargo, la molleja parece ser más sensible a los efectos de las AF que el proventrículo. La diferencia en la sensibilidad de ambos órganos

radicaría en los tiempos de retención de los alimentos, pero las contracciones de ambos son coordinadas, así que el tiempo de retención es el mismo. Sin embargo, la diferencia en la respuesta de la sensibilidad del proventrículo y la molleja a las AF, es mediada por diferencias en el recubrimiento interno de los órganos o por el resultado de la toxicosis sistémica causada y reflejada en las concentraciones de AF en los tejidos (Huff *et al.*, 1986).

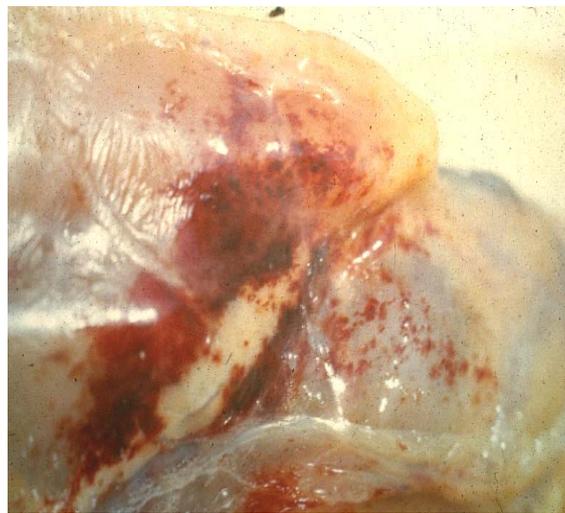


**Figura 11: Hifas del hongo *Aspergillus flavus* saliendo de aberturas de la molleja.**

### **I.3.3 Efectos en pechuga.**

Las lesiones que se aprecian en piernas y músculos de la pechuga, en pollos y gallinas con aflatoxicosis de deben al decremento de los mecanismos de coagulación de la sangre y a la fragilidad del endotelio capilar, que incrementan la tendencia a hemorragias en el cuerpo (**Figura 12**) (Ortatatli & Oğuz, 2001; Goher *et al.*, 2004).

Las gallinas con aflatoxicosis también presentan una marcada disminución en la producción de pechuga. Las AF reducen la producción de músculo o afectan su integridad llevando el decremento en peso de este tejido a un extremo mayor a lo que sucede con el tejido óseo (Huff *et al.*, 1984; Begum *et al.*, 2001; Bahrami, 2004; Sapkota *et al.*, 2005; Bintvihok & Kositcharoenkul, 2006).

**A****B**

**Figura 12: Hemorragias causadas por AFB<sub>1</sub> en pechuga de gallina. A) Con piel. B) Sin piel.**

#### **I.4. Métodos de control.**

La contaminación de los granos con micotoxinas comienza en el campo, y es ahí donde la mayoría de las acciones prácticas y económicas se deben establecer para reducir los niveles de AF; las medidas de control se enfocan a prevenir la colonización con *A. flavus* y *A. parasiticus* a los cultivos, y la producción de AF en los cultivos (Zuber *et al.*, 1993; Raju *et al.*, 2005; García & Heredia, 2006).

Sin embargo, en los últimos 10 años, se han realizado estudios de control para desintoxicar los alimentos contaminados por AF y minimizar los efectos deletéreos que ellas causan en las aves de corral (Zaghini *et al.*, 2001; Oğuz *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2003).

Muchos investigadores, desde 1990 han estado probando adsorbentes de AF, algunos son exitosos, pero pocos son utilizados comercialmente. Estos incluyen silicatos de aluminio, bentonitas, zeolitas naturales y sintéticas, que son adsorbentes inertes y no nutritivos, utilizados por su capacidad de unión a las AF cuya finalidad es removerlas de los alimentos contaminados y reducir su absorción por el tracto gastrointestinal de las aves de corral (Oliveira *et al.*, 2003). También son utilizados para reducir la toxicidad por AF en pollos, gallinas y otras especies de aves, las cuales después de ser tratadas con esos componentes presentan una mejora significativa (Oğuz *et al.*, 2000; Naveenkumar *et al.*, 2005).

## II. OBJETIVOS

### II.1. General.

- Identificar y cuantificar las aflatoxinas presentes en hígado, molleja y pechuga de gallina de postura.

### II.2. Particulares.

- Extraer, concentrar y purificar las aflatoxinas presentes en hígado, molleja y pechuga de gallina.
- Cuantificar las aflatoxinas (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, AFM<sub>1</sub>, AFM<sub>2</sub>, AFP<sub>1</sub> Y AFL) por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).
- Elaborar las curvas de calibración para cada aflatoxina.
- Conocer las diferencias en cantidad de aflatoxinas de los distintos tejidos de gallina.
- Definir cuál es el mejor método químico usado (método de Qian & Yang, 1984 ó método de Koeltzow & Tanner, 1990)) y proponer mejoras al mismo.
- Comparar los dos métodos de análisis químico para ver cuál extrae y purifica mejor a las aflatoxinas en los tejidos de la gallina.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### III.1 Diseño experimental.

Con objeto de conocer la cantidad de AFB<sub>1</sub> ingerida por gallinas raza Hi/Line W36, de 121 semanas de edad en segundo ciclo de producción, se diseñó un experimento sobre el paso de la AFB<sub>1</sub> del alimento a los tejidos (pechuga, molleja e hígado) de gallinas de postura. Este experimento se realizó en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola (CEIEPA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM en Tláhuac, Distrito Federal, del 8 al 15 de agosto de 2005, esta última fecha corresponde al día en que se sacrificaron las gallinas.

Se trabajó con 25 gallinas colocadas en jaulas individuales, las cuales se subdividieron en 3 grupos:

a) **El grupo control** que constó de 9 gallinas alimentadas con 2 kg diarios de sorgo molido y homogeneizado sin contaminación con AFB<sub>1</sub>, aunque las gallinas generalmente comieron 125 g diarios, se les pusieron 250 g por ave, para facilitar su consumo.

b) **El grupo con dosis baja de AFB<sub>1</sub> de 30 µg/kg** fue de 8 gallinas. Se trabajó con esta dosis baja dado que la legislación Mexicana y del Tratado de Libre Comercio (TLC) indica que para las gallinas de postura el límite máximo de tolerancia de AFB<sub>1</sub> en el alimento es de 20 µg/kg y como casi siempre se pierde toxina en las paredes del recipiente, se contaminó con 30 µg/kg, para que a las gallinas les llegaran al menos 20 µg/kg.

c) Finalmente, **el grupo** alimentado con sorgo contaminado **con dosis alta de AFB<sub>1</sub> de 500 µg/kg**, fue de otras 8 gallinas. Esta dosis se utilizó para tratar de asegurar el paso de AFB<sub>1</sub> de alimento a tejidos.

Después de ocho días de experimento, las gallinas se sacrificaron por dislocación cervical, se les extrajo el hígado, pechuga y molleja, cada órgano fue pesado para obtener el peso fresco y etiquetado de acuerdo a la concentración del tratamiento al que pertenecían, se tomó asimismo el número de gallina y la fecha. Los tejidos se congelaron a - 4°C hasta su análisis.

Los hígados y mollejas se colocaron en cajas de Petri, y las pechugas en charolitas de papel aluminio, y se colocaron dentro de una campana de extracción a temperatura ambiente para su secado total por aire. Cada tejido se molió en un molino de café Moulinex. Después de obtener el tejido seco y molido se pesó cada muestra para la obtención del peso seco. En el **Cuadro 1** se presenta la adición de la AFB<sub>1</sub> al alimento de las gallinas, y el peso inicial de las mismas.

**Cuadro 1: Experimento sobre la adición de la AFB<sub>1</sub> al alimento de las gallinas, el peso inicial de las mismas y el tipo de tratamiento.**

<b>Alimento Control sin AFB<sub>1</sub> (250 g) colocado en comedero por día.</b>	<b>Peso inicial (kg) de gallina 08 de agosto del 2005</b>
<b>N° de gallina</b>	<b>N° de gallina</b>
1	1.764
2	1.482
3	1.440
4	1.724
5	1.602
6	1.652
7	1.782
8	1.682
9	2.128
<b>Tratamiento con alimento adicionado con 30 µg/kg de AFB<sub>1</sub> por día.</b>	
<b>N° de gallina</b>	<b>N° de gallina</b>
1	1.602
2	1.536
3	2.080
4	1.688
5	1.896
6	1.440
7	1.712
8	1.740
<b>Tratamiento con alimento adicionado con 500 µg/kg de AFB<sub>1</sub> por día.</b>	
<b>N° de gallina</b>	<b>N° de gallina</b>
1	2.008
2	1.654
3	1.414
4	1.946
5	1.876
6	1.604
7	1.958
8	2.194

### III.1.1. Composición del alimento de las gallinas.

A continuación se presenta la composición del alimento de las gallinas que se mezcló y homogeneizó en el CEIEPA y que sirvió de base para preparar una tonelada de alimento para hacer el experimento (**Cuadro 2**).

**Cuadro 2: Ingredientes de la fórmula para preparar una tonelada de alimento base para las gallinas.**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad en kg</b>
Sorgo sin marca (Siroga SA de CV)	675.817
Soya (Siroga SA de CV)	190.016
Carbonato de Calcio (Moliendas Tizayuca SA de CV)	89.207
Aceite vegetal crudo de soya (Siroga SA de CV)	24.349 L
Fosfato de calcio (Tecamac Industrial SA de CV)	12.345
Sal (El Elefante SA de CV)	3.882
DL metionina (Degusa SA de CV)	1.533
Pigmento extracto de flor de cempoaltxóchitl (Pigmentos vegetales SA de CV)	1.500
Cloruro de colina (Celanece SA de CV)	0.500
Vitaminas de gallina de postura A, D, E, K y complejo B (Helm SA de CV)	0.250
Minerales: Zn, Mg, Mn, I, Fe, Cu, Co, Se (Helm SA de CV)	0.500
Antibiótico Bacitracina zinc (Insumos Químicos SA de CV)	0.100
Antioxidante BHT y BTQ (Insumos Químicos SA de CV)	0.150

### III.2. Análisis químico.

Se describirán primero los métodos de extracción de las AF y después los pasos para cuantificarlas.

#### III.2.1. Comparación de dos métodos químicos (Qian & Yang, 1984 y Koeltzow & Tanner, 1990), para el análisis de AFB<sub>1</sub> en tejidos de gallina.

Se realizaron análisis *in vitro* para conocer el porcentaje de recuperación de la AFB<sub>1</sub> por cada uno de los dos métodos químicos.

A continuación se describirá cada uno de los métodos empleados.

### **III.2.2. Porcentaje de recuperación *in vitro* de la AFB<sub>1</sub> en tejidos de gallina, para valorar los métodos químicos.**

Se realizaron análisis de los tejidos control y de los fortificados con AFB<sub>1</sub>. Con relación a los tejidos control sin AFB<sub>1</sub>, se realizaron 15 diferentes extracciones (cinco de hígado, cinco de molleja y cinco de pechuga), con cada uno de los dos métodos a probar (Qian & Yang, 1984 y Koeltzow & Tanner, 1990), esto da un total de 30 extracciones de tejidos control.

Con objeto de comparar los dos métodos usados y obtener sus porcentajes de recuperación, lo primero que se hizo fue la fortificación con AFB<sub>1</sub>, de hígados, mollejas y pechugas compradas en supermercado según el método siguiente:

#### **III.2.2.1 Fortificación de los tejidos de gallina con AFB<sub>1</sub>.**

- a. Se prepararon 5 diferentes concentraciones de estándar de AFB<sub>1</sub> (0.5, 1, 2, 5 y 10 ng/g), para fortificar los tejidos.
- b. Por otro lado, se cortó un gramo por cada uno de cinco hígados, mollejas o pechugas y se homogeneizaron en morteros, por separado, con 2 mL de solución de cloruro de sodio (NaCl) (J.T. Baker, 3624-19) saturada.
- c. Cada pedazo homogeneizado se colocó en un tubo de centrifuga de 50 mL, se le añadieron 2.5 mL H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> y 10 mL de metanol (MeOH) (Fermont, N° Cat. 06123), para hacer una solución de MeOH/H<sub>2</sub>O (81:19 v/v).
- d. Finalmente, se fortificó cada gramo de tejido homogeneizado (con sal, agua y metanol), con cada concentración de AFB<sub>1</sub>.
- e. Las muestras fortificadas se dejaron reposar en el refrigerador por 24 horas.

El método de la fortificación *in vitro* se usó igual para ambas técnicas de extracción que a continuación se describen:

#### **III.2.2.2. Técnica de Qian & Yang (1984) para la extracción rápida y detección de aflatoxinas en hígado.**

Cada muestra de tejido fortificada y reposada, se agitó por 10 minutos en un vortex-2 (Scientific industries Modelo G-560) y se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min (Centrifuga Cool Working System 4235). El total de sobrenadante de cada muestra, se vertió en una columna LC-18 desechable de fase reversa (Supelclean LC-18 SPE Tubes 6 mL, 57054), que previamente fue lavada con 5 mL de MeOH y después con 5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>. Después el filtrado de cada columna LC-18, aproximadamente 11 mL, que representa el 75% de la muestra original, se diluyó con H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> (1:5 v/v), hasta que el contenido de MeOH fue del 20 %. El filtrado diluido (36 mL) se transfirió a una segunda columna de LC-18 de fase reversa desechable, prelavada con 5 mL de MeOH y se le pusieron otros 5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>. Después de secar esta segunda columna LC-18 a temperatura ambiente por toda la noche, las AFB<sub>1</sub> se eluyeron con 2 mL de acetona (Merck, 501766) al 5% en cloruro de metileno (J.T. Baker, N° Cat. 9315-3). El eluido se evaporó a sequedad a 40 °C y se resuspendió en 200 µL de Fase móvil (H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>:acetonitrilo (ACN J.T. Baker, N° Cat. 901703):MeOH 6:2:3 v/v) , y se inyectaron 50 µL con una microjeringa (Microliter # 705, Hamilton, 80565) a la columna cromatográfica del HPLC (Phenomex C<sub>18</sub> de 250 x 4.60 mm 5 µ). Los restantes 150 µL se evaporaron a sequedad a 40°C.

No obstante de que el método original no menciona eluir la primera columna LC-18, se eluyó, con objeto de conocer cuánta AFB<sub>1</sub> se retenía por ella y así poder proponer modificaciones al método de Qian & Yang que lo optimicen.

### **III.2.2.3 Técnica de Koeltzow & Tanner (1990) para la extracción de aflatoxinas, en un gramo de tejido animal, y su concentración con columnas de inmunoafinidad.**

Cada homogeneizado fortificado en la solución de MeOH/H<sub>2</sub>O (66:34 v/v) de los tres tejidos, se agitó por 10 minutos en vortex y se centrifugó a 3000 rpm por 15 min. El total del sobrenadante se diluyó con 40 mL de solución de amortiguadora de fosfatos (PBS) a 7.4 de pH con objeto de proteger al anticuerpo de la columna de inmunoafinidad. Quedó un volumen final de 50 mL de extracto diluido que se pasó por una columna de inmunoafinidad Easi-

Extract para aflatoxinas totales, prelavada con 20 mL de PBS para activarla, cuidando que no se seque. El filtrado se desechó en un frasco de residuos. La columna de inmunoafinidad contiene un gel de agarosa con anticuerpos monoclonales que retienen a las AF totales, por una reacción antígeno-anticuerpo.

Después se lavó la columna con 20 mL de H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> desionizada y se secó haciendo pasar aire por ella. Finalmente, se eluyó con 2 mL de MeOH y se colectó el eluido en un vial de vidrio ámbar. El eluido se evaporó a sequedad a 40 °C y se resuspendió en 1 mL de MeOH grado HPLC, de los cuales se inyectaron 50 µL con una microjeringa, al cromatógrafo de líquidos (HPLC). Los restantes 950 µL se evaporaron a sequedad a 40 °C y se refrigeraron.

### **III.2.3. Extracción de aflatoxinas de los tejidos del experimento.**

Se hicieron análisis para conocer la recuperación *in vivo* de la AFB<sub>1</sub> de los tejidos de gallina de las muestras del experimento donde se les dió sorgo contaminado.

#### **III.2.3.1. Extracción rápida y detección de aflatoxinas en los hígados, mollejas y pechugas del experimento por el método de Qian & Yang (1984).**

Hay que recordar que se alimentó las gallinas tratadas con sorgo contaminado con AFB<sub>1</sub>, y se alimentó con sorgo limpio, no contaminado, a las gallinas control. Para la extracción de AFB<sub>1</sub> de los hígados, mollejas y pechugas del experimento se utilizó la técnica de Qian & Yang (1984) con modificaciones por Carvajal & Díaz-Zaragoza (2006) en proceso de publicación.

De cada tejido seco y molido de hígado, molleja y pechuga, se pesó un gramo, se colocó en un tubo de centrífuga de 50 mL y se le agregaron 2 mL de solución de NaCl saturada, se continuó con el método de Qian & Yang (1984) descrito anteriormente.

La modificación realizada por Carvajal & Díaz-Zaragoza (2006) se describe a continuación. Se secaron ambas columnas LC-18 de fase reversa, a

temperatura ambiente por toda la noche. La AFB<sub>1</sub> se eluyó con 2 mL de acetona en cloruro de metileno (5:95 v/v). Los eluidos de la primera y de la segunda columnas LC-18, por separado, se evaporaron a sequedad a 40 °C, se resuspendieron en 1 mL de MeOH grado cromatográfico, y se inyectaron 50 µL de cada eluido, con una microjeringa al HPLC.

### **II.2.3.2. Método de extracción de aflatoxinas de los hígados, mollejas y pechugas del experimento, concentradas con columnas de inmunoafinidad (Koeltzow & Tanner, 1990).**

Para la extracción de AF de los hígados, mollejas y pechugas del experimento se usó la técnica de Koeltzow & Tanner (1990) concentrando las AF por medio de columnas de inmunoafinidad. Las modificaciones aplicadas al mencionado método constaron en secar los tejidos antes de pesarlos.

Se pesaron 10 g de tejido seco de cada uno de los **hígados** de las 25 gallinas. Cada muestra se colocó en un vaso de licuadora con 2 g de NaCl y se licuó con una solución de MeOH/H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> (40:10 v/v) por 2 minutos.

Para extraer las AF del tejido seco de cada una de las **mollejas** de las 25 gallinas, se pesaron 6 g de cada molleja, se colocaron en vasos de licuadora, en forma individual, se les añadió 1 g de NaCl y se licuaron con 50 mL de MeOH/H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> (40:10 v/v) por 2 minutos.

Para la extracción de AF del tejido seco de las **pechugas** se pesaron 40 g de cada una, se colocaron en forma individual en vasos de licuadora Waring, se les añadieron 5 g de NaCl para clarificar cada extracto, 200 mL de una solución de MeOH/H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> (80:20 v/v), y se licuó cada mezcla por 2 minutos.

Una vez licuados los tejidos, cada extracto se filtró con papel filtro de poro fino, y se puso a evaporar a temperatura ambiente en una campana de extracción, para reducir a 15 mL el volúmen del extracto. El extracto evaporado se diluyó en 4 volúmenes de PBS a pH 7.4. Los 60 mL del extracto diluido se volvieron a filtrar y se pasaron por una columna de inmunoafinidad Easi-Extract desechable, prelavada con 20 mL de PBS para activarla, cuidando que no se secase. Después se lavó la columna con 20 mL de H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> desionizada y se secó haciendo pasar aire por ella. Finalmente, se eluyó con 2 mL de

MeOH grado HPLC y se colectó el eluido en un vial de vidrio ámbar. El eluido se evaporó a sequedad en una incubadora Lab-line Instruments Inc., 40 °C, se redisolvió en 1 mL de MeOH grado HPLC, y se inyectaron 50 µL con una microjeringa al cromatógrafo de líquidos.

### **III.3. Cuantificación por Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).**

#### **III.3.1. Aparatos.**

La cuantificación de AFB<sub>1</sub> por análisis en HPLC se hizo en el cromatógrafo marca Agilent Series 1100, equipado con una bomba isocrática Modelo G1310A y una válvula de inyección con loop de 20 µL. Se utilizó un detector de fluorescencia LC-10 Perkin-Elmer con excitación de 360 nm, emisión de 418 a 700 nm y flujo de 1mL/min. Se usó una columna cromatográfica Phoenomex C<sub>18</sub> de 250 x 4.60 mm 5 µm. El integrador de datos fue Modelo LCI 100 de Perkin-Elmer.

#### **III.3.2. Reactivos.**

##### **III.3.2.1. Solución isocrática.**

La fase móvil para el HPLC se elaboró con 600 mL de H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>, 200 mL de ACN y 300 mL de MeOH, que se filtró al vacío con una membrana de 0.45 µm HV (Durapore, HVLPO4700). Las muestras rediluidas en MeOH, fueron inyectadas al HPLC con una microjeringa de 50 µL.

##### **III.3.2.2. Solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS).**

- **Reactivos para preparar 5 L:**

Reactivo	Marca	Fórmula	Cantidad
Cloruro de Potasio	J.T. Baker N° Cat 3040	K Cl	10.0 g
Fosfato de potasio monobásico	J.T. Baker N° Cat 3246-20	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10.0 g

Fosfato de sodio monobásico hidrogenado	J.T. Baker N° Cat.3818-01	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	58.0 g
Cloruro de Sodio	J.T. Baker N° Cat. 3624-19	Na Cl	400.0 g
Azida de Sodio	J.T. Baker N° Cat. V01	Na N <sub>3</sub>	2.5 g
Agua destilada		H <sub>2</sub> O	Aforar a 5 L

- **Preparación:**

Las sales (excepto Azida de Sodio) son pesadas individualmente en recipientes previamente tarados, en la balanza Triple beam marca Ohaus, series 700. La azida de sodio es pesada, a 4 ó 5 decimales, en una balanza analítica marca Denver Instrument company, series DE, modelo 100 A. Las sales son mezcladas y disueltas, usando un agitador magnético en aproximadamente 4.5 L de agua destilada. El volumen de la solución se afora a 5 L, con agua destilada, y el pH se ajusta a 7.4.

### III.4. Proceso.

#### III.4.1. Medición de un microgramo (µg/kg) de AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, AFM<sub>1</sub>, AFM<sub>2</sub>, AFP<sub>1</sub> y AFL por espectrofotometría.

Para obtener la concentración del estándar de AFB<sub>1</sub> (Sigma, N° Cat A-6636) necesaria para realizar la fortificación de los tejidos (hígado, molleja y pechuga), y así conocer el porcentaje de recuperación de la toxina, se procedió a preparar el estándar de AFB<sub>1</sub>. También se prepararon los estándares de AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, AFM<sub>1</sub>, AFM<sub>2</sub> y AFL para obtener la concentración de cada AF y elaborar las curvas de calibración. La preparación de los estándares consistió en diluir el estándar puro con 1 mL de benceno:acetonitrilo (98:2 v/v) (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub> Merck, N° Cat. 404129/ ACN J.T. Baker, N° Cat. 901703), de acuerdo a las indicaciones sugeridas por los Métodos Oficiales AOAC 970.43 para micotoxinas (Scott, 1995).

Se midió la absorbancia de cada AF en un espectrofotómetro Genesys 10 UV Modelo Thermo Electron Corporation, y se aplicó la siguiente fórmula para hacer una concentración de 1 µg/mL de AF:

$$\underline{\text{Absorbancia de AF a 360-362 nm x peso molecular (PM)}} =$$

### Coeficiente de extinción de la AFB<sub>1</sub> (CE)

$$\text{Ejemplo con la AFB}_1 = \frac{0.748 \times 312}{21800} = 0.010705321800$$

después se divide 1 entre 0.010705321800 = 93.4 que son los  $\mu\text{L}$  de AFB<sub>1</sub> que hay que poner en el vial. Se restan 1000  $\mu\text{L}$  menos 93.4  $\mu\text{L}$ , se redondea a 93  $\mu\text{L}$ , y dan 907 que son los  $\mu\text{L}$  de MeOH que se tendrán que mezclar en el vial para dar la solución de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Cada solución patrón original tuvo que ser calculada con los pesos moleculares y coeficientes de extinción específicos de cada AF (**Cuadro 3**). De estas soluciones patrón originales se hicieron las diluciones, se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos y con las diferentes áreas de los picos cromatográficos se obtuvieron las curvas de regresión con el programa Microsoft Office Excel 2003.

A continuación se ponen los pesos moleculares y coeficientes de extinción de cada AF usada. Se añadieron AFM<sub>1</sub>, AFM<sub>2</sub>, AFP<sub>1</sub> y AFL porque son los productos del metabolismo de la AFB<sub>1</sub> que aparecen en los tejidos animales.

**Cuadro 3: Pesos moleculares y coeficientes de extinción de cada aflatoxina.**

AF	Peso molecular (PM)	Coeficiente de extinción (CE)
AFB <sub>1</sub>	312	21,800
AFB <sub>2</sub>	314	24,000
AFG <sub>1</sub>	328	17,700
AFG <sub>2</sub>	330	17,100
AFM <sub>1</sub>	328	21,250
AFM <sub>2</sub>	328	22,900
AFL	314	14,100

#### III.4.2 Curva de calibración con las diluciones de las aflatoxinas.

La curva de calibración se obtuvo a partir de diferentes diluciones del estándar de AFB<sub>1</sub> en Metanol grado HPLC (MeOH) (J.T. Baker, N° 909303). Las diluciones fueron 1 (1000 ng/mL), 1:1 (500 ng/mL), 1:2 (250 ng/mL), 1:4

(125 ng/mL), 1:8 (62.5 ng/mL), 1:16 (31.25 ng/mL), 1:32 (15.63 ng/mL) y 1:64 (7.8 ng/mL).

Las diferentes diluciones se cuantificaron por HPLC y las áreas obtenidas se graficaron por regresión lineal para obtener el coeficiente de correlación ( $r \approx 1$  ó sea aproximado a 1) de la curva de calibración con el programa Microsoft Excel 2003.

Lo mismo se hizo con cada una de las otras AF.

### **III.5. Metodología del Análisis Estadístico.**

El análisis estadístico fue realizado con el Software JMP6 por el Dr. Ignacio Méndez del Instituto de Investigaciones en Matemáticas Aplicadas y Sistemas (IIMAS). El análisis estadístico consistió en ANOVAS de dos Factores, transformación de los valores de cada AF con el modelo de Box & Cox, gráficas de interacción entre columnas LC-18, pruebas de Tukey y Análisis de las variables categóricas vía Cuadro de Contingencia para conocer las diferencia significativas existentes entre el grupo control y los tratamientos.

En el caso de los hígados de gallinas del experimento analizadas por el método de Qian & Yang (1984) se realizó un análisis de varianza AxB con 2 factores (ANOVA AxB) correspondientes a la primera y segunda columnas LC-18 del Método de Qian & Yang (1984). El análisis de varianza AxB permite conocer si los valores de AF retenidos en la primera columna LC-18 son significativamente diferentes los de la segunda columna, y qué tanto afecta la cantidad retenida en una columna en los valores de la otra.

El análisis estadístico ANOVA AxB se aplicó para los valores cuantificados de las AFG<sub>1</sub> y AFG<sub>2</sub>, por ser más abundantes en el hígado, estar presentes en un mayor número de muestras y por ser retenidas por ambas columnas LC-18.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### IV.1 Diseño Experimental.

El día 15 de agosto del 2005, se dejó de alimentar a las gallinas con sorgo contaminado con AFB<sub>1</sub> y se obtuvo el peso final de las gallinas. Una vez muertas por dislocación cervical se les extrajeron las pechugas, mollejas e hígados, los cuales fueron pesados y etiquetados de manera individual (**Cuadro 4**). También se registró la cantidad de alimento consumido por las gallinas que fue de 125 g de los 250 g colocados en cada comedero.

**Cuadro 4: Experimento sobre el paso de la AFB<sub>1</sub> de alimento a tejidos de gallina.**

Tratamiento	Peso inicial (kg)	Peso final (kg)	Peso seco		
			Pechuga	Hígado	Molleja
<b>Control</b>					
1	1.764	1.774	58.7	14.5	10.3
2	1.482	1.500	47.7	16.2	9
3	1.440	2.014	44.3	14.9	13
4	1.724	1.670 *	53.5	22.5	10.1
5	1.602	1.660	58	14	8.4
6	1.652	1.720	58	19.6	9.8
7	1.782	1.570 *	53.3	11.2	14.9
8	1.682	1.750	60.6	21.7	10.3
9	2.128	2.294	58.1	17.3	9.7
<b>30 µg/kg</b>					
1	2.008	2.048	56.1	18.6	9.2
2	1.654	1.630 *	58.5	13.5	9
3	1.414	1.714	44.4	35.2	11.2
4	1.946	1.886 *	72.6	15.6	7.2
5	1.896	1.954	55.7	20.3	11
6	1.440	1.494	51.2	13.8	8.7
7	1.712	1.782	53.3	23	8.8
8	1.740	1.656 *	79.3	15.2	9.6
<b>500 µg/kg</b>					
1	1.602	1.654	58	16.1	7.7
2	1.536	1.708	58.4	20.6	12.2
3	2.080	2.012 *	65.1	15.5	10.3
4	1.688	1.750	58.7	13.3	9.9
5	1.876	1.906	50.6	15.4	9.7
6	1.604	1.714	57.8	14.1	11.3
7	1.958	1.798 *	65.6	16.5	12.6
8	2.194	2.152 *	78.9	20.4	11

\* La gallina bajó de peso.

## IV.2. Curvas de calibración de aflatoxinas.

Las curvas de calibración se elaboraron de acuerdo al tiempo de retención en que salieron los picos cromatográficos (**Cuadro 5**) y su área bajo la curva.

**Cuadro 5: Resumen de los tiempos de retención cromatográficos de las aflatoxinas, bajo las condiciones experimentales.**

AF	Tiempo de retención en minutos
AFB <sub>1</sub>	11.61 a 12.91
AFB <sub>2</sub>	10.38 a 10.62
AFG <sub>1</sub>	8.65 a 9.17
AFG <sub>2</sub>	7.13 a 7.53
AFM <sub>1</sub>	6.44 a 6.59
AFM <sub>2</sub>	9.46 a 9.68
AFP <sub>1</sub>	5.38 a 5.74
AFL	9.39 a 9.60

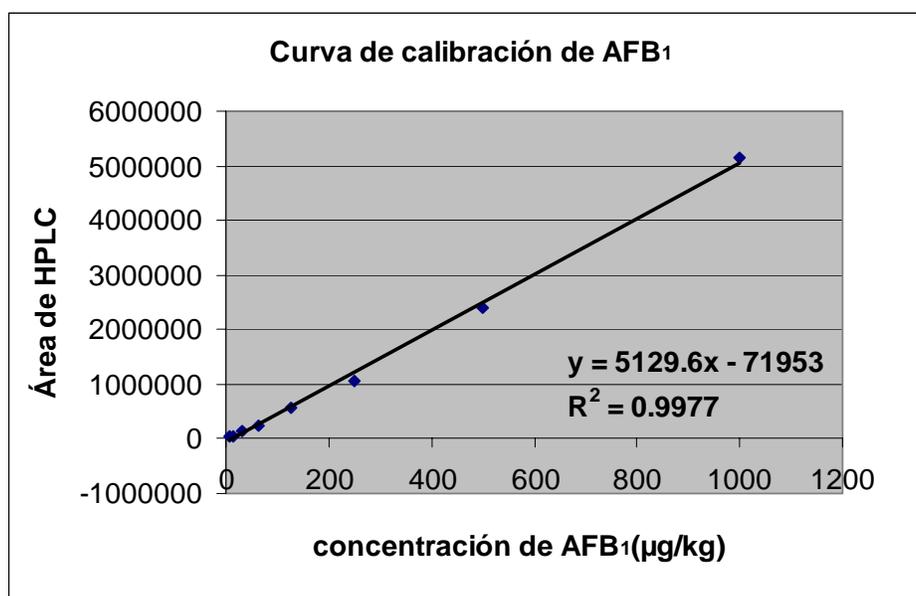
Los tiempos de retención que van de 9.46 a 9.60 minutos se comparten entre las AFM<sub>2</sub> y AFL, de modo que si es 9.39 a 9.45 corresponderá a AFL y si es de 9.61 a 9.68 corresponderá a AFM<sub>2</sub>.

### a) Curva de calibración de AFB<sub>1</sub>.

Las diluciones utilizadas en la elaboración de la curva de calibración de AFB<sub>1</sub>, se encuentran dentro del intervalo de concentración de 7.8 µg/kg a 1000 µg/kg, el tiempo de retención para esta toxina se localiza en el rango de 11.61 a 12.91 minutos como se observa en el **Cuadro 6**, en la cual también se muestra el área bajo la curva obtenida en los cromatogramas para cada dilución. Las diluciones hechas para la curva de calibración de AFB<sub>1</sub> engloban las concentraciones de 30 y 500 µg/kg empleadas para la contaminación del alimento para las gallinas del experimento. En la **Figura 13** se presenta gráficamente los datos de la curva de calibración de AFB<sub>1</sub> después de analizarlos por medio de una regresión lineal, la cual dio un coeficiente de correlación de  $R^2 = 0.9977$ .

**Cuadro 6: Resultados de la curva de calibración de AFB<sub>1</sub>.**

Dilución del estándar de AFB <sub>1</sub>	Concentración de AF en la curva de calibración (µg/kg)	Tiempo de retención (minutos)	Área relativa
1	1000	12.20	5 139 070
1:1	500	12.09	2 404 416
1:2	250	12.06	1 056 606
1:4	125	12.02	557 358
1:8	62.50	11.62	238 352
1:16	31.25	11.61	157 948
1:32	15.63	12.27	46 134
1:64	7.80	12.91	43 540



**Figura 13: Curva de calibración para AFB<sub>1</sub> de 7.8 a 500 µg/kg.**

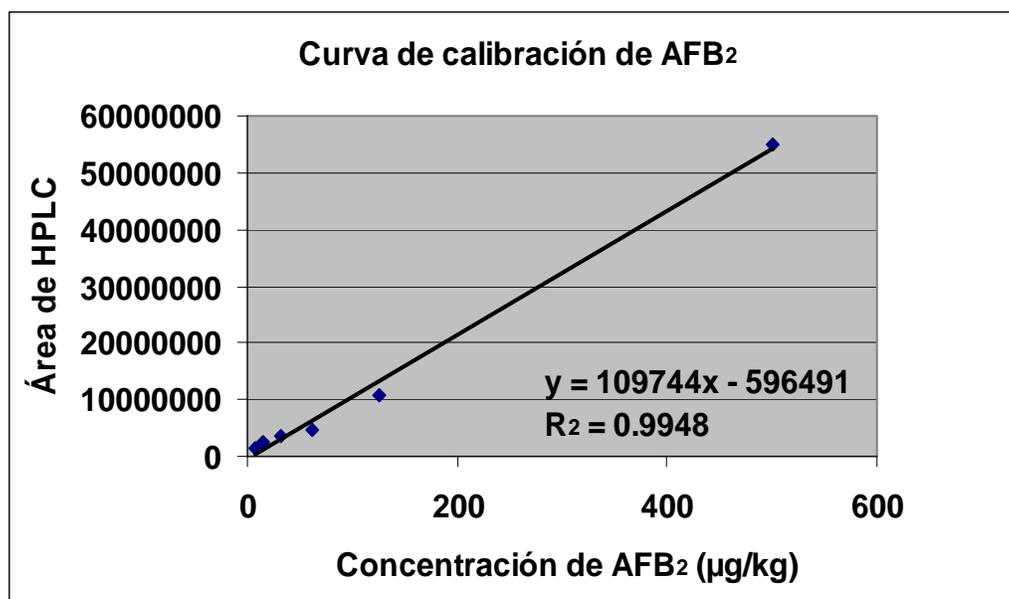
**b) Curva de calibración de AFB<sub>2</sub>.**

En el **Cuadro 7**, se muestran las diluciones utilizadas en la elaboración de la curva de calibración de AFB<sub>2</sub> están dentro del intervalo de concentración de 7.8 µg/kg a 500 µg/kg, su tiempo de retención está dentro del rango de 10.38 a 10.62 min, y las áreas bajo la curva obtenidas en los cromatogramas

para cada dilución. En la **Figura 14** se presenta gráficamente los datos de la curva de calibración, donde se observa un coeficiente de correlación de  $R^2=0.9948$  obtenido después de ser analizado con una regresión lineal.

**Cuadro 7: Resultados de la curva de calibración de AFB<sub>2</sub>.**

Dilución del estándar de AFB <sub>2</sub>	Concentración de AF en la curva de calibración (µg/kg)	Tiempo de retención (minutos)	Área relativa
1:1	500	10.55	54 925 928
1:2	125	10.42	10 859 224
1:8	62.50	10.38	4 734 204
1:16	31.25	10.62	3 623 392
1:32	15.63	10.62	2 403 952
1:64	7.80	10.57	1 324 144



**Figura 14: Curva de calibración para AFB<sub>2</sub> de 7.8 a 1000 µg/kg.**

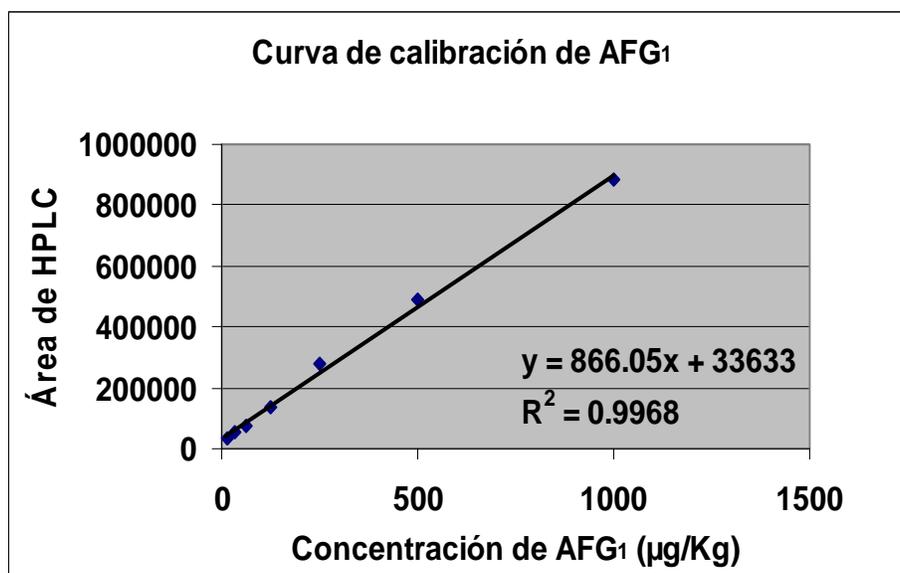
**c) Curva de calibración de AFG<sub>1</sub>.**

Las diluciones utilizadas en la elaboración de la curva de calibración de AFG<sub>1</sub>, se encuentran dentro del intervalo de concentración de 62.5 µg/kg a 1000 µg/kg, el tiempo de retención para esta toxina se localiza en el rango de 8.65 a 9.17 minutos como se observa en el **Cuadro 8**, en la cual también se muestra el área bajo la curva obtenida en los cromatogramas para cada dilución. La dilución 1:64 (7.8 µg/kg) hecha para la curva de calibración de

AFG<sub>1</sub> no fue detectada por el HPLC ya que esta toxina es menos sensible para el HPLC que AFB<sub>1</sub> y AFB<sub>2</sub>. En la **Figura 15** se presentan gráficamente los datos de la curva de calibración de AFG<sub>1</sub> después de analizarlos por medio de una regresión lineal, se obtuvo un coeficiente de correlación de  $R^2 = 0.9968$ .

**Cuadro 8: Resultados de la curva de calibración de AFG<sub>1</sub>.**

Dilución del estándar de AFG <sub>1</sub>	Concentración de AF en la curva de calibración (µg/kg)	Tiempo de retención (minutos)	Área relativa
1	1000	8.79	883882
1:1	500	8.72	486804
1:2	250	8.66	279800
1:4	125	8.67	137796
1:8	62.50	9.17	75248
1:16	31.25	9.09	53360
1:32	15.63	8.65	37120



**Figura 15: Curva de calibración para AFG<sub>1</sub> de 15.63 a 1000 µg/kg.**

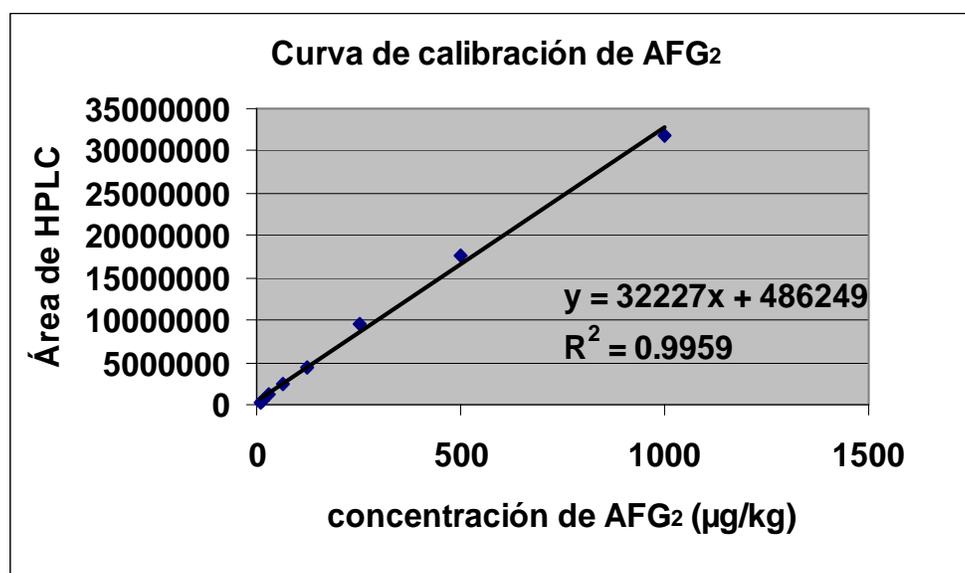
**d) Curva de calibración de AFG<sub>2</sub>.**

Las diluciones utilizadas en la elaboración de la curva de calibración de AFG<sub>2</sub>, se encuentran dentro del intervalo de concentración de 7.8 µg/kg a 1000 µg/kg, el tiempo de retención para esta toxina se localiza en el rango de 7.13 a 7.53 minutos como se observa en el **Cuadro 9**, en la cual también se muestra el área bajo la curva obtenida en los cromatogramas para cada dilución. En la

**Figura 16** se presentan los datos de la curva de calibración de AFG<sub>2</sub> de forma gráfica y después de analizarlos con una regresión lineal se obtuvo un coeficiente de correlación de  $R^2 = 0.9959$ .

