



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE
AFLATOXINAS Y SUS METABOLITOS
HIDROXILADOS, DEL ALIMENTO AL HUEVO DE
GALLINA, POR HPLC.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

LIZETH PAOLA FALCÓN CAMPOS



MÉXICO D. F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Jurado asignado:

Presidente	Dr. Hermilo Leal Lara
Vocal	QFB. Juan Diego Ortiz Palma Pérez
Secretaria	Dra. Magda Carvajal Moreno
1er. Suplente	Dra. Araceli Patricia Peña Álvarez
2°. Suplente	Dr. José Pedraza Chaverri

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Micotoxinas C-119. Departamento de Botánica. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México

Asesor del Tema:

Dra. Magda Carvajal Moreno

Sustentante

Lizeth Paola Falcón Campos

DEDICATORIA

A todas las personas involucradas directa e indirectamente en la realización de esta tesis:

A mi Mamá Margarita Campos Cuevas y a mi Papá Cruz Falcón Medina por enseñarme que los logros se alcanzan trabajando.

A Agustín por el apoyo brindado.

A mis hijos Kevin, Iván y Fátima, por su alegría compartida, porque la alegría es el remedio universal de todo mal.

A mi padrino Roberto Enciso Peña †, por sus enseñanzas y sus palabras que me ayudan en el andar de esta vida.

AGRADECIMIENTOS

A las Personas

A mi directora de tesis la Dra. Magda Carvajal Moreno por su confianza, enseñanza, tiempo, y por aquella calidad humana que la identifica.

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

Presidente	Dr. Hermilo Leal Lara
Vocal	QFB. Juan Diego Ortiz Palma Pérez
Secretaria	Dra. Magda Carvajal Moreno
1 ^{er} . Suplente	Dra. Araceli Patricia Peña Álvarez
2 ^o . Suplente	Dr. José Pedraza Chaverri

Al Dr. Ernesto Ávila González por apoyar este proyecto con las instalaciones del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola (CEIEPAV) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, en Tulyehualco, Distrito Federal.

Al Dr. Ignacio Méndez Ramírez y a la Dra. Silvia Ruiz del Instituto de Investigaciones en Matemáticas Aplicadas y Sistemas (IIMAS), UNAM por el análisis estadístico.

A la Biól. Nahlleli Civi Chilpa Galván por el apoyo en el muestreo.

A mis profesores involucrados en la adquisición de conocimiento durante mi trayectoria escolar: desde mis primeros años de preescolar hasta la actual Licenciatura, en especial al Dr. Lino Reyes, por su disponibilidad, tiempo y orientación académica.

A la QFB Sara Montañó Benavides, por su confianza y orientación durante la realización de mi servicio social, por su ayuda en aclarar mis dudas, haciéndome ver que las mejores decisiones están dentro de uno mismo; en general por su sencillez y calidad humana.

A las Instituciones

Al Instituto de Biología, UNAM 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 Proyecto N° IN225105-2, y por la beca que me otorgó para la realización de esta tesis de Licenciatura.

A la Facultad de Química por la carrera brindada y en general a la Ciudad Universitaria de la UNAM por su inigualable belleza, instalaciones y servicios, porque fue mi otra casa.

Al Instituto de Investigaciones en Matemáticas Aplicadas y en Sistemas (IIMAS), UNAM, por el apoyo en análisis estadístico.

Al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, por la experiencia adquirida en sus instalaciones al realizar mi servicio social, y mi proyecto de LABDEA (Laboratorio de Desarrollo de Alimentos).