**Cuadro 9: Resultados de la curva de calibración de AFG<sub>2</sub>.**

Dilución del estándar de AFG <sub>2</sub>	Concentración de AF en la curva de calibración (µg/kg)	Tiempo de retención (minutos)	Área relativa
1	1000	7.28	31920012
1:1	500	7.35	17725008
1:2	250	7.39	9618788
1:4	125	7.13	4447800
1:8	62.50	7.14	2326668
1:16	31.25	7.25	1178424
1:32	15.63	7.42	569160
1:64	7.80	7.53	305120



**Figura 16: Curva de calibración para AFG<sub>2</sub> de 7.8 a 1000 µg/kg.**

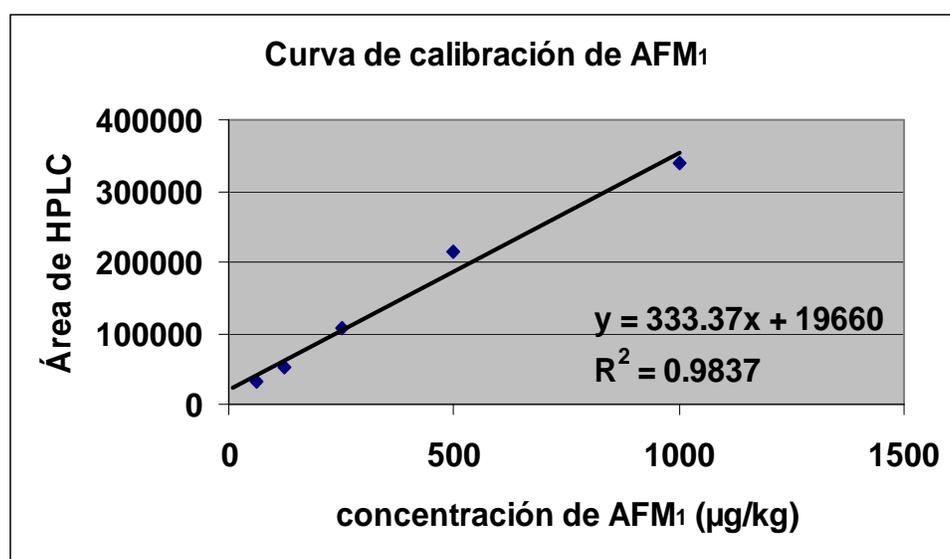
**e) Curva de calibración de AFM<sub>1</sub>.**

Las diluciones utilizadas en la elaboración de la curva de calibración de AFM<sub>1</sub>, se encuentran dentro del intervalo de concentración de 62.5 µg/kg a 1000 µg/kg, el tiempo de retención para esta toxina se localiza en el rango de 6.44 a 6.59 minutos como se observa en el **Cuadro 10**, en la cual también se muestra el área bajo la curva obtenida en los cromatogramas para cada

dilución. Las diluciones 1:16 (31.2 µg/kg), 1:32 (15.6 µg/kg) y 1:64 (7.8 µg/kg) hechas para la curva de calibración de AFM<sub>1</sub> no fueron detectadas por el HPLC al ser esta toxina menos sensible para el cromatógrafo. En la **Figura 17** se presentan gráficamente los datos de la curva de calibración de AFM<sub>1</sub> después de analizarlos por medio de una regresión lineal, se obtuvo un coeficiente de correlación de  $R^2 = 0.9837$ .

**Cuadro 10: Resultados de la curva de calibración de AFM<sub>1</sub>.**

Dilución del estándar de AFM <sub>1</sub>	Concentración de AF en la curva de calibración (µg/kg)	Tiempo de retención (minutos)	Área relativa
1	1000	6.44	340222
1:1	500	6.53	213320
1:2	250	6.54	106856
1:4	125	6.57	53004
1:8	62.5	6.59	30796



**Figura 17: Curva de calibración para AFM<sub>1</sub> de 62.5 a 1000 µg/kg.**

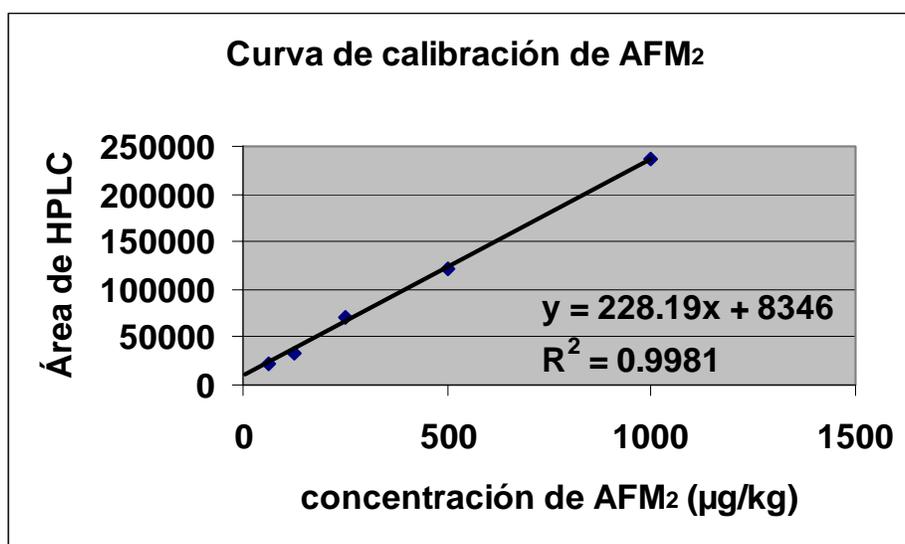
**f) Curva de calibración de AFM<sub>2</sub>.**

En el **Cuadro 11** se muestran las diluciones utilizadas en la elaboración de la curva de calibración de AFM<sub>2</sub> y están dentro del intervalo de concentración de 62.5 µg/kg a 1000 µg/kg, su tiempo de retención está dentro del rango de 9.46 a 9.68 min. y las áreas bajo la curva obtenidas en los cromatogramas para cada dilución. La dilución 1:64 (7.8 µg/kg) hecha para la

curva de calibración de AFM<sub>2</sub> no fue detectada por el HPLC al ser esta toxina menos sensible para el cromatógrafo como AFM<sub>1</sub>. En la **Figura 18** se presentan gráficamente los datos de la curva de calibración, donde se observa un coeficiente de correlación de  $R^2 = 0.9981$  obtenido después de ser analizados con una regresión lineal.

**Cuadro 11: Resultados de la curva de calibración de AFM<sub>2</sub>.**

Dilución del estándar de AFM <sub>2</sub>	Concentración de AFM <sub>2</sub> en la curva de calibración (µg/kg)	Tiempo de retención (minutos)	Área relativa
1	1000	9.46	236016
1:1	500	9.46	121568
1:2	250	9.51	71456
1:4	125	9.68	32512
1:8	62.5	9.63	22288



**Figura 18: Curva de calibración para AFM<sub>2</sub> de 62.5 a 1000 µg/kg.**

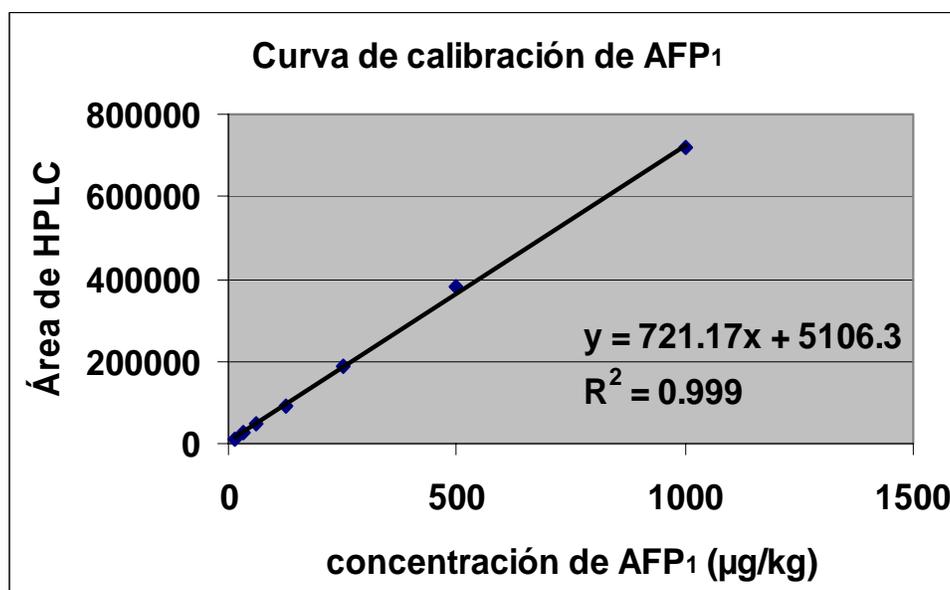
**g) Curva de calibración de AFP<sub>1</sub>.**

En el **Cuadro 12**, se observan las diluciones utilizadas en la elaboración de la curva de calibración de AFP<sub>1</sub>, las cuales se encuentran dentro del intervalo de concentración de 15.63 µg/kg a 1000 µg/kg, su tiempo de retención está dentro del rango de 5.38 a 5.74 min y las áreas bajo la curva obtenidas en los cromatogramas para cada dilución. En la **Figura 19** se presenta

gráficamente los datos de la curva de calibración, donde se observa un coeficiente de correlación de  $R^2 = 0.999$  obtenido después de ser analizado con una regresión lineal.

**Cuadro 12: Resultados de la curva de calibración de AFP<sub>1</sub>.**

Dilución del estándar de AFP <sub>1</sub>	Concentración de AFP <sub>1</sub> en la curva de calibración (µg/kg)	Tiempo de retención (minutos)	Área relativa
1	1000	5.74	718234
1:1	500	5.69	381808
1:2	250	5.59	189296
1:4	125	5.47	89492
1:8	62.5	5.38	46032
1:16	31.25	5.55	28860
1:32	15.63	5.59	13094



**Figura 19: Curva de calibración para AFP<sub>1</sub> de 15.6 a 1000 µg/kg.**

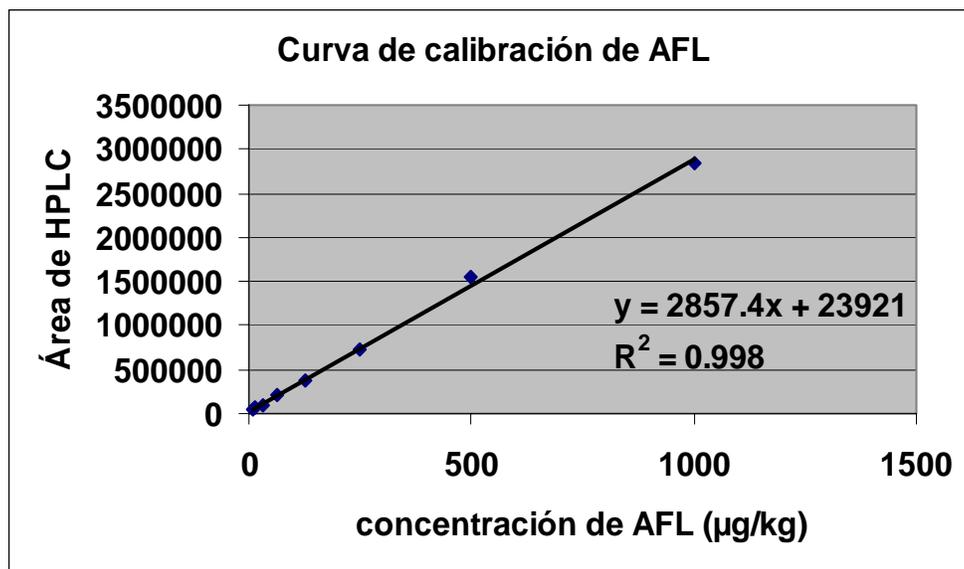
**h) Curva de calibración de AFL.**

En el **Cuadro 13**, se observan las diluciones utilizadas en la elaboración de la curva de calibración de AFL, las cuales se encuentran dentro del intervalo

de concentración de 7.8 µg/kg a 1000 µg/kg, su tiempo de retención está dentro del rango de 9.39 a 9.60 min, y las áreas bajo la curva obtenidas en los cromatogramas para cada dilución. En la **Figura 20** se presenta gráficamente los datos de la curva de calibración, donde se observa un coeficiente de correlación de  $R^2 = 0.998$  obtenido después de ser analizado con una regresión lineal.

**Cuadro 13: Resultados de la curva de calibración de AFL.**

Dilución del estándar de AFL	Concentración de AFL en la curva de calibración (µg/kg)	Tiempo de retención (minutos)	Área relativa
1	1000	9.43	2835360
1:1	500	9.47	1554792
1:2	250	9.53	718360
1:4	125	9.60	386448
1:8	62.5	9.53	205344
1:16	31.25	9.46	87636
1:32	15.63	9.44	59512
1:64	7.8	9.39	36336



**Figura 20: Curva de calibración para AFL de 7.8 a 1000 µg/kg.**

### **IV.3. Comparación de los porcentajes de recuperación de los dos métodos químicos para el análisis de AFB<sub>1</sub> en tejidos de aves.**

#### **IV.3.1. Adición de AFB<sub>1</sub> (Fortificación) de los tejidos de aves y su porcentaje de recuperación para la comparación y valoración de las técnicas.**

A continuación se presentan los datos obtenidos en la cuantificación por HPLC de 30 extracciones (15 controles y 15 fortificadas) correspondientes a los estudios de porcentaje de recuperación del método de Qian y Yang (1984), 30 extracciones del porcentaje de recuperación del método de Koeltzow & Tanner (1990), y la comparación de ambos métodos, para saber cuál era más recomendable para la cuantificación, identificación y obtención de un mayor porcentaje de recuperación de AF en tejidos de aves.

#### **IV.3.2. Método de Qian & Yang (1984), para la extracción rápida y detección de aflatoxinas en los hígados, mollejas y pechugas para obtener el porcentaje de recuperación.**

##### **a. Recuperación de AFB<sub>1</sub> en hígado por el método de Qian & Yang (1984).**

En los cromatogramas de los extractos de tejido de hígado, molleja y pechuga fortificados de AFB<sub>1</sub> y analizados por el método de Qian & Yang, 1984, se observa lo siguiente:

Como se puede ver en el **Cuadro 14** la primera columna LC-18 retuvo más AFB<sub>1</sub> que la 2<sup>a</sup> Columna, y en la técnica de Qian & Yang (1984) los

autores indican que la AFB<sub>1</sub> se queda retenida en la parte blanca (el gel de sílice, más alúmina) de la 2<sup>a</sup> columna de modo que si seguimos sus indicaciones y eliminamos lo que queda retenido en la 1<sup>a</sup> columna LC-18 se estará perdiendo el 83.4% de la AFB<sub>1</sub> total de la muestra. Cuando se reprodujo la técnica de Qian & Yang, la mayoría de la AFB<sub>1</sub> se retuvo en la primera columna, en contra de lo especificado por los autores. Es decir, cuando se use esta técnica hay que eluir ambas columnas con acetona al 5% en diclorometano, que fue el eluyente recomendado y usado, y sumar la cantidad de AFB<sub>1</sub> obtenido de ambas columnas, para tener una recuperación de 92%, los autores de la técnica reportan una recuperación total de 95% que no se hubiera logrado eliminando el eluido la 1<sup>a</sup> columna.

**Cuadro 14: Recuperación de AFB<sub>1</sub> de los extractos de hígado fortificados por el método de Qian & Yang (1984).**

N° Hígado	Recuperación de AFB <sub>1</sub> en hígado.						
	Control			Fortificación			
	1 <sup>a</sup> Columna µg/kg	2 <sup>a</sup> Columna µg/kg	Total de AFB <sub>1</sub> basal µg/kg	Adición de AFB <sub>1</sub> µg/kg	1 <sup>a</sup> Columna µg/kg	2 <sup>a</sup> Columna µg/kg	Total de AFB <sub>1</sub> recuperada (%)
1	22.6	25.1	47.7	0.5	22.9	25.2	48.1 (80%)
2	24.7	10.4	35.1	1.0	25.3	10.7	36.0 (90%)
3	9.0	7.1	16.1	2.0	10.7	7.2	17.9 (90%)
4	8.9	10.8	19.7	5.0	11.4	13.3	24.7 (100%)
5	286.1	10.4	296.5	10.0	291.1	15.4	306.5 (100%)
	<b>351.3</b>	<b>63.8</b>	<b>415.1</b>		<b>361.4</b>	<b>71.8</b>	<b>433.2 (92%)</b>

En la recuperación de la AFB<sub>1</sub> del hígado fortificado, aparecen otros picos con tiempo de retención de 6.70 minutos correspondiente a AFM<sub>1</sub>, con un área de 4,644,568 que corresponde a 13,651 µg/kg que es una cantidad alta, esto indicaría que el ave cuyo hígado se analizó y que fue comprado en el supermercado, había comido AFB<sub>1</sub> en su alimento y lo había acumulado en el hígado a lo largo de su vida, y ya estaba metabolizado en su mayoría (96.7%) como AFM<sub>1</sub>, y la cantidad de AFB<sub>1</sub> basal que fue de 415.1 µg/kg que correspondió al 3.3% del total ingerido. El ave metaboliza a la AFB<sub>1</sub> formando un producto menos tóxico que es la AFM<sub>1</sub>, como un proceso de destoxificación.

Generalmente los animales metabolizan la AFB<sub>1</sub>, a AFM<sub>1</sub>, AFP<sub>1</sub> y AFL. Como podemos observar en la **Figura 8** de la Ruta biosintética de las AF, la AFG<sub>2</sub> es un producto metabólico de la dihidro-O- metil esterigmatocistina que se sintetiza en forma separada a la AFB<sub>1</sub> y sin conexión directa con ella (Trail

*et al.*, 1995; Minto & Townsend, 1997; Bennett *et al.*, 1997). Las primeras investigaciones sobre la ruta biosintética de AF (Steyn *et al.*, 1980), realizadas con C<sup>14</sup>, estudios cristalográficos y de resonancia magnética, indican que la AFB<sub>1</sub> puede formar a la AFG<sub>1</sub>, cosa que se especifica en las publicaciones de Trail *et al.* (1995), de Minto & Townsend (1997) y de Bennett *et al.* (1997) como producida a partir de un ancestro que es la dimetil esterigmatocistina.

**b. Recuperación de AFB<sub>1</sub> en molleja por el método de Qian & Yang (1984).**

La recuperación de AFB<sub>1</sub> en molleja fue de 90.2%, lo cual se consideró aceptable para dar resultados confiables. La contaminación basal de la molleja fue de 42.8 µg/kg, pero menor que el hígado y la pechuga, lo cual indica que la población mexicana está consumiendo esta cantidad de AFB<sub>1</sub> cada vez que ingiere mollejas, cantidad que supera el límite de 20 µg/kg de AF totales establecido en la NOM-188-SSA1-2002 (**Cuadro 15**).

**Cuadro 15: Recuperación de AFB<sub>1</sub> de los extractos de molleja fortificados por el método de Qian & Yang (1984).**

N° Molleja	Recuperación de AFB <sub>1</sub> en molleja.						
	Control			Fortificación			
	1 <sup>a</sup> Columna µg/kg	2 <sup>a</sup> Columna µg/kg	Total de AFB <sub>1</sub> basal µg/kg	Adición de AFB <sub>1</sub> µg/kg	1 <sup>a</sup> Columna µg/kg	2 <sup>a</sup> Columna µg/kg	Total de AFB <sub>1</sub> recuperada (%)
1	6.5	5.7	12.2	0.5	6.7	5.9	12.6 (80%)
2	1.0	5.4	6.4	1.0	0	7.3	7.3 (90%)
3	4.6	4.0	8.6	2.0	4.5	5.9	10.4 (90%)
4	1.6	0	1.6	5.0	6.4	0	6.4 (96%)
5	12.3	1.7	14.0	10.0	17.0	6.5	23.5 (95%)
	<b>26.0</b>	<b>16.8</b>	<b>42.8</b>		<b>34.6</b>	<b>25.6</b>	<b>60.2 (90.2%)</b>

La recuperación de AF en hígado fue mayor (92%) que en molleja (90%) esto se debe en mucho a la anatomía y fisiología del tejido, pues la molleja es más dura y callosa que el hígado, quien es un tejido blando y lleno de enzimas que facilitan el metabolismo. **Cuadros 14 y 15.**

En molleja hubo también AFB<sub>2</sub> (10.57 µg/kg), AFG<sub>1</sub> (81.3 µg/kg) y trazas de AFG<sub>2</sub> (0.6 µg/kg).

**c. Recuperación de AFB<sub>1</sub> en pechuga por el método de Qian & Yang (1984).**

La recuperación promedio de AFB<sub>1</sub> en pechuga fue de 87% lo cual también es una proporción correcta para dar resultados confiables. La **contaminación basal de la pechuga** fue de **334.9 µg/kg**, lo cual indica que la población mexicana está consumiendo esta cantidad de AFB<sub>1</sub> cada vez que ingiere pechugas, considerando que la mayoría de las gallinas contengan ese nivel de contaminación de AFB<sub>1</sub>.

En la pechuga la recuperación obtenida en la 2<sup>a</sup>. Columna LC-18 es mayor (294.0 µg/kg) que la retenida en la primera columna (57.9 µg/kg), como lo recomienda la técnica de Qian & Yang (1984), y pero si no se toma en cuenta el eluido de la primera columna se perderá el 20% de la AFB<sub>1</sub>, por lo que se recomienda eluir ambas columnas y sumar sus contenidos de AF para tener una medición más precisa. Se encontró la presencia de AFG<sub>1</sub> y AFG<sub>2</sub> posiblemente provenientes del alimento dado a las aves. Se presentaron también AFB<sub>2</sub>, AFM<sub>2</sub> y AFL. **Cuadro 16.**

**Cuadro 16: Recuperación de AFB<sub>1</sub> de los extractos de pechuga fortificados por el método de Qian & Yang (1984).**

N° Pechuga	Recuperación de AFB <sub>1</sub> en pechuga.						
	Control			Fortificación			
	1 <sup>a</sup> Columna µg/kg	2 <sup>a</sup> Columna µg/kg	Total de AFB <sub>1</sub> basal (µg/kg)	Adición de AFB <sub>1</sub> µg/kg	1 <sup>a</sup> Columna µg/kg	2 <sup>a</sup> Columna µg/kg	Total de AFB <sub>1</sub> recuperada (%)
1	0	11.1	11.1	0.5	-	11.5	11.5 (80%)
2	0	44.7	44.7	1.0	-	45.6	45.6 (90%)
3	10.4	1.0	11.4	2.0	13.0	-	13.0 (80%)
4	43.0	149.7	192.7	5.0	44.9	152.2	197.1 (88%)
5	-	75.0	75.0	10.0	-	84.7	84.7 (97%)
	<b>53.4</b>	<b>281.5</b>	<b>334.9</b>		<b>57.9</b>	<b>294.0</b>	<b>351.9 (87%)</b>

Las recuperaciones obtenidas en hígado (92%), molleja (90%) y pechuga (87%) quizá pudieron ser mayores en el caso de haber usado un homogeneizador de tejidos en lugar de mortero para la molienda, ya que el homogenizado en partículas más pequeñas da más uniformidad al análisis de las muestras.

El total de la contaminación basal de AFB<sub>1</sub> en los hígados control fue de 415.1 µg/kg mientras que en molleja fue de 42.8 µg/kg y en pechuga 334.9 µg/kg, indicando que el riesgo de consumo de AF en orden decreciente es: primero el de mayor riesgo es el hígado, en segundo lugar la pechuga y en tercer lugar la molleja. Hay que considerar que se obtuvo la contaminación basal (de los controles comprados en supermercado), y de la contaminación artificial de los tejidos fortificados, esto nos da un panorama completo de las AF de cada tejido. Las diferentes durezas de los tejidos quizá hicieron una diferencia pequeña, aunque no hubieran cambiado las proporciones de riesgo de los tejidos. Los resultados de las muestras del experimento se presentarán en el análisis de los tejidos de las gallinas.

#### **IV.3.3. Método de Koeltzow & Tanner (1990) para la extracción y concentración de aflatoxinas de tejido animal, por columnas de inmunoafinidad para obtener el porcentaje de recuperación.**

Los cromatogramas obtenidos de los eluidos de la extracción de AFB<sub>1</sub> con el método químico de Koeltzow & Tanner (1990) muestran un porcentaje de recuperación bajo. La recuperación de AFB<sub>1</sub> del método de Koeltzow & Tanner (1990) y el área de los cromatogramas de los tres distintos tejidos, su tiempo de retención y su área se presentan en los **Cuadros 17, 18 y 19**.

##### **a. Recuperación de AFB<sub>1</sub> en hígado por el método de Koeltzow & Tanner, 1990.**

La recuperación de AFB<sub>1</sub> por el método de Koeltzow & Tanner (1990) fue de 94% en hígado de gallina y con un límite de detección de 5 µg/kg, abajo del cual ya no se logró detectar ninguna AF (**Cuadro 17**). El método de Qian & Yang (1984) tuvo un límite de detección de 0.5 µg/kg aunque un porcentaje de recuperación del 92%.

**Cuadro 17: Cuantificación del extracto de hígado fortificado con AFB<sub>1</sub> (µg/kg), y concentrado en columnas de inmunoafinidad, por el método de Koeltzow & Tanner (1990).**

N° Hígado	Recuperación de AFB <sub>1</sub> en hígado.		
	Control	Fortificación	
	Total de AFB <sub>1</sub> basal (µg/kg)	Adición de AFB <sub>1</sub> (µg/kg)	Total de AFB <sub>1</sub> recuperada (%)
1	0	0.5	0
2	0	1.0	0
3	0	2.0	0
4	93.8	5.0	98.4 (92%)
5	79.2	10.0	88.7 (95%)
	<b>173.0</b>		<b>187.1 (94%)</b>

**b. Recuperación de AFB<sub>1</sub> en molleja por el método de columnas de inmunoafinidad (Koeltzow & Tanner, 1990).**

En molleja la recuperación obtenida por el método de columnas de inmunoafinidad fue de 92%. Este método recupera hasta 2 ng/mL lo cual es un límite menor al de la recuperación en hígado (**Cuadro 18**).

**Cuadro 18: Cuantificación del extracto de molleja fortificado con AFB<sub>1</sub> (µg/kg), y concentrado en columnas de inmunoafinidad por el método de Koeltzow & Tanner (1990).**

N° Molleja	Recuperación de AFB <sub>1</sub> en molleja.		
	Control	Fortificación	
	Total de AFB <sub>1</sub> basal (µg/kg)	Adición de AFB <sub>1</sub> (µg/kg)	Total de AFB <sub>1</sub> recuperada (%)
1	0	0.5	0
2	0	1	0
3	11.0	2	12.8 (90%)
4	20.9	5	25.6 (94%)
5	3.5	10	13.8 (92%)
	<b>35.4</b>		<b>52.2 (92%)</b>

**c. Recuperación de AFB<sub>1</sub> en pechuga por el método de columnas de inmunoafinidad (Koeltzow & Tanner, 1990).**

La recuperación de AFB<sub>1</sub> en pechuga por el método de Koeltzow & Tanner (1990) fue de 87.5%, con un límite de detección de 1 ng/g, la cantidad adicionada de 0.5 µg/kg de AFB<sub>1</sub> ya no se logró detectar por medio de esta técnica. En la fortificación de pechuga con 10 µg/kg se obtuvo un porcentaje de recuperación de 92% y esta prueba se repitió 4 veces (**Cuadro 19**).

**Cuadro 19: Cuantificación del extracto de pechuga fortificado con AFB<sub>1</sub> (µg/kg), y concentrado en columnas de inmunoafinidad por el método de Koeltzow & Tanner (1990).**

N° Pechuga	Recuperación de AFB <sub>1</sub> en pechuga.		
	Control	Fortificación	
	Total de AFB <sub>1</sub> basal (µg/kg)	Adición de AFB <sub>1</sub> (µg/kg)	Total de AFB <sub>1</sub> recuperada (%)
1	0	0.5	0
2	10.2	1.0	11.0 (80 %)
3	20.1	2.0	21.9 (90%)
4	35.6	5.0	40.0 (88 %)
5	6.9	10.0	16.1 (92%)
	<b>72.8</b>		<b>89.0 (87.5%)</b>

#### IV.3.4. Cuantificación de aflatoxinas en los tejidos de gallina del experimento por método de Qian & Yang (1984).

##### a.1. Cuantificación de aflatoxinas en hígados de gallinas del experimento con método de Qian & Yang (1984).

En el **Cuadro 20 a**, se puede observar cómo los controles de las segundas columnas LC-18 retienen más AF que las primeras, como se esperaba según la técnica de Qian & Yang (1984) (**Figura 21 a, b, d, e y f**), excepto AFG<sub>1</sub>, donde la primera columna LC-18 retuvo una cantidad promedio por gallina de 48.5 µg/kg y la segunda retuvo 30.2 µg/kg por gallina (**Figura 21 c**).

**Cuadro 20 a: Cuantificación de aflatoxinas (µg/kg) en los hígados de gallina del experimento por el método de Qian & Yang (1984).**

Gallinas	Cantidad ( µg/kg) de AF en hígado de gallina															
	AFB <sub>1</sub>		AFB <sub>2</sub>		AFG <sub>1</sub>		AFG <sub>2</sub>		AFM <sub>1</sub>		AFM <sub>2</sub>		AFP <sub>1</sub>		AFL	
	Columna		Columna		Columna		Columna		Columna		Columna		Columna		Columna	
Control	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>
1	-	19.8	-	-	111.7	183.2	1.6	13.1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	3.0	17.4	-	-	-	-	42.3	-	-	13.4
3	-	-	-	-	-	35.1	2.8	16.1	-	-	-	-	-	-	7.6	-
4	-	-	-	-	-	-	3.1	12.3	-	-	-	-	-	-	7.3	-
5	1.7	-	-	-	71.8	-	0.9	16.3	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	99.6	10.9	1.6	7.4	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	13.6	-	2.0	23.1	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	66.0	-	-	122.1	35.3	2.8	13.2	-	-	-	-	-	464.6	-	14.5
9	-	-	-	-	18.1	7.3	3.1	28.2	-	-	-	-	-	358.6	-	-
Suma	1.7	65.8	-	-	436.9	271.8	20.9	147.1	-	-	-	-	42.3	823.2	14.9	27.9
$\bar{X}$ AF/ gallina	0.2	7.3	-	-	48.5	30.2	2.3	16.3	-	-	-	-	4.7	91.5	1.7	3.1

<b>Tratamiento: gallinas alimentadas con sorgo contaminado con 30 µg/kg AFB<sub>1</sub></b>															
1	-	-	-	-	11.8	352.5	3.8	14.2	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	155.6	1.3	8.2	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	7.2	26.4	1.2	9.4	-	-	-	-	-	106.9	-
4	-	-	-	-	-	54.3	0.8	13.4	-	-	-	-	-	1069.9	-
5	-	-	3.9	-	97.9	143	0.8	30.5	-	-	-	-	-	1694.7	-
6	-	-	-	-	-	-	1.1	20.5	-	-	-	-	124.2	1428.6	16.1
7	-	-	-	-	-	-	1.5	18.4	41.8	-	-	-	-	441.4	-
8	-	-	-	-	-	-	1.1	13.1	40.7	-	-	-	-	312.1	6.8
<b>Suma</b>	-	-	<b>3.9</b>	-	<b>116.9</b>	<b>731.8</b>	<b>11.6</b>	<b>127.7</b>	<b>82.5</b>	-	-	-	<b>124.2</b>	<b>5053.6</b>	<b>22.9</b>
<b>X AF/ gallina</b>	-	-	<b>0.5</b>	-	<b>14.6</b>	<b>91.5</b>	<b>1.5</b>	<b>16.0</b>	<b>10.3</b>	-	-	-	<b>15.5</b>	<b>631.7</b>	<b>2.9</b>
<b>Tratamiento: gallinas alimentadas con sorgo contaminado con 500 µg/kg AFB<sub>1</sub></b>															
1	-	-	-	-	12.9	12.1	1.2	9.0	-	-	-	-	-	71.2	-
2	-	-	0.1	-	70.1	104.6	0.7	11.5	39.6	-	-	-	-	231.3	-
3	5.4	-	-	-	71.0	122.2	1.1	14.9	-	-	-	-	-	1081.1	-
4	-	-	-	-	19.6	16.3	0.8	12.4	36.9	-	-	-	-	2086.7	-
5	-	-	-	-	-	136.5	0.9	16.5	-	2919.1	-	-	-	592.8	6.7
6	-	-	-	0.43	35.0	351.9	-	12.1	39.0	620.2	-	-	-	1489.8	-
7	-	-	-	-	-	-	1.0	17.9	52.4	1031.0	-	-	-	421.1	4.5
8	-	-	-	-	-	15.7	-	29.6	-	-	-	-	-	196.6	-
<b>Suma</b>	<b>5.4</b>	-	<b>0.1</b>	<b>0.43</b>	<b>208.6</b>	<b>759.3</b>	<b>5.7</b>	<b>121.9</b>	<b>167.9</b>	<b>4570.3</b>	-	-	-	<b>6170.6</b>	<b>11.2</b>
<b>X AF/ gallina</b>	<b>0.7</b>	-	<b>0.01</b>	<b>0.05</b>	<b>26.1</b>	<b>94.9</b>	<b>0.7</b>	<b>15.3</b>	<b>21.0</b>	<b>571.3</b>	-	-	-	<b>771.3</b>	<b>1.4</b>

- = Análisis realizado igual a no detectable.

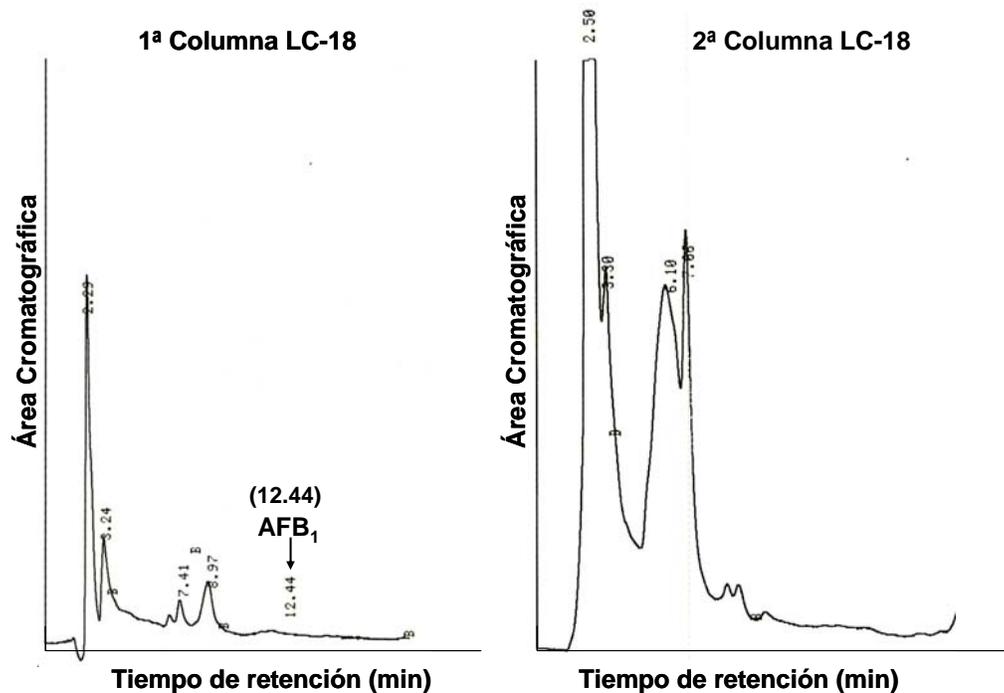
Quizá la mayor retención de AFG<sub>1</sub> por la primera columna LC-18, se relacione con la estructura química de esta AF, donde el oxígeno forma una lactona, en el anillo final. Posiblemente esta lactona interacciona con más rapidez frente a la alúmina y el gel de sílice, de la primera columna LC-18, y queda menos sustrato para interaccionar cuando se repite su elución con la segunda columna LC-18. Si no se suman las AF de los eluidos con acetona en diclorometano de ambas columnas, se perderá el 9.33% de las AF cuantificadas por este método.

Los resultados de un gramo de **hígado control**, muestran el posible riesgo de ingestión de AF del consumidor. Al sumar las 9 repeticiones o sea los pedazos de un gramo de las 9 gallinas control, dio una suma de AF totales de 1,852.5 ng (= 1.9 µg) en 9 g de hígado, que es una cantidad real. El riesgo es en patés o en papilla de hígado de pollo para niños, donde el consumo es alrededor de 27 g por ración (sería de 5.7 µg), que se sumará al resto de AF de los otros alimentos (arroz, tortillas, lácteos, etc.), suponiendo que contienen concentraciones similares a las encontradas en el hígado.

Con respecto al tratamiento de sorgo contaminado con **30 µg/kg de AFB<sub>1</sub>** y que sirvió de alimento a las gallinas, los eluidos de las segundas columnas LC-18 retienen más las AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, AFP<sub>1</sub> y AFL (**Figura 22 b, c, e y f**) que a AFB<sub>2</sub> y AFM<sub>1</sub> (**Figura 22 a y d**), quienes no se detectaron en las segundas columnas LC-18.

En el tratamiento de 500 µg/kg de AFB<sub>1</sub> se encontraron las misma AF que en el tratamiento de 30 µg/kg de AFB<sub>1</sub>, más AFB<sub>1</sub> retenida por la primera columna LC-18 (**Figura 23**). No se detectó AFM<sub>2</sub> en ningún caso, quizá no existe biotransformación de AFB<sub>1</sub> a AFM<sub>2</sub> en el metabolismo de las gallinas.

Se presentan los cromatogramas más representativos de las AF del hígado Control (**Figura 21**), de los tratamientos de las gallinas alimentadas con sorgo contaminado con 30 µg/kg de AFB<sub>1</sub> (**Figura 22**) y 500 µg/kg de AFB<sub>1</sub> (**Figura 23**), en los cuales se observan las diferencias entre la retención de ambas columnas LC-18 .



**Figura 21: (a) Cromatogramas de AFB<sub>1</sub> de la muestra 5 de hígado Control.**

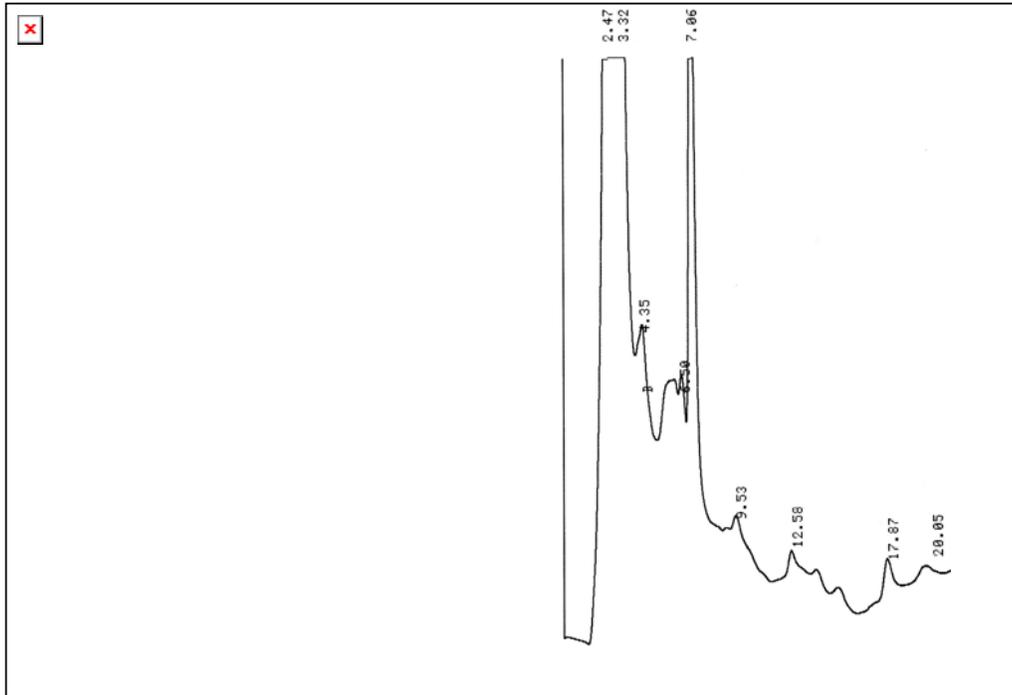


Figura 21: (b) Cromatogramas de AFB<sub>1</sub> de la muestra 8 de hígado del grupo Control.

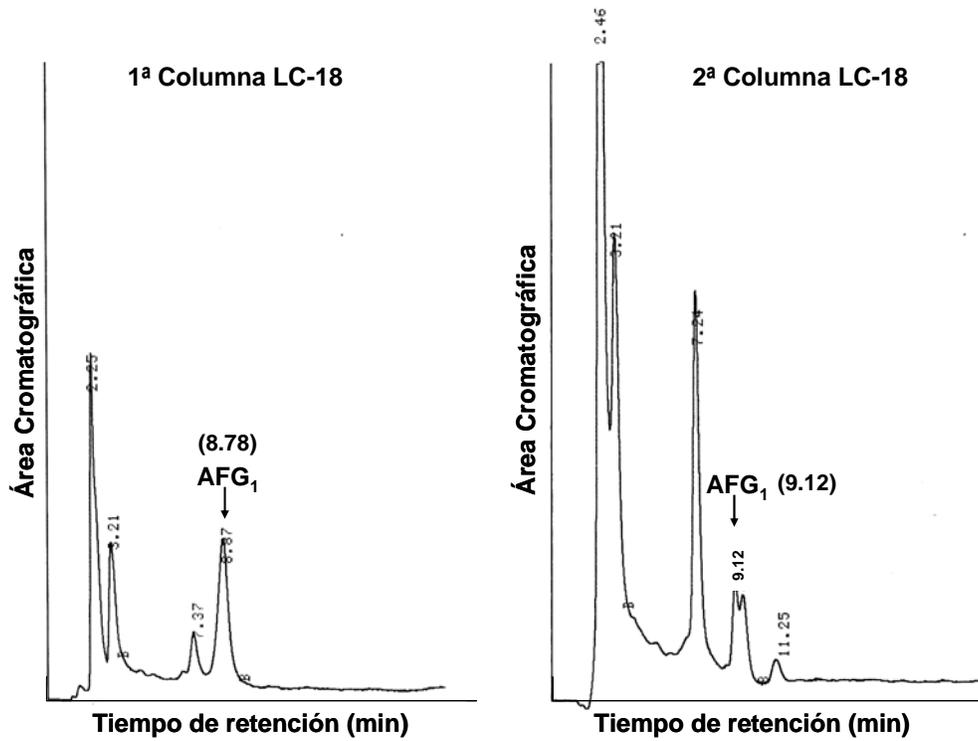


Figura 21: (c) Cromatogramas de AFG<sub>1</sub> de la muestra 1 de hígado del grupo Control.

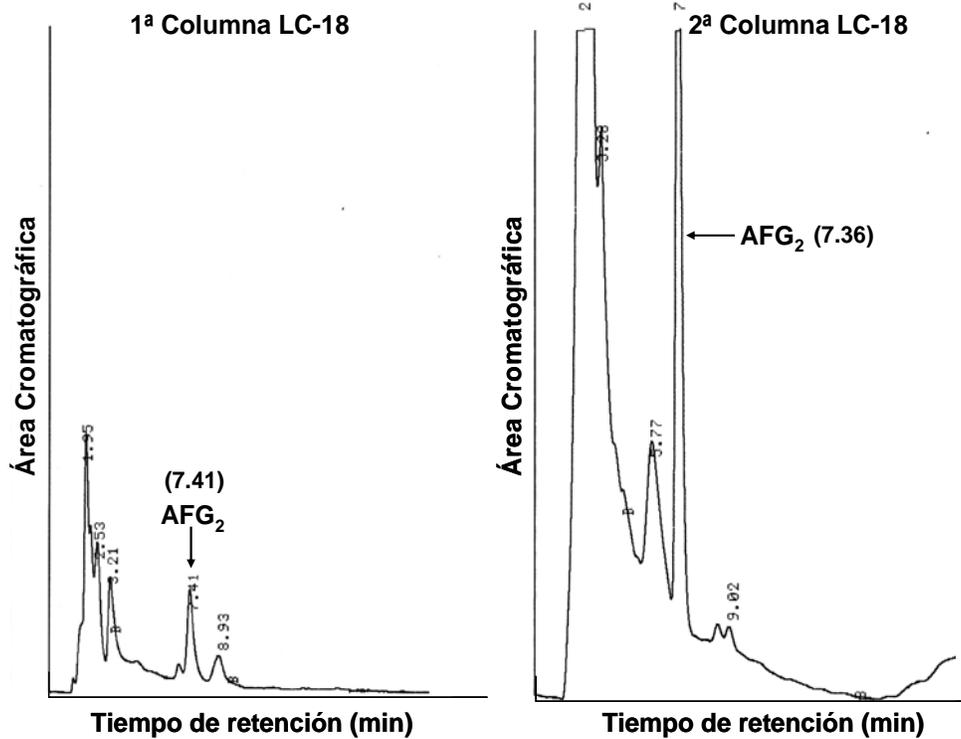


Figura 21: (d) Cromatogramas de AFG<sub>2</sub> de la muestra 9 de hígado del grupo Control.

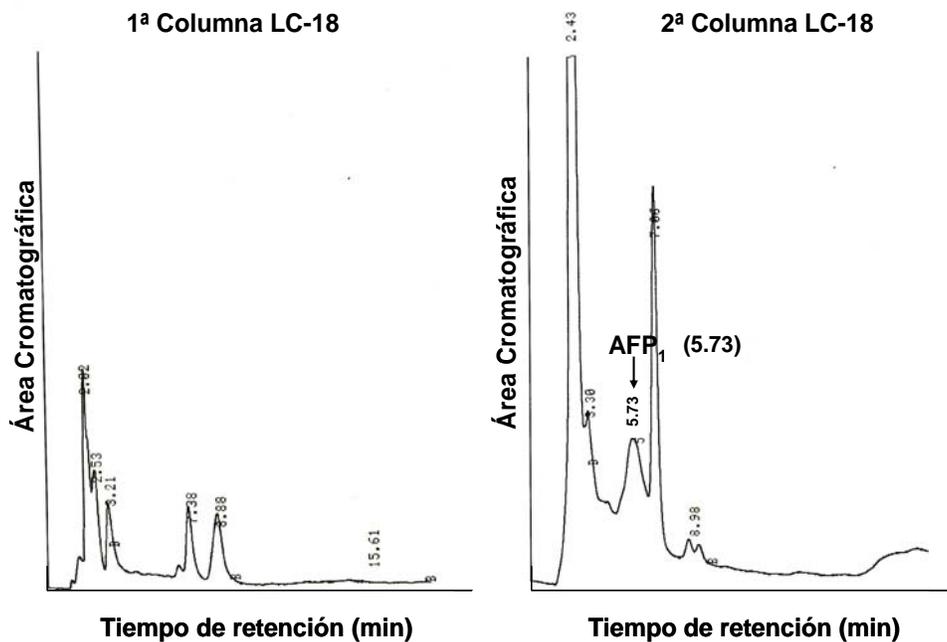
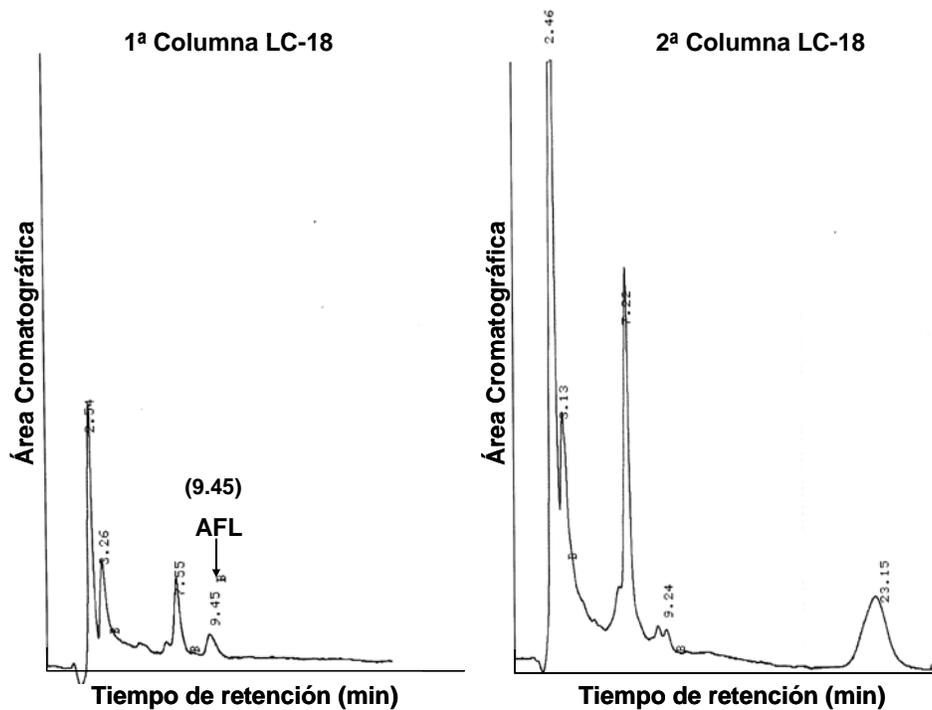


Figura 21: (e) Cromatogramas de AFP<sub>1</sub> de la muestra 8 de hígado Control.



**Figura 21: (f) Cromatogramas de AFL de la muestra 3 de hígado Control.**

**Figura 21: Cromatogramas de las aflatoxinas encontradas en los hígados de gallinas del grupo Control alimentadas con sorgo sin AFB<sub>1</sub>. (a) AFB<sub>1</sub> de la muestra 5. (b) AFB<sub>1</sub> de la muestra 8. (c) AFG<sub>1</sub> de la muestra 1. (d) AFG<sub>2</sub> de la muestra 9. (e) AFP<sub>1</sub> de la muestra 8. (f) AFL de la muestra 3.**

Cromatogramas correspondientes a la retención de las AF, por las dos columnas LC-18, provenientes de los hígados de las gallinas alimentadas con sorgo adicionado con 30 µg/kg.

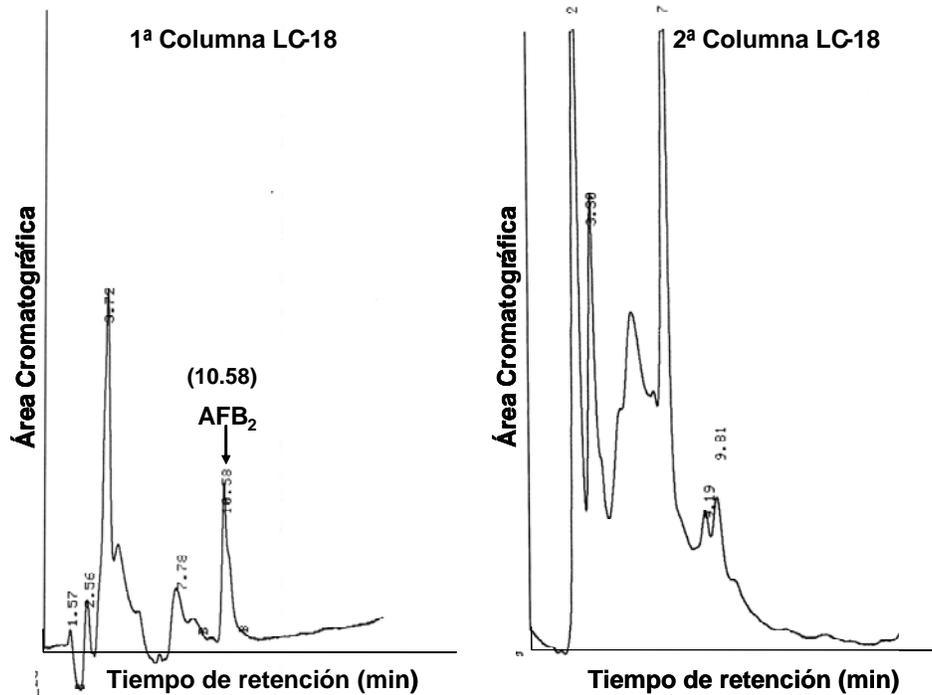


Figura 22: (a) Cromatogramas de AFB<sub>2</sub> de la muestra 5 de hígado de gallina alimentada con sorgo contaminado con 30 µg/kg de AFB<sub>1</sub>.

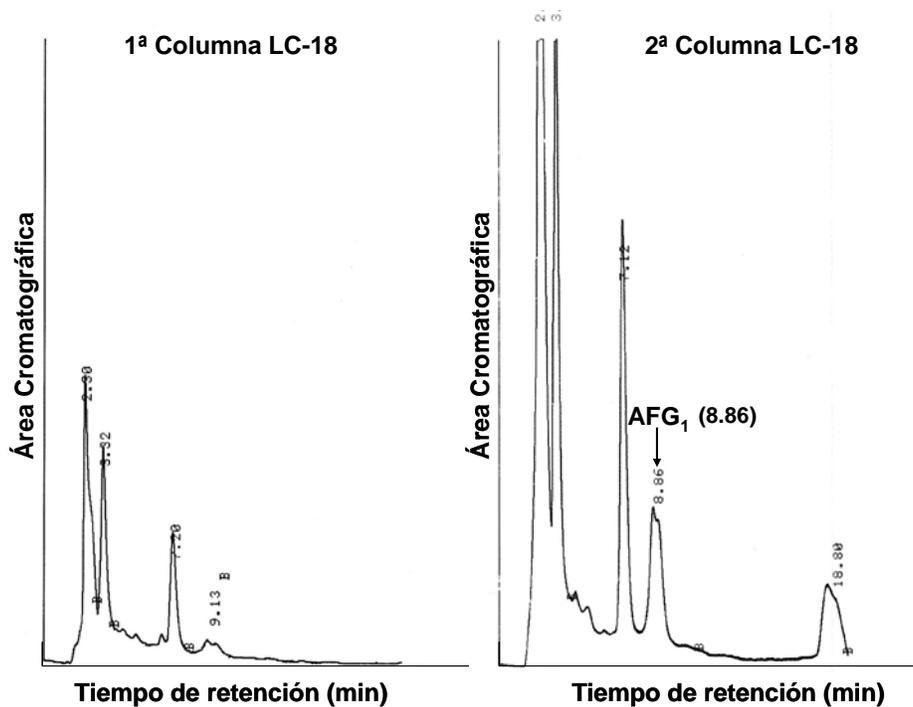


Figura 22: (b) Cromatogramas de AFG<sub>1</sub> de la muestra 1 de hígado de gallina alimentada con sorgo contaminado con 30 µg/kg de AFB<sub>1</sub>.

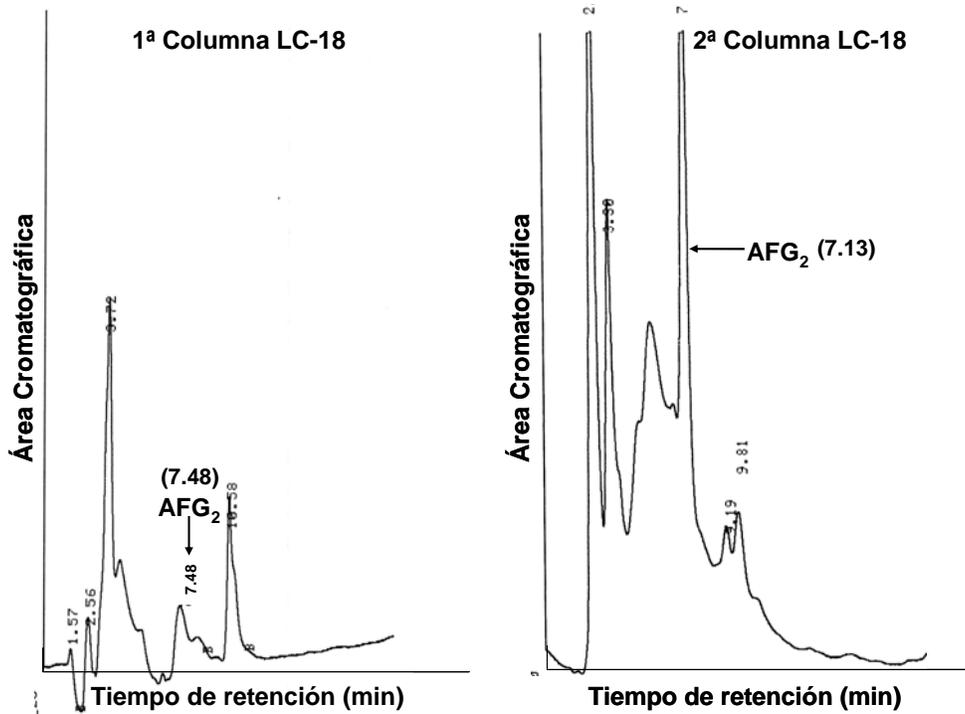


Figura 22: (c) Cromatogramas de AFG<sub>2</sub> de la muestra 5 de hígado de gallina alimentada con sorgo contaminado con 30 µg/kg de AFB<sub>1</sub>.

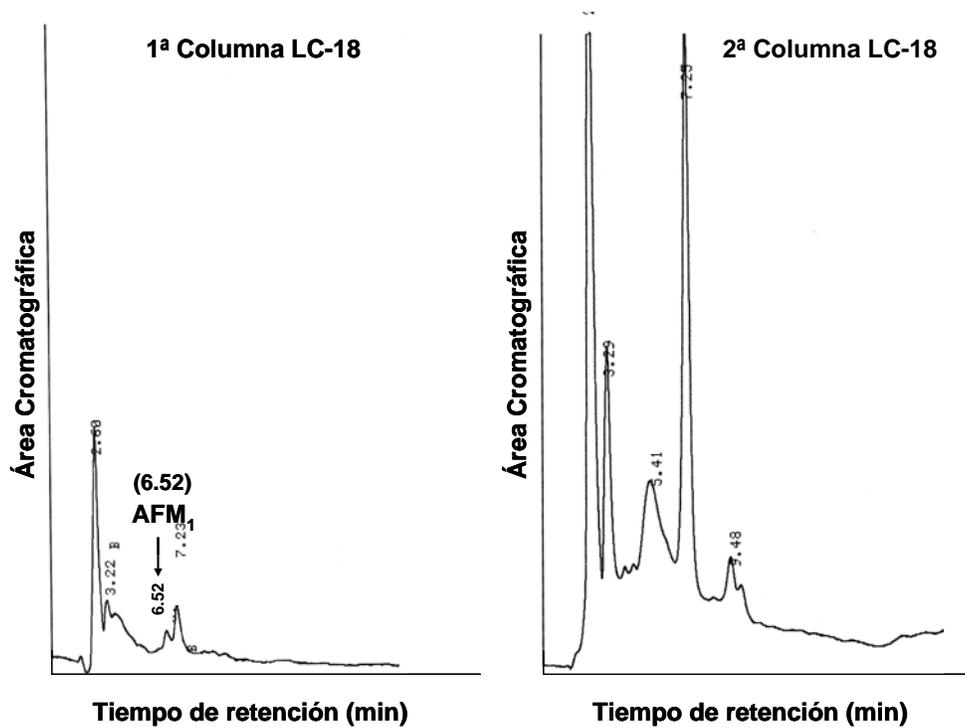


Figura 22: (d) Cromatogramas de  $AFP_1$  de la muestra 7 de hígado de gallina alimentada con sorgo contaminado con  $30 \mu\text{g}/\text{kg}$  de  $AFB_1$ .

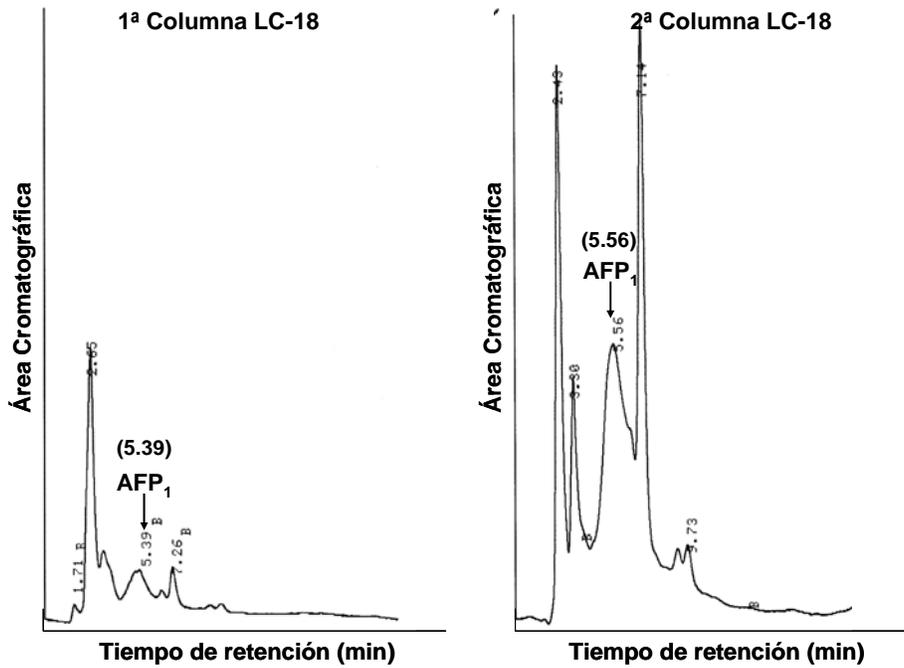


Figura 22: (e) Cromatogramas de  $AFP_1$  de la muestra 6 de hígado de gallina alimentada con sorgo contaminado con  $30 \mu\text{g}/\text{kg}$  de  $AFB_1$ .

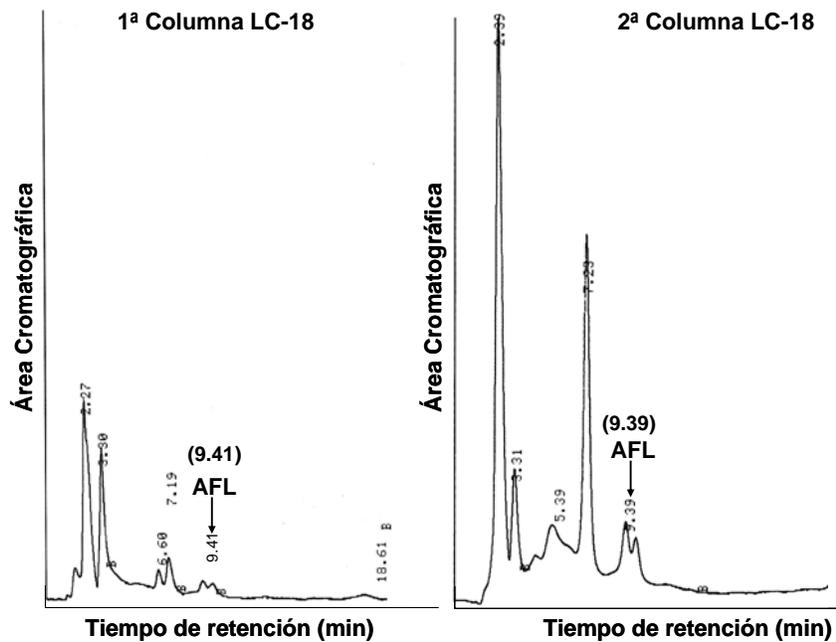
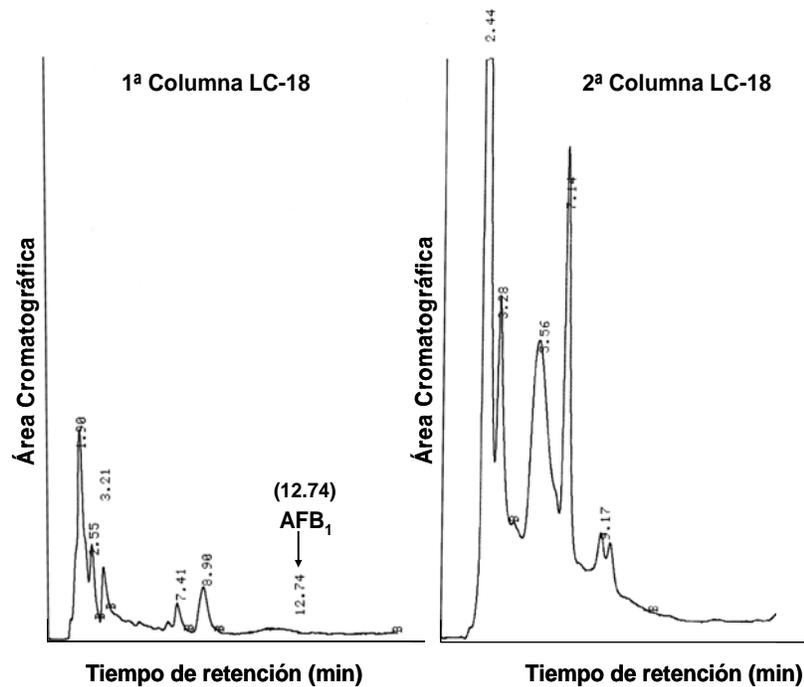


Figura 22: (f) Cromatogramas de  $AFL$  de la muestra 8 de hígado de gallina alimentada con sorgo contaminado con  $30 \mu\text{g}/\text{kg}$  de  $AFB_1$ .

**Figura 22: Cromatogramas de las aflatoxinas encontradas en los hígados de gallinas alimentadas con sorgo contaminado con 30 µg/kg de AFB<sub>1</sub>. (a) AFB<sub>2</sub> de la muestra 5. b) AFG<sub>1</sub> de la muestra 1. (c) AFG<sub>2</sub> de la muestra 5. (d) AFM<sub>1</sub> de la muestra 7. (e) AFP<sub>1</sub> de la muestra 6. (f) AFL de la muestra 8.**

Cromatogramas correspondientes a la retención de las AF, por las dos columnas LC-18, provenientes de los hígados de las gallinas alimentadas con sorgo adicionado con 500 µg/kg.



**Figura 23: (a) Cromatogramas de AFB<sub>1</sub> de la muestra 3 de hígado de gallina alimentada con sorgo contaminado con 500 µg/kg de AFB<sub>1</sub>.**

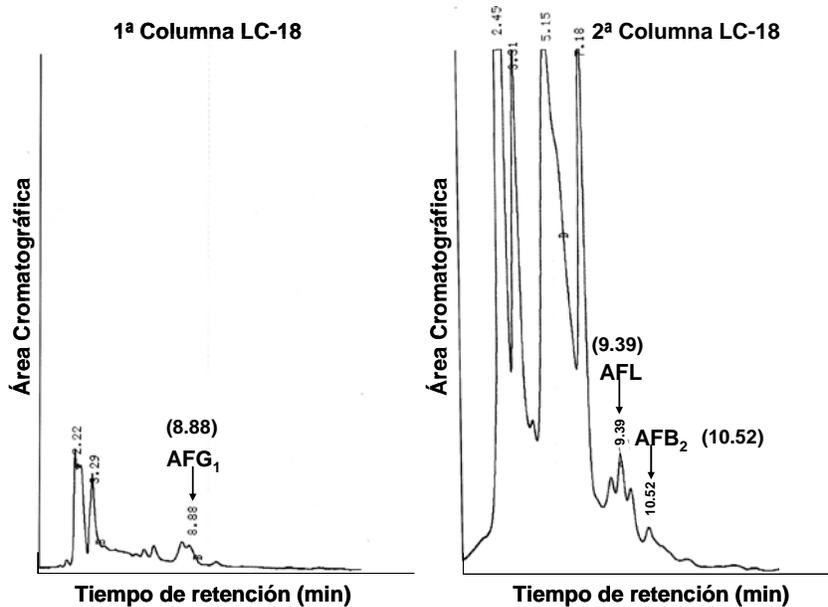


Figura 23: (b) Cromatograma de AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> y AFL de la muestra 6 de hígado de gallina alimentada con sorgo contaminado con 500 µg/kg de AFB<sub>1</sub>.

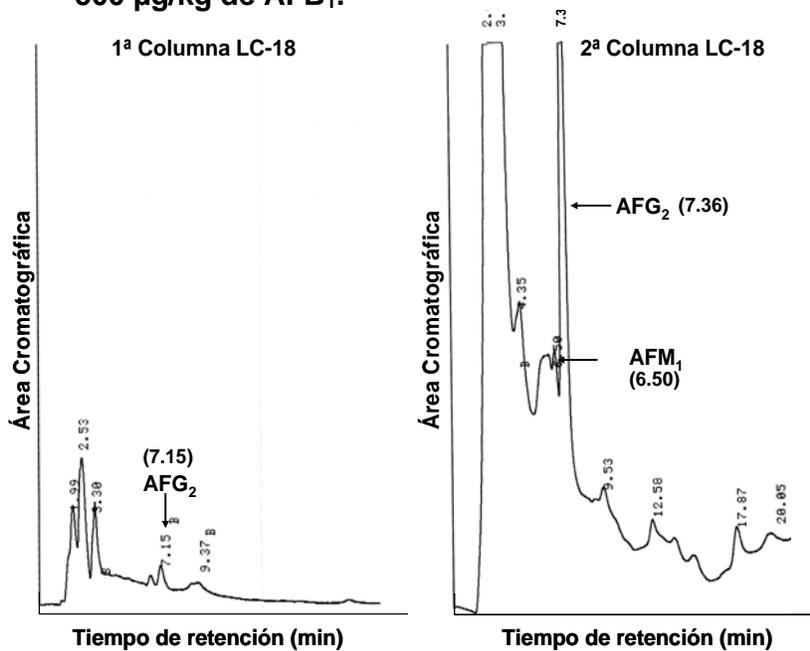
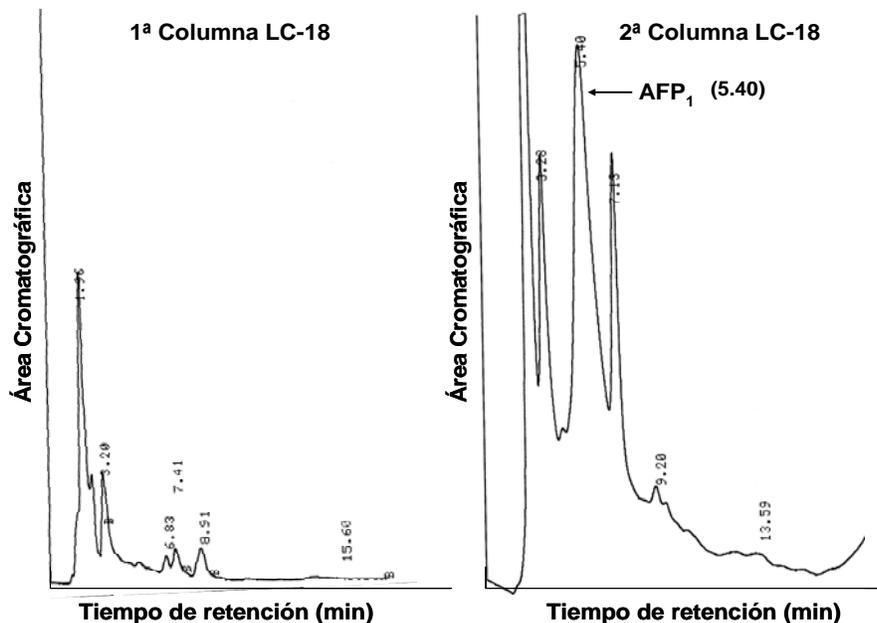


Figura 23: (c) Cromatograma de AFG<sub>2</sub> y AFM<sub>1</sub> de la muestra 7 de hígado de gallina alimentada con sorgo contaminado con 500 µg/kg de AFB<sub>1</sub>.



**Figura 23: (d) Cromatogramas de AFP<sub>1</sub> de la muestra 4 de hígado de gallina alimentada con sorgo contaminado con 500 µg/kg de AFB<sub>1</sub>.**

**Figura 23: Cromatogramas de las aflatoxinas encontradas en hígados de gallinas alimentadas con sorgo contaminado con 500 µg/kg de AFB<sub>1</sub>. (a) AFB<sub>1</sub> de la muestra 3. (b) AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> y AFL de la muestra 6. (c) AFG<sub>2</sub> y AFM<sub>1</sub> de la muestra 7. (d) AFP<sub>1</sub> de la muestra 4.**

Se presentó la cuantificación total y los tipos de AF de los hígados de gallina, la retención de la primera y segunda columnas LC-18 (Técnica de Qian & Yang, 1984), el análisis de los controles y de los 2 tratamientos (con 30 µg/kg, y con 500 µg/kg). El grupo control tuvo AFB<sub>1</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, AFM<sub>1</sub>, AFP<sub>1</sub> y AFL. En las muestras adicionadas con 30 µg/kg de AFB<sub>1</sub>, se detectaron AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, AFM<sub>1</sub>, AFP<sub>1</sub> y AFL. Finalmente, en muestras adicionadas con 500 µg/kg de AFB<sub>1</sub>, se identificaron AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, AFP<sub>1</sub> y AFL (**Figuras 21 a 23 y Cuadro 20 b**).

**Cuadro 20 b: Resumen de la cuantificación de aflatoxinas (µg/kg) en los hígados de gallina del experimento por el método de Qian & Yang (1984).**

Gallinas Control	Cantidad ( µg/kg) de AF en hígado de gallina sumada de las dos columnas LC-18							
	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	AFM1	AFM2	AFP1	AFL
1	19.8	-	294.9	14.7	-	-	-	-
2	-	-	-	20.4	-	-	42.3	13.4
3	-	-	35.1	19.0	-	-	-	7.6
4	-	-	-	15.4	-	-	-	7.3

5	1.7	-	71.8	17.2	-	-	-	-
6	-	-	110.5	9.0	-	-	-	-
7	-	-	13.6	25.1	-	-	-	-
8	66	-	157.4	16.0	-	-	464.6	14.5
9	-	-	25.4	31.3	-	-	358.6	-
Suma	<b>87.5</b>		<b>708.7</b>	<b>168.1</b>			<b>865.5</b>	<b>42.8</b>
$\bar{x}$ AF/ gallina	<b>9.7</b>		<b>78.7</b>	<b>18.7</b>			<b>96.2</b>	<b>4.8</b>
<b>Tratamiento: gallinas alimentadas con sorgo contaminado con 30 <math>\mu\text{g}/\text{kg}</math> AFB<sub>1</sub></b>								
1	-	-	364.3	18.0	-	-	-	-
2	-	-	155.6	9.5	-	-	-	-
3	-	-	33.6	10.6	-	-	106.9	-
4	-	-	54.3	14.2	-	-	1069.9	-
5	-	3.9	240.3	31.3	-	-	1694.7	-
6	-	-	-	21.6	-	-	1552.8	16.1
7	-	-	-	19.9	41.8	-	441.4	14.8
8	-	-	-	14.2	40.7	-	312.1	70.2
Suma	-	<b>3.9</b>	<b>848.1</b>	<b>139.3</b>	<b>82.5</b>		<b>5177.8</b>	<b>101.1</b>
$\bar{x}$ AF/ gallina	-	<b>0.5</b>	<b>106.0</b>	<b>17.4</b>	<b>10.3</b>		<b>647.2</b>	<b>12.6</b>
<b>Tratamiento: gallinas alimentadas con sorgo contaminado con 500 <math>\mu\text{g}/\text{kg}</math> AFB<sub>1</sub></b>								
1	-	-	25.0	10.2	-	-	71.2	-
2	-	0.1	174.7	12.2	39.6	-	231.3	-
3	5.4	-	193.2	16.0	-	-	1081.1	-
4	-	-	35.9	13.2	36.9	-	2086.7	-
5	-	-	136.5	17.4	2912.1	-	592.8	6.7
6	-	0.4	386.9	12.1	659.2	-	1489.8	78.7
7	-	-	-	18.9	1083.4	-	421.1	4.5
8			15.7	29.6			196.6	
Suma	<b>5.4</b>	<b>0.5</b>	<b>967.9</b>	<b>129.6</b>	<b>4734.2</b>		<b>6170.6</b>	<b>89.9</b>
$\bar{x}$ AF/ gallina	<b>0.7</b>	<b>0.06</b>	<b>121.0</b>	<b>16.2</b>	<b>591.8</b>		<b>771.3</b>	<b>11.2</b>

■ = Análisis realizado igual a no detectables.

Las toxinas con mayor concentración o acumulación en los hígados de los tratamientos con 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y con 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  fueron: AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, AFP<sub>1</sub> y AFL, mientras en el grupo control (9.7  $\mu\text{g}/\text{kg}$  por gallina) y en el tratamiento con adición de 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de AFB<sub>1</sub> se encontró esta misma toxina AFB<sub>1</sub> (0.7  $\mu\text{g}/\text{kg}$  por gallina).

El tratamiento con adición de 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  acumuló AFB<sub>1</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, AFM<sub>1</sub>, AFP<sub>1</sub>, AFL y no AFM<sub>2</sub>, posiblemente las gallinas alimentadas con el sorgo contaminado ya han metabolizado la AFB<sub>1</sub>, dando lugar a los otros metabolitos de AF mencionados.

La AFB<sub>1</sub> es sumamente tóxica y el metabolismo de la gallina tiende a bloquear este veneno transformándolo en otros compuestos menos tóxicos, como una medida de protección para el organismo, de modo que la alta presencia de ese metabolito es un indicativo del proceso de desintoxicación que se está realizando en la gallina (Yip & Coulombe, 2006).

**a.2. Resultados del Análisis Estadístico de la presencia de aflatoxinas en hígado por el método de Qian & Yang, 1984.**

Como se observa en el **Cuadro 20 a**, las diferencias existentes entre la capacidad de retención de ambas columnas LC-18 en hígado, no es clara.

Como todo experimento donde se utilizan seres vivos en diseño experimental, en el presente experimento se obtuvieron resultados paramétricos (biológicos), los cuales se tuvieron que transformar a datos no paramétricos (no biológicos) por medio de la transformación de Box & Cox, donde a los valores de cada muestra se les suma un 1 para evitar obtener ceros una vez que se calcula el logaritmo. Esta transformación hace que la prueba sea más confiable.

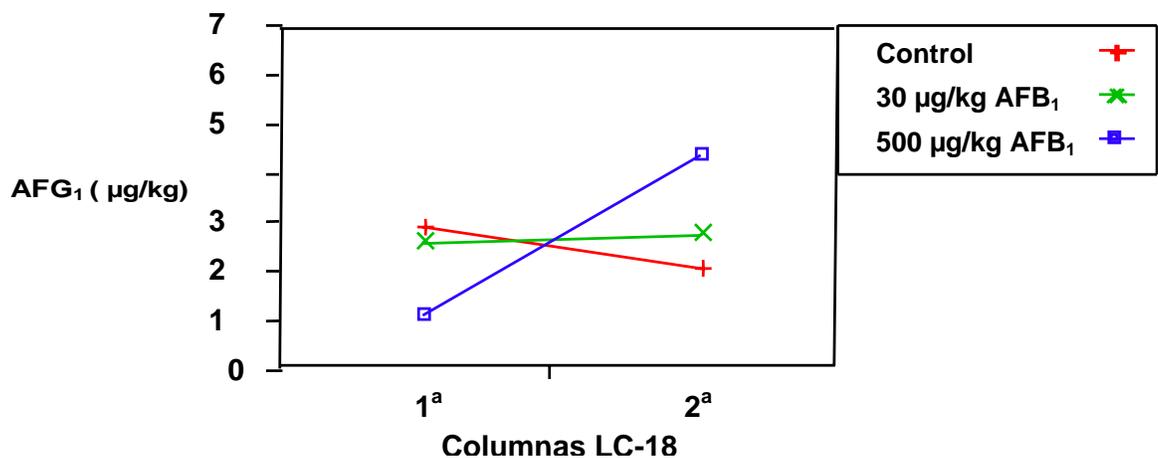
La transformación de los valores de las muestras correspondientes a AFG<sub>1</sub> (**Figura 24**) indica que existen diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre columnas LC-18, por lo que se deben sumar ambas columnas para obtener una cantidad de AFG<sub>1</sub> confiable al final de este método.

**Análisis de Varianza**

Fuentes de Variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados medios	F experimental
<b>Modelo</b>	5	80577.36	16115.5	3.0285
<b>Error</b>	44	234132.12	5321.2	<b>Prob &gt; F</b>
<b>C. Total</b>	49	314709.49		<b>0.0196*</b>

\* Estadísticamente significativo.

**Interacción entre la 1ª y 2ª columna LC-18 de la AFG<sub>1</sub>**



**Figura 24: Análisis de Varianza e interacción de los valores transformados de AFG<sub>1</sub> entre la 1ª y 2ª columna LC-18 del**

### análisis químico de hígado.

La interacción de los valores no transformados de cada muestra de AFG<sub>2</sub> no es significativa entre la primera y segunda columnas. Pero la interacción (**Figura 25**) de los valores con transformación de Box & Cox sí fue significativa. La segunda columna retiene mayor cantidad de AFG<sub>2</sub> que la primera columna como lo notaron los autores Qian & Yang, sin embargo, no se deben de ignorar las cantidades de AFG<sub>2</sub> retenidas por la primera columna, pues se perdería mucha precisión.

En cuanto a AFG<sub>2</sub> del grupo control, existe mayor efecto significativo entre columnas LC-18. La segunda columna del grupo control retiene mayor cantidad de AF que la primera columna, habiendo una diferencia significativa entre ambas.

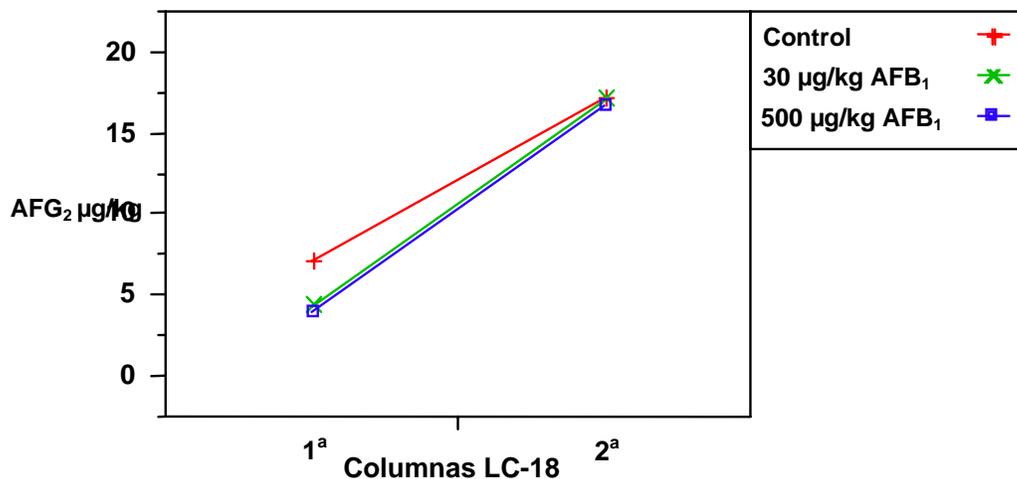
En los tratamientos AFG<sub>2</sub>, cuando los valores de cada muestra han sido transformados y cuando se les hace la transformación de Box & Cox (**Figura 25**), la segunda columna presentó mayor retención de AFG<sub>2</sub>, existiendo diferencias significativas entre ambas columnas, con lo que se concluye, después del análisis con el método de Qian & Yang (1984), que es necesario la suma de la primera con la segunda columna para obtener un dato más preciso de la cantidad total de AFG<sub>2</sub>.