ÍNDICE

Nº	Contenido	Página
	Jurado asignado.....	ii
	Dedicatoria.....	iii
	Agradecimientos.....	iv
	Índice.....	vi
	Lista de Tablas.....	ix
	Lista de Figuras.....	xii
	Resumen.....	xv
	Abstract.....	xvi
I.	INTRODUCCIÓN.....	1
	I.1. La avicultura.....	1
	I.1.1. Origen e importancia de la avicultura.....	1
	I.1.2. La avicultura en México.....	1
	I.1.3. Producción y consumo de huevo a nivel mundial y en México.....	2
	I.1.4. Anatomía y fisiología del huevo de gallina.....	4
	I.1.5. Composición y propiedades nutricionales del huevo.....	8
	I.2. Las micotoxinas.....	10
	I.2.1. Definición, historia e importancia.....	10
	I.2.2. Especies de hongos productores de micotoxinas.....	12
	I.2.3. Factores ambientales en la producción de micotoxinas.....	13
	I.3. Las aflatoxinas (AF).....	14
	I.3.1. Definición e importancia.....	14
	I.3.2. Estructura, tipos y propiedades fisicoquímicas.....	14
	I.3.3. Metabolismo de las Aflatoxinas.....	16
	I.3.4. Toxicidad de las Aflatoxinas.....	17
	I.3.5. Impacto económico.....	20
	I.4. Métodos de análisis para micotoxinas y aflatoxinas.....	21
	I.4.1. Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC).....	22
	I.5. Métodos de control.....	24
	I.6. Legislación y límites de tolerancia.....	25

Nº	Contenido	Página
II.	OBJETIVOS	27
	II.1. Generales.....	27
	II.2. Particulares.....	27
III.	HIPÓTESIS	28
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS	29
	IV.1. Diseño experimental con gallinas ponedoras.....	29
	IV.1.1 Composición del alimento base para las gallinas.....	30
	IV.1.2 Preparación de las concentraciones de AFB ₁ para la inoculación	
	del alimento.....	31
	IV.2. Análisis químico	32
	IV.2.1 Muestras de huevo.....	32
	IV.2.2. Método de extracción de Aflatoxinas en huevo.....	33
	IV.2.3. Límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) para las AF...	34
	IV.2.4. Porcentaje de recuperación.....	34
	IV.2.5. Cuantificación de AF por HPLC.....	34
	IV.2.6. Curvas de calibración.....	36
	IV. 3. Análisis estadístico	38
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
	V. 1. Diseño experimental con gallinas y muestreo de huevo.....	40
	V. 2. Identificación y cuantificación de aflatoxinas en huevo.....	47
	V.2.1. Validación del método.....	47
	V.2.2. Linealidad (curvas de calibración de aflatoxinas).....	47
	a) Curva de calibración de AFB ₁	48

Nº	Contenido	Página
	b) Curva de calibración de AFB ₂	49
	c) Curva de calibración de AFG ₁	50
	d) Curva de calibración de AFG ₂	51
	e) Curva de calibración de AFM ₁	52
	f) Curva de calibración de AFM ₂	53
	g) Curva de calibración de AFP ₁	54
	h) Curva de calibración de AFL.....	55
	V. 3. Límite de detección y cuantificación para las aflatoxinas.....	56
	V. 4. Porcentaje de recuperación de AFB ₁ en yema y clara.....	56
	V. 5. Identificación y cuantificación de aflatoxinas en yema y clara.....	57
	V.5.1. Detección de AF en huevo del experimento.....	57
	V.5.2. Aflatoxinas de huevo comercial de la Ciudad de México.....	62
	V. 6. Cromatogramas de AF en yema y clara de huevo.....	67
	V.6.1. Del experimento.....	67
	V.6.2. De huevo comercial en la Ciudad de México.....	71
	V. 7. Análisis estadístico de aflatoxinas en yema y clara.....	73
VI.	CONCLUSIONES	79
VII.	BIBLIOGRAFÍA	80