Análisis de Varianza

Fuentes de Variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados medios	F experimental
Modelo	5	1773.9319	354.786	77.7255
Error	44	200.8426	4.565	Prob > F
C. Total	49	1974.7745		<0.0001*

\* Estadísticamente significativo.

**Interacción entre la 1ª y 2ª columna LC-18 de la AFG<sub>2</sub>**



Grupo			Mínimos Cuadrados
Control	a		12.1
30 µg/kg AFB <sub>1</sub>	a	b	10.7
500 µg/kg AFB <sub>1</sub>		b	10.3

**Figura 25: Análisis de Varianza e interacción de los valores transformados de AFG<sub>2</sub> entre la 1ª y 2ª columnas LC-18 del análisis de AF de hígado.**

Se realizó un análisis estadístico para conocer las diferencias significativas existentes entre el grupo Control y los tratamientos (30 µg/kg de AFB<sub>1</sub> y 500 µg/kg de AFB<sub>1</sub>) con relación a las AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub> y AFM<sub>1</sub> identificadas en el hígado. El análisis estadístico consistió en hacer un análisis de varianza simple con los datos originales (ANOVA de la variable original), otro cuando a los datos se les ha aplicado una transformación de Box & Cox (ANOVA de la variable transformada) y un análisis de presencia/ausencia vía Cuadro de contingencia (variable Categórica) (P<0.05).

No se encontraron diferencias significativas (P<0.05) entre los valores de AFB<sub>1</sub> del grupo Control y de los tratamientos (30 µg/kg y 500 µg/kg de AFB<sub>1</sub>) del hígado con ninguna de las pruebas estadísticas utilizadas en el análisis (**Cuadro 21a y b**) (**Figura 26**). En el análisis de presencia/ausencia vía Cuadro de Contingencia, se observa que el grupo Control presentó mayor número de muestras con AFB<sub>1</sub> que los tratamientos, pero no se observaron diferencias significativas (P<0.05) (**Cuadro 21c**).

**Cuadro 21: Resultados del Análisis Estadístico de la cuantificación de AFB<sub>1</sub> (µg/kg) en el hígado por el método de Qian & Yang, 1984.**

(a) ANOVA de la variable original.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F experimental	Prob > F
Tratamiento	2	509.12	254.56	1.43	0.2615
Error	22	3925.75	178.44		
Total	24	4434.87			

(b) ANOVA de la variable transformada (transformación de Box & Cox).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F experimental	Prob > F
Tratamiento	2	0.591	0.2957	1.84	0.1830
Error	22	3.542	0.1610		
Total	24	4.134			

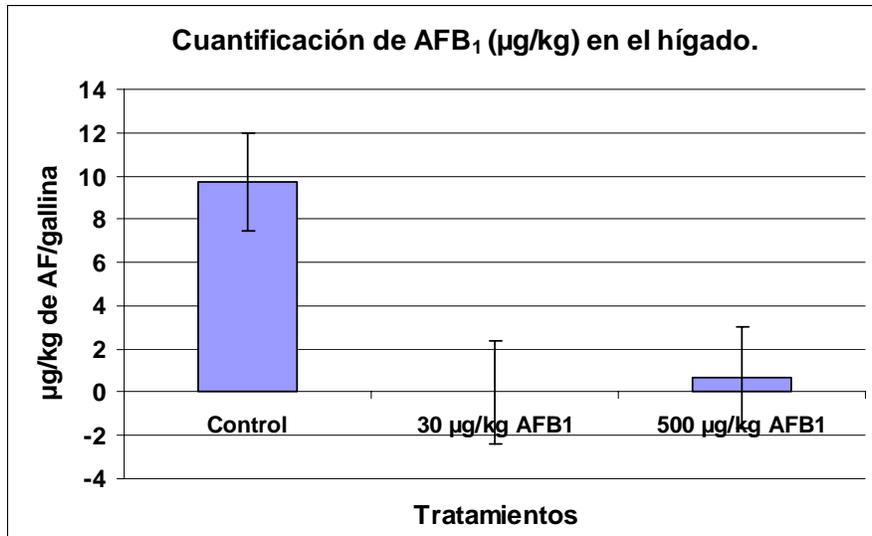
(c) Análisis de Presencia/Ausencia vía Cuadro de Contingencia.

Conteo	Muestras por tratamiento	Ausencia		Presencia	
		Nº de muestras	(%)	Nº de muestras	(%)
Control	9	6	66.7	3	33.3
30 µg/kg AFB <sub>1</sub>	8	8	100	0	0
500 µg/kg AFB <sub>1</sub>	8	7	87.5	1	12.5
Total	25	21		4	

Prueba de Xi

Modelo	-Logaritmo	Grados de libertad	Xi Cuadrada	Prob>Xi cuadrada
Diferencia	2.249	2	4.497	0.1055
Completo	8.743			
Total	10.992			

Nivel	Media	Desviación Estándar
Control	9.7	4.5
30 µg/kg AFB <sub>1</sub>	0	4.7
500 µg/kg AFB <sub>1</sub>	0.7	4.7



**Figura 26: Comparación de las mediciones promedio de AFB<sub>1</sub> (µg/kg) encontradas por hígado de gallina.**

No se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre los valores de AFB<sub>2</sub> del grupo Control y de los tratamientos (30 µg/kg y 500 µg/kg de AFB<sub>1</sub>) del hígado con ninguna de las pruebas estadísticas utilizadas en el análisis (**Cuadro 22a y b**) (**Figura 27**). El análisis de presencia/ausencia vía Cuadro de Contingencia, indica que el grupo Control no presentó muestras con AFB<sub>2</sub>. El tratamiento de 30 µg/kg de AFB<sub>1</sub> presentó el 12.5% de presencia y el tratamiento de 500 µg/kg de AFB<sub>1</sub> presentó un 25.0% de presencia de AFB<sub>2</sub> en las muestras. No se observaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) (**Cuadro 22c**).

**Cuadro 22: Resultados del Análisis Estadístico de la cuantificación de AFB<sub>2</sub> (µg/kg) en el hígado por el método de Qian & Yang (1984).**

(a) ANOVA de la variable original.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F experimental	Prob > F
Tratamiento	2	1.158	0.579	0.947	<b>0.4030</b>
Error	22	13.447	0.611		
Total	24	14.605			

(b) ANOVA de la variable con transformación de Box & Cox.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F experimental	Prob > F

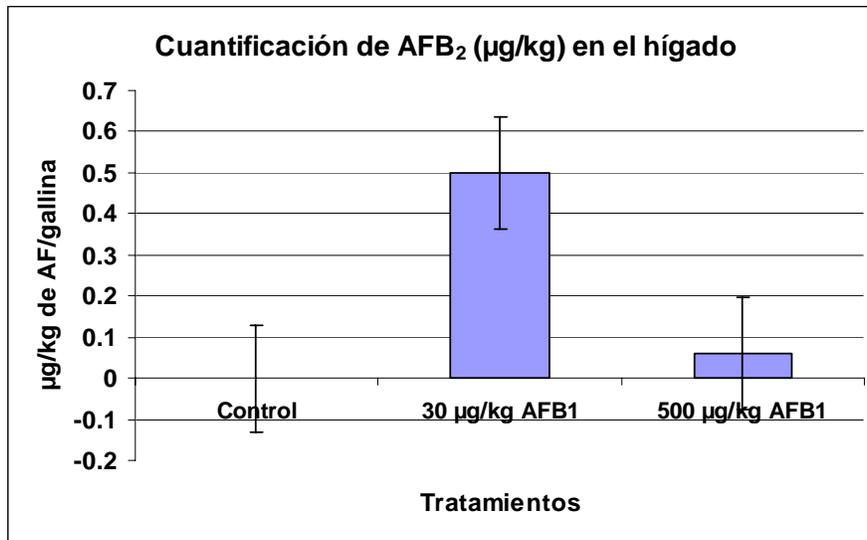
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F experimental	Prob > F
Tratamiento	2	0.011	0.006	0.7497	<b>0.4842</b>
Error	22	0.165	0.007		
Total	24	0.176			

(c) Análisis de Presencia/Ausencia vía Cuadro de Contingencia.

Conteo	Muestras por tratamiento	Ausencia		Presencia	
		Nº de muestras	(%)	Nº de muestras	(%)
Control	9	9	100	0	<b>0</b>
30 µg/kg AFB <sub>1</sub>	8	7	87.5	1	<b>12.5</b>
500 µg/kg AFB <sub>1</sub>	8	6	75.0	2	<b>25.0</b>
Total	25	22		3	

Prueba de Xi

Modelo	-Logaritmo	Grados de libertad	Xi Cuadrada	Prob>Xi cuadrada
Diferencia	1.660	2	3.321	<b>0.1901</b>
Completo	7.513			
Total	9.173			



Nivel	Media	Desviación Estándar
Control	0.0	0.261
30 µg/kg AFB <sub>1</sub>	0.5	0.276
500 µg/kg AFB <sub>1</sub>	0.06	0.276

Figura 27: Comparación de las mediciones promedio de AFB<sub>2</sub> (µg/kg) encontradas por hígado de gallina.

Entre el grupo Control y los tratamientos (30 µg/kg de AFB<sub>1</sub> y 500 µg/kg de AFB<sub>1</sub>) para los valores de AFG<sub>1</sub> identificada en el hígado, no se encontraron diferencias significativas (P<0.05) con ninguna de las pruebas estadísticas

utilizadas en el análisis (**Cuadro 23 a y b**) (**Figura 28**). En el análisis de presencia/ausencia vía Cuadro de Contingencia, se observa que el grupo Control contiene un 77.8% de muestras con AFG<sub>1</sub>, el tratamiento de 500 µg/kg de AFB<sub>1</sub> presentó un 87.5% de las muestras con AFG<sub>1</sub>, mientras el tratamiento de 30 µg/kg de AFB<sub>1</sub> presentó el menor porcentaje, con el 12.5% de presencia de AFG<sub>1</sub>. Con este análisis tampoco se observaron diferencias significativas (P<0.05) (**Cuadro 23c**).

**Cuadro 23: Resultados del Análisis Estadístico de la cuantificación de AFG<sub>1</sub> (µg/kg) en el hígado por el método de Qian & Yang (1984).**

(a) ANOVA de la variable original.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F experimental	Prob > F
Tratamiento	2	7854.79	3927.4	0.266	<b>0.7692</b>
Error	22	325427.08	14792.1		
Total	24	333281.87			

(b) ANOVA de la variable transformada (transformación de Box & Cox).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F experimental	Prob > F
Tratamiento	2	1745.32	872.66	0.2846	<b>0.7550</b>
Error	22	67451.65	3065.98		
Total	24	69196.97			

(c) Análisis de Presencia/Ausencia vía Cuadro de Contingencia.

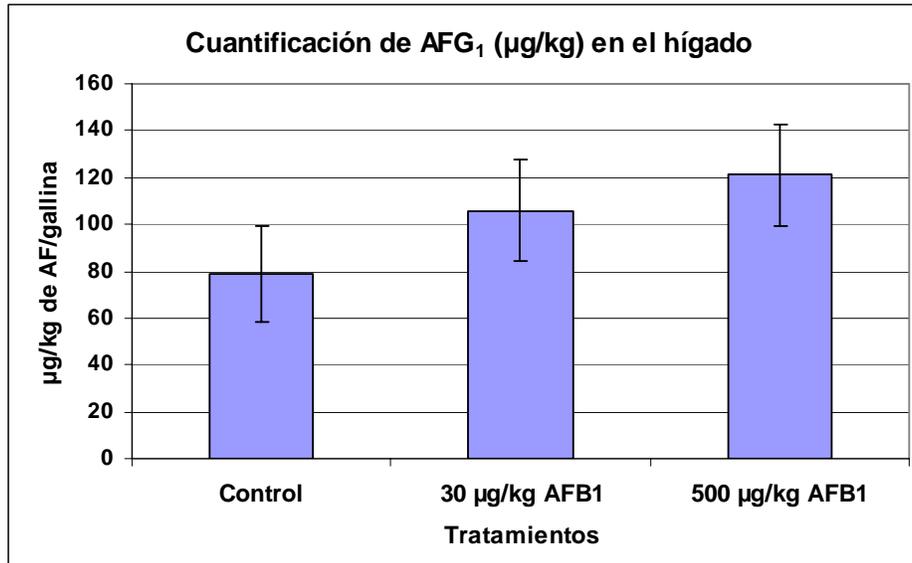
Conteo	Muestras por tratamiento	Ausencia		Presencia	
		Nº de muestras	(%)	Nº de muestras	(%)
Control	9	2	22.2	7	<b>77.8</b>
30 µg/kg AFB <sub>1</sub>	8	3	37.5	5	<b>62.5</b>
500 µg/kg AFB <sub>1</sub>	8	1	12.5	7	<b>87.5</b>
Total	25	6		19	

Prueba de Xi

Modelo	-Logaritmo	Grados de libertad	Xi Cuadrada	Prob>Xi cuadrada
Diferencia	0.703	2	1.40595	<b>0.4951</b>
Completo	13.0743			
Total	13.777			

Nivel	Media	Desviación Estándar
Control	78.7	40.5
30 µg/kg AFB <sub>1</sub>	106.0	43.0

Nivel	Media	Desviación Estándar
500 $\mu\text{g/kg AFB}_1$	121.0	43.0



**Figura 28:** Comparación de las mediciones promedio de AFG<sub>1</sub> ( $\mu\text{g/kg}$ ) encontradas por hígado de gallina.

El análisis estadístico aplicado a los valores de la AFG<sub>2</sub> hallada en los hígados, tampoco mostró diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre el grupo Control y los tratamientos (30  $\mu\text{g/kg}$  de AFB<sub>1</sub> y 500  $\mu\text{g/kg}$  de AFB<sub>1</sub>) (**Cuadro 24 a y b**) (**Figura 29**). Con esta AF no se realizó el análisis de presencia/ausencia vía Cuadro de Contingencia, ya que en el 100% de las muestras se encontró AFG<sub>2</sub> (**Cuadro 20 b**).

**Cuadro 24:** Resultados del Análisis Estadístico de la cuantificación de AFG<sub>2</sub> ( $\mu\text{g/kg}$ ) en el hígado por el método de Qian & Yang (1984).

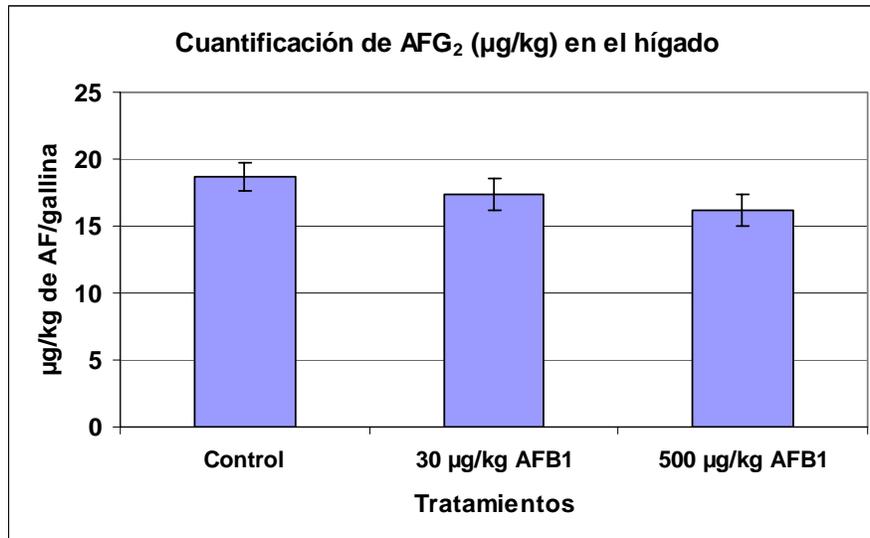
(a) ANOVA de la variable original.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F experimental	Prob > F
Tratamiento	2	26.056	13.028	0.303	<b>0.7416</b>
Error	22	945.944	42.998		
Total	24	972.0			

(b) ANOVA de la variable con transformación de Box & Cox.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F experimental	Prob > F

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F experimental	Prob > F
Tratamiento	2	23.499	11.749	0.336	<b>0.7182</b>
Error	22	769.178	34.963		
Total	24	792.677			



Nivel	Media	Desviación Estándar
Control	18.7	2.2
30 µg/kg AFB <sub>1</sub>	17.4	2.3
500 µg/kg AFB <sub>1</sub>	16.2	2.3

**Figura 29: Comparación de las mediciones promedio de AFG<sub>2</sub> (µg/kg) encontradas en el hígado de gallina.**

Para los valores de AFM<sub>1</sub> no hubo efectos significativos ( $P < 0.05$ ) entre el grupo Control y los tratamientos (30 µg/kg y 500 µg/kg de AFB<sub>1</sub>) cuando se hizo el ANOVA simple (**Cuadro 25a**) (**Figura 30**). Al aplicar la transformación de Box & Cox a los valores cuantificados de cada muestra sí se observaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre el grupo Control y los tratamientos (**Cuadro 25b**). Al analizar los valores de cada muestra por presencia/ausencia vía Cuadro de Contingencia, también existe diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre el grupo Control y los tratamientos. Con relación a la presencia de AFM<sub>1</sub>, el grupo Control presenta 0%, el tratamiento de 30 µg/kg de AFB<sub>1</sub> presentó el 25% de AFM<sub>1</sub> y el tratamiento de 500 µg/kg de AFB<sub>1</sub>, posee el 62.5% de presencia de AFM<sub>1</sub> (**Cuadro 25c**).

**Cuadro 25: Resultados del Análisis Estadístico de la cuantificación de AFM<sub>1</sub> (µg/kg) en el hígado por el método de Qian & Yang, 1984.**

(a) ANOVA de la variable original.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F experimental	Prob > F
Tratamiento	2	1872014.2	936007	2.822	<b>0.0811</b>
Error	22	7296077.6	331640		
Total	24	9168091.8			

(b) ANOVA de la variable con transformación de Box & Cox.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F experimental	Prob > F
Tratamiento	2	212.88	106.440	5.8249	<b>0.0093*</b>
Error	22	402.011	18.273		
Total	24	614.89			

(c) Análisis de Presencia/Ausencia vía Cuadro de Contingencia.

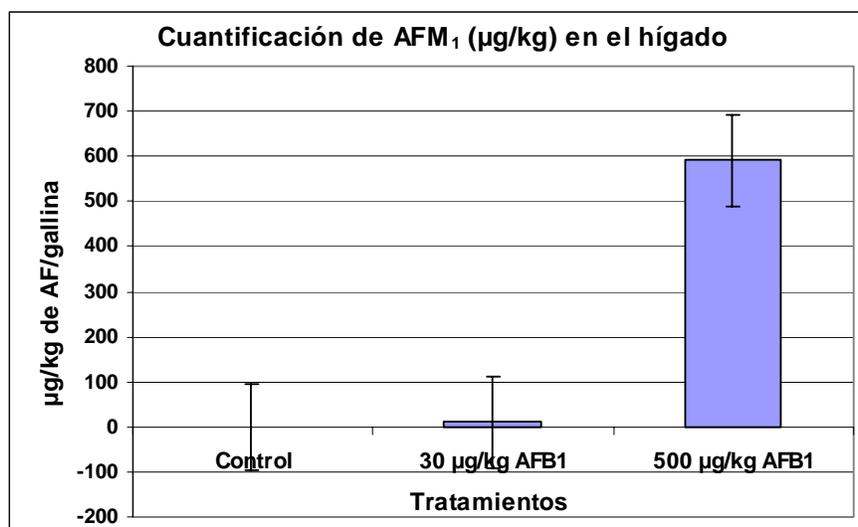
Conteo	Muestras por tratamiento	Ausencia		Presencia	
		Nº de muestras	(%)	Nº de muestras	(%)
Control	9	9	100.0	0	<b>0</b>
30 µg/kg AFB <sub>1</sub>	8	6	75.0	2	<b>25.0</b>
500 µg/kg AFB <sub>1</sub>	8	3	37.5	5	<b>62.5</b>
Total	25	18		7	

Prueba de Xi

Modelo	-Logaritmo	Grados de libertad	Xi Cuadrada	Prob>Xi cuadrada
Diferencia	5.033	2	10.065	<b>0.0065*</b>
Completo	9.791			
Total	14.824			

\* Estadísticamente significativo.

Nivel	Media	Desviación Estándar
Control	0	191.9
30 µg/kg AFB <sub>1</sub>	10.3	203.6
500 µg/kg AFB <sub>1</sub>	591.8	203.6



**Figura 30: Comparación de las mediciones promedio de AFM<sub>1</sub> (µg/kg) encontradas en el hígado por gallina.**

Para los valores de AFP<sub>1</sub> hubo un efecto marginalmente significativo ( $P < 0.05$ ) entre el grupo Control y los tratamientos (30 µg/kg y 500 µg/kg de AFB<sub>1</sub>) cuando se hizo el ANOVA simple (**Cuadro 26a**) (**Figura 31**). Al aplicar la transformación de Box & Cox a los valores cuantificados de cada muestra se observan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre el grupo Control y los tratamientos (**Cuadro 26b**). Al analizar los valores por presencia/ausencia vía Cuadro de Contingencia, también existen diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre el grupo Control y los tratamientos. Con relación a la presencia de AFP<sub>1</sub> se observa que el grupo Control presentó 33.3%, el tratamiento de 30 µg/kg presentó un 25% en las muestras y el tratamiento de 500 µg/kg de AFB<sub>1</sub>, tuvo el 100% de presencia de AFP<sub>1</sub> (**Cuadro 26c**).

**Cuadro 26: Resultados del Análisis Estadístico de la cuantificación de AFP<sub>1</sub> (µg/kg) en el hígado por el método de Qian & Yang (1984).**

(a) ANOVA de la variable original.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F experimental	Prob > F
Tratamiento	2	2226797.8	1113399	3.3775	0.0526*
Error	22	7252370.3	329653		
Total	24	9479168.1			

(b) ANOVA de la variable transformada (transformación de Box & Cox).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F experimental	Prob > F
Tratamiento	2	229337.33	114669	6.8598	<b>0.0048*</b>
Error	22	367751.26	16716		
Total	24	597088.59			

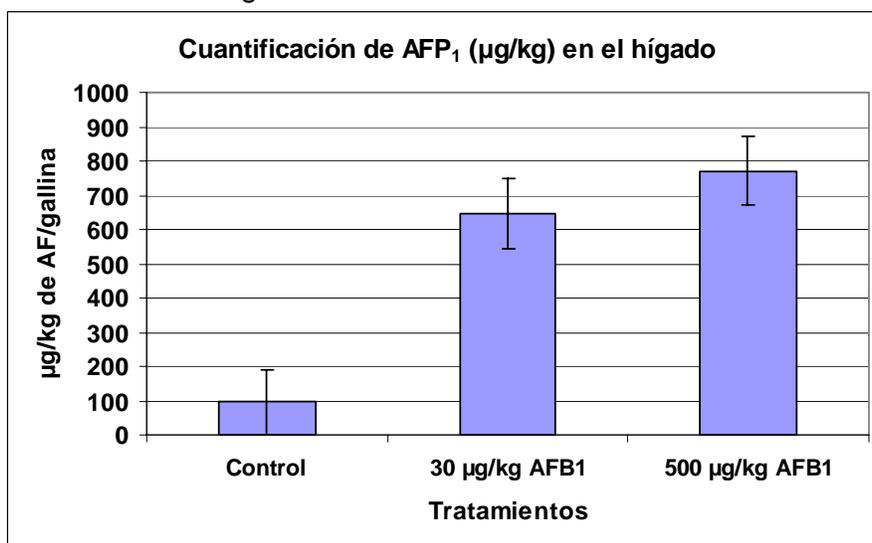
(c) Análisis de Presencia/Ausencia vía Cuadro de Contingencia.

Cuento	Muestras por tratamiento	Ausencia		Presencia	
		Nº de muestras	(%)	Nº de muestras	(%)
Control	9	6	66.7	3	33.3
30 µg/kg AFB <sub>1</sub>	8	2	25.0	6	75.0
500 µg/kg AFB <sub>1</sub>	8	0	0	8	100.0
Total	25	8		17	

Prueba de Xi

Modelo	-Logaritmo	Grados de libertad	Xi Cuadrada	Prob>Xi cuadrada
Diferencia	5.444	2	10.889	<b>0.0043*</b>
Completo	10.227			
Total	15.672			

\* Estadísticamente significativo.



Nivel	Media	Desviación Estándar
Control	96.1	191.4
30 µg/kg AFB <sub>1</sub>	647.2	202.9
500 µg/kg AFB <sub>1</sub>	771.3	202.9

Figura 31: Comparación de las mediciones promedio de AFP<sub>1</sub> (µg/kg) encontradas en el hígado por gallina.

Entre el grupo Control y los tratamientos (30 µg/kg y 500 µg/kg de AFB<sub>1</sub>) para los valores de AFL identificada en el hígado, no se encontraron diferencias significativas (P<0.05) con ninguna de las pruebas estadísticas utilizadas en el análisis (**Cuadro 27 a y b**) (**Figura 32**). En el análisis de presencia/ausencia vía Cuadro de Contingencia, se observa que el grupo Control tuvo la mayor cantidad de AFL (44.4%), el tratamiento de 500 µg/kg de AFB<sub>1</sub> y el tratamiento de 30 µg/kg de AFB<sub>1</sub> presentaron ambos el 37.5% de las muestras con AFL. Con este análisis tampoco hubo diferencias significativas (P<0.05) (**Cuadro 27c**).

**Cuadro 27: Resultados del Análisis Estadístico de la cuantificación de AFL (µg/kg) en el hígado por el método de Qian & Yang (1984).**

**(a) ANOVA de la variable original.**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F experimental	Prob > F
Tratamiento	2	304.943	152.47	0.347	<b>0.7108</b>
Error	22	9674.539	439.75		
Total	24	9979.482			

**(b) ANOVA de la variable con transformación de Box & Cox.**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F experimental	Prob > F
Tratamiento	2	0.688	0.344	0.032	<b>0.9682</b>
Error	22	233.807	10.628		
Total	24	234.494			

**(c) Análisis de Presencia/Ausencia vía Cuadro de Contingencia.**

Cuento	Muestras por tratamiento	Ausencia		Presencia	
		Nº de muestras	(%)	Nº de muestras	(%)
Control	9	5	55.6	4	<b>44.4</b>
30 µg/kg AFB <sub>1</sub>	8	5	62.5	3	<b>37.5</b>
500 µg/kg AFB <sub>1</sub>	8	5	62.5	3	<b>37.5</b>
Total	25	15		10	

**Prueba de Xi**

Modelo	-Logaritmo	Grados de libertad	Xi Cuadrada	Prob>Xi cuadrada
Diferencia	0.058	2	0.115	<b>0.9440</b>
Completo	16.768			
Total	16.825			



6	-	-	-	-	-	1805.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	49.5
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	1052.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Suma	-	-	-	-	-	<b>6667.0</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>2223.9</b>
$\bar{X}$ AF/gallina	-	-	-	-	-	<b>740.8</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>247.1</b>
<b>Tratamiento: gallinas alimentadas con sorgo contaminado con 30 µg/kg AFB<sub>1</sub></b>																
1	-	-	-	-	-	-	-	2.7	-	-	-	-	-	-	38.2	-
2	-	-	-	-	-	1123.8	-	2.2	-	-	-	-	-	-	9.6	-
3	-	-	-	-	-	1574.1	-	2.9	-	-	-	-	-	-	30.5	-
4	-	-	-	-	-	1053.5	-	3.8	-	-	-	-	-	-	221.5	-
5	-	-	-	-	-	638.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	0.4	-	-	-	-	-	-	78.0	11.1	-
7	-	-	-	-	-	8.8	0.3	-	-	-	-	-	-	-	114.6	-
8	-	-	-	-	-	11.1	1.1	-	-	88.9	-	-	-	-	122.5	-
Suma	-	-	-	-	-	<b>4409.7</b>	<b>1.8</b>	<b>11.6</b>	-	<b>88.9</b>	-	-	-	<b>78.0</b>	<b>548.0</b>	
$\bar{X}$ AF/gallina	-	-	-	-	-	<b>551.2</b>	<b>0.2</b>	<b>1.5</b>	-	<b>11.1</b>	-	-	-	<b>9.8</b>	<b>68.5</b>	
<b>Tratamiento: gallinas alimentadas con sorgo contaminado con 500 µg/kg AFB<sub>1</sub></b>																
1	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	-	-	-	338.5
2	-	-	-	-	-	-	1.2	-	-	-	-	-	-	-	758.2	701.3
3	-	-	-	-	-	1347.1	1.1	-	-	-	-	-	-	-	467.5	-
4	-	-	-	-	-	-	1.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	408.5	2102.9	-	-	-	-	-	-	-	-	76.9	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	0.9	5.6	-	-	-	-	-	-	-	1312.3
Suma	-	-	-	-	<b>408.5</b>	<b>3450.0</b>	<b>5.4</b>	<b>5.6</b>	-	-	-	-	-	-	<b>1302.6</b>	<b>2352.1</b>
$\bar{X}$ AF/gallina	-	-	-	-	<b>51.0</b>	<b>431.3</b>	<b>0.7</b>	<b>0.7</b>	-	-	-	-	-	-	<b>162.8</b>	<b>294.0</b>

- = Análisis realizado igual a no detectable.

Para el tratamiento de 500 µg/kg, AFG<sub>1</sub> fue retenida en la segunda columna (**Figura 35 a**), mientras que la primera columna posee sólo trazas. AFG<sub>2</sub> y AFL fueron retenidos en ambas columnas (**Figura 35 b**). Se deben sumar los eluidos de ambas columnas, y no perder del 7% al 46% de AF cuantificadas en la molleja.

Como se puede apreciar las mollejas tuvieron menos AF que los hígados.

A continuación se presentan los cromatogramas más representativos de las AF encontradas en la molleja, en el grupo Control (**Figura 33**) en los cuales se observan las diferencias existentes entre la retención de ambas columnas LC-18 usadas en el método químico de Qian & Yang (1984).

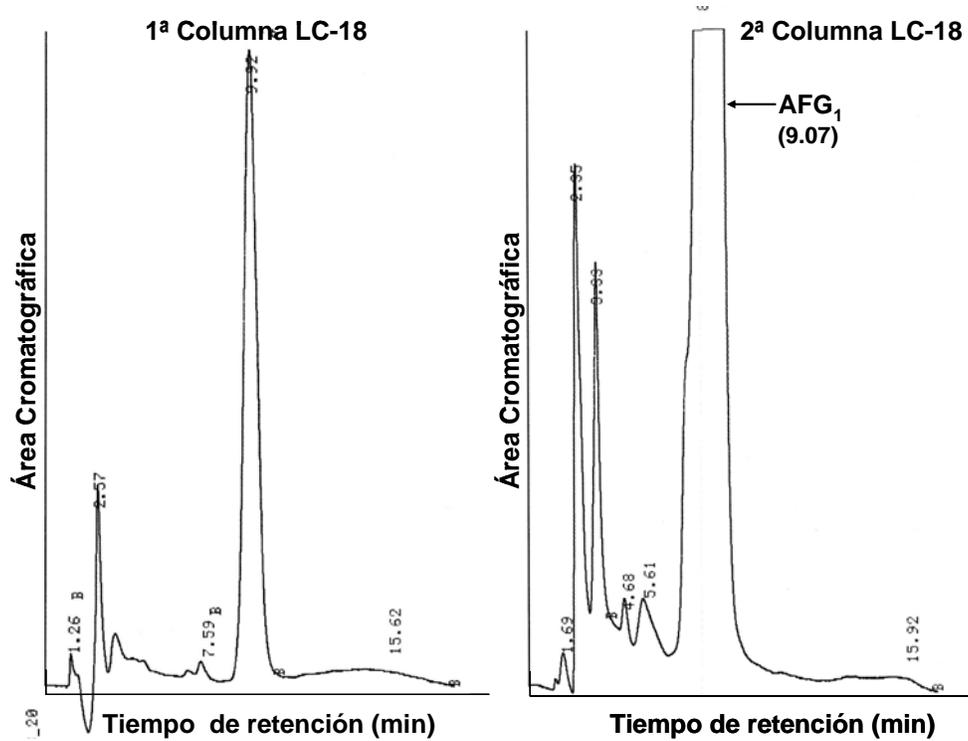


Figura 33: (a) Cromatogramas de AFG<sub>1</sub> de la muestra 5 de molleja de gallina alimentada con sorgo sin AFB<sub>1</sub> del grupo Control.

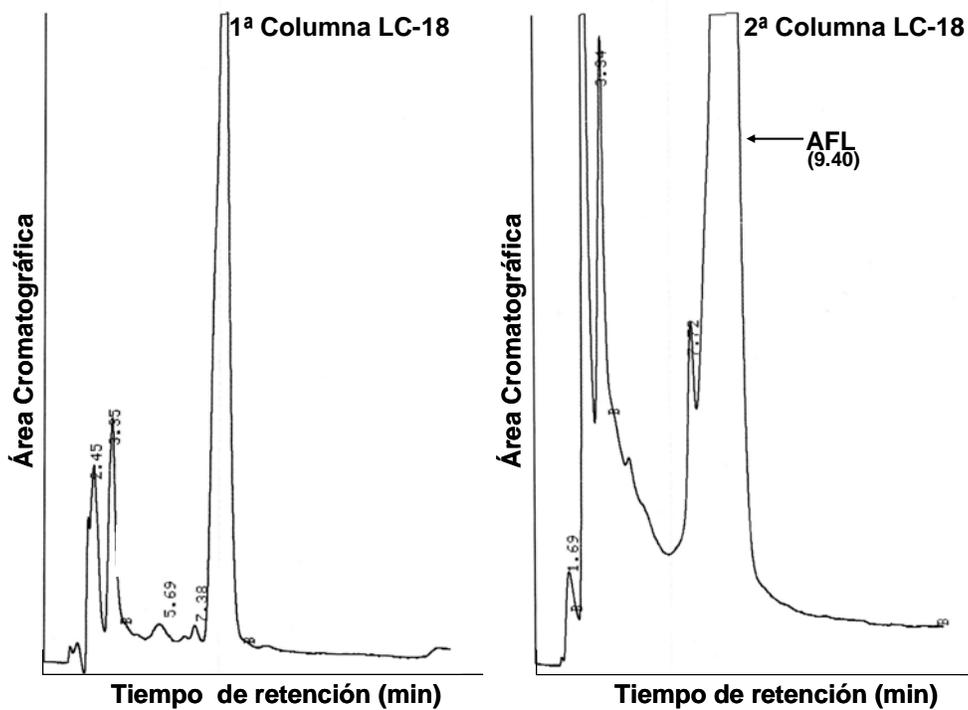
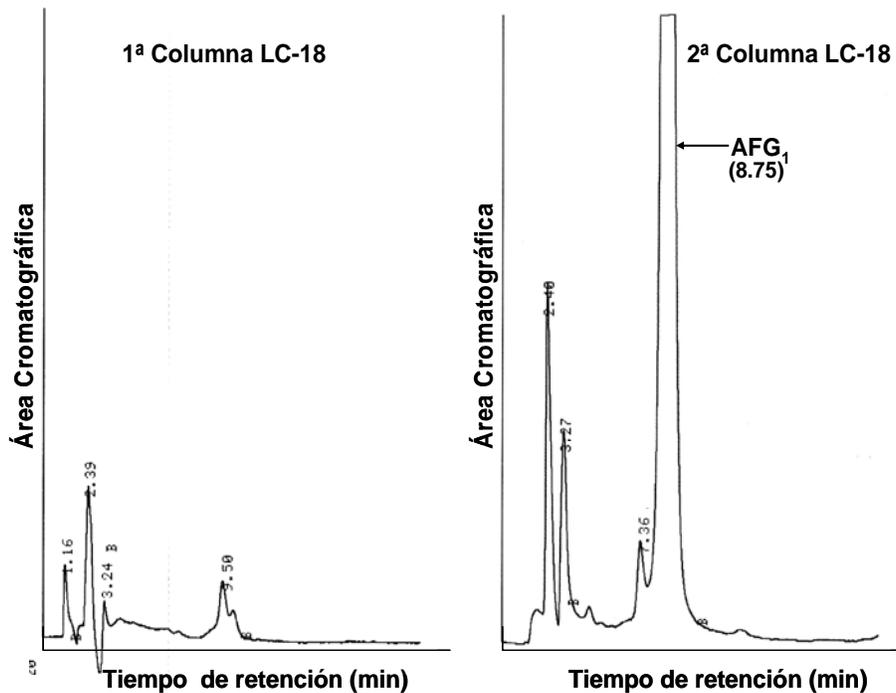


Figura 33: (b) Cromatogramas de AFL de la muestra 3 de molleja de gallina alimentada con sorgo sin AFB<sub>1</sub> del grupo Control.

**Figura 33: Cromatogramas de las aflatoxinas encontradas en mollejas de gallinas alimentadas con sorgo sin contaminación de AFB<sub>1</sub> o sea grupo Control. (a) AFG<sub>1</sub> de la muestra 5. (b) AFL de la muestra 3.**

Cromatogramas en aflatoxinas de las mollejas de las gallinas alimentadas con sorgo contaminado con 30 µg/kg de AFB<sub>1</sub> (**Figura 34**) en los cuales se observan las diferencias existentes entre la retención de ambas columnas LC-18 usadas en el método químico de Qian & Yang (1984).



**Figura 34: (a) Cromatogramas de AFG<sub>1</sub> de la muestra 3 de molleja de gallina alimentada con sorgo contaminado con 30 µg/kg de AFB<sub>1</sub>.**

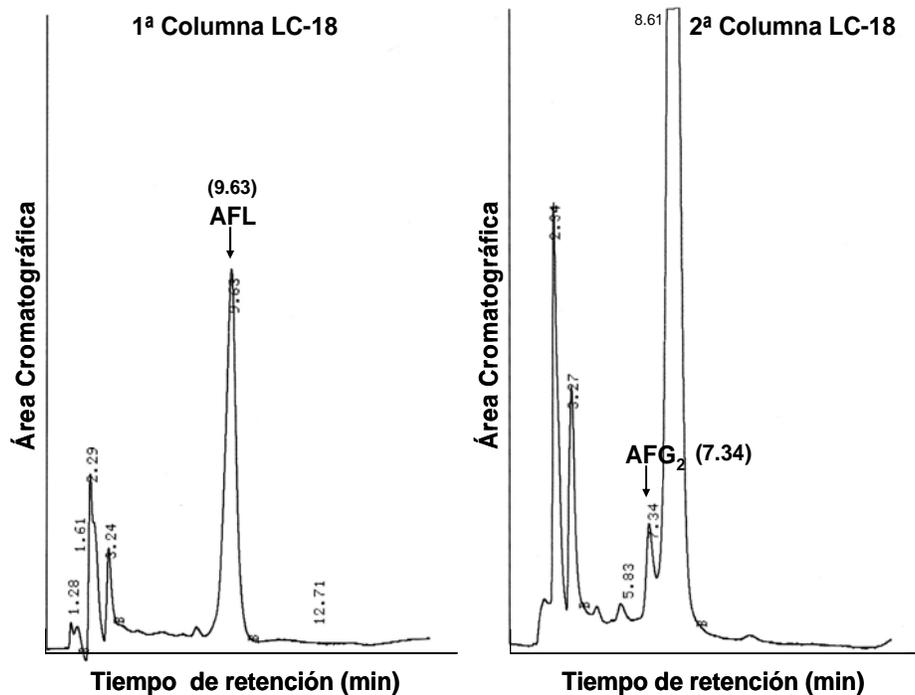


Figura 34: (b) Cromatogramas de AFG<sub>2</sub> y AFL de la muestra 4 de molleja de gallina alimentada con sorgo contaminado con 30 µg/kg de AFB<sub>1</sub>.

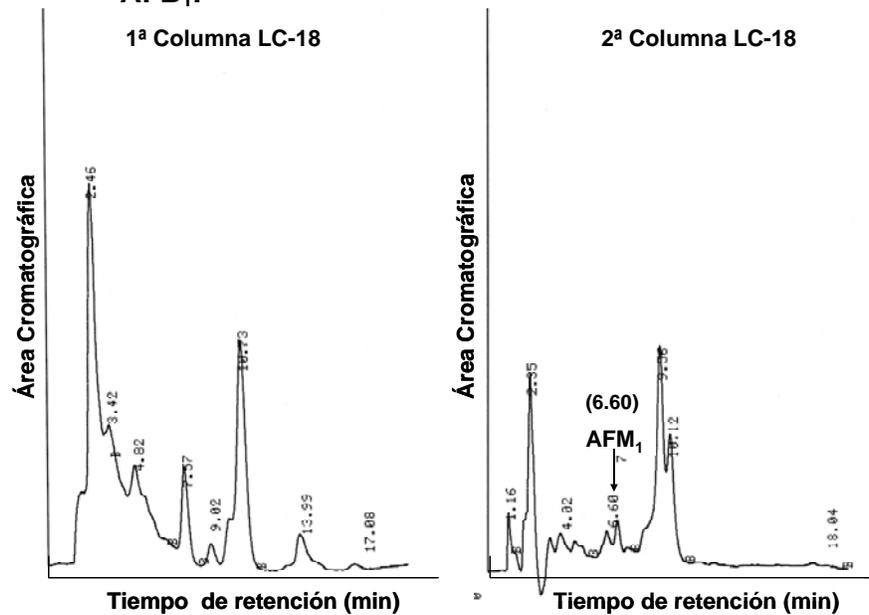


Figura 34: (c) Cromatogramas de AFM<sub>1</sub> de la muestra 8 de molleja de gallina alimentada con sorgo contaminado con 30 µg/kg de AFB<sub>1</sub>.