LISTA DE TABLAS

N°	Tablas	Página
1	Participación de la avicultura en la producción pecuaria (UNA, 2011).....	2
2	Producción de huevo en México (2001-2011) (UNA, 2011).....	2
3	Estados productores de huevo (UNA, 2011).....	3
4	Principales consumidores de huevo (2006 y 2010) (<i>per cápita</i>) (UNA, 2011; Márquez, 2008).....	3
5	Características físicas del huevo (INA, 2008b).....	5
6	Proporción porcentual de las partes del huevo (INA, 2008b; IEH, 2008c).....	6
7	Líneas genéticas de gallina para la producción de huevo (INA, 2008c).....	7
8	Composición nutricional del huevo entero, clara y yema, por 100 g (Astiasarán & Martínez, 2000).....	9
9	Micotoxinas involucradas en micotoxicosis (Vaamonde, 1995).....	13
10	Condiciones de producción de micotoxinas por hongos (Denli & Pérez, 2006).....	13
11	Propiedades físicas y químicas de algunas Aflatoxinas y sus metabolitos (OPS, 1983).....	16
12	Clasificación de micotoxinas según su toxicidad (Binder, 2007b).....	18
13	Letalidad de dosis únicas de AFB ₁ (Shibamoto & Bjeldanes, 1996).....	20
14	La AFB ₁ y sus efectos en los animales domésticos. (Denli & Pérez, 2006).	21
15	Niveles máximos tolerados para la AFB ₁ en alimentos (FAO, 2003).....	25
16	Máxima cantidad permitida de aflatoxinas ($\mu\text{g kg}^{-1}$) en comestibles para consumo humano y comercio de algunos países (Liu <i>et al.</i> , 2006).....	26
17	Límites de Aflatoxinas totales permitidos en cereales para consumo animal (Norma Oficial Mexicana, NOM-188-SSA1-2002).....	26
18	Peso inicial de las gallinas de los tres tratamientos del experimentos.....	30

N°	Tablas	Página
19	Composición del alimento base para las gallinas.....	31
20	Reactivos para preparar 5 L de solución amortiguadora PBS.....	35
21	Peso molecular y coeficientes de extinción de cada AF (OPS, 1983).....	37
22	Peso fresco de huevos del grupo control.....	40
23	Peso fresco de huevos del grupo alimentado con 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₁	41
24	Peso fresco de huevos del grupo alimentado con 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₁	42
25	Peso inicial y final de las gallinas.....	43
26	Peso de yema y clara de los huevos de gallinas control.....	44
27	Peso de yema y clara de los huevos de gallinas alimentadas con 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₁	45
28	Peso de yema y clara de los huevos de gallinas con 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₁ ..	46
29	Promedio del consumo de alimento, pesos inicial y final de gallinas y de la clara y la yema del huevo sin cascarón.....	47
30	Tiempos de retención cromatográficos de las AF.....	47
31	Curva de calibración AFB ₁	48
32	Curva de calibración AFB ₂	49
33	Curva de calibración AFG ₁	50
34	Curva de calibración AFG ₂	51
35	Curva de calibración AFM ₁	52
36	Curva de calibración AFM ₂	53
37	Curva de calibración AFP ₁	54
38	Curva de calibración AFL.....	55
39	Límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) para las AF y sus metabolitos hidroxilados	56

N°	Tablas	Página
40	Porcentaje de recuperación de AFB ₁ en yema y clara de huevo.....	56
41	Aflatoxinas ($\mu\text{g kg}^{-1}$) en yema y clara de gallinas control del experimento..	57
42	Aflatoxinas ($\mu\text{g kg}^{-1}$) en yema y clara de gallinas alimentadas con 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₁	58
43	Aflatoxinas ($\mu\text{g kg}^{-1}$) en yema y clara de gallinas alimentadas con 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₁	59
44	Promedios (Φ) de la concentración de AF ($\mu\text{g kg}^{-1}$) y ajuste al 100% según el porcentaje de recuperación en yema (95%) y clara (91%)	60
45	Aflatoxinas ($\mu\text{g kg}^{-1}$) en huevo entero (yema + clara) y su ajuste con el porcentaje de recuperación.....	61
46	Aflatoxinas ($\mu\text{g kg}^{-1}$) en yema de huevo comercial de 4 marcas.....	63
47	Aflatoxinas ($\mu\text{g kg}^{-1}$) en clara de huevo comercial de 4 marcas.....	64
48	Resumen de aflatoxinas ($\mu\text{g kg}^{-1}$) en yema y clara de huevo comercial.....	65
49	Resumen del promedio de aflatoxinas ($\mu\text{g kg}^{-1}$) en huevo comercial completo.....	65
50	Pruebas de Wilcoxon / Kruskal-Wallis (Rango de Suma).....	73
51	Análisis de varianza en yema y clara.....	74
52	Modelos lineales mixtos controlado por el efecto de la gallina.....	77