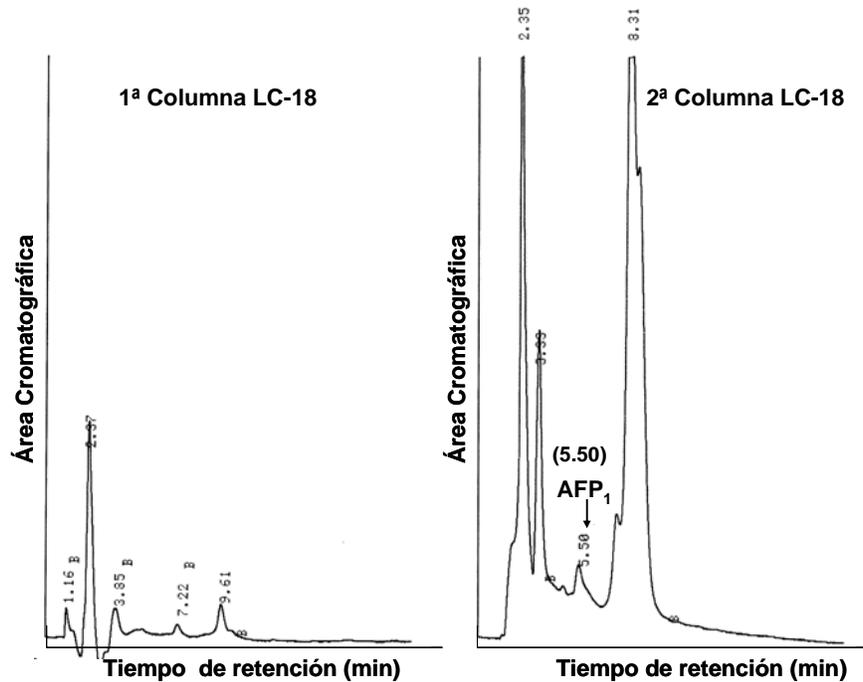


Figura 34: (d) Cromatogramas de AFP<sub>1</sub> de la muestra 6 del tratamiento de 30 µg/kg de AFB<sub>1</sub>.

Figura 34: Cromatogramas de las aflatoxinas encontradas en molleja de gallina alimentada con sorgo contaminado con 30 µg/kg de AFB<sub>1</sub>. (a) AFG<sub>1</sub> de la muestra 3. (b) AFG<sub>2</sub> y AFL de la muestra 4. (c) AFM<sub>1</sub> de la muestra 8. (d) AFP<sub>1</sub> de la muestra 6.

Cromatogramas de aflatoxinas de mollejas de gallinas alimentadas con sorgo contaminado con 500 µg/kg de AFB<sub>1</sub> (Figura 35), en los cuales se observan las diferencias existentes entre la retención de ambas columnas LC-18 usadas en el método químico de Qian & Yang (1984).

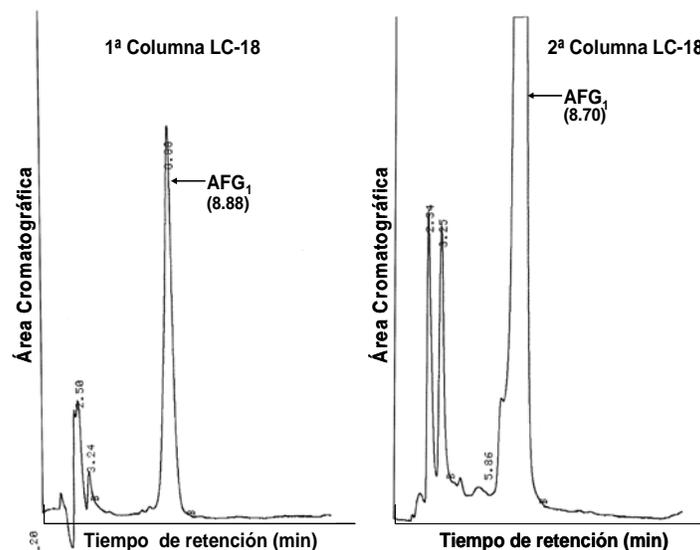


Figura 35: (a) Cromatogramas de AFG<sub>1</sub> de la muestra 5 de molleja de gallina alimentada con sorgo contaminado con 500 µg/kg de AFB<sub>1</sub>.

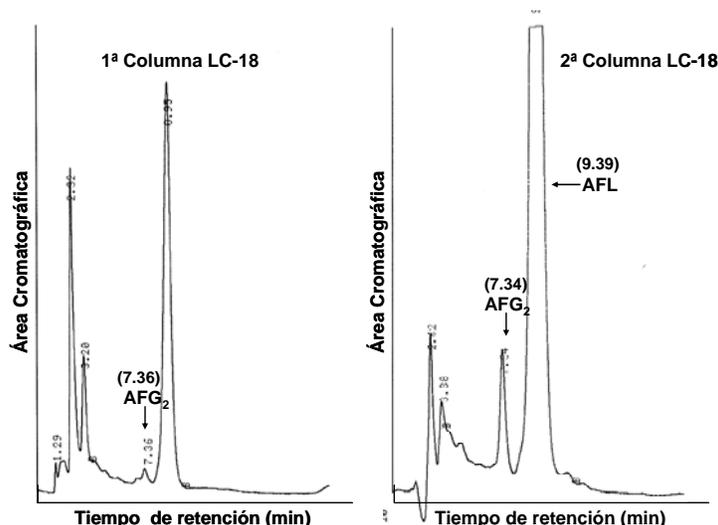


Figura 35: (b) Cromatogramas de AFG<sub>2</sub> y AFL de la muestra 8 del tratamiento de 500 µg/kg de AFB<sub>1</sub>.

Figura 35: Cromatogramas de las aflatoxinas encontradas en molleja de gallina alimentada con sorgo contaminado con 500 µg/kg de AFB<sub>1</sub>. (a) AFG<sub>1</sub> de la muestra 5. (b) AFG<sub>2</sub> y AFL de la muestra 8.

En el **Cuadro 28 b**, se muestra la cuantificación total de AF procedentes del análisis de la primera y segunda columna LC-18 con la técnica de Qian & Yang (1984), de las mollejas de gallinas, así como el tipo de AF encontradas en el análisis de las muestras correspondientes al control, al tratamiento de adición de 30 µg/kg y de 500 µg/kg de AFB<sub>1</sub>.

**Cuadro 28 b: Resumen de la cuantificación de aflatoxinas (µg/kg) en las mollejas de gallina del experimento por el método de Qian & Yang, 1984.**

Gallinas	Cantidad ( µg/kg) de AF en molleja de gallina								
	Control	AFB <sub>1</sub>	AFB <sub>2</sub>	AFG <sub>1</sub>	AFG <sub>2</sub>	AFM <sub>1</sub>	AFM <sub>2</sub>	AFP <sub>1</sub>	AFL
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	2174.4
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	3809.2	-	-	-	-	-
6	-	-	-	1805.8	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	49.5
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	1052.0	-	-	-	-	-

<b>Suma</b>	-	-	6667.0	-	-	-	-	<b>2223.9</b>
$\bar{X}$ AF/gallina	-	-	<b>740.8</b>	-	-	-	-	<b>247.1</b>
<b>Tratamiento: gallinas alimentadas con sorgo contaminado con 30 <math>\mu\text{g}/\text{kg}</math> AFB<sub>1</sub></b>								
1	-	-	-	2.7	-	-	-	38.2
2	-	-	1123.8	2.2	-	-	-	9.6
3	-	-	1574.1	2.9	-	-	-	30.5
4	-	-	1053.5	3.8	-	-	-	221.5
5	-	-	638.4	-	-	-	-	-
6	-	-	-	0.4	-	-	78.0	11.1
7	-	-	8.8	0.3	-	-	-	114.6
8	-	-	11.1	1.1	88.9	-	-	122.5
<b>Suma</b>	-	-	<b>4409.7</b>	<b>13.4</b>	<b>88.9</b>	-	<b>78.0</b>	<b>548.0</b>
$\bar{X}$ AF/gallina	-	-	<b>551.2</b>	<b>1.7</b>	<b>11.1</b>	-	<b>9.8</b>	<b>68.5</b>
<b>Tratamiento: gallinas alimentadas con sorgo contaminado con 500 <math>\mu\text{g}/\text{kg}</math> AFB<sub>1</sub></b>								
1	-	-	-	0.7	-	-	-	338.5
2	-	-	-	1.2	-	-	-	1459.5
3	-	-	1347.1	1.1	-	-	-	467.5
4	-	-	-	1.5	-	-	-	-
5	-	-	2102.9	-	-	-	-	76.9
6	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	408.5	6.5	-	-	-	1312.3
<b>Suma</b>	-	-	<b>3858.5</b>	<b>11.0</b>	-	-	-	<b>3654.7</b>
$\bar{X}$ AF/gallina	-	-	<b>482.3</b>	<b>1.4</b>	-	-	-	<b>456.1</b>

■ = Análisis realizado igual a no detectable.

En las muestras correspondientes al Control, se encontraron AFG<sub>1</sub> y AFL. En las muestras del tratamiento con adición de 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de AFB<sub>1</sub>, se detectaron AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, AFM<sub>1</sub>, AFP<sub>1</sub> y AFL. Mientras que en las muestras con adición de 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de AFB<sub>1</sub>, se obtuvieron AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub> y AFL. No se detectaron AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub> y AFM<sub>2</sub> en ningún caso.

Las micotoxinas con mayor concentración o acumulación en los tejidos correspondientes a los tratamientos de adición con 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y con 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de la molleja fueron AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub> y AFL, mientras en el grupo control de mollejas se encontró AFG<sub>1</sub> y AFL. La presencia de AFG<sub>1</sub> en el grupo control se debe a que las gallinas utilizadas en el experimento al ser de dos años de edad, habían consumido con anterioridad sorgo contaminado con AFG<sub>1</sub>, la cual se acumuló y fue detectada en este experimento. Las mollejas que se venden en el mercado, procedentes de pollos y pollas de engorda, representan animales que están listos para su venta y consumo de los 4 a 6 meses de edad, por lo que su corta vida no les permite acumular altas cantidades de AFG<sub>1</sub> en los músculos intermedios, de la capa córnea y túnica muscular,

representando un riesgo menor para la salud humana al consumir cantidades menores de AF. En el caso de las gallinas ponedoras que también se comen, el riesgo de acumulación de AF es mayor pues son aves de más de dos años de edad.

En el grupo de gallinas alimentadas con sorgo adicionado con 30 µg/kg de AFB<sub>1</sub>, se encontraron AFM<sub>1</sub> y AFP<sub>1</sub> en pequeñas cantidades. AFM<sub>1</sub> y AFP<sub>1</sub> son productos del metabolismo de las gallinas, sin embargo, cabe mencionar que la molleja es, con respecto al hígado y la pechuga, el órgano menos sensible a la absorción y acumulación de AF. No obstante, cuando las gallinas son alimentadas con altas cantidades de AFB<sub>1</sub> (2.5 µg/g y 5 µg/g), la parte superior del tracto digestivo, principalmente el proventrículo y la molleja, sufren un incremento en el peso. El incremento en el peso y tamaño de la molleja, se deben a la inflamación y retención de agua debida al contacto directo con las AF en el proceso digestivo (Huff *et al.*, 1986).

#### **b. 2. Resultados del Análisis estadístico de la cuantificación de aflatoxinas en molleja por el método de Qian & Yang, 1984.**

Como se observa en el **Cuadro 28 a**, en este tejido las diferencias existentes entre la capacidad de retención de ambas columnas LC-18 es muy notoria. Se sumaron las cantidades retenidas en ambas columnas LC-18 para la AFG<sub>1</sub>, la AFG<sub>2</sub> y el AFL. La AFG<sub>2</sub> y el AFL fueron retenidas en mayor cantidad por la primera columna LC-18, mientras que las AFG<sub>1</sub>, AFM<sub>1</sub> y AFP<sub>1</sub> fueron retenidas en la segunda columna. Por lo anterior, no fue necesario realizar un análisis de varianza AxB, ni gráficas de interacción para conocer las diferencias significativas existentes entre la capacidad de retención de ambas columnas.

No obstante, se realizó un análisis estadístico para conocer las diferencias significativas existentes entre el grupo Control y los tratamientos (30 µg/kg y 500 µg/kg) con relación a AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub> y AFL identificadas, al ser más abundantes y frecuentes en la molleja. El análisis estadístico fue de varianza simple (P<0.05) con los datos originales (ANOVA de la variable original), y cuando se les aplicó una transformación de Box & Cox (ANOVA de la variable transformada) y un análisis de presencia/ausencia vía Cuadro de Contingencia (variable Categórica).

Para AFG<sub>1</sub> no hubo efectos ni diferencias significativas entre el control y los tratamientos (30 µg/kg y 500 µg/kg) cuando se realizó el análisis estadístico ya mencionado (**Cuadro 29**).

**Cuadro 29: Resultados del Análisis Estadístico de la cuantificación de AFG<sub>1</sub> (µg/kg) en molleja por el método de Qian & Yang (1984).**

(a) ANOVA de la variable original.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F experimental	Prob > F
Tratamiento	2	308042	154021	0.159	<b>0.8540</b>
Error	22	21309246	968602		
Total	24	21617288			

(b) ANOVA de la variable con transformación de Box & Cox.

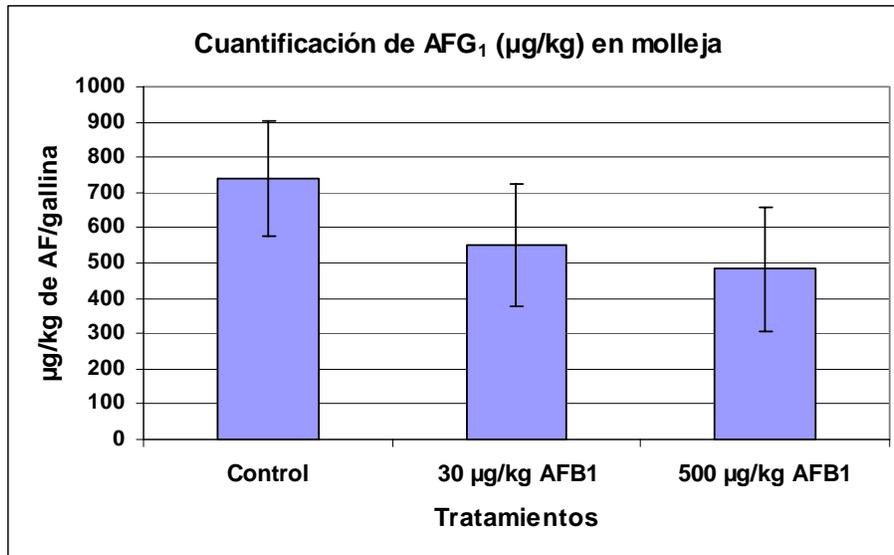
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F experimental	Prob > F
Tratamiento	2	5709.328	2854.66	0.930	<b>0.4094</b>
Error	22	67510.197	3068.65		
Total	24	73219.524			

(c) Análisis de Presencia/Ausencia vía Cuadro de Contingencia.

Conteo	Muestras por tratamiento	Ausencia		Presencia	
		Nº de muestras	(%)	Nº de muestras	(%)
Control	9	6	66.7	3	<b>33.3</b>
30 µg/kg AFB <sub>1</sub>	8	2	25.0	6	<b>75.0</b>
500 µg/kg AFB <sub>1</sub>	8	5	62.5	3	<b>37.5</b>
Total	25	13		12	

Prueba de Xi

Modelo	-Logaritmo	Grados de libertad	Xi Cuadrada	Prob>Xi cuadrada
Diferencia	1.7889	2	3.578	<b>0.1672</b>
Completo	15.52			
Total	17.309			



Nivel	Media	Desviación Estándar
Control	740.8	328.0
30 µg/kg AFB <sub>1</sub>	551.2	347.9
500 µg/kg AFB <sub>1</sub>	482.3	347.9

**Figura 36: Comparación de las mediciones promedio de AFG<sub>1</sub> (µg/kg) encontradas en la molleja por gallina.**

Para AFG<sub>2</sub>, cuando se realizó el ANOVA simple hubo efectos marginalmente significativos ( $P < 0.05$ ) entre el grupo Control y los tratamientos (30 µg/kg y 500 µg/kg de AFB<sub>1</sub>) (**Cuadro 30a**) (**Figura 37**). Cuando se aplicó la transformación de Box & Cox a los valores cuantificados de cada muestra se observó un efecto muy significativo ( $P < 0.05$ ) entre el grupo Control y los tratamientos (**Cuadro 30b**). También existió diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre el Grupo Control y los tratamientos al analizar los valores de cada muestra por ausencia/presencia vía Cuadro de Contingencia. Se observa que el grupo Control presentó 0% de AFG<sub>2</sub>, el tratamiento de 30 µg/kg de AFB<sub>1</sub>, tuvo un 87.5% de AFG<sub>2</sub> en las muestras y el tratamiento de 500 µg/kg de AFB<sub>1</sub>, presentó un 62.5% de AFG<sub>2</sub> (**Cuadro 30c**). Por último, se aplicó una prueba de Tukey a los valores de cada muestra, donde se observa que existieron diferencias entre el grupo Control y los tratamientos, pero no hubo ninguna diferencia entre el tratamiento de 30 y 500 µg/kg de AFB<sub>1</sub> (**Cuadro 30d**).

**Cuadro 30: Resultados del Análisis Estadístico de la cuantificación de AFG<sub>2</sub> (µg/kg) en molleja por el método de Qian & Yang (1984).**

(a) ANOVA de la variable original.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F experimental	Prob > F
Tratamiento	2	13.756	6.878	3.25	<b>0.0578</b>
Error	22	46.510	2.114		
Total	24	60.266			

(b) ANOVA de la variable con transformación de Box & Cox.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F experimental	Prob > F
Tratamiento	2	6.750	3.375	10.924	<b>0.0005*</b>
Error	22	6.797	0.310		
Total	24	13.548			

(c) Análisis de Presencia/Ausencia vía Cuadro de Contingencia.

Cuento	Muestras por tratamiento	Ausencia		Presencia	
		Nº de muestras	(%)	Nº de muestras	(%)
Control	9	9	100	0	<b>0</b>
30 µg/kg AFB <sub>1</sub>	8	1	12.5	7	<b>87.5</b>
500 µg/kg AFB <sub>1</sub>	8	3	37.5	5	<b>62.5</b>
Total	25	13		12	

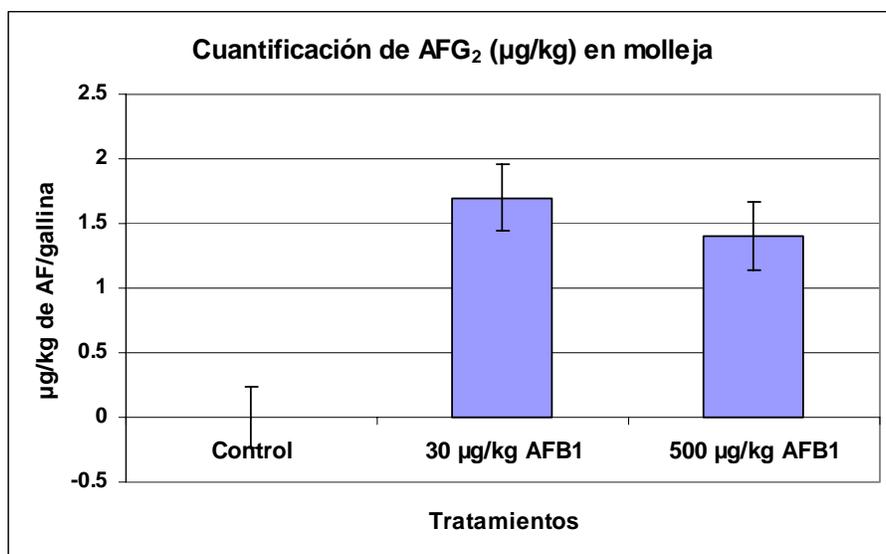
Prueba de Xi

Modelo	-Logaritmo	Grados de libertad	Xi Cuadrada	Prob>Xi cuadrada
Diferencia	9.002	2	18.003	<b>0.0001*</b>
Completo	8.307			
Total	17.309			

\* Estadísticamente significativo.

(d) Prueba de Tukey

Nivel	Media	Desviación Estándar	Interacción
Control	0.0	0.48	B
30 µg/kg AFB <sub>1</sub>	1.7	0.51	A
500 µg/kg AFB <sub>1</sub>	1.4	0.51	A



**Figura 37: Comparación de las mediciones promedio de AFG<sub>2</sub> (µg/kg) encontradas en molleja por gallina.**

En el análisis estadístico de AFL, no se observaron diferencias significativas entre el grupo Control y tratamientos (30 µg/kg y 500 µg/kg de AFB<sub>1</sub>) al aplicar el ANOVA a los valores originales (**Figura 38**) ni cuando se hizo la transformación de Box & Cox (**Cuadro 31**).

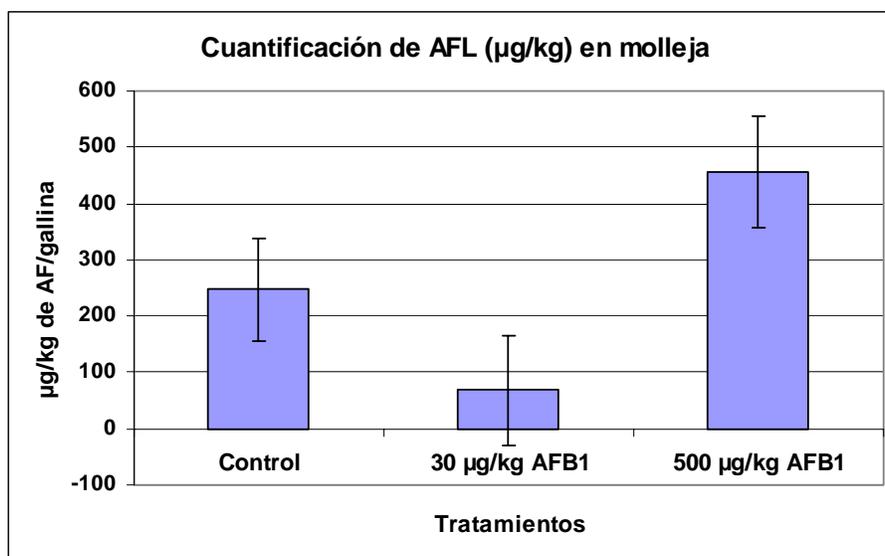
**Cuadro 31: Resultados del Análisis Estadístico de la cuantificación de AFL (µg/kg) en molleja por el método de Qian & Yang, 1984.**

(a) ANOVA de la variable original.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F experimental	Prob > F
Tratamiento	2	604620.2	302310	0.986	<b>0.3889</b>
Error	22	6744928.1	306588		
Total	24	7349548.3			

(b) ANOVA de la variable con transformación de Box & Cox.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F experimental	Prob > F
Tratamiento	2	5749.6	2874.8	2.38	<b>0.1161</b>
Error	22	26595.1	1208.9		
Total	24	32344.7			



Nivel	Media	Desviación Estándar
Control	247.1	184.6
30 µg/kg AFB <sub>1</sub>	68.5	195.8
500 µg/kg AFB <sub>1</sub>	456.2	195.8

**Figura 38: Comparación de las mediciones promedio de AFL (µg/kg) encontradas en molleja por gallina.**

**c.1. Resultados de la cuantificación de aflatoxinas en pechugas de gallinas del experimento.**

Como se observa en el **Cuadro 32 a**, la mayor cantidad de AF retenidas tanto en el grupo Control como en los 2 tratamientos establecidos durante el experimento se presentó en la segunda columna LC-18, como se indica en la técnica de Qian & Yang (1984).

En los casos en los que la primera columna retuvo AF, lo hizo en cantidades muy pequeñas comparadas con las grandes cantidades de AF retenidas en la segunda columna, ó cuando la cantidad de AF encontradas en el extracto, al ser pequeña se retuvo en la primera columna, y al pasarlo por la segunda columna ésta ya no retuvo nada. Sin embargo, si no se toma en cuenta los eluidos de las primeras columnas se pierde el 2.3% de AF cuantificadas por esta técnica.

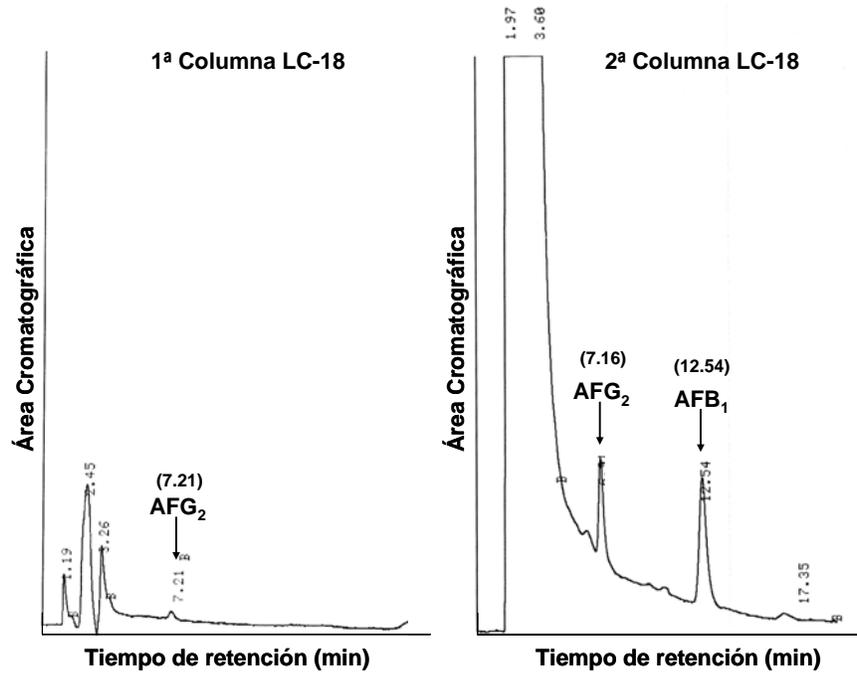
**Cuadro 32 a: Resultados de la cuantificación de aflatoxinas ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) en pechuga de gallina del experimento por el método de Qian & Yang (1984).**

Gallinas	Cantidad ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) de AF en pechuga de gallina															
	AFB <sub>1</sub>		AFB <sub>2</sub>		AFG <sub>1</sub>		AFG <sub>2</sub>		AFM <sub>1</sub>		AFM <sub>2</sub>		AFP <sub>1</sub>		AFL	
	Columna 1 <sup>a</sup>	Columna 2 <sup>a</sup>	Columna 1 <sup>a</sup>	Columna 2 <sup>a</sup>	Columna 1 <sup>a</sup>	Columna 2 <sup>a</sup>	Columna 1 <sup>a</sup>	Columna 2 <sup>a</sup>	Columna 1 <sup>a</sup>	Columna 2 <sup>a</sup>	Columna 1 <sup>a</sup>	Columna 2 <sup>a</sup>	Columna 1 <sup>a</sup>	Columna 2 <sup>a</sup>	Columna 1 <sup>a</sup>	Columna 2 <sup>a</sup>
Control																
1	-	26.5	-	-	-	-	1.7	-	-	23.9	-	-	185.7	-	-	-
2	-	14.6	-	-	-	-	-	-	-	26.8	-	-	-	-	-	-
3	-	22.8	-	-	-	-	-	0.8	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	23.7	-	-	-	-	-	5.3	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	14.3	-	-	-	-	-	-	-	245.7	-	-	-	-	-	-
6	-	52.1	-	-	-	-	0.2	3.6	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	5.5	-	-	-	-	-	-	-	171.0	-	-	-	-	-	-
8	-	2.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	273.9	-	-
9	-	-	-	-	-	-	1.1	-	-	-	-	-	-	250.7	-	-
Suma	-	162.5	-	-	-	-	3.0	9.7	-	467.4	-	-	185.7	524.6	-	-
$\bar{X}$ AF/gallina	-	18.1	-	-	-	-	0.3	1.1	-	52.0	-	-	20.6	58.3	-	-
<b>Tratamiento: gallinas alimentadas con sorgo contaminado con 30 <math>\mu\text{g}/\text{kg}</math> AFB<sub>1</sub></b>																
1-10	-	-	-	-	-	-	1.3	89.2	-	-	-	-	-	220.6	-	-
2-11	-	-	-	-	-	-	-	61.8	-	-	-	-	-	40.6	-	-
3-12	-	-	-	-	-	-	-	66.3	-	-	-	-	-	234.1	-	-
4-13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	35.5	-	-
5-14	-	-	-	-	-	-	-	93.4	-	-	-	-	-	266.2	-	33.7
6-15	-	-	-	-	-	-	-	97.1	-	-	-	144.6	-	176.0	-	-
7-16	-	-	-	-	-	128.7	-	105.1	-	-	-	-	-	129.2	-	-
8-17	-	-	-	-	-	-	-	59.3	-	-	-	-	-	57.7	-	5.0
Suma	-	-	-	-	-	128.7	1.3	572.2	-	-	-	144.6	-	1159.9	-	38.7
$\bar{X}$ AF/gallina	-	-	-	-	-	16.1	0.16	71.5	-	-	-	18.1	-	145.0	-	4.8
<b>Tratamiento: gallinas alimentadas con sorgo contaminado con 500 <math>\mu\text{g}/\text{kg}</math> AFB<sub>1</sub></b>																
1-18	-	-	-	-	-	-	0.5	-	-	8007.4	-	-	-	631.9	-	-
2-19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12674.9	-	-	-	1875.5	-	-
3-20	-	-	-	-	-	152.4	0.2	-	-	9104.1	-	-	-	650.0	-	-
4-21	-	-	-	-	-	3946.4	-	15.5	-	2318.1	-	-	-	1485.7	-	-
5-22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3158.4	-	-	-	170.6	-	-
6-23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2933.7	-	-	-	240.1	-	-
7-24	-	-	-	-	-	-	-	5.3	-	-	-	-	-	39.0	-	-
8-25	-	-	-	-	-	-	-	30.0	-	-	-	-	-	191.5	-	-
Suma	-	-	-	-	-	4098.8	0.7	50.8	-	-	-	-	-	5284.3	-	-
$\bar{X}$ AF/gallina	-	-	-	-	-	512.4	0.08	6.4	-	4774.6	-	-	-	660.5	-	-

- = Análisis realizado igual a no detectable.

En el grupo Control, la segunda columna retuvo AFB<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, AFM<sub>1</sub> y AFP<sub>1</sub> (**Figura 39 a, b y c**). En el tratamiento de las gallinas alimentadas con sorgo adicionado con 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de AFB<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub> y AFP<sub>1</sub> (**Figura 40 a y c**). Y el tratamiento de 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de AFB<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, AFM<sub>1</sub> y AFP<sub>1</sub> (**Figura 41 b y c**).

A continuación se presentan los cromatogramas más representativos de las AF encontradas en la pechuga del grupo Control (**Figura 39**) como del tratamiento de gallinas alimentadas con sorgo contaminado con 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de AFB<sub>1</sub> (**Figura 40**) y 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de AFB<sub>1</sub> (**Figura 41**), en los cuales se observan de una forma clara las diferencias existentes entre la retención de ambas columnas LC-18 usadas en el método químico de Qian & Yang (1984).



**Figura 39: (a) Cromatogramas de AFB<sub>1</sub> y AFG<sub>2</sub> de la muestra 6 del grupo Control.**

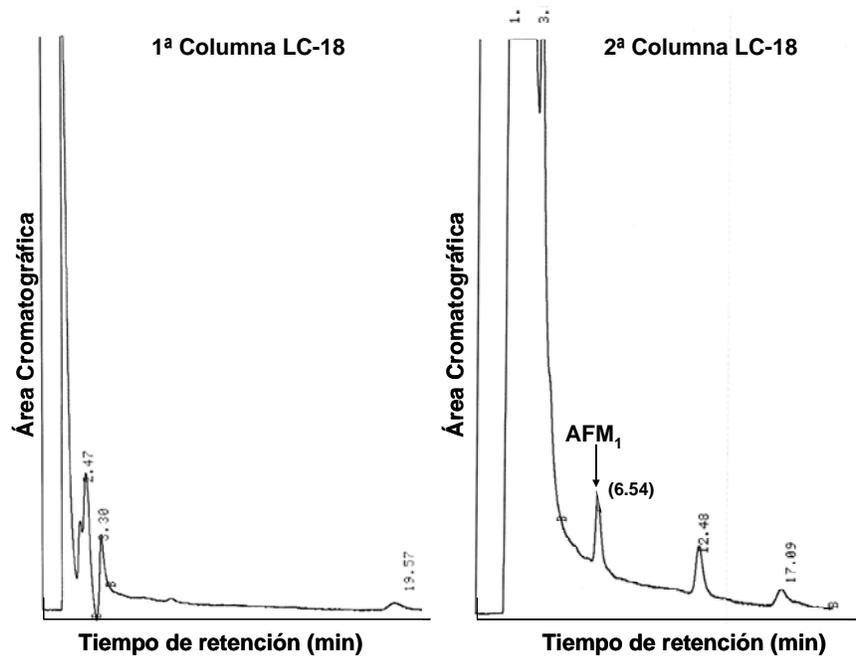


Figura 39: (b) Cromatogramas de  $AFM_1$  de la muestra 5 de pechuga de gallina alimentada con sorgo sin  $AFB_1$  ó del grupo Control.

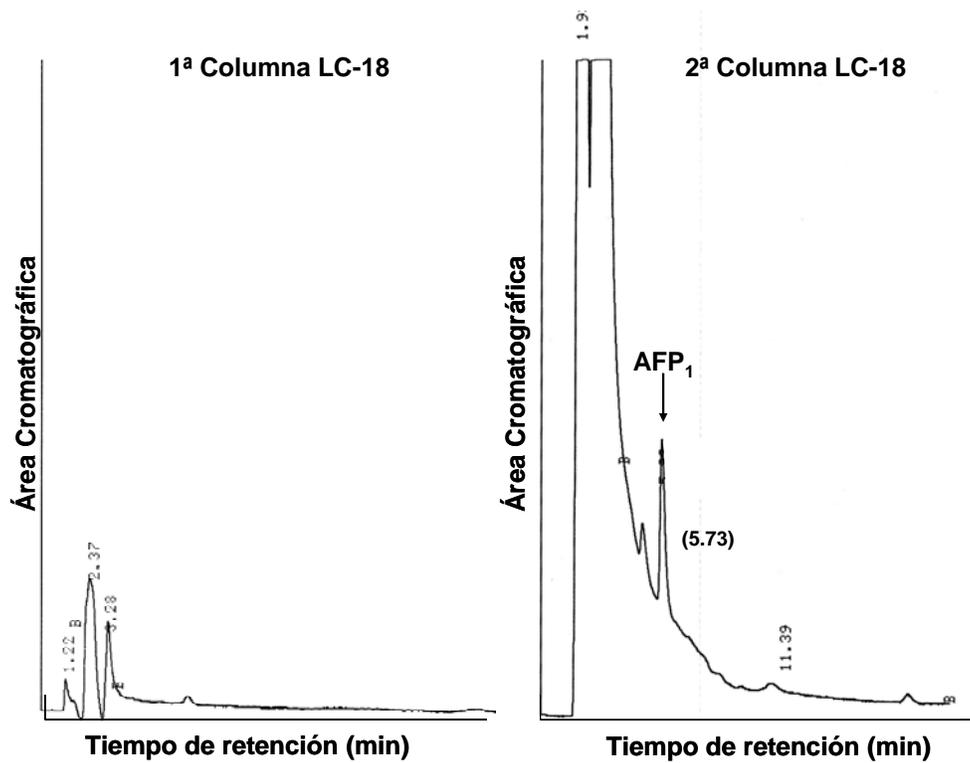


Figura 39: (c) Cromatogramas de  $AFP_1$  de la muestra 8 de pechuga de gallina alimentada con sorgo sin  $AFB_1$  ó del grupo Control.

Figura 39: Cromatogramas de las aflatoxinas encontradas en pechugas de gallinas alimentadas con sorgo sin  $AFB_1$  ó del grupo Control.

(a) AFB<sub>1</sub> y AFG<sub>2</sub> de la muestra 6. (b) AFM<sub>1</sub> de la muestra 5. (c) AFP<sub>1</sub> de la muestra 8.

Muestras representativas de los cromatogramas de HPLC de las dos columnas LC-18 aplicadas a los tratamientos de adición de 30 µg/kg al sorgo con que se alimentó a las gallinas del experimento.

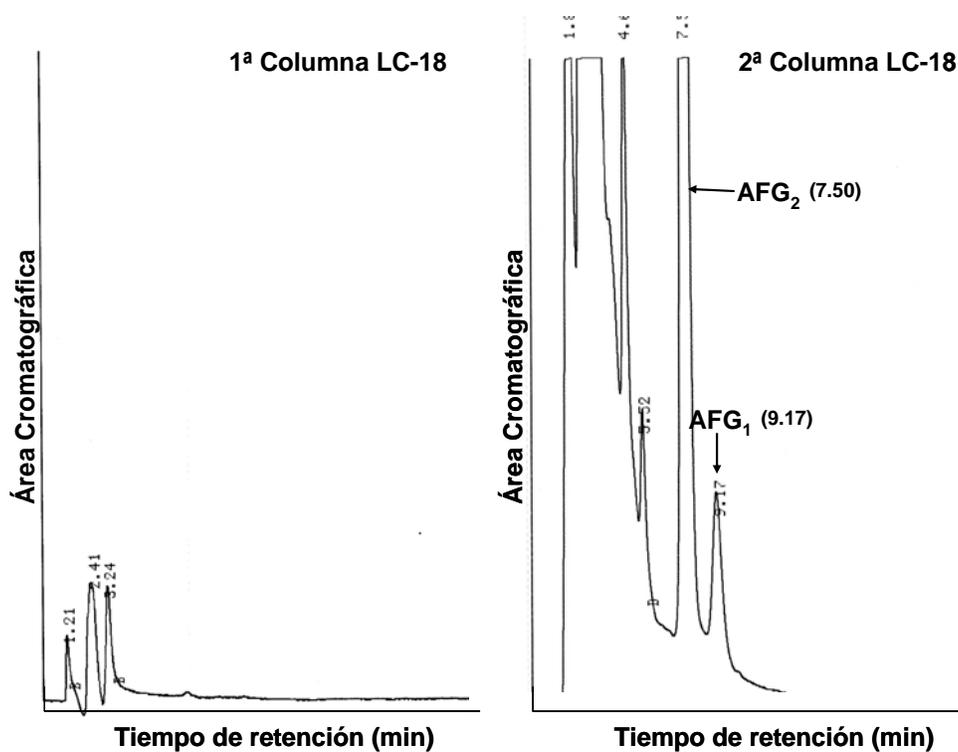


Figura 40: (a) Cromatogramas de AFG<sub>1</sub> y AFG<sub>2</sub> de la muestra 7 de pechuga de gallina alimentada con sorgo contaminado con 30 µg/kg de AFB<sub>1</sub>.

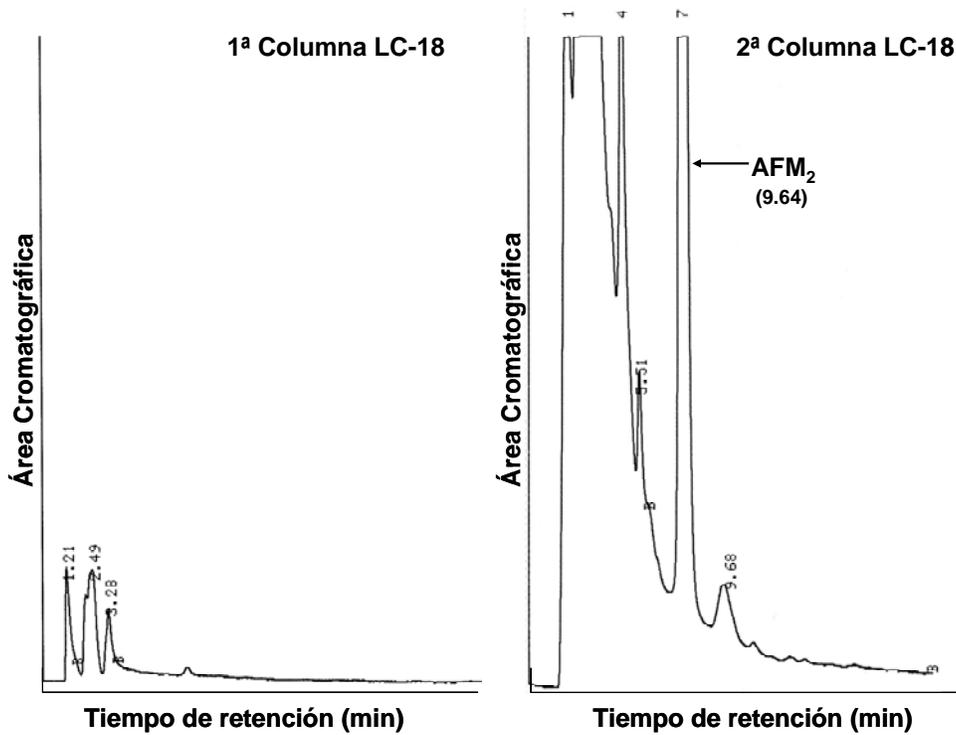


Figura 40: (b) Cromatogramas de AFM<sub>2</sub> de la muestra 6 de pechuga de gallina alimentada con sorgo contaminado con 30 µg/kg de AFB<sub>1</sub>.

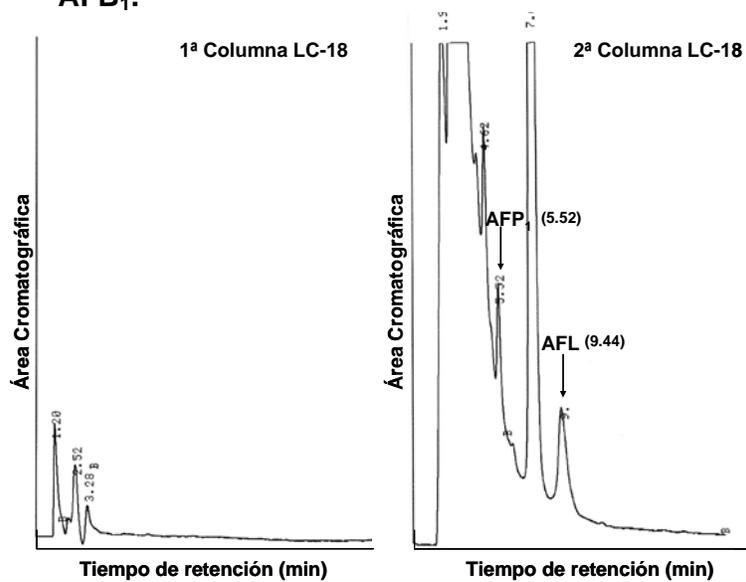


Figura 40: (c) Cromatogramas de AFP<sub>1</sub> y AFL de la muestra 5 de pechuga de gallina alimentada con sorgo contaminado con 30 µg/kg de AFB<sub>1</sub>.

Figura 40: Cromatogramas de las aflatoxinas encontradas en pechugas de gallinas alimentadas con sorgo contaminado con 30 µg/kg de AFB<sub>1</sub>. (a) AFG<sub>1</sub> y AFG<sub>2</sub> de la muestra 7. (b) AFM<sub>2</sub> de la muestra 6. (c) AFP<sub>1</sub> y AFL de la muestra 5.

Muestras representativas de los cromatogramas de HPLC de las dos columnas LC-18 aplicadas a los tratamientos de adición de 500 ug/kg al sorgo que alimentó a las gallinas del experimento.

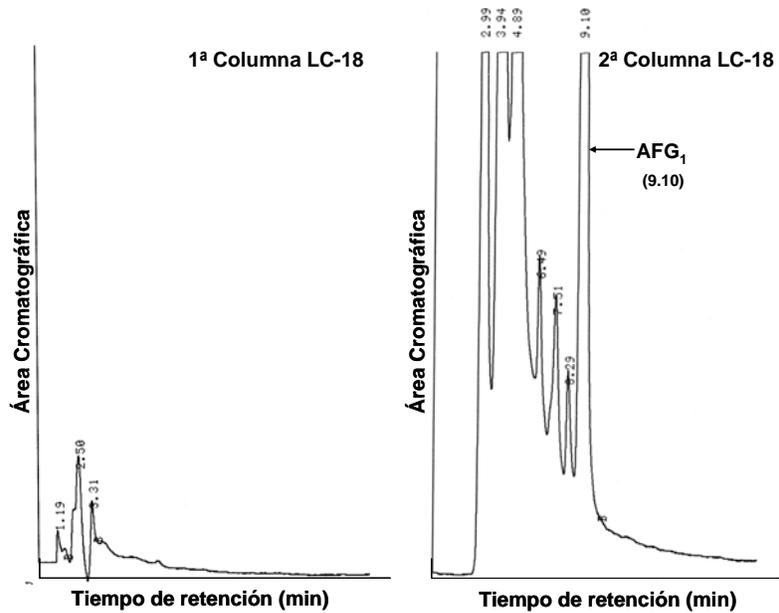


Figura 41: (a) Cromatogramas de AFG<sub>1</sub> de la muestra 4 de pechuga de gallina alimentada con sorgo contaminado con 500 µg/kg de AFB<sub>1</sub>.

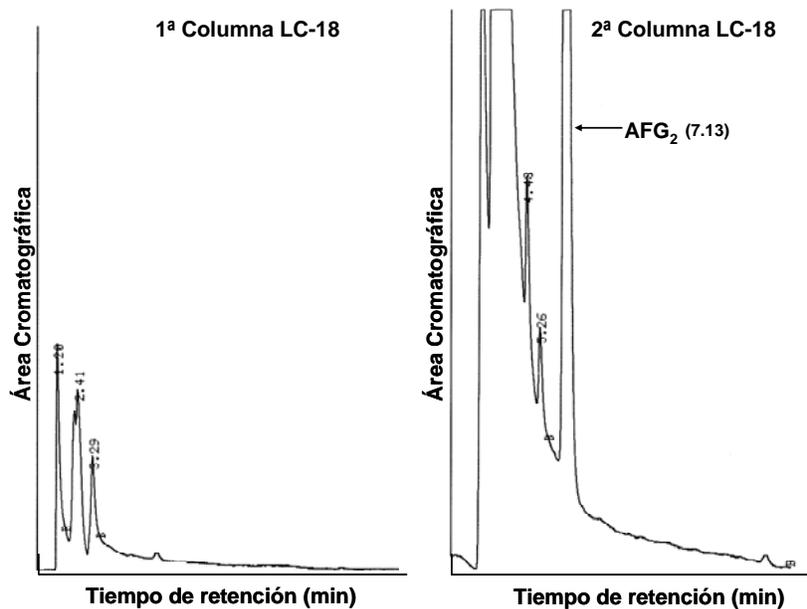


Figura 41: (b) Cromatogramas de AFG<sub>2</sub> de la muestra 8 de pechuga de gallina alimentada con sorgo contaminado con 500 µg/kg de AFB<sub>1</sub>.

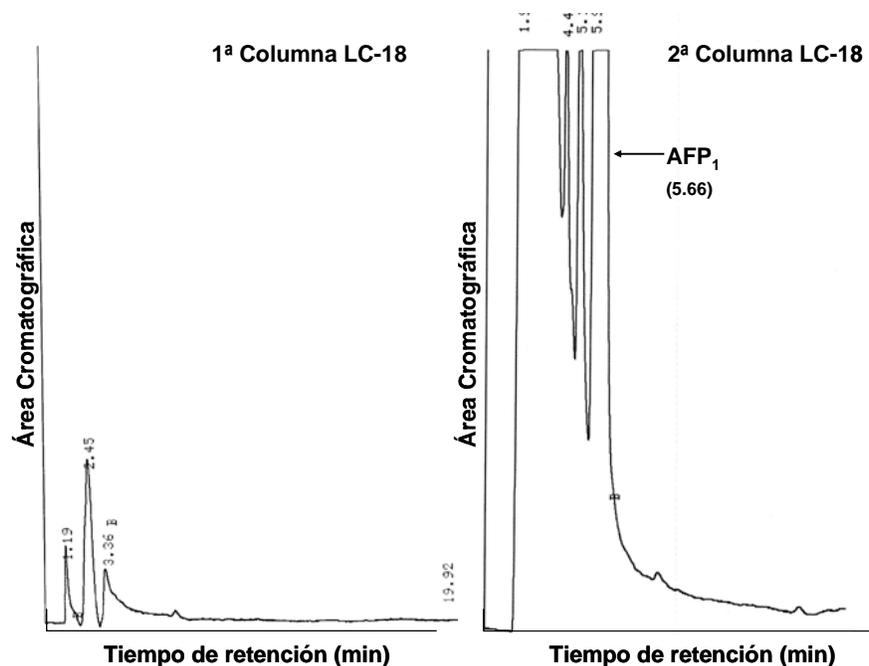


Figura 41: c) Cromatogramas de AFP<sub>1</sub> de la muestra 2 de pechuga de gallina alimentada con sorgo contaminado con 500 µg/kg de AFB<sub>1</sub>.

Figura 41: Cromatogramas de las aflatoxinas encontradas en pechugas de gallinas alimentadas con sorgo contaminado con 500 µg/kg de AFB<sub>1</sub>. (a) AFG<sub>1</sub> de la muestra 4. (b) AFG<sub>2</sub> de la muestra 8. (c) AFP<sub>1</sub> de la muestra 2.

En el **Cuadro 32 b**, se muestra la cuantificación total de AF procedentes del análisis de la primera y segunda columna LC-18 de la técnica de Qian & Yang, 1984, en las pechugas de gallina, así como el tipo de AF encontradas en el análisis de las muestras correspondientes al control y los 2 tratamientos (30 µg/kg y 500 µg/kg). En las muestras correspondientes al Control, se encontraron AFB<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, AFM<sub>1</sub> y AFP<sub>1</sub>.

**Cuadro 32 b: Resumen de la cuantificación de aflatoxinas (µg/kg) en las pechugas de gallina del experimento por el método de Qian & Yang (1984).**

Gallinas	Cantidad ( µg/kg) de AF en pechuga de gallina							
	AFB <sub>1</sub>	AFB <sub>2</sub>	AFG <sub>1</sub>	AFG <sub>2</sub>	AFM <sub>1</sub>	AFM <sub>2</sub>	AFP <sub>1</sub>	AFL
1	26.5	-	-	1.7	23.9	-	185.7	-
2	14.6	-	-	-	26.8	-	-	-
3	22.8	-	-	0.8	-	-	-	-
4	23.7	-	-	5.3	-	-	-	-

5	14.3	-	-	-	245.7	-	-	-
6	52.1	-	-	3.8	-	-	-	-
7	5.5	-	-	-	171.0	-	-	-
8	2.7	-	-	-	-	-	273.9	-
9	-	-	-	1.1	-	-	250.7	-
<b>Suma</b>	<b>162.2</b>	-	-	<b>12.7</b>	<b>467.4</b>	-	<b>710.3</b>	-
$\bar{X}$ AF/gallina	<b>18.0</b>	-	-	<b>1.4</b>	<b>51.9</b>	-	<b>78.9</b>	-
<b>Tratamiento: gallinas alimentadas con sorgo contaminado con 30 µg/kg AFB<sub>1</sub></b>								
1	-	-	-	90.5	-	-	220.6	-
2	-	-	-	61.8	-	-	40.6	-
3	-	-	-	66.3	-	-	234.1	-
4	-	-	-	-	-	-	35.5	-
5	-	-	-	93.4	-	-	266.2	33.7
6	-	-	-	97.1	-	144.6	176.0	-
7	-	-	128.7	105.1	-	-	129.2	-
8	-	-	-	59.3	-	-	57.7	5.0
<b>Suma</b>	-	-	<b>128.7</b>	<b>573.5</b>	-	<b>144.6</b>	<b>1159.9</b>	<b>38.7</b>
$\bar{X}$ AF/gallina	-	-	<b>16.1</b>	<b>71.7</b>	-	<b>18.1</b>	<b>145.0</b>	<b>4.8</b>
<b>Tratamiento: gallinas alimentadas con sorgo contaminado con 500 µg/kg AFB<sub>1</sub></b>								
1	-	-	-	0.5	8007.4	-	631.9	-
2	-	-	-	-	12674.9	-	1875.5	-
3	-	-	152.4	0.2	9104.1	-	650.0	-
4	-	-	3946.4	15.5	2318.1	-	1485.7	-
5	-	-	-	-	3158.4	-	170.6	-
6	-	-	-	-	2933.7	-	240.1	-
7	-	-	-	5.3	-	-	39.0	-
8	-	-	-	30.0	-	-	191.5	-
<b>Suma</b>	-	-	<b>4098.8</b>	<b>51.5</b>	<b>38196.6</b>	-	<b>5284.3</b>	-
$\bar{X}$ AF/gallina	-	-	<b>512.4</b>	<b>6.4</b>	<b>4774.6</b>	-	<b>660.5</b>	-

- Análisis realizado igual a no detectable.

En las muestras del tratamiento de 30 µg/kg, se detectaron AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, AFM<sub>1</sub>, AFM<sub>2</sub>, AFP<sub>1</sub> y AFL. Mientras en las muestras de 500 µg/kg AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, AFM<sub>1</sub> y AFP<sub>1</sub>. No se detectó AFB<sub>2</sub> en ningún caso, y sólo en una muestra se encontró AFM<sub>2</sub>. AFM<sub>2</sub> también es un producto de la biotransformación de AFB<sub>1</sub>.

Las toxinas con mayor concentración o acumulación en los tejidos correspondientes a los tratamientos de 30 µg/kg y 500 µg/kg de la pechuga fueron AFM<sub>1</sub> y AFP<sub>1</sub>, mientras en el grupo control de la pechuga se encontró AFB<sub>1</sub>. La presencia de AFB<sub>1</sub> en el control se debe a que las gallinas utilizadas en el experimento son de alrededor de dos años de edad, tiempo en el que han acumulado esa cantidad tan alta. Normalmente las pechugas que se venden en el mercado, son de pollos y gallinas de engorda, los cuales son animales que están listos para su venta y consumo de los 4 a 6 meses de edad, lo que indica

que su corta vida no les permite metabolizar y acumular altas cantidades de AF en los tejidos del músculo representando un riesgo menor para la salud humana al consumir cantidades menores de AF.

En cuanto a la acumulación de AFM<sub>1</sub> y AFP<sub>1</sub>, y no de AFB<sub>1</sub> en los tratamientos establecidos en el experimento, se da porque las gallinas alimentadas con el sorgo contaminado con concentraciones de 30 µg/kg y 500 µg/kg ya han metabolizado las AFB<sub>1</sub>, dando lugar a los metabolitos de AF ya mencionados.

Lo anterior se puede probar con un experimento a nivel molecular en el hígado, donde el citocromo P<sub>450</sub> es más activo. Cuando las gallinas son alimentadas con AFB<sub>1</sub> o cualquier agente xenobiótico que entre al organismo, los sistemas enzimáticos son alertados para empezar la biotransformación a compuestos menos tóxicos (Orellana & Guajardo, 2004).

Para que la biotransformación se lleve a cabo, es necesaria la expresión de los genes que serán traducidos como enzimas, y que degradaran a la AFB<sub>1</sub> a metabolitos hidrolizados, los cuales son menos tóxicos. En el momento en que la expresión de esos genes se presente, se deben extraer los RNA mensajeros para su secuenciación e identificación. Una vez que se conocen los genes expresados, se obtendrá la cantidad de transcritos producidos al exponer a las gallinas a diferentes concentraciones de AFB<sub>1</sub>, en este caso 30 µg/kg y 500 µg/kg. Con lo que se establecería si estas concentraciones de AFB<sub>1</sub> son suficientes para que el hígado empiece a metabolizar y producir metabolitos menos tóxicos. Mientras cantidades debajo de esa concentración de AFB<sub>1</sub>, indicaría que el hígado no ha acumulado una cantidad de AFB<sub>1</sub> que promueva su biotransformación.

## **c.2. Resultados del Análisis Estadístico de aflatoxinas en pechuga por el método de Qian & Yang (1984).**

Como se observa en el **Cuadro 32 a**, en este tejido las diferencias existentes entre la capacidad de retención de ambas columnas LC-18 es muy clara. Se sumaron las cantidades retenidas en ambas columnas LC-18 para AFG<sub>2</sub> y AFP<sub>1</sub>, debido a que la primera columna retuvo trazas de estas AF y la segunda columna retuvo la mayor cantidad de éstas como del resto de AF

localizadas en la pechuga. Por lo anterior, no fue necesario realizar un análisis de varianza AxB, ni gráficas de interacción para conocer las diferencias significativas existentes entre la capacidad de retención de ambas columnas.

No obstante, se realizó un análisis estadístico para conocer las diferencias significativas existentes entre el grupo Control y los tratamientos (30 µg/kg y 500 µg/kg) con relación a AFB<sub>1</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, AFM<sub>1</sub>, AFP<sub>1</sub> y AFL identificadas, al haberse encontrado con mayor frecuencia en la pechuga. El análisis estadístico consistió en hacer un análisis de varianza simple (P<0.05) con los datos originales (ANOVA de la variable original), un análisis de varianza simple cuando a los datos se les ha aplicado una transformación de Box & Cox (ANOVA de la variable transformada) y un análisis de presencia/ausencia vía Cuadro de Contingencia (variable Categórica).

En el análisis estadístico de AFB<sub>1</sub>, se observan diferencias muy significativas (P<0.05) entre el grupo Control y tratamientos (30 µg/kg de AFB<sub>1</sub> y 500 µg/kg de AFB<sub>1</sub>) al aplicar el análisis estadístico completo ya mencionado (**Cuadro 33 a y b**) (**Figura 42**). Sin embargo, la diferencia observada se debe a que sólo el grupo Control presentó AFB<sub>1</sub> (100%) mientras los tratamientos no, como lo indica el análisis de presencia/ausencia y la prueba de Tukey (**Cuadro 33 c y d**).

**Cuadro 33: Resultados del Análisis Estadístico de la cuantificación de AFB<sub>1</sub> (µg/kg) en pechuga por el método de Qian & Yang (1984).**

(a) ANOVA de la variable original.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F experimental	Prob > F
Tratamiento	2	1870.85	935.4	10.137	0.0008*
Error	22	2030.18	92.3		
Total	24	3901.03			

(b) ANOVA de la variable transformada (transformación de Box & Cox).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F experimental	Prob > F
Tratamiento	2	78.710356	39.3552	54.0091	<0.0001*
Error	22	16.030879	0.7287	Prob > F	
Total	24	94.741235			

(c) Análisis de Presencia/Ausencia vía Cuadro de Contingencia.

Conteo	Muestras por tratamiento	Ausencia		Presencia	
		Nº de muestras	(%)	Nº de muestras	(%)
Control	9	1	11.1	8	88.9
30 µg/kg AFB <sub>1</sub>	8	8	100.0	0	0
500 µg/kg AFB <sub>1</sub>	8	8	100.0	0	0
Total	25	17		8	

Prueba de Xi

Modelo	-Logaritmo	Grados de libertad	Xi Cuadrada	Prob>Xi cuadrada
Diferencia	12.53	2	25.06	<0.0001*
Completo	3.14			
Total	15.67			

\* Estadísticamente significativo.

(d) Prueba de Tukey

Nivel	Media	Desviación Estándar	Interacción
Control	18.0	3.2	A
30 µg/kg AFB <sub>1</sub>	0	0	B
500 µg/kg AFB <sub>1</sub>	0	0	B

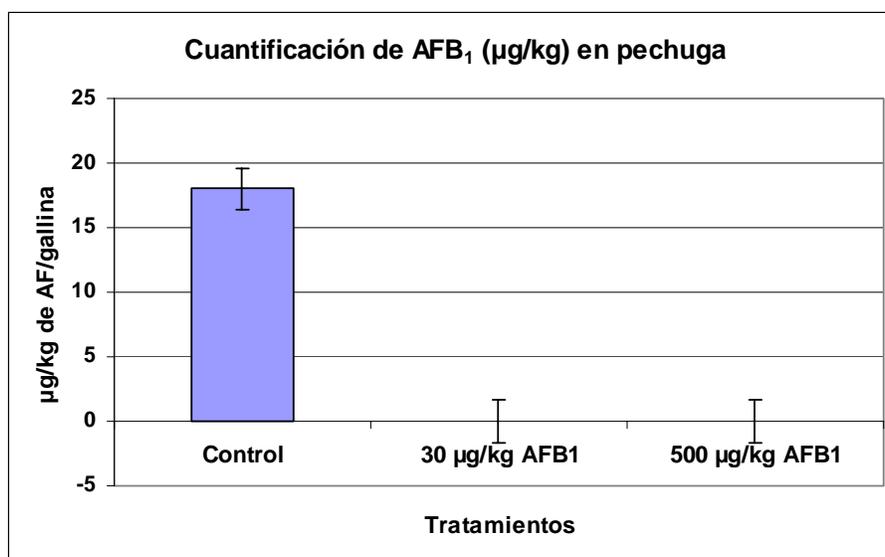


Figura 42: Comparación de las mediciones promedio de AFB<sub>1</sub> (µg/kg) encontradas en la pechuga por gallina.

Entre el grupo Control y los tratamientos (30 µg/kg y 500 µg/kg de AFB<sub>1</sub>) para los valores de AFG<sub>1</sub> identificada en la pechuga, no se encontraron diferencias significativas (P<0.05) con ninguna de las pruebas estadísticas utilizadas en el análisis (**Cuadro 34 a y b**) (**Figura 43**). El análisis de presencia/ausencia vía Cuadro de Contingencia, se observa que el grupo Control no tuvo presencia de AFG<sub>1</sub>, el tratamiento de 30 µg/kg de AFB<sub>1</sub> presentó 12.5% y el tratamiento de 500 µg/kg de AFB<sub>1</sub> presentó el 25% de las muestras con AFG<sub>1</sub>. Con este análisis tampoco hubo diferencias significativas mientras (P<0.05) (**Cuadro 34 c**).

**Cuadro 34: Resultados del Análisis Estadístico de la cuantificación de AFG<sub>1</sub> (µg/kg) en pechuga por el método de Qian & Yang (1984).**

(a) ANOVA de la variable original.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F experimental	Prob > F
Tratamiento	2	1387220	693610	1.129	<b>0.3413</b>
Error	22	13511772	614171		
Total	24	14898992			

(b) ANOVA de la variable transformada (transformación de Box & Cox).

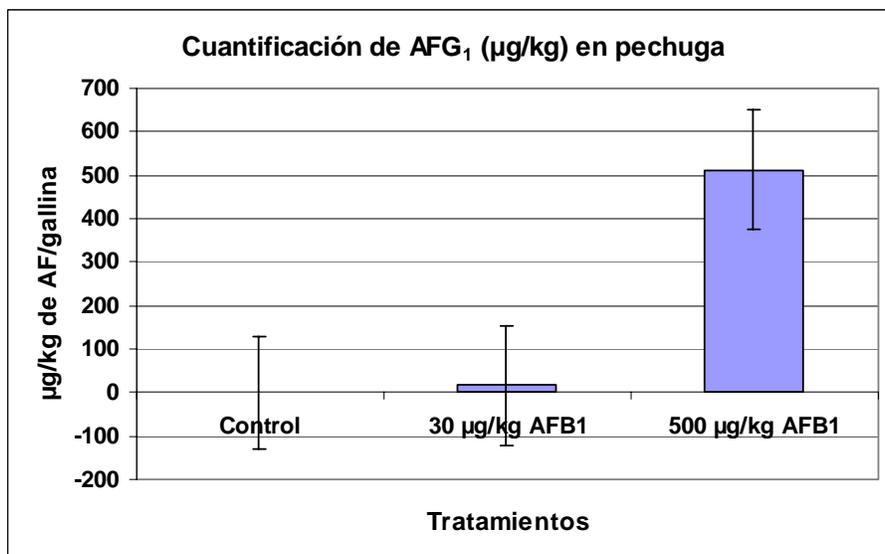
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F experimental	Prob > F
Tratamiento	2	1.623	0.811	1.228	<b>0.3122</b>
Error	22	14.537	0.661		
Total	24	16.160			

(c) Análisis de Presencia/Ausencia vía Cuadro de Contingencia.

Conteo	Muestras por tratamiento	Ausencia		Presencia	
		Nº de muestras	(%)	Nº de muestras	(%)
Control	9	9	100.0	0	<b>0</b>
30 µg/kg AFB <sub>1</sub>	8	7	87.5	1	<b>12.5</b>
500 µg/kg AFB <sub>1</sub>	8	6	75.0	2	<b>25.0</b>
Total	25	22		3	

Prueba de Xi

Modelo	-Logaritmo	Grados de libertad	Xi Cuadrada	Prob>Xi cuadrada
Diferencia	1.660	2	3.32	<b>0.1901</b>
Completo	7.513			
Total	9.173			



Nivel	Media	Desviación Estándar
Control	0	0
30 µg/kg AFB <sub>1</sub>	16.1	277.1
500 µg/kg AFB <sub>1</sub>	512.4	277.1

**Figura 43: Comparación de las mediciones promedio de AFG<sub>1</sub> (µg/kg) encontradas en la pechuga por gallina.**

El análisis estadístico de AFG<sub>2</sub> si dio diferencias muy significativas ( $P < 0.05$ ) entre el grupo Control y tratamientos (30 µg/kg de AFB<sub>1</sub> y 500 µg/kg de AFB<sub>1</sub>) al aplicar el análisis estadístico completo ya mencionado (**Cuadro 35 a y b**) (**Figura 44**). Sin embargo, al aplicar el análisis de presencia/ausencia no se observaron diferencias significativas. Con la prueba de Tukey se observó que hay una diferencia no estadística entre el grupo Control y los tratamientos, pero entre tratamientos no se observa diferencia alguna (**Cuadro 35 c y d**), lo cual se le atribuye a la variabilidad genética de los seres vivos.

**Cuadro 35: Resultados del Análisis Estadístico de la cuantificación de AFG<sub>2</sub> (µg/kg) en pechuga por el método de Qian & Yang (1984).**

(a) ANOVA de la variable original.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F experimental	Prob > F
Tratamiento	2	25195.78	12597.9	31.23	<0.0001*
Error	22	8873.32	403.3		
Total	24	34069.10			

(b) ANOVA de la variable con transformación de Box & Cox.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F experimental	Prob > F
Tratamiento	2	1218.5692	609.285	13.1394	0.0002*
Error	22	1020.1581	46.371		
Total	24	2238.7273			

\* Estadísticamente significativo.

(c) Análisis de Presencia/Ausencia vía Cuadro de Contingencia.

Conteo	Muestras por tratamiento	Ausencia		Presencia	
		Nº de muestras	(%)	Nº de muestras	(%)
Control	9	4	44.4	5	55.6
30 µg/kg AFB <sub>1</sub>	8	1	12.5	7	87.5
500 µg/kg AFB <sub>1</sub>	8	3	37.5	5	62.5
Total	25	8		17	

Prueba de Xi

Modelo	-Logaritmo	Grados de libertad	Xi Cuadrada	Prob>Xi cuadrada
Diferencia	1.182	2	2.37	0.3065
Completo	14.489			
Total	15.672			

(d) Prueba de Tukey

Nivel	Media	Desviación Estándar	Interacciones
Control	1.4	6.7	A
30 µg/kg AFB <sub>1</sub>	71.7	7.1	B
500 µg/kg AFB <sub>1</sub>	6.4	7.1	B

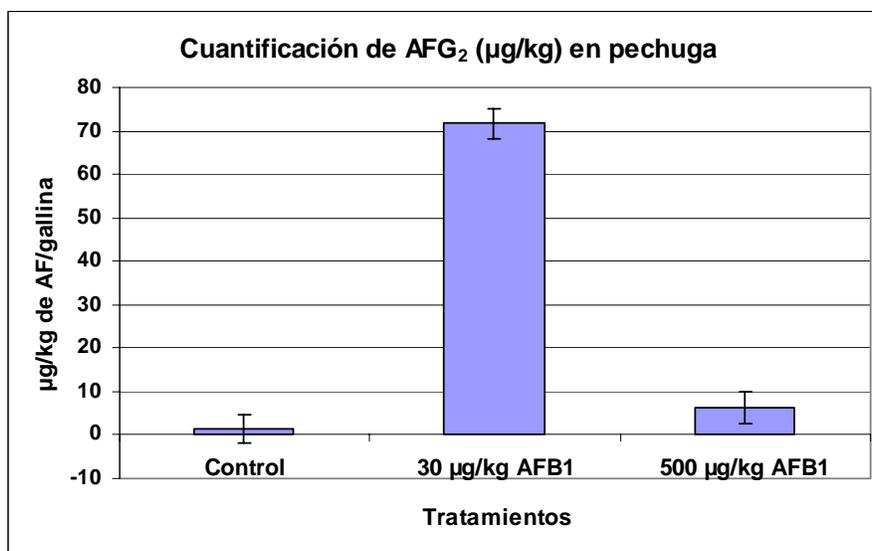


Figura 44: Comparación de las mediciones promedio de AFG<sub>2</sub> (µg/kg) encontradas en la pechuga por gallina.

Para AFM<sub>1</sub>, el análisis estadístico de los valores de cada muestra sin y con transformación de Box & Cox indica una diferencia muy significativa entre el grupo Control y tratamientos (**Cuadro 36 a y b**) (**Figura 45**). Con la prueba de Tukey se observa que el tratamiento de 500 µg/kg de AFB<sub>1</sub> tiene mayor cantidad de AFM<sub>1</sub> que el tratamiento de 30 µg/kg de AFB<sub>1</sub>, pero no son diferentes estadísticamente y el grupo Control es igual a ambos tratamientos (**Cuadro 36 d**).

**Cuadro 36: Resultados del Análisis Estadístico de la cuantificación de AFM<sub>1</sub> (µg/kg) en pechuga por el método de Qian & Yang (1984).**

(a) ANOVA de la variable original.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F experimental	Prob > F
Tratamiento	2	122600609	61300305	9.033	<b>0.0014*</b>
Error	22	149305949	6786634.1		
Total	24	271906559			

(b) ANOVA de la variable con transformación de Box & Cox.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F experimental	Prob > F
Tratamiento	2	13969.83	6984.92	9.035	<b>0.0014*</b>
Error	22	17008.08	773.09		
Total	24	30977.91			

(c) Análisis de Presencia/Ausencia vía Cuadro de Contingencia.

Conteo	Muestras por tratamiento	Ausencia		Presencia	
		Nº de muestras	(%)	Nº de muestras	(%)
Control	9	5	55.6	4	<b>44.4</b>
30 µg/kg AFB <sub>1</sub>	8	8	100	0	<b>0</b>
500 µg/kg AFB <sub>1</sub>	8	2	25.0	6	<b>75.0</b>
Total	25	15		10	

Prueba de Xi

Modelo	-Logaritmo	Grados de libertad	Xi Cuadrada	Prob>Xi cuadrada
Diferencia	6.144	2	12.288	<b>0.0021*</b>
Completo	10.681			
Total	16.825			

\* Estadísticamente significativo.

(d) Prueba de Tukey

Nivel	Media	Desviación Estándar	Interacciones	
Control	51.9	868.4	A	B
30 $\mu\text{g/kg}$ AFB <sub>1</sub>	0	921.04	B	
500 $\mu\text{g/kg}$ AFB <sub>1</sub>	4774.6	921.04	A	

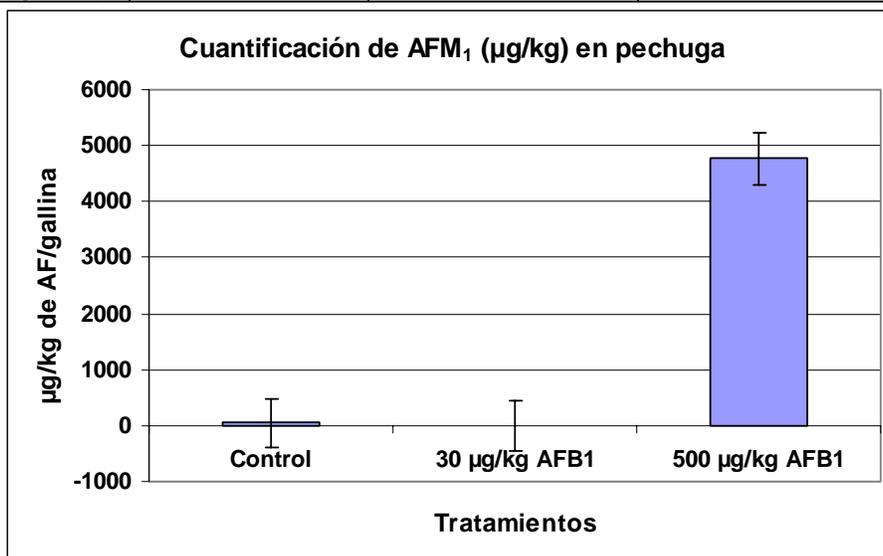


Figura 45: Comparación de las mediciones promedio de AFM<sub>1</sub> ( $\mu\text{g/kg}$ ) encontradas en la pechuga por gallina.

En el ANOVA de los valores originales AFP<sub>1</sub> sí se observan diferencias significativas entre el grupo Control y los otros dos. Al transformar los valores de cada muestra se observó una diferencia muy significativa entre tratamientos al realizar el ANOVA (**Cuadro 37 a y b**) (**Figura 46**). La diferencia radica en que las gallinas tratadas con sorgo contaminado con 500  $\mu\text{g/kg}$  de AFB<sub>1</sub> presentaron la mayor cantidad de AFP<sub>1</sub>, el tratamiento de 30  $\mu\text{g/kg}$  de AFB<sub>1</sub> tuvo una cantidad intermedia y el grupo control presenta la menor cantidad de AFP<sub>1</sub>. En el análisis de presencia/ausencia se muestra que el 100% de las muestras pertenecientes a los tratamientos presentan AFP<sub>1</sub> y el grupo Control sólo presentó el 33.3%. (**Cuadro 37 c**). La prueba de Tukey nos indicó que si existen diferencias significativas entre el grupo Control y los tratamientos (**Cuadro 37 d**).

**Cuadro 37: Resultados del Análisis Estadístico de la cuantificación de AFP<sub>1</sub> ( $\mu\text{g/kg}$ ) en pechuga por el método de Qian & Yang (1984).**

(a) ANOVA de la variable original.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F experimental	Prob > F
Tratamiento	2	1667233.0	833616	5.4624	0.0119 *
Error	22	3357432.5	152611		
Total	24	5024665.5			

(b) ANOVA de la variable con transformación de Box & Cox.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F experimental	Prob > F
Tratamiento	2	173815.5	86907.7	10.13	0.0008 *
Error	22	188702.4	8577.4		
Total	24	362517.9			

(c) Análisis de Presencia/Ausencia vía Cuadro de Contingencia.

Conteo	Muestras por tratamiento	Ausencia		Presencia	
		Nº de muestras	(%)	Nº de muestras	(%)
Control	9	6	66.7	3	33.3
30 µg/kg AFB <sub>1</sub>	8	0	0	8	100.0
500 µg/kg AFB <sub>1</sub>	8	0	0	8	100.0
Total	25	6		19	

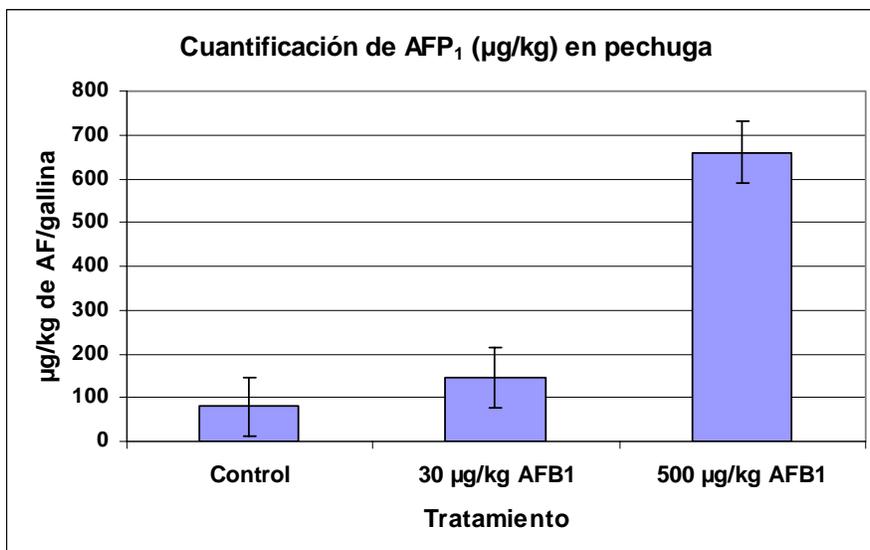
Prueba de Xi

Modelo	-Logaritmo	Grados de libertad	Xi Cuadrada	Prob>Xi cuadrada
Diferencia	8.048	2	16.097	0.0003*
Completo	5.729			
Total	13.777			

\* Estadísticamente significativo.

(d) Prueba de Tukey

Nivel	Media	Desviación Estándar	Interacciones
Control	78.9	130.2	B
30 µg/kg AFB <sub>1</sub>	145.0	138.1	A
500 µg/kg AFB <sub>1</sub>	660.5	138.1	A



**Figura 46: Comparación de las mediciones promedio de AFP<sub>1</sub> (µg/kg) encontradas en la pechuga por gallina.**

En el análisis estadístico de AFL, no se observan diferencias significativas entre el grupo Control y tratamientos (30 µg/kg y 500 µg/kg de AFB<sub>1</sub>) al aplicar el ANOVA a los valores originales ni cuando se ha hecho la transformación de Box & Cox (**Cuadro 38**) (**Figura 47**).

**Cuadro 38: Resultado del Análisis Estadístico de la cuantificación de AFL (µg/kg) en pechuga por el método de Qian & Yang (1984).**

(a) ANOVA de la variable original.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F experimental	Prob > F
Tratamiento	2	127.304	63.652	1.438	<b>0.2587</b>
Error	22	973.479	44.249		
Total	24	1100.783			

(b) ANOVA de la variable con transformación de Box & Cox.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F experimental	Prob > F
Tratamiento	2	0.104	0.052	2.493	<b>0.1057</b>
Error	22	0.456	0.021		
Total	24	0.559			

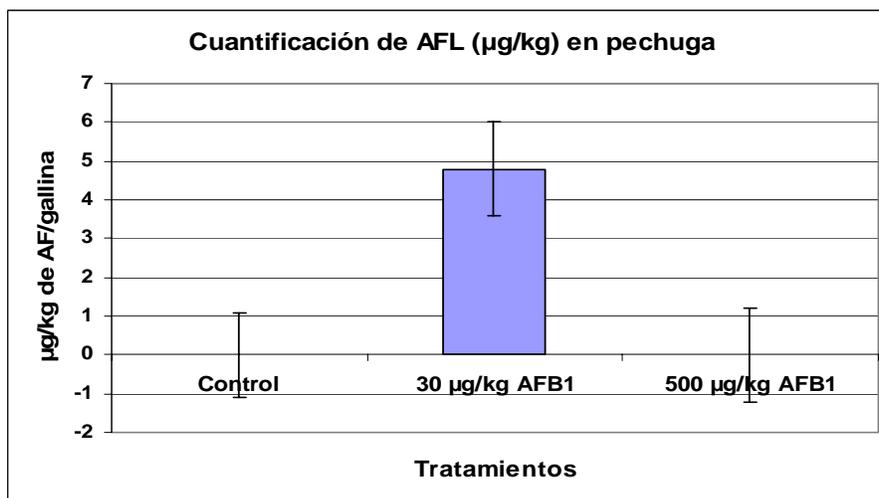
(c) **Análisis de Presencia/Ausencia vía Cuadro de Contingencia.**

Cuento	Muestras por tratamiento	Ausencia		Presencia	
		Nº de muestras	(%)	Nº de muestras	(%)
Control	9	9	100.0	0	0
30 µg/kg AFB <sub>1</sub>	8	6	75.0	2	25.0
500 µg/kg AFB <sub>1</sub>	8	8	100.0	0	0
Total	25	23		2	

**Prueba de Xi**

Modelo	-Logaritmo	Grados de libertad	Xi Cuadrada	Prob>Xi cuadrada
Diferencia	2.471	2	4.94	0.0845
Completo	4.499			
Total	6.969			

Nivel	Media	Desviación Estándar
Control	0	2.2
30 µg/kg AFB <sub>1</sub>	4.8	2.4
500 µg/kg AFB <sub>1</sub>	0	2.4



**Figura 47: Comparación de las mediciones promedio de AFL (µg/kg) encontradas en la pechuga por gallina.**

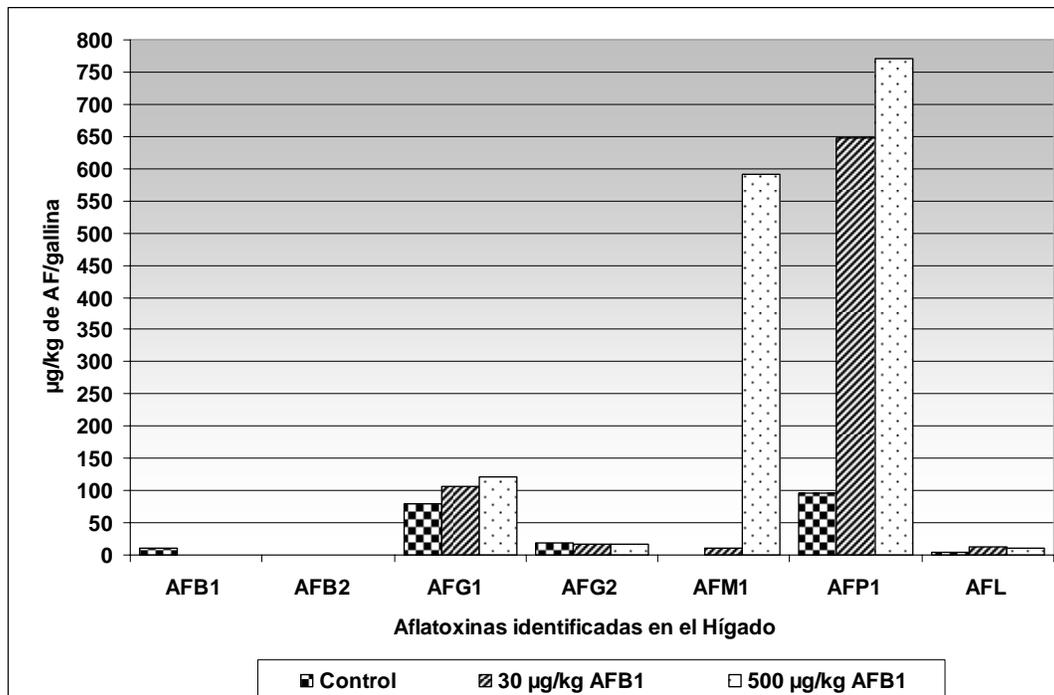
En la **Figura 48** se observan las cantidades promedio de cada AF encontrada por gallina, en los hígados del grupo Control y en los tratamientos. En cuanto a la cuantificación de AFB<sub>1</sub>, se observa mayor acumulación en el grupo Control, mientras en los tratamientos de 30 µg/kg y 500 µg/kg de AFB<sub>1</sub>, la cantidad detectada fue menor. Cabe recordar, que las gallinas utilizadas en este experimento eran de casi tres años de edad, por lo que habían acumulado AF durante su vida. Por ello en el grupo Control se identificó AFB<sub>1</sub>, pero era de

esperarse que también se encontrara esta toxina en los tratamientos de 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de  $\text{AFB}_1$ . La explicación está ligada con la activación del complejo enzimático del citocromo  $\text{P}_{450}$  (Yip & Coulombe, 2006).

Para que el citocromo  $\text{P}_{450}$  empiece a degradar a las AF, necesita una cantidad suficiente de ellas, la cual estimule su activación, es decir, se presente la expresión de los genes que serán traducidos a enzimas necesarias para la biotransformación. Por lo que la cantidad acumulada y encontrada de  $\text{AFB}_1$ , en los hígados del grupo Control, no fue suficiente para que en las gallinas se diera expresión de esos genes, ni la activación del citocromo  $\text{P}_{450}$  para que se biotransformara a metabolitos hidrolizados.

En las gallinas pertenecientes a los tratamientos de 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de  $\text{AFB}_1$ , sí se metabolizó la  $\text{AFB}_1$  a  $\text{AFM}_1$ ,  $\text{AFP}_1$  y  $\text{AFL}$ . La suma de la  $\text{AFB}_1$  acumulada antes del experimento más la cantidad de la  $\text{AFB}_1$  administrada durante la fase experimental (30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de  $\text{AFB}_1$ ), alcanzaron la cantidad requerida para promover la expresión de los genes del citocromo  $\text{P}_{450}$  para su biotransformación, por ello no hubo  $\text{AFB}_1$  detectada en los hígados de estos tratamientos, sin embargo, nótese que existen cantidades muy altas de  $\text{AFM}_1$  y  $\text{AFP}_1$  en este tejido. Las gallinas del tratamiento de 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de  $\text{AFB}_1$ , biotransformaron la mayor cantidad de  $\text{AFB}_1$  a  $\text{AFP}_1$ , y poca cantidad de  $\text{AFM}_1$  y  $\text{AFL}$ , mientras las gallinas del tratamiento de 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de  $\text{AFB}_1$ , biotransformaron toda la  $\text{AFB}_1$  a cantidades elevadas de  $\text{AFM}_1$  y  $\text{AFP}_1$ , y a una cantidad pequeña de  $\text{AFL}$ .

En la biotransformación de la  $\text{AFB}_1$  en los mamíferos no se obtienen  $\text{AFG}_1$  y  $\text{AFG}_2$ , su presencia se atribuye a la contaminación del alimento que habían consumido a lo largo de su vida antes de este experimento, por ello la detección y cuantificación de estas toxinas es notable, cuando no debieron encontrarse.



**Figura 48:** Cantidades promedio de las aflatoxinas identificadas en hígados del grupo Control y los tratamientos de 30 y 500 µg/kg de AFB<sub>1</sub>.

En la **Figura 49** se observan las cantidades promedio de cada AF encontrada por gallina, en las mollejas del grupo Control y en los tratamientos. En la molleja sólo se identificaron AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub> y AFL. La presencia del AFL proviene de la biotransformación de la AFB<sub>1</sub>. La acumulación del AFL en los hígados de los tres tratamientos es baja en comparación con las mollejas (**Figura 48 y 49**).

Las mollejas del grupo Control acumularon más AFL que las mollejas del tratamiento de 30 µg/kg de AFB<sub>1</sub>. Las mollejas del tratamiento de 500 µg/kg de AFB<sub>1</sub>, presentaron la mayor cantidad de los tres tratamientos. El que se haya encontrado AFB<sub>1</sub> en los hígados y AFL en las mollejas del grupo Control se da porque la AFB<sub>1</sub> y el AFL son interconvertibles, encontrar ambas AF indica igual riesgo para la salud ya que presentan una toxicidad parecida.

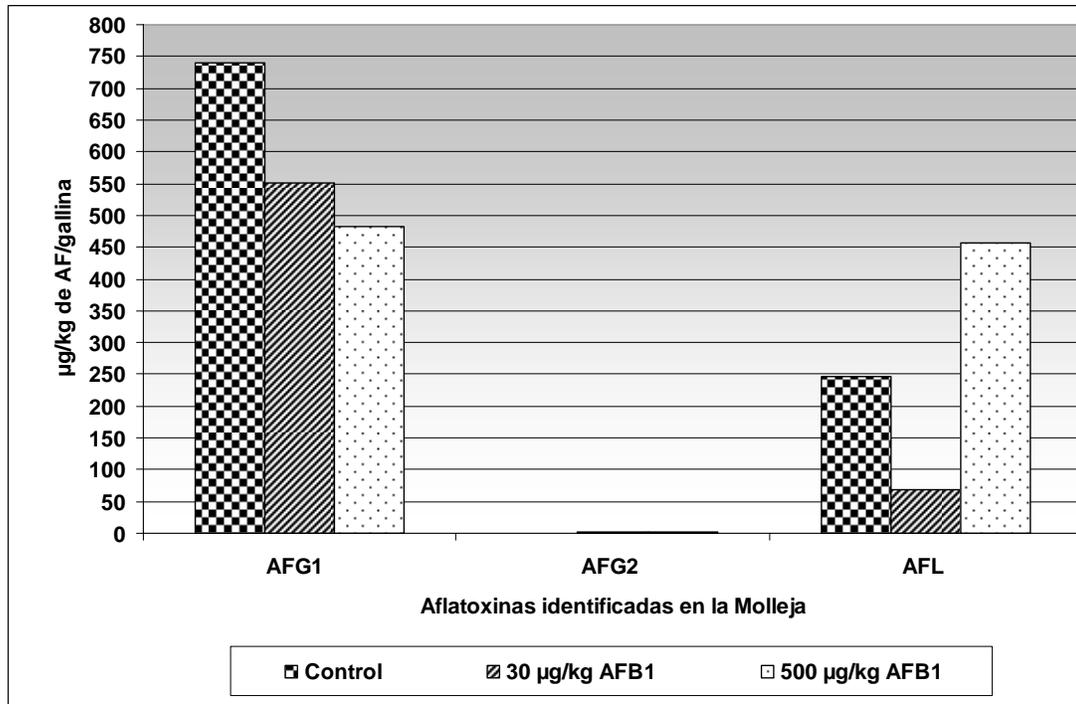
Las mollejas del tratamiento de 30 µg/kg de AFB<sub>1</sub>, tuvieron baja acumulación de AFL pero no hubo diferencia significativa al compararlo con el control y el tratamiento de 500 µg/kg de AFB<sub>1</sub>. En la **Figura 48** se observa que los hígados del tratamiento de 30 µg/kg tuvieron mayor cantidad de AFL que el control y el tratamiento de 500 µg/kg. Las mollejas del tratamiento de 500 µg/kg

de AFB<sub>1</sub>, acumularon la mayor cantidad de AFL, pero en el hígado, este tratamiento tuvo menor cantidad de AFL que en el tratamiento de 30 µg/kg. Lo anterior indica que este tejido es el que acumula mayor cantidad de AFL, más cuando la cantidad de AFB<sub>1</sub> administrada es alta (500 µg/kg), aunque la biotransformación se presente en el hígado.

Las mollejas de los tres tratamientos, acumularon una cantidad elevada de AFG<sub>1</sub>. La molleja es el primer órgano a donde el alimento llega, la presencia de la AFG<sub>1</sub> y AFG<sub>2</sub> se debe a la contaminación que ya trae el alimento de origen sin metabolismo de los mismos; los músculos principales de la molleja, muelen y reducen de tamaño al alimento para que pueda pasar al tubo intestinal. Probablemente, la actividad rítmica de la molleja, permite que el alimento libere a la AFG<sub>1</sub> y la AFG<sub>2</sub>, las cuales son absorbidas y acumuladas por los músculos. Por eso éste es el tejido con mayor acumulación de de AFG<sub>1</sub> y AFG<sub>2</sub>, en comparación con el hígado y la pechuga.

En cuanto a la cantidad de AFG<sub>1</sub> acumulada por las mollejas, el grupo Control tuvo mayor acumulación, le siguieron las mollejas del tratamiento de 30 µg/kg de AFB<sub>1</sub> y las mollejas del tratamiento de 500 µg/kg tuvieron la menor acumulación. Estos datos indican el comportamiento en el consumo del alimento por las gallinas. Uno de los síntomas que presentan las gallinas cuando son contaminadas con AF, es la disminución en el consumo del alimento, lo que conlleva a la disminución de su peso y baja productividad de carne.

Así, las gallinas del grupo control, que consumieron alimento contaminado con AF, pero no con cantidades elevadas de AFB<sub>1</sub> como las gallinas de los tratamientos; no declinaron su consumo de alimento y por eso tuvieron mayor cantidad de AFG<sub>1</sub> en la molleja. Mientras las gallinas que comieron alimento contaminado con 30 µg/kg y 500 µg/kg de AFB<sub>1</sub>, bajaron su consumo de alimento y la acumulación de AFG<sub>1</sub>. De esa manera, las gallinas del tratamiento de 500 µg/kg de AFB<sub>1</sub> presentaron menor acumulación de AFG<sub>1</sub>. El suministrar concentraciones de 30 y 500 µg/kg de AFB<sub>1</sub> agravó los daños que las gallinas ya presentaban por el consumo de alimento contaminado con AF durante su vida.



**Figura 49: Cantidades promedio de las aflatoxinas identificadas en las mollejas del grupo Control y los tratamientos de 30 y 500 µg/kg de AFB<sub>1</sub>.**

En la **Figura 50** se observan las cantidades promedio de cada AF encontrada por gallina, en las pechugas del grupo Control y en los tratamientos. En la pechuga se identificaron a AFB<sub>1</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, AFM<sub>1</sub>, AFP<sub>1</sub> y AFL.

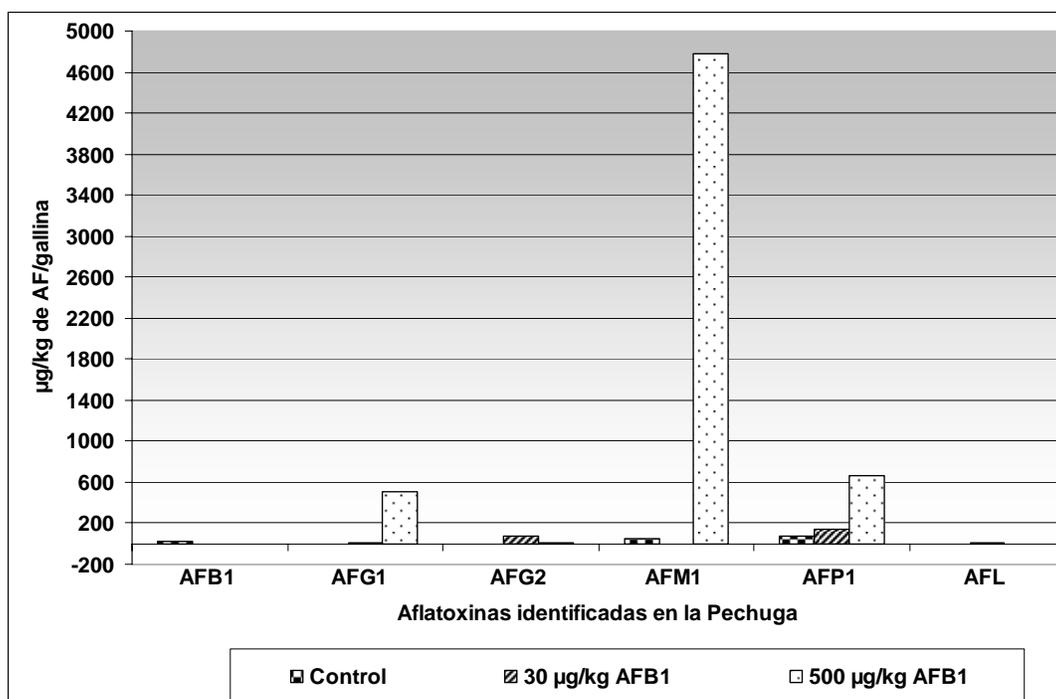
En las pechugas del grupo Control hubo presencia de AFB<sub>1</sub>. La cantidad acumulada de AFB<sub>1</sub> en el hígado y pechuga, no fue la suficiente para activar el citocromo P<sub>450</sub> e iniciar la biotransformación. Las pechugas de los tratamientos no presentan acumulación de AFB<sub>1</sub>, pero sí gran cantidad de AFP<sub>1</sub> y AFM<sub>1</sub>.

Las pechugas del tratamiento de 30 µg/kg de AFB<sub>1</sub> no presentaron AFM<sub>1</sub>, sin embargo en la **Figura 48** se observa que los hígados del mismo tratamiento acumularon cantidades altas de AFP<sub>1</sub>. Es decir, la AFB<sub>1</sub> consumida por las gallinas del tratamiento de 30 µg/kg de AFB<sub>1</sub>, biotransformaron esta toxina en su mayoría a AFP<sub>1</sub>, la cual fue acumulada por el hígado.

Las pechugas del tratamiento de 500 µg/kg de AFB<sub>1</sub> tuvieron la mayor cantidad de AFM<sub>1</sub>. Al parecer, la biotransformación de cantidades altas de AFB<sub>1</sub> origina cantidades elevadas de AFM<sub>1</sub>, ya que esta toxina fue identificada

en los hígados del tratamiento de 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de  $\text{AFB}_1$  (591.8  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) y en las pechugas del mismo tratamiento (4774.6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), siendo el último tejido el que mayor acumulación tuvo.

Las pechugas e hígados del tratamiento de 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de  $\text{AFB}_1$  presentaron cantidades altas de  $\text{AFP}_1$ . El organismo biotransforma a la  $\text{AFB}_1$  a  $\text{AFP}_1$ , porque ésta última al ser más soluble en agua, se excreta con mayor facilidad por medio de la orina y la bilis (Orellana & Guajardo, 2004).



**Figura 50: Cantidades promedio de las aflatoxinas identificadas en las pechugas del grupo Control y los tratamientos de 30 y 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de  $\text{AFB}_1$ .**

Debido a que ambas columnas LC-18 utilizadas en el análisis de los tejidos con el método de Qian & Yang (1984), están compuestas de igual fase sólida y se utilizan bajo las mismas condiciones, se optó por hacer las modificaciones al método de Qian & Yang (1984) para comprobar que ambas segundas columnas LC-18 retenían AF.

La mayoría de las AF identificadas en los hígados, mollejas y pechugas de los tres tratamientos, fueron retenidas en la segunda columna LC-18 como indica el método de Qian & Yang (1984), a excepción de  $\text{AFG}_1$ , que fue retenida en mayor cantidad por la primera columna LC-18. Sin embargo, cantidades

pequeñas de AF también fueron cuantificadas es la primera columna. Lo que indica que es correcta la modificación realizada al método.

No hubo un comportamiento similar en la capacidad de retención de las columnas LC-18 para cada AF presente, ni un patrón de cantidades que se siguiera en el hígado, molleja y pechuga. Aunque la segunda columna haya retenido la mayor cantidad de AF encontrada, la primera columna tiene trazas o cantidades de 20 µg/kg a 100 µg/kg, es decir, en el análisis de cada tejido varía la capacidad de retención de la primera columna. Puede retener poca AF en una muestra, mientras en otra que pertenece al mismo tejido y tratamiento, retiene mucha AF. Lo anterior, se atribuye a que las AF se distribuyen en forma heterogénea, focal y no en forma homogénea, estos datos sirven para la valoración de la técnica ó método. Ya que para tejido o matriz analizada debe realizarse una valoración.

Las columnas LC-18 retienen componentes de media y baja polaridad. De ahí, que en el método de Qian & Yang (1984) se utilicen dos columnas LC-18. La primera tiene la función de retener cualquier compuesto de baja polaridad (como la grasa) y dejar pasar compuestos de media polaridad, como las AF, para su retención en la segunda columna. En este experimento se llevó a cabo la valoración del método de Qian & Yang (1984) de igual manera para los tres tejidos. Por la morfofisiología de cada tejido debió hacerse por separado, de acuerdo a las diferencias en la cantidad de grasa contenida en cada tejido, y esto es un factor importante para la capacidad de retención de ambas columnas LC-18. El hígado tiene mayor contenido de grasa, le sigue la pechuga y al final la molleja. Por lo tanto, las diferencias en la capacidad de retención de la primera columna, está dada por la composición de la matriz.

#### **IV.3.5. Cuantificación de aflatoxinas en los tejidos de gallina del experimento con método de Koeltzow & Tanner (1990).**

El método químico de Koeltzow & Tanner, 1990, con columnas de inmovilización para la concentración y purificación de AF, no recuperó las cantidades de AF esperadas en los tres tejidos (hígado, molleja y pechuga). La cantidad de AF debió estar dentro del rango de 30 µg/kg a 500 µg/kg ya que

esas fueron las concentraciones administradas a las gallinas por el sorgo contaminado.

**a.1. Resultados de la cuantificación de aflatoxinas ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) de los hígados de gallina del experimento con el método de Koeltzow & Tanner (1990).**

En el **Cuadro 39**, se muestra la cuantificación total y el tipo de AF encontradas en los hígados de gallina analizados por el método de Koeltzow & Tanner (1990), de las muestras correspondientes al control y los 2 tratamientos (con adición de 30 ó de 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Las AFG<sub>2</sub>, AFM<sub>1</sub> y AFP<sub>1</sub> se encontraron en el grupo control.

**Cuadro 39: Resultados de la cuantificación de aflatoxinas ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) en hígado de gallinas del experimento por el método de Koeltzow & Tanner (1990).**

Gallinas	Cantidad ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) de AF en hígado de gallina								
	Control	AFB <sub>1</sub>	AFB <sub>2</sub>	AFG <sub>1</sub>	AFG <sub>2</sub>	AFM <sub>1</sub>	AFM <sub>2</sub>	AFP <sub>1</sub>	AFL
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	2.6	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	2.8	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	5.6	-	-	-	-
Suma					11.0				
$\bar{X}$ AF/gallina					1.2				
<b>Tratamiento: gallinas alimentadas con sorgo contaminado con 30 <math>\mu\text{g}/\text{kg}</math> AFB<sub>1</sub></b>									
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	0.2	-	-	-	-
3	-	-	-	-	0.4	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	18.0	0.4	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	1064.2	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	1.2	-	-	-	-
Suma				18.0	2.2			1064.2	
$\bar{X}$ AF/gallina				2.3	0.3			133.0	
<b>Tratamiento: gallinas alimentadas con sorgo contaminado con 500 <math>\mu\text{g}/\text{kg}</math> AFB<sub>1</sub></b>									
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	141.2	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	5.3	-	-	-	-

5	-	-	4.3	-	6916.5	-	-	-
6	-	-	9.1	-	-	-	3113.0	-
7	-	-	5.5	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	516.8	-	-	-
<b>Suma</b>			<b>160.1</b>	<b>5.3</b>	<b>7433.3</b>		<b>3113.0</b>	
$\bar{x}$ AF/gallina			<b>20.0</b>	<b>0.7</b>	<b>929.2</b>		<b>389.1</b>	

■ = Análisis realizado igual a no detectable.

En las muestras adicionadas con 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de  $\text{AFB}_1$ , se detectaron  $\text{AFG}_1$ ,  $\text{AFG}_2$ , y  $\text{AFP}_1$ . Mientras que en las muestras adicionadas con 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de  $\text{AFB}_1$ , se identificaron  $\text{AFG}_1$  y  $\text{AFG}_2$ . Las toxinas con mayor concentración o acumulación en los hígados correspondientes al tratamiento de adición con 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  fue  $\text{AFP}_1$  y para el tratamiento con adición de 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  fue  $\text{AFG}_1$  (**Cuadro 39**).

#### a. 2. Resultados del Análisis Estadístico de los hígados de gallina con el método de Koeltzow & Tanner (1990).

Se realizó un análisis estadístico para conocer las diferencias significativas que existen entre los tratamientos con relación a las AF encontradas en el hígado. Las pruebas se realizaron con un análisis de varianza de dos factores así como una transformación de Box & Cox a los valores de cada tratamiento para conocer las diferencias significativas entre ellos. Cuando el número de valores presentes eran pocos se efectuó un análisis de presencia o ausencia, vía Cuadro de Contingencia.

Cuando se hizo el análisis de varianza en los valores de  $\text{AFG}_1$  no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos, por ello se aplicó una prueba no paramétrica de Wilcoxon/Kruskal-Wallis sobre los valores (**Cuadro 40**), donde se observa una diferencia marginalmente significativa de 0.054.

#### **Cuadro 40: Prueba no paramétrica de Wilcoxon / Kruskal-Wallis para conocer las diferencias significativas entre los valores del grupo Control y los tratamientos de $\text{AFG}_1$ .**

Nivel	Cantidad	Suma de cuadrados	Cuadrados Medios	Desviación Estándar
Control	9	80.0	10.0	-1.6
30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ $\text{AFB}_1$	8	93.0	11.6	-0.5
500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ $\text{AFB}_1$	8	127.0	15.8	2.2

### Prueba de aproximación a Xi cuadrada

Xi cuadrada	Grados de libertad	Prob>Xi cuadrada
5.8392	2	<b>0.0540</b>

Para analizar la AFG<sub>1</sub>, también se aplicó el análisis de presencia o ausencia, vía Cuadro de contingencia, la cual arrojó una diferencia significativa de 0.0375 como se observa en el **Cuadro 41**, donde el tratamiento de 500 µg/kg AFB<sub>1</sub> tiene el 50 % de presencia de AFG<sub>1</sub> en las muestras, el tratamiento de 30 µg/kg tiene el 12.5 % y el grupo control tiene 0%.

**Cuadro 41: Resultados del análisis de presencia o ausencia, vía Cuadro de Contingencia de AFG<sub>1</sub>.**

Conteo	Muestras por tratamiento	Ausencia		Presencia	
		Nº de muestras	(%)	Nº de muestras	(%)
30 µg/kg AFB <sub>1</sub>	8	7	87.5	1	12.5
500 µg/kg AFB <sub>1</sub>	8	4	50	4	50
Control	9	9	100	0	0
<b>Total</b>	25	20		5	

### Prueba de Xi

Fuente de Variación	Grados de libertad	-Logaritmo	R cuadrada
Modelo	2	3.722423	0.3031
Error	21	8.559339	
Total	23	12.281762	
Nº de muestras	25		

Prueba	Xi Cuadrada	Prob>Xi cuadrada
Indice de probabilidad	7.445	0.0242
Pearson	6.568	<b>0.0375</b>

**Cuadro 42: Resultados del Análisis Estadístico de la AFG<sub>2</sub> (µg/kg) de mollejas de las gallinas por el método de Koeltzow & Tanner (1990).**

#### (a) Análisis de Varianza

Fuentes de Variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados medios	F experimental	Prob > F
Tratamiento	2	4.980833	2.49042	0.9239	<b>0.4125</b>
Error	21	56.608750	2.69565		
Total	23	61.589583			

#### (b) Análisis de presencia o ausencia, vía Cuadro de Contingencia.

Conteo	Muestras por tratamiento	Ausencia		Presencia	
		Nº de muestras	(%)	Nº de muestras	(%)
30 µg/kg AFB <sub>1</sub>	8	4	50	4	50
500 µg/kg AFB <sub>1</sub>	8	7	87.5	1	12.5
Control	9	6	66.6	3	33.3



Tratamiento: gallinas alimentadas con sorgo contaminado con 30 µg/kg AFB <sub>1</sub>								
1	1.9	-	-	1.03	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-
3	5.6	-	-	-	-	-	-	-
4	8.9	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-
8	3.2	-	-	-	-	-	-	-
Tratamiento: gallinas alimentadas con sorgo contaminado con 500 µg/kg AFB <sub>1</sub>								
1	-	-	-	3.6	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-
3	15.25	-	4.4	0.43	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-
5	37.5	-	132.7	-	-	-	-	-
6	-	-	-	0.8	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-
8	4.82	-	-	0.9	-	-	-	-

■ = Análisis realizado igual a no detectable.

AFB<sub>1</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub> y AFP<sub>1</sub> corresponden a las AF encontradas en el grupo control. En las muestras adicionadas con 30 µg/kg de AFB<sub>1</sub>, se detectaron AFB<sub>1</sub> y AFG<sub>2</sub>. Mientras que en las muestras adicionadas con 500 µg/kg de AFB<sub>1</sub>, se identificaron AFB<sub>1</sub>, AFG<sub>1</sub> y AFG<sub>2</sub>. Las toxinas con mayor concentración o acumulación en las mollejas fueron las correspondientes al tratamiento de adición con 30 µg/kg fue AFB<sub>1</sub> y para el tratamiento con adición de 500 µg/kg fueron AFB<sub>1</sub> y AFG<sub>1</sub>. Asimismo, el grupo control de las mollejas presentó mayor acumulación de AFG<sub>1</sub> (**Cuadro 43**).

## **b.2. Resultados del Análisis Estadístico de las mollejas de gallina con método de Koeltzow & Tanner (1990).**

De las AF encontradas en las mollejas del grupo control y de los tratamientos de 30 y 500 µg/kg AFB<sub>1</sub>, se llevó a cabo el análisis estadístico en AFB<sub>1</sub>, AFG<sub>1</sub> y AFG<sub>2</sub> para conocer las diferencias significativas existentes entre tratamientos. Sin embargo, el análisis de varianza y la prueba no paramétrica de Wilcoxon/Kruskal-Wallis de los valores de AFB<sub>1</sub> no arrojaron diferencias significativas entre tratamientos para cada AF, el análisis de presencia o ausencia, vía Cuadro de contingencia tampoco permite ver una diferencia significativa entre tratamientos (**Cuadro 44**).

**Cuadro 44: Resultados del Análisis Estadístico de la AFB<sub>1</sub> (µg/kg) de mollejas de gallinas por el método de Koeltzow & Tanner (1990).**

**(a) Análisis de Varianza**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F experimental	Prob > F
Tratamiento	2	142.7508	71.3754	1.0740	<b>0.3597</b>
Error	21	1395.6087	66.4576		
C. Total	23	1538.3596			

**(b) Análisis de presencia o ausencia, vía Cuadro de Contingencia.**

Conteo	Muestras por tratamiento	Ausencia		Presencia	
		Nº de muestras	(%)	Nº de muestras	(%)
30 µg/kg AFB <sub>1</sub>	8	4	50	4	<b>50</b>
500 µg/kg AFB <sub>1</sub>	8	5	62.5	3	<b>37.5</b>
Control	9	7	77.8	2	<b>22.2</b>
Total	25	16		9	

**Prueba de Xi**

Fuentes de Variación	Grados de libertad	-Logaritmo	R cuadrada (U)
Modelo	2	0.541153	0.0341
Error	21	15.336365	
Total	23	15.877518	

Prueba	Xi cuadrada	Prob>Xi cuadrada
Índice de probabilidad	1.082	0.5821
Porcentaje	1.067	<b>0.5866</b>

El análisis de varianza y la prueba no paramétrica de Wilcoxon/Kruskal-Wallis de los valores de AFG<sub>1</sub> no arrojaron diferencias significativas entre tratamientos para cada AF, el análisis de presencia o ausencia, vía Cuadro de contingencia tampoco permite ver una diferencia significativa entre tratamientos (Cuadro 45).

**Cuadro 45: Resultados del Análisis Estadístico de la AFG<sub>1</sub> (µg/kg) de mollejas de gallinas por el método de Koeltzow & Tanner, 1990.**

**(a) Análisis de Varianza**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F experimental	Prob > F
Tratamiento	2	1185.511	592.755	0.7758	<b>0.4731</b>
Error	21	16044.459	764.022		
C. Total	23	17229.970			

**(b) Análisis de presencia o ausencia, vía Cuadro de Contingencia.**

Conteo	Muestras por tratamiento	Ausencia		Presencia	
		Nº de muestras	(%)	Nº de muestras	(%)
30 µg/kg AFB <sub>1</sub>	8	8	100	0	0
500 µg/kg AFB <sub>1</sub>	8	6	75	2	25
Control	9	6	66.6	3	33.3
Total	25	20		5	

#### Prueba de Xi

Fuente de variación	Grados de libertad	-Logaritmo	R cuadrada (U)
Modelo	2	2.490575	0.2028
Error	21	9.791187	
Total	23	12.281762	
N	25		

Prueba	Xi cuadrada	Prob>Xi cuadrada
Índice de probabilidad	4.981	0.0829
Pearson	3.537	0.1706

El análisis de varianza y la prueba no paramétrica de Wilcoxon/Kruskal-Wallis de los valores de AFG<sub>2</sub> no arrojaron diferencias significativas entre tratamientos para cada AF, el análisis de presencia o ausencia, vía Cuadro de contingencia tampoco permite ver una diferencia significativa entre tratamientos (**Cuadro 46**).

**Cuadro 46: Resultados del Análisis Estadístico de la AFG<sub>2</sub> (µg/kg) de mollejas de gallinas por el método de Koeltzow & Tanner (1990).**

(a) **Análisis de Varianza.**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F experimental	Prob > F
Tratamiento	2	1.477408	0.738704	0.8968	0.4229
Error	21	17.298288	0.823728		
C. Total	23	18.775696			

(b) **Análisis de presencia o ausencia, vía Cuadro de Contingencia.**

Conteo	Muestras por tratamiento	Ausencia		Presencia	
		Nº de muestras	(%)	Nº de muestras	(%)
30 µg/kg AFB <sub>1</sub>	8	7	87.5	1	12.5
500 µg/kg AFB <sub>1</sub>	8	4	50	4	50
Control	9	8	88.9	1	11.1
Total	25	19		6	

#### Prueba de Xi

Fuentes de variación	Grados de libertad	-Logaritmo	R cuadrada (U)
Modelo	2	1.922543	0.1425



3	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-

- = Análisis realizado igual a no detectable.

En las muestras adicionadas con 30 µg/kg de AFB<sub>1</sub>, se detectaron AFB<sub>1</sub>, AFG<sub>1</sub> y AFG<sub>2</sub>. Mientras que en las muestras adicionadas con 500 µg/kg de AFB<sub>1</sub>, no se identificó ninguna AF.

Los tratamientos que presentaron mayor concentración de AF fueron:

a) las pechugas adicionadas con 30 µg/kg, con más AFG<sub>1</sub>, y b) con adición de 500 µg/kg hubo más AFB<sub>1</sub>. En esta cuantificación de AF en pechuga no se llevó a cabo análisis estadístico pues casi no hubo datos para cada tratamiento.

Las pérdidas económicas por la contaminación con micotoxinas de alimentos dirigidos al hombre y animales son muy grandes. Los cultivos muy contaminados por micotoxinas frecuentemente tienen que ser destruidos. Pero la mayoría de las veces, los cultivos contaminados son dirigidos como alimento para los animales. Los animales que consumen alimento contaminado con micotoxinas, principalmente AFB<sub>1</sub>, son productores de carne y otros productos derivados (leche, huevo, aceites, etc.) destinados a la alimentación humana, estos alimentos contienen residuos de AF y de metabolitos hidrolizados productos de la biotransformación de las micotoxinas (Bennett & Klich, 2003).

La cantidad de residuos de AF que es transportada del alimento a los tejidos animales se expresa como un índice de n: 1, donde n es la concentración de AFB<sub>1</sub> que se necesita en el alimento para recuperar la concentración de una unidad de AFB<sub>1</sub> residual y/o sus metabolitos en productos comestibles (Oliveira *et al.*, 2003). Se han encontrado residuos de AFB<sub>1</sub> en productos comestibles de origen animal, dirigidos a consumo humano, como es el caso del hígado y huevo (Park & Pohland, 1986).

La AFB<sub>1</sub> es considerada como el más potente cancerígeno conocido (Squire, 1981). Sin embargo, existen las demás AF (AFB<sub>2</sub>, AFM<sub>1</sub>, AFM<sub>2</sub>, AFP<sub>1</sub> y AFL) que también han sido descritas, especialmente como productos de la biotransformación de AFB<sub>1</sub> en mamíferos y conocidos como metabolitos hidrolizados (Bennett & Klich, 2003). Estudios epidemiológicos han presentado

una fuerte correlación entre la incidencia de cáncer de hígado en humanos y animales, y el consumo de maíz contaminado con AF. Es conveniente aclarar que los efectos de las AF son potenciadas por la hepatitis B (Henry *et al.*, 1999).

La aflatoxicosis es una causa de grandes pérdidas económicas en la producción de pollos y gallinas. En el presente estudio encontramos altos niveles de contaminación por AF en las gallinas control y esto ya fue reportado antes por Micco *et al.* (1988) quienes señalan que pequeñas cantidades de AFB<sub>1</sub> y sus metabolitos pueden ser encontrados en varios tejidos comestibles de gallinas. Tedesco *et al.* (2004) indican que la contaminación de AF en aves representa un gran riesgo para la salud pública, por el alto consumo de animales contaminados.

Las pérdidas en la producción de carne en las gallinas son atribuidas al tejido muscular dañado por la contaminación de AFB<sub>1</sub>, resultando en enfermedades agudas ó crónicas. Las lesiones patológicas se asocian con aflatoxicosis aguda que incluye necrosis hepatocelular (Wilkinson *et al.*, 2003; Bryden & Cumming, 1980). Tanto en nuestros resultados como en la literatura, el hígado es el primer órgano blanco de las AF, el daño hepático se presenta cuando aves de corral, peces, roedores y primates han consumido alimentos contaminados con AFB<sub>1</sub>. Existen diferencias entre la susceptibilidad de las especies a la contaminación, y la respuesta del organismo contaminado con AFB<sub>1</sub>, es influenciada por la edad, sexo, peso, dieta, exposición a otros agentes infecciosos y a la presencia de otras micotoxinas (Cullen & Newberne, 1994; Eaton & Groopman, 1994). Esto se comprobó al trabajar con gallinas control de dos años de edad que ya habían acumulado grandes cantidades de AF durante su vida, de modo que no hubo una diferencia significativa entre los 3 tratamientos del experimento.

Como parte de esta investigación, se adquirieron en el mercado hígados, pechugas y mollejas para hacer fortificaciones con dosis pequeñas de AFB<sub>1</sub> y obtener el porcentaje de recuperación de la técnica. Sin embargo, después del análisis químico de recuperación de AFB<sub>1</sub>, en los diversos tejidos control se obtuvieron cantidades basales de AFB<sub>1</sub> muy altas. En el hígado del grupo Control se detectó una cantidad basal de 415.1 µg/kg de AFB<sub>1</sub> y en pechugas del grupo Control se encontró una cantidad de 335 µg/kg de AFB<sub>1</sub>, la cantidad

de AFB<sub>1</sub> basal de las mollejas de gallinas del grupo Control fue menor que el hígado o pechuga, con 42.8 µg/kg de AFB<sub>1</sub>.

La susceptibilidad y la respuesta del organismo a la contaminación con AF es mediada por la edad, según Cullen & Newberne (1994) y Eaton & Groopman (1994). Teóricamente, los pollos de engorda, quienes son sacrificados de 5 a 6 meses de edad, deberán tener menos contaminación basal de AF que las gallinas de postura de 2 a 3 años. Sin embargo, las cantidades de AFB<sub>1</sub> basales encontradas en pollos de engorda, son muy altas. Estos datos prueban que la población mexicana está consumiendo cantidades altas de AFB<sub>1</sub> en la carne de pollo de engorda, considerando que existan concentraciones similares en la mayoría.

Las diferencias en susceptibilidad a las AF no han permitido extrapolar los datos de toxicidad de animales a humanos, y las muertes de humanos por toxicidad aguda de AF son menos frecuentes. Algunos humanos adultos pueden estar consumiendo de 2 a 6 mg de AF en un solo día (Krishnamachari *et al.*, 1975). Lo que ha dado paso a calcular que la dosis letal para los adultos es aproximadamente de 10 a 20 mg de AF (Pitt, 2000). Los resultados de esta investigación arrojaron que el consumo de AF por los humanos sí es frecuente, las gallinas utilizadas en esta investigación tenían 121 semanas de edad (dos años 17 semanas) y presentaron una acumulación de AF considerable. El órgano más contaminado fue el hígado como era de esperarse, según lo reportado en la literatura. Le siguió la pechuga, en contaminación por AF, y por último la molleja.

Cuando las gallinas, pollos y demás animales consumen AFB<sub>1</sub>, tienden a inhibirla formando productos menos tóxicos como son los metabolitos hidrolizados (entre ellos la AFM<sub>1</sub> y AFP<sub>1</sub>) como un proceso de destoxicación. Aún así, el organismo corre peligro al acumularlos.

En los hígados de gallina de mi trabajo, se detectaron cantidades de 647.2 µg/kg y 771.3 µg/kg de AFP<sub>1</sub>; 10.3 µg/kg y 591.8 µg/kg de AFM<sub>1</sub> por órgano (**Cuadro 20 a**). En las pechugas hubo cantidades de AF muy elevadas, se encontraron cantidades de 145.0 µg/kg y 660.5 µg/kg de AFP<sub>1</sub> y 51.9 µg/kg y 4774.6 µg/kg de AFM<sub>1</sub> por pechuga (**Cuadro 32 a**). En la molleja, las cantidades encontradas fueron de 740.8 µg/kg, 551.2 µg/kg y 482.3 µg/kg de AFG<sub>1</sub>, y 247.1 µg/kg, 68.5 µg/kg y 456.1 µg/kg de AFL (**Cuadro 28 a**). Todas

las cantidades encontradas en los distintos órganos analizados son muy altas y rebasan por mucho los límites de AF permitidas en la NOM en los alimentos destinados para consumo humano que es de 20 µg/kg. Es interesante señalar que el AFL es interconvertible con la AFB<sub>1</sub>, es decir se pueden transformar uno en la otra y viceversa, de modo que el encontrar cantidades altas de AFL es un claro indicio de peligro para la salud.

Para probar qué tan peligrosos son los metabolitos hidrolizados para el hombre y otros mamíferos, es necesario realizar una prueba de genotoxicidad *in vivo*, en un sistema eucariótico como *Drosophila melanogaster*, y extrapolar los daños que sean observados, al hombre. La prueba de genotoxicidad mejor conocida es la Prueba de mutación y recombinación somática (SMART). Esta prueba detecta eventos de mutación e induce la recombinación mitótica cuando el modelo eucariótico es tratado con compuestos genotóxicos, además es posible cuantificar la actividad recombinogénica contra la mutagénica (Spanó & Graf, 1998). Sí se aplica esta prueba con cada uno de los metabolitos biotransformados a partir de AFB<sub>1</sub>, se obtendrá un dato de mayor precisión en cuanto al efecto tóxico a nivel genético y anatómico.

En investigaciones previas realizadas por Bintvihok *et al.* (2002), sobre los residuos de AFB<sub>1</sub> y sus metabolitos hidrolizados en hígado, músculo y huevo de pollos, patos, gallinas de postura y codornices, y las diferencias existentes entre la cantidad acumulada por especie, se observan cantidades de AF mucho menores a las encontradas en la presente investigación. Este estudio fue realizado durante 11 días, en los cuales las aves de 1 día de edad, fueron alimentadas con 3000 µg/kg de AFB<sub>1</sub> y en nuestro estudio se utilizaron gallinas de postura con más de dos años de edad que ya estaban contaminadas, y fueron alimentadas con sorgo contaminado por 8 días. Bintvihok *et al.* (2002) observó que los niveles acumulados de AFB<sub>1</sub> y sus metabolitos en tejidos fueron más altos en codorniz que en las otras aves. Además, la cantidad de AFB<sub>1</sub> fue equivalente a los niveles de los metabolitos hidrolizados acumulados.

En el trabajo de Bintvihok *et al.* (2002), las cantidades de AFB<sub>1</sub> y de los metabolitos hidrolizados fueron más de 10 veces mayores en el hígado que en el músculo de todas las aves estudiadas. En las gallinas de postura observaron acumulación de AF en hígado al 8<sup>o</sup> día del estudio con una concentración de

0.34 ± 0.03 ppb de AFB<sub>1</sub> y de 2.38 ± 0.36 ppb de los metabolitos hidrolizados conjugados; y a los 11 días del estudio, hubo una concentración de 0.13 ± 0.042 ppb de AFB<sub>1</sub> y 1.84 ± 0.08 ppb de metabolitos hidrolizados. En el músculo no observaron acumulación de AF al 8<sup>o</sup> día del estudio, sin embargo sí se detectaron concentraciones de 0.14 ± 0.04 ppb de metabolitos hidrolizados conjugados; y a los 11 días del estudio, tampoco hubo detección de concentración alguna de AFB<sub>1</sub>, pero sí de metabolitos hidrolizados (0.11 ± 0.05 ppb).

En otra investigación (Bintvihok & Kositcharoenkul, 2006), se han encontrado niveles altos de AFB<sub>1</sub> y AFM<sub>1</sub> en hígado, mayores que los encontrados en músculo de gallina. Las gallinas fueron alimentadas con alimento convencional, el cual fue tratado con pequeñas cantidades de AFB<sub>1</sub> (50 y 100 ppb) durante 6 semanas. Los resultados de Bintvihok & Kositcharoenkul (2006), difieren a los encontrados en nuestro estudio, ya que encontramos una cantidad mayor de AFB<sub>1</sub> y AFM<sub>1</sub> en pechuga que en hígado. Las discrepancias obtenidas se deben, a que el diseño experimental es diferente para ambos experimentos. En el nuestro caso, se contaminó sorgo con dosis de 30 µg/kg y 500 µg/kg, que fue administrado durante una semana. Además, cabe mencionar que en el hígado fueron identificadas las AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub> y AFL en cantidades mayores a las encontradas en pechuga. AFG<sub>1</sub> y AFG<sub>2</sub> son toxinas provenientes del alimento que fue administrado a las gallinas antes del experimento.

Encontrar mayores cantidades de AF en el hígado indica que la AFB<sub>1</sub> es biotransformada en este órgano por una enzima asociada al citocromo P<sub>450</sub>, que genera metabolitos hidrolizados como son las AFB<sub>2</sub>, AFM<sub>2</sub> y AFP<sub>1</sub>, a sus intermediarios (8-9 epóxido) (Yip & Coulombe, 2006) y el AFL, que es formado por una enzima citoplásmica NADPH dependiente (Oliveira *et al.*, 2003). Estos metabolitos hidrolizados, formados a partir de la biotransformación de AFB<sub>1</sub>, son acumulados por el hígado y ayudan equilibrar los altos niveles de AFB<sub>1</sub> y AFM<sub>1</sub>, de esa manera disminuye su toxicidad.

Para confirmar que el sistema enzimático del citocromo P<sub>450</sub> degrada la AFB<sub>1</sub> a metabolitos hidrolizados, se debe estimular al citocromo P<sub>450</sub> *in vitro* con alguna sustancia tóxica, como el fenobarbital (Chilo, 1999). Si se colocan mitocondrias y microsomas en un tubo de ensayo bajo condiciones ambientales

y experimentales favorables para la activación y funcionamiento citocromo P<sub>450</sub>, éste se estimula con fenobarbital (droga hepatotóxica). Una vez que el citocromo P<sub>450</sub> esté activado, se coloca una cantidad conocida de AFB<sub>1</sub>. Entonces, la AFB<sub>1</sub> será biotransformada a los metabolitos hidrolizados ya mencionados. Después de algún tiempo, se cuantifica la AFB<sub>1</sub> restante, así como a los productos de su degradación, por medio de HPLC o espectrofotometría de masas. Así se sabrá la cantidad de AFB<sub>1</sub> biotransformada y a qué tipo de metabolitos.

Sin embargo, la biotransformación de AFB<sub>1</sub> también origina metabolitos electrofílicos, entre ellos los epóxidos, que son compuestos químicamente reactivos y tóxicos, su blanco es el ADN y producen mutaciones. Se debe tener cuidado en los análisis de AF, tal vez no se encuentren metabolitos hidrolizados en los tejidos porque el metabolismo haya generado metabolitos electrofílicos como el 8-9 epóxido de AFB<sub>1</sub>. El metabolito hidrolizado 8-9 epóxido tiene la capacidad de unirse al ADN y proteínas para formar aductos (Eaton & Groopman, 1994). Es conocido que este epóxido se une en la posición del N<sup>7</sup> de la guanina, para formar aductos de AFB<sub>1</sub>-ADN, y causando las mutaciones o transversiones de GC a AT (Bennett & Klich, 2003).

En los resultados de esta investigación se observa que los hígados pertenecientes a las gallinas tratadas con alimento contaminado con 30 µg/kg y 500 µg/kg presentaron un aumento en el tamaño, llamado hepatomegalia, en comparación con el grupo Control. Los hígados pertenecientes al tratamiento de 30 µg/kg presentaban un color rojo pálido, mientras los hígados pertenecientes al tratamiento de 500 µg/kg presentaron un color ocre-amarillento y apariencia grasa (**Figura 51**). La interferencia de las AF en el metabolismo de los lípidos es la causa del deterioro de triglicéridos del hígado, por lo que se reducen en el suero y conducen a la formación de "hígado graso" (Quist *et al.*, 2000; Altintas *et al.*, 2003; Eraslan *et al.*, 2005). Los cambios patológicos y la presencia de hígado graso se utilizan para evaluar los efectos tóxicos de la AFB<sub>1</sub> sobre este órgano (Karaman *et al.*, 2005). El hígado es el órgano blanco de las AF y ahí es donde se lleva a cabo la biotransformación de la AFB<sub>1</sub> (Yip & Coulombe, 2006).



**Figura 51: Hígados de gallina del experimento realizado con alimento contaminado por una semana. A:** Hígado control, nótese zonas de color rojo claro sobre el fondo guinda que indica contaminación basal por AF. **B:** Hígado de gallina que ingirió alimento con 30 µg/kg de AFB<sub>1</sub> y **C:** Hígado de gallina que ingirió alimento con 500 µg/kg de AFB<sub>1</sub>.

Una investigación hecha por Harinthanano *et al.* (2000), indica que cuando las gallinas son tratadas con dosis orales de 5 mg/kg de AFB<sub>1</sub> durante 10 días, presentan un decremento en el consumo de alimento. El 87.5% de las gallinas tratadas con la AFB<sub>1</sub>, presentaron hígado graso y hemorragias a los dos días de haber empezado la administración del tratamiento, de los 3 a 9 días los hígados se tornaron de un color amarillo pálido, aunque su peso no aumentó en comparación con el grupo control. El 62.5 al 87.5% de las mollejas sufrieron ulceración y erosión en la mucosa entre los 2 y 8 días de haber empezado el tratamiento. Al comparar los resultados de Harinthanano *et al.* (2000), y los daños en los órganos de mi estudio, existe una diferencia en la morfología de los órganos y es por la menor cantidad de AFB<sub>1</sub> administrada a nuestras gallinas en comparación con la utilizada por él.

De acuerdo a los resultados mostrados en el **Cuadro 20 b** para la cuantificación e identificación de AF en hígado, el **Cuadro 28 (b)** para mollejas y el **Cuadro 32 (b)** para pechuga, se observa que la AFG<sub>1</sub> fue identificada y detectada en los tres órganos analizados. La cantidad presente varía, en el hígado se detectaron de 78.7 µg/kg a 121.0 µg/kg de AFG<sub>1</sub> por gallina; en la

pechuga de 16.1 µg/kg a 512.4 µg/kg de AFG<sub>1</sub> por gallina, y en la molleja de 551.2 µg/kg a 740.8 µg/kg de AFG<sub>1</sub> por gallina. La presencia de AFG<sub>1</sub> indica que su origen puede ser el hongo *A. parasiticus* quien la puede formar de forma simultánea con AFB<sub>1</sub>. Ambas AF son un alto riesgo para la salud humana. La AFG<sub>1</sub> es un potente cancerígeno para riñón de rata. Al detectarse AFG<sub>1</sub> en los hígados, pechugas y mollejas prueba que las gallinas utilizadas en esta investigación estuvieron consumiendo durante sus más de dos años de vida sorgo contaminado con AF proveniente de *A. flavus* y/o *A. parasiticus*, lo cual acumuló esta cantidad elevada de AFG<sub>1</sub>.

Debido a la relación estrecha que posee AFG<sub>1</sub> con AFB<sub>1</sub> se ha realizado una investigación (Garner *et al.*, 1972), sobre la toxicidad de AFG<sub>1</sub> *in vitro* para después hacer una extrapolación de los datos y conocer la potencia cancerígena de esta AF en mamíferos y animales. La unión de la AFB<sub>1</sub> y de la AFG<sub>1</sub> al ADN es mayor que su unión al ARN ribosomal de hígado y riñones de rata, y la AFB<sub>1</sub> forma la mayor cantidad de aductos. En estudios de coeficiente de distribución de AFB<sub>1</sub> y AFG<sub>1</sub> sobre diversos modelos de membrana, se mostró que la AFB<sub>1</sub> es más lipofílica que la AFG<sub>1</sub>, por ello la AFG<sub>1</sub> se une menos al ADN y es menos cancerígena que la AFB<sub>1</sub>. La menor potencia cancerígena de la AFG<sub>1</sub> se ha probado en microsomas de hígado y bacterias en un ensayo de suspensión líquida, donde AFG<sub>1</sub> resultó ser cuatro veces menos tóxica que la AFB<sub>1</sub> (Garner *et al.*, 1972). Por otro lado, se ha reportado que la toxicidad de AFG<sub>1</sub> es del 30% de la actividad presente en AFB<sub>1</sub> en ensayos con *Salmonella* (Wong & Hsieh, 1976). Con lo anterior se puede hacer una extrapolación de los datos sobre la toxicidad de AFG<sub>1</sub> *in vitro* para conocer su potencia cancerígena en mamíferos y animales.

La caracterización de aductos (que son los cancerígenos activos) de AFG<sub>1</sub>-ADN (*trans*-9,10-dihidro-9-(7-guanyl)-10-hidroxi-AFG<sub>1</sub>) formados por activación *in vivo*, *in vitro* y por oxidación perácida indica que la mayoría de estos aductos poseen la misma estructura química que los aductos de AFB<sub>1</sub>. El aducto de AFG<sub>1</sub>-ADN se forma al unirse con el N<sup>7</sup> de la guanina. Se dice hay una buena correlación entre las uniones AFG<sub>1</sub>-ADN *in vivo* en el hígado y la susceptibilidad a desarrollar cáncer.

Es muy probable que la membrana nuclear de las células hepáticas sean las responsables de la unión de la AFG<sub>1</sub> y AFB<sub>1</sub> al ADN, mientras el retículo

endoplásmico es responsable de unir las AF al ARN ribosomal (Neal & Godoy, 1976). Aunque es difícil de probar porque los tumores son producidos en otros órganos que no son el hígado, a menos que ellos mismos tengan la capacidad de activar las AF. Alternativamente, puede existir un metabolito que transporte las AF a otros órganos y reactivar los metabolitos hidrolizados (Garner *et al.*, 1979).

Por lo anterior, es necesario prestar atención a la presencia de AFG<sub>1</sub> en los tejidos que son destinados al consumo humano, aunque está probado que la toxicidad de AFG<sub>1</sub> es menor que la de AFB<sub>1</sub> en un 70%, pero poseen la misma capacidad para formar aductos con el ADN y ARN, y provocar tumores de cáncer.

Con relación a la AFM<sub>1</sub> es un metabolito muy frecuente en orina de poblaciones humanas (Sun *et al.*, 1999) y tiene una asociación directa con el incremento de hepatitis, cirrosis y cáncer hepatocelular. Cuando se usa leche contaminada con AFM<sub>1</sub>, el queso concentra el 40% al 60% de la AFM<sub>1</sub> (López *et al.*, 2001), la crema retiene el 10% y la mantequilla menos del 2% (Van Egmond, 1994). La Agencia Internacional de Investigación en Cáncer la sitúa a la AFM<sub>1</sub> como "Probable cancerígeno" (IARC, 1997).

En los últimos 10 años, los investigadores han realizado estudios de control, para encontrar la forma de desintoxicar los alimentos contaminados por AF y minimizar los efectos deletéreos que éstas causan a las aves de corral (Zaghini, *et al.*, 2001; Oğuz *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2003). La detección de AF en granos y cereales comerciales, y en sus productos derivados han originado una preocupación sobre el riesgo que corre la salud humana por causa de las micotoxinas. Esto ha renovado el interés por nuevos métodos para destoxificar componentes y alimentos utilizados para el consumo animal y humano (García & Heredia, 2006). Un método de control es utilizar adsorbentes de AF, algunos son exitosos, pero pocos son utilizados comercialmente.

Zaghini *et al.* (2005), probó el adsorbente conocido como Mananoligosacárido (MOS) para evaluar si aminora el efecto de la AFB<sub>1</sub> sobre la calidad del huevo y el daño al hígado. Administró un suplemento alimenticio con 11% de MOS más 2.5 ppm de AFB<sub>1</sub> durante 4 semanas. Al final encontró cantidades muy pequeñas de AFB<sub>1</sub> acumuladas en los hígado pertenecientes al grupo tratado con MOS+AFB<sub>1</sub> (2.21±1.37 ppb) y en el huevo la presencia de

AFB<sub>1</sub> fue nula. Con lo que concluye que el MOS posee la habilidad de adsorber y degradar la AFB<sub>1</sub> y reduce la absorción gastrointestinal de AFB<sub>1</sub> y sus niveles en tejidos.

Otro estudio se elaboró con diferentes aceites vegetales para evaluar su eficacia y contrarrestar los efectos adversos de la AFB<sub>1</sub> en pollos. Los efectos del aceite vegetal (30 g/kg) administrado a los pollos junto con el alimento contaminado con AFB<sub>1</sub> (0.3 µg/g) redujeron en gran consideración los daños ocasionados al hígado y contrarrestaron los efectos adversos que le ocasiona la AFB<sub>1</sub> cuando el pollo la había consumido AFB<sub>1</sub> sola (Raju *et al.*, 2005).

De los dos métodos químicos (Qian & Yang, 1984 y Koeltzow & Tanner, 1990) utilizados para la obtención del porcentaje de recuperación de AFB<sub>1</sub> en los tejidos analizados en el experimento, el mejor método químico para la detección de AF en tejidos de gallina de postura fue el de Qian & Yang, 1984. Este método posee un límite de detección mayor, la utilización de ambas columnas LC-18 no impide detectar la cantidad de 0.5 ng/mL. Sin embargo, se deben de aplicar las modificaciones mencionadas para obtener el porcentaje de recuperación idóneo y aceptable de más del 80%. El método es más económico que el de columnas de inmuno-afinidad y aunque tarda el doble de tiempo, es más confiable y con mejor detección.

## V. CONCLUSIONES

1. El método de Qian & Yang (1984) modificado tiene una mejor recuperación de la AFB<sub>1</sub> que el de Koeltzow & Tanner (1990) y es más recomendable para el análisis de aflatoxinas en tejidos de gallina.
2. El método de Qian & Yang (1984) requiere eluir las aflatoxinas de ambas columnas LC-18 y sumarlas, con esta modificación se recuperan el 92% de las aflatoxinas.
3. Las cantidades basales de aflatoxinas en el hígado control (415.1 µg/kg) y en pechuga control (335 µg/kg) de gallina son muy altas, mientras en las mollejas control es menor (42.8 µg/kg).
4. Hay un riesgo para la salud cuando se ingieren hígados, pechugas y mollejas de pollo/gallina contaminadas con aflatoxinas.
5. Con respecto a los **hígados** de gallina del experimento analizados con el método de Qian & Yang (1984):
  - No hubo diferencia significativa entre la contaminación por AF de las gallinas control y las tratadas. El grupo Control tuvo alta cantidad de aflatoxinas en los tejidos provenientes de la alta contaminación basal del alimento.
  - El grupo control tuvo AFB<sub>1</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, AFM<sub>1</sub>, AFP<sub>1</sub> y AFL. Y los tratamientos a) con 30 µg/kg, tuvo AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, AFM<sub>1</sub>, AFP<sub>1</sub> y AFL; y b) con 500 µg/kg, presentó AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, AFP<sub>1</sub> y AFL.
6. Con respecto a las **mollejas** de las gallinas del experimento analizadas con el método de Qian & Yang (1984):
  - La segunda columna LC-18 retuvo a la mayor cantidad de aflatoxinas de los tres tratamientos.
  - En el grupo Control, se encontraron AFG<sub>1</sub> y AFL. En los tratamientos con 30 µg/kg, se detectaron AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, AFM<sub>1</sub>, AFP<sub>1</sub> y AFL; y con 500 µg/kg, se obtuvieron AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub> y AFL.
7. Con respecto a las **pechugas** de las gallinas del experimento analizadas con el método de Qian & Yang (1984):
  - La segunda columna LC-18 retuvo a la mayor cantidad de aflatoxinas.
  - El grupo Control presentó AFB<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, AFM<sub>1</sub> y AFP<sub>1</sub>; los tratamientos: a) con 30 µg/kg, tuvo AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, AFM<sub>1</sub>, AFM<sub>2</sub>, AFP<sub>1</sub> y AFL; b) con 500 µg/kg presentó AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, AFM<sub>1</sub> y AFP<sub>1</sub>.
8. El método químico de Koeltzow & Tanner, 1990, no fue suficientemente sensible para los tres tejidos (hígado, molleja y pechuga), ya que en la

cuantificación e identificación, no se encontraron las cantidades de AF esperadas.

## VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Abadia-Serna, B., Afanador-Tellez, G., Céspedes, A.E. & Díaz, G.J. 1997. Ocurrencia natural de aflatoxinas en sorgos híbridos cultivados en la microregión del Alto Magdalena, Colombia. *Revista-CORPOICA (Colombia)*, 2(1):21-26.
2. Abdolamir-Allameh, Alireza-Safamehr, Mirhadi, S.A., Mahmmoud-Shivazad, Razzaghi-Abyaneh, M. & Afshar-Naderi, A. 2005. Evaluation of biochemical and production parameters of broiler chicks fed ammonia treated aflatoxin contaminated maize grains. *Animal Feed Science and Technology*, 122 (3/4): 289-301.
3. Alonso, P. F. & Domínguez, C.M.C. 1997. Estudio histórico de algunas de las variables productivas y económicas de la avicultura nacional hasta 1995. V Jornada Médico Avícola. 12 - 14 de marzo, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México.
4. Altintas, A., Bilgili, A., Kontas, T. & Eraslan, G. 2003. Liver and serum vitamin A-carotene levels in broilers following dietary aflatoxin exposure. *Veterinary Journal of Ankara University*, 50(1):1-6.
5. Bahrami, A.M. 2004. Distribution of aflatoxin B<sub>1</sub> from poultry feed to different tissue of broilers in tropical weather. *Animal health a breakpoint in economic development? The 11<sup>th</sup> International Conference of the Association of Institutions for Tropical Veterinary Medicine and 16<sup>th</sup> Veterinary Association Malaysia Congress. August 23-27, 2004. Petaling Jaya, Malaysia. 244-246 pp.*
6. Beckwith, A. C., Vesonder, R. F. & Ciegler, A. 1975. Action of weak bases upon aflatoxin B<sub>1</sub> in contact with macromolecular reactants. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 23:582-587.
7. Begum, F., Rehman, A., Maliha, G. & Nuzhat, J. 2001. Distribution of aflatoxin B<sub>1</sub> from poultry feed to different body tissues of broilers. *Pakistan Veterinary Journal*, 21(3):121-123.
8. Bennett, J.W., Chang, P.K. & Bhatnagar, D. 1997. One gene to whole pathway: The role of norsolorinic acid in aflatoxin research. *Advances in Applied Microbiology*, 45: 1-15.
9. Bennett, J.W. & Klich, M. 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*. 16(3): 197-516.
10. Bhanuprakash, K., Sathyanarayana, M.L., Vijavasarithi, S.K. & Upendra, H.A. 2006. Serum biochemistry, organ weights and performance of broiler chickens fed aflatoxin, ochratoxin and toxin binder. *Indian Veterinary Journal*, 83(2):159-161.
11. Bhatnagar D., Ehrlich, K. C. & Clevel, T. E. 2003. Molecular genetics analysis and regulation of aflatoxin biosynthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61:83-93.

12. Bhatti, B.M., Talat, T. & Sardar, R. 2001. Estimation of aflatoxin B<sub>1</sub> in feed ingredients and compound poultry feeds. *Pakistan Veterinary Journal*, 21(2): 57-60.
13. Bianchi Del, M., Oliveira, C.A.F., Albuquerque, R., Guerra, J.L. & Correa, B. 2005. Effects of prolonged oral administration of aflatoxin B<sub>1</sub> and fumonisin B<sub>1</sub> en broiler chickens. *Poultry Science*, 84(12):1835-1840.
14. Bintvihok, A. & Kositcharoenkul, S. 2006. Effect of dietary calcium propionate on performance, hepatic enzyme activities and aflatoxin residues in broilers fed a diet containing low levels of aflatoxin B<sub>1</sub>. *Toxicon*, 47(1):41-46.
15. Bintvihok, A. Thiengnin, S., Doi, K. & Kumagai, S. 2002. Residues of aflatoxins in the liver, muscle and eggs of domestic fowls. *Journal of Veterinary Medicine Science*, 64(11):1037-1039.
16. Bradley, O.C. 1960. The structure of the fowl. Editorial Oliver and Boyd Ltd. Edimburgo. 128 pp.
17. Bryden, W.L. & Cumming, R.B. 1980. Observations on the liver of the chicken following aflatoxin B<sub>1</sub> ingestion. *Avian Pathology*, 9:551-556.
18. Buxadé, C. 2000. La gallina ponedora. Sistemas de explotación y técnicas de producción. 2<sup>a</sup> Edición. Editorial Mundi-Prensa. España. 639 pp.
19. Calnek, B.W., Barnes, H.J., Beard, C.W., Mc Dougald, L.R. & Saif, Y.M. 1997. Diseases of poultry. 9<sup>a</sup> Edition. Editorial Board for the American Association of Avian Pathologist. Ames, IOWA, USA. 929 pp.
20. Card, L.E. & Nesheim, M.C. 1966. Poultry production. 10<sup>th</sup> edition. Editorial Lea-Febiger. Philadelphia, U.S.A. 325 pp.
21. Castelló, J.A., Roca, F.L., Chavarri J.L.C. & Pinan, F.O. 1989. Biología de la gallina. Editorial Real Escuela de Avicultura. España. 307 pp.
22. Chang, P.K., Cary, J.W, Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Bennett, J.W, Linz, J.E., Woloshuk, C.P. & Payne, G.A. 1993. Cloning of the *Aspergillus parasiticus* *apa-2* gene associated with the regulation of aflatoxin biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiolgy*, 59:3273-3279.
23. Charmley, L.L., Trenholm, H.L., Prelusky, D.B. & Rosenberg, A. 1995. Economic losses and decontamination. *Natural Toxins*, 3(4):199-203.
24. Cheeke, P. R. & Shull, L.R. 1985. Natural toxicants in feeds and poisonous plants. AVI Publishing Company, Inc. Westport, Connecticut, U.S.A. 492 pp.
25. Chilo, H. 1999. El citocromo P<sub>450</sub> y su rol en la hepatotoxicidad inducida por las drogas. *Enfermedades del Aparato digestivo*, 2(2): 34-37.

26. Clotet, S. R. 1990. Las gallinas ponedoras y la producción de huevos. Editorial Sintesis, S. A. Barcelona, España. 424 pp.
27. Cullen, J.M. & Newberne, P.N. 1994. Acute hepatotoxicity of aflatoxins. Capítulo 1:3-26 pp. *In*: Eaton, D.L. & Groopman, J.J (Ed). 1994. The toxicology of aflatoxins. Human health, veterinary and agricultural significance. Academic Press, Inc.San Diego. 544 pp.
28. De longh, H., Beerthuis, R. K., Vles, R. O., Barret, C. B. & Ord, W. O. 1962. Investigation of the factor in groundnut meal responsible for turkey X disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 65: 548-551.
29. Eaton, D.L. & Groopman, J.J. 1994 a. The toxicology of aflatoxins. Human health, veterinary and agricultural significance. Academic Press, Inc.San Diego. 544 pp.
30. Eaton, D.L., Ramsdell, H.S. & Neal, G.E. 1994 b. Biotransformación de Aflatoxinas. Capítulo 3: 45-72 pp. *In*: Eaton, D.L. & Groopman, J.J (Ed). 1994. The toxicology of aflatoxins. Human health, veterinary and agricultural significance. Academic Press, Inc.San Diego,USA. 544 pp.
31. Eraslan, G., Akdogan, M., Yarsan, E., Sahindokuyucu, F., Essiz, D. & Altintas, L. 2005. The effects of aflatoxins on oxidative stress in broiler chickens. *Turk Veterinerlik ve Hayvanclik Dergisi*, 29(3):701-707.
32. Escobar, A. & Sánchez-Regueiro, O. 2002. Determination of aflatoxin B<sub>1</sub> in food and feedstuffs in Cuba (1990 through 1996) using an immunoenzymatic reagent kit (Aflacen). *Journal of Food Protection*, 65(1):219-221.
33. Flores, C.M., Hernández, L.B. & Vázquez, J. 2006. Contaminación con micotoxinas en alimento balanceado y granos de uso pecuario en México en el año 2003. *Técnica Pecuaria en México*, 44 (2): 247-256.
34. García, S. & Heredia, N. 2006. Mycotoxins in Mexico: Epidemiology, management and control strategies. *Mycopathologia*, 162:255-264.
35. Garner, R.C., Martin, C.N., Lindsay, J.R., Coles, B.F. & Tolson, M.R. 1979. Comparison of aflatoxin B<sub>1</sub> and aflatoxin G<sub>1</sub> binding to cellular macromolecules *in vitro*, *in vivo* and after peracid oxidation; characterisation of the major nucleic acid adducts. *Chemico-Biological Interactions*, 26:57-73.
36. Garner, R.C., Miller, E.C. & Miller, J.A. 1972. Liver microsomal metabolites of aflatoxin B<sub>1</sub> to a reactive derivative toxic to *Salmonella typhimurium* TA1530. *Cancer Research*, 32:2058.
37. Giacomini, L., Fick, F.A., Dilkin, P., Mallmann, C.A., Rauber, R.H. & Almeida, C. 2006. Performance and plumage of broiler chicken intoxicated by aflatoxins. *Ciencia Rural*, 36(1):234-239.
38. Giavarini, I. 1971. Tratado di Avicoltura. Editorial Edagricole. Bolonia. 159 pp.

39. Goher, L.M.A., Abdel-Hakim, N.F., Shamma, T.A., El-Niely, H.F.G & Abdallah, E.A. 2004. Effectiveness of mycodote for detoxification of aflatoxin contaminated local chicken diets. *Egyptian Journal of Agricultural Research*, 82 (3):1415-1428.
40. Gordon, R.F. & Jordan, F.T.W. 1985. *Enfermedades de las aves*. 2ª Edición. Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V. México, D.F. 383 pp.
41. Gqaleni, N., Smith, J.E. & Lancey, J. 1996. Co-production of aflatoxin and Cyclopiazonic acid in isolates of *Aspergillus flavus*. *Food Additives and Contaminants*, 13:677-685.
42. Henry, S.H., Bosch, F.X., Troxell, T.C. & Bolger, P.M. 1999. Reducing liver cancer-global control of aflatoxin. *Science*, 286:2453-2454.
43. Hoffmann, G. & Volker, A. 1969. *Anatomía y Fisiología de las Aves domésticas*. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 190 pp.
44. Huff, W.E., Doerr, J.A., Wabeck, C.J., Chaloupka, G.W., May, J.D, & Merkley J.W. 1984. The Individual and combined effects of aflatoxins and ochratoxin A on various processing parameters of broiler chickens. *Poultry Science*, 63:2153-2161.
45. Huff, W.E., & Doerr, J.A. 1981. Synergism between aflatoxins and ochratoxin A in broilers chickens. *Poultry Science*, 60: 550-555.
46. Huff, W.E., Kubena, L.F., Harvey, R.B., Corrier, D.E. & Mollenhauer, H.H. 1986. Progression of aflatoxicosis in broiler chickens. *Poultry Science*, 65:1891-1899.
47. IARC, International Agency for the Research of Cancer. 1997. Some naturally occurring substances: food items and Constituents heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Naturally occurring aflatoxins (Group I Aflatoxin M<sub>1</sub> (Group 2B))08/21/1997. IARC Monographs N° 56/09:5.1-5.5.
48. Jordan, F.T. & Pattison, M. 1996. *Poultry Diseases*. 4a Edición. Editorial Saunders Company. Gran Bretaña. 546 pp.
49. Jull, M.A. 1953. *Avicultura*. 2ª ed. Ed. Hispano-americana. México. 557 pp.
50. Karaman, M., Basmacioglu, H., Ortatatli, M. & Oğuz, H. 2005. Evaluation of the detoxifying effect of yeast glucomannan on aflatoxicosis in broilers as assessed by gross examination and histopathology. *British Poultry Science*, 46(3):394-400.
51. Harinthanano, K., Sailasut, A., Rungsipipa, A., Bintviho, A. & Sasipreeyaja, J. 2000. Pathological changes and faecal excretion levels seen in broiler chicks after a single oral dose of aflatoxin B<sub>1</sub>. In *AGRIS 2003/10-2006/09*. AN: 205-040071.
52. Khan, M.M.H., Chowdhury, B., Bhuiya, M.R.H. & Rahim, M. 2005. Variation of aflatoxin level in different poultry feeds used in different poultry farms of Bangladesh round the year. *International Journal of Poultry Science*, 4(6):382-387.

53. Koeltzow, D. E. & Tanner, S. N. 1990. Comparative evaluation of commercially available test methods. *Journal Association of Official Analytical Chemists*, 73: 584-589.
54. Krishnamachari, K.A.V.R., Bhat, R.V., Nagarajan, V. & Tilnak, T.M.G. 1975. Hepatitis due to aflatoxicosis. An outbreak in Western India. *Lancet* 1: 1061-1063.
55. López, C., Ramos, L., Ramadan, S., Bulacio, L., & Pérez, J. 2001. Distribution of aflatoxin M<sub>1</sub> in cheese obtained from milk artificially contaminated. *International Journal of Food Microbiology*, 64: 211-215.
56. Mavarez, Y., Vale-Echeto, O., Perozo, F., Rivera, S. & Arenas, E. 2005. Effect of selenium supplementation on liver and lymphoid organs in aflatoxin B<sub>1</sub> fed broilers. *Indian Veterinary Journal*, 82(10):1035-1036.
57. Meyers, D.M., Obrian, G., Du, W.L., Bhatnagar, D. & Payne, G.A. 1998. Characterization of *afIJ*, a gene required for conversion of pathway intermediates to aflatoxin. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 3713-3717.
58. Micco, C., Miraglia, M., Onori, R., Brera, C., Mantovani, A., Ioppolo, A. & Stasolla, D. 1988. Long-term administration of low doses of mycotoxins to poultry. 1. Residues of aflatoxin B<sub>1</sub> and its metabolites in broilers and laying hens. *Food Additives and Contaminants*, 5:303-308.
59. Minto, R.E. & Townsend, C.A. 1997. Enzymology and molecular biology of aflatoxin biosynthesis. *Chemical Review*, 97, 2537-2552.
60. Moctezuma-Zárate, M.G. 2002. Mutagénesis por AFB<sub>1</sub> presente en maíz y tortillas, y la nixtamalización como posible control. *Tesis de Doctorado en Ciencias (Biología)*. Universidad Nacional Autónoma de México. 99 pp.
61. Mohanamba, T., Habibi, S.M.M., Sastry, P.R., Rajeswari, K.R. & Rao, M.R.K. 2002. *Aspergillus flavus* contamination of feeds and its potential to produce aflatoxin. *Indian Veterinary Journal*, 79(12):1302-1303.
62. Nath, R. & Sarma, S. 2005. Effect of aflatoxin on liver enzymes of broiler chicken. *Indian Veterinary Journal*, 82(10):1104-1105.
63. Naveenkumar, B., Reddy, K.S., Reddy, A.G. & Kalakumar, B. 2005. Mechanism of toxicity due to aflatoxins and evaluation of chromium and methionine. *Indian Journal of Veterinary Research*, 14(2):5-10.
64. Neal, G.E. & Godoy, H.M. 1976. The effect of pre-treatment with phenobarbitone on the activation of aflatoxin B<sub>1</sub> by rat liver. *Chemico-Biological Interactions*, 14:279.
65. Neumann, K. F. 2001. Gallinas de Postura. Centro de Estudios Agropecuarios. Editorial Iberoamericana, S. A. de C. V. Serie Agronegocios. México, D. F. 88 pp.

66. North, M. O. 1982. Manual de producción avícola. 2ª Edición. Editorial El Manual Moderno, S. A. de C. V. México, D.F. 816 pp.
67. Obrian, G.R., Fakhoury, A.M. & Payne, G.A. 2003. Identification of genes differentially expressed during aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. Fungal Genetics and Biology, 39: 118-127.
68. Oğuz H., Kurtoğlu, V. & Coskun, B. 2000. Preventive efficacy of clinoptilolite in broilers during chronic aflatoxin (50 & 100 µg/kg) exposure. Research in Veterinary Science, 69:197-201.
69. Oğuz, H., Kurtoğlu, F. & Birdane, Y.O. 2002. Evaluation of biochemical characters of broilers chickens during dietary aflatoxin (50 and 100 µg/kg) and clinoptilolite exposure. Research in Veterinary Science, 73: 101-103.
70. Oliveira, C.A.F., Rosmanimbo, J. F., Castro, A. L., Butkeraitis, P., Reis, T. A. & Corrêa, B. 2003. Aflatoxin residues in eggs of laying Japanese quail after long-term administration of rations containing low levels of aflatoxin B<sub>1</sub>. Food Additives and Contaminants, 20(7): 648-653.
71. ONU. Organización Mundial de las Naciones Unidas. 2002. Cumbre Mundial sobre el Desarrollo Sostenible. Cumbre de Johannesburgo, del 24 de agosto al 4 septiembre de 2002. <http://www.un.org/spanish/>.
72. OPS. Organización Panamericana de la Salud. 1983. Micotoxinas. Criterios de la salud ambiental 11. 131 pp.
73. Orellana, M. & Guajardo, V. 2004. Actividad del citocromo P<sub>450</sub> y su alteración en diversas patologías. Revista Médica de Chile, 132:85-94.
74. Ortatagli, M. & Oğuz, H. 2001. Ameliorative effects of dietary clinoptilolite on pathological changes in broilers chickens during aflatoxicosis. Research in Veterinary Science, 71:59-66.
75. Park, D.L. & Pohland, A.E. 1986. A rationale for the control of aflatoxin in animal feeds. Mycotoxins and Phycotoxins, edited by Steyn, P.S. & Vleggaar, R. Amsterdam: Elsevier. 473-482.
76. Pitt, J.I. 2000. Toxigenic fungi: which are important? Med. Mycol., 38(1):17-22.
77. Qian, G-S & Yang, G. C. 1984. Rapid extraction and detection of aflatoxins B<sub>1</sub> and M<sub>1</sub> in beef liver. Journal Agricultural and Food Chemistry, 32:1071-1073.
78. Quist, C. F., Bounous, D. I., Kilburn, J. V., Nettles, V. F., & Wyatt, R. D. 2000. The effect of dietary aflatoxin on wild turkey poults. Journal of Wildlife Diseases. Research in Veterinary Science, 71:59-66.
79. Raju, M.V.L.N., Rama Rao, S.A., Radhika, K. & Panda, A.K. 2005. Effect of amount and source of supplemental dietary vegetable oil on broiler chickens exposed to aflatoxicosis. British Poultry Science, 46(5): 587-594.

80. Ratnavanthi, C.V. & Sashidhar, R.B. 2003. Substrate suitability of different genotypes of sorghum in relation to *Aspergillus* infection and aflatoxin production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(11):3482-3492.
81. Romer, A.S. & Parsons, T.S. 1981. *Anatomía Comparada*. 5ª Edición. Editorial Interamericana, S.A. de C.V. México, D. F. 427 pp.
82. Salyi, G. 1999. Mycotoxicosis in poultry. *Baromfi*, 3:58-63.
83. Santuario, J.M., Mallmann, C.A., Rosa, A.P, Appel, G., Heer, A., Dageförde, S. & Böttcher, M. 1999. Effect of sodium bentonite on the performance and blood variables of broilers chickens intoxicated with aflatoxins. *British Poultry Science*, 40:115-119.
84. Sapkota, D., Islam, R., Baruah, K.K. & Upadhyaya, T.N. 2005. A study on the efficacy of dietary *Osimum sanctum* against aflatoxin B<sub>1</sub> contaminated feed in broilers. *Indian Journal of Poultry Science*, 40(3):282-284.
85. Scott, P.M. 1995. Natural Toxins. Chapter 49. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. Vol. II. 16<sup>th</sup> Edition. USA. 1-49.
86. Secretaría de Salud. 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-188-SSA 1-2002. Productos y servicios: Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal, especificaciones sanitarias. *Diario Oficial de la Federación*, 2002: 11 de Marzo de 1999.
87. Siame, B.A., Mpuchane, S.F., Gashe, B.A., Allotey, J. & Teffera, G. 1998. Occurrence of aflatoxins, fumonisin B<sub>1</sub> and zearalenone in foods and feeds in Botswana. *Journal of Food Protection*, 61(12):1670-1673.
88. Singh, N., Jand, S.K. & Baxi, K.K. 2003. Chemical detoxification of aflatoxins in contaminated poultry feed. *Indian Journal of Animal Sciences*, 73(2):197-199.
89. Sodhi, S., Brar, A.P.S., Ghai, J.K. & Brar, R.S. 2005. Biochemical and immunological effects of dietary exposure to aflatoxin B<sub>1</sub> in broiler chicks. *Indian Journal of Poultry Science*, 40(2):155-157.
90. Spanó, M.A & Graf, U. 1998. Segundo taller sobre SMART: un método para detectar las actividades mutágena y recombinogénica en células somáticas de *Drosophila*, en la Universidad Federal de Uberlandia (MG), Brasil. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 14(002):111-114.
91. Squire, R.A. 1981. Ranking animal carcinogens: a proposed regulatory approach. *Science*, 214:877-880.
92. Steyn, P.S., Vleggaar, R. & Wessels, P.L. 1980. The Biosynthesis of Aflatoxin and its congeners. 105-155 pp. *In: The Biosynthesis of Mycotoxins. A study of secondary metabolism*. Steyn, P.S. (Ed). Chapter 4. Academic Press, USA. 431 pp.

93. Sun, Z., Lu, P., Gail, M.H., Pee, D., Zhang, Q., Ming, L., Wang, J., Wu, Y., Liu, G., Wu, Y., & Zhu, Y. 1999. Increased risk of hepatocellular carcinoma in male hepatitis B surface antigen carriers with hepatitis who have detectable urinary aflatoxin metabolite M<sub>1</sub>. *Hepatology*, 30: 379-383.
94. Sudershan, R.V., Vasanthi, S. & Bhat, R.V. 2004. Alternative uses of sorghum and pearl millet in Asia. Proceedings of an expert meeting, ICRISAT, Patancheru, Andhra-Pradesh, India, 1-4 July, 2003; 322-325.
95. Sweeney, M.J. & Dobson, A.D.W. 1999. Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters*, 175:149-163.
96. Tedesco, D., Steidler, S., Galletti, S. & Tamani, M. 2004. Efficacy of Silymarin-phospholipid complex in reducing the toxicity of aflatoxin B<sub>1</sub> in broilers chicks. *Poultry Science*, 83(11):1839-1844.
97. Trail, F., Mahanti, N. & Linz, J.E. 1995. Molecular biology of aflatoxin biosynthesis. *Microbiology*, 141: 755-765.
98. Trujillo, E. 2003. La producción avícola cubana, logros y desafíos. *Revista Cubana de Ciencia Avícola*, 27:103-114.
99. UNA. Unión Nacional de Avicultores. 2005. Compendio de Indicadores económicos del sector avícola. Dirección de Estudios Económicos. México, D. F. [www.una.org.mx](http://www.una.org.mx)
100. Van Egmond, H.P. 1994. Aflatoxins in milk. Chapter 17, p. 365-381. In D.L. Eaton & J.D. Groopman (ed). *The toxicology of aflatoxins. Human health, veterinary and agricultural significance*. Academic Press, Inc., San Diego, Calif. U.S.A.
101. Vardon, P.J. 2003. Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems, potential economic costs of mycotoxins in the United States. Report N° 139. Coast Task Force. 136-149 pp.
102. Verma, J., Johri, T.S., Swain, B.K. & Ameena, S. 2004. Effect of graded levels of aflatoxin, ochratoxin and their combinations on the performance and immune response of broilers. *British Poultry Science*, 45(4): 512-518.
103. Wilkinson, J., Rood, D., Minior, D., Guillard, K., Darre, M. & Silbart, L.K. 2003. Immune response to a mucosally administered aflatoxin B<sub>1</sub> vaccine. *Poultry Science*, 82:1565-1572.
104. Wong, J.J., & Hsieh, D.P.H. 1976. Mutagenicity of aflatoxins related to their metabolism and carcinogenic potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73:2241.

105. Yip, S.S.M. & Coulombe, R.A. 2006. Molecular cloning and expression of a novel cytochrome P<sub>450</sub> from turkey liver with aflatoxin oxidizing activity. *Chemical Research in Toxicology*, 19(1):30-37.
106. Yu, J., Woloshuk, C.P., Bhatnagar, D. & Cleveland, T.E. 2000. Cloning and characterization of *avfA* and *omtB* genes involved in aflatoxin biosynthesis in three *Aspergillus* species. *Gene*, 248:157-167.
107. Zaghini, A., Altafini, A., Rizzi, L. & Simioli, M. 2001. Study on the ability of esterified glucomannans (EGM) to prevent the gastrointestinal absorption of mycotoxins in laying hens. *Proceedings of the Associazione Scientifica di Produzione Animale (ASPA), Florence, Italy. Congress recent Progress in Animal Production Science*, 2:442-444.
108. Zaghini, A., Martelli, G., Roncada, P., Simiolo, M. & Rizzi, L. 2005. Mannanligosaccharides and aflatoxin B<sub>1</sub> in feed for laying hens: effects on egg quality, aflatoxin B<sub>1</sub> and M<sub>1</sub> residues in eggs, and aflatoxin B<sub>1</sub> in liver. *Poultry Science Association*, 84(6):825-832.
109. Zuber M.S., Darrah, L.L., Lillehoj, E.B., Josephson, L.M., Manwiller, A., Scott, G.E., Gudauskas, R.T., Horner, E.S., Widstrom, N.W., Thompon, D.L., Bockholt A.J. & Brewbaker, J.L. 1993. Comparison of open-pollinated maize varieties and hybrids for preharvest aflatoxins contamination in the southern United States. *Plant Disease*, 67:185-187.