LISTA DE FIGURAS

N°	Figuras	Página
1	Proceso de formación del huevo (IEH, 2008 b).....	5
2	Corte transversal y partes del huevo IEH, 2008 c).....	6
3	Fases de crecimiento fúngico y localización de la síntesis de micotoxina (Soriano del Castillo, 2007).....	11
4	Fórmulas químicas de las Aflatoxinas (Soriano del Castillo, 2007).....	15
5	Metabolismo de la AFB ₁ (Derache, 1990).....	17
6	Mecanismo de acción de la AFB ₁ (Juan <i>et al.</i> , 2007).....	19
	Curvas de calibración:	
7	Curva de calibración AFB ₁ (ng mL ⁻¹).....	48
8	Curvas de calibración AFB ₂ (ng mL ⁻¹).....	49
9	Curvas de calibración AFG ₁ (ng mL ⁻¹).....	50
10	Curvas de calibración AFG ₂ (ng mL ⁻¹).....	51
11	Curvas de calibración AFM ₁ (ng mL ⁻¹).....	52
12	Curvas de calibración AFM ₂ (ng mL ⁻¹).....	53
13	Curvas de calibración AFP ₁ (ng mL ⁻¹).....	54
14	Curvas de calibración AFL (ng mL ⁻¹).....	55
	Cromatogramas:	
15	Yema de huevo de la gallina 9 del grupo control del día 1 con AFB ₂ basal (0.1 µg kg ⁻¹).....	67
16	Yema de huevo de la gallina 5 del grupo control del día 4; con AFG ₂ basal (1.17 µg kg ⁻¹), AFB ₁ basal (5.0 µg kg ⁻¹) y AFM ₂ basal (21 µg kg ⁻¹)	67
17	Yema de la gallina 4 alimentada con 30 µg kg ⁻¹ AFB ₁ , del día 3 con AFB ₁ (37 µg kg ⁻¹).....	67

N°	Figuras	Página
18	Yema de huevo de la gallina 8 alimentada con 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$ AFB ₁ , del día 6, con AFM ₁ (3145 $\mu\text{g kg}^{-1}$).....	67
19	Yema de huevo de la gallina 6 alimentada con 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₁ , del día 8 con AFB ₁ (72 $\mu\text{g kg}^{-1}$).....	68
20	Yema de huevo de la gallina 2 alimentada con 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ AFB ₁ , del día 1 con AFB ₁ (30 $\mu\text{g kg}^{-1}$).....	68
21	Clara de huevo de la gallina 8 del grupo control, del día 1 sin AF basales	68
22	Clara de huevo de la gallina 8 del grupo control del día 4 con AF basales AFG ₂ (6 $\mu\text{g kg}^{-1}$), AFG ₁ (112 $\mu\text{g kg}^{-1}$) y AFB ₁ (30 $\mu\text{g kg}^{-1}$).....	68
23	Clara de huevo de la gallina 2 alimentada con 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$ AFB ₁ , del día 1 con AFB ₁ (67 $\mu\text{g kg}^{-1}$).....	69
24	Clara de huevo de la gallina 7 alimentada con 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$ AFB ₁ , del día 5 con AFG ₂ (3 $\mu\text{g kg}^{-1}$) y AFB ₁ (90 $\mu\text{g kg}^{-1}$).....	69
25	Clara de huevo de la gallina 6 alimentada con 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$ AFB ₁ del día 4 con AFM ₁ (1309 $\mu\text{g kg}^{-1}$), AFL (70 $\mu\text{g kg}^{-1}$) y AFB ₁ (117 $\mu\text{g kg}^{-1}$).....	69
26	Clara de huevo de la gallina 8 alimentada con 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$ AFB ₁ , del día 6, con AFP ₁ (490 $\mu\text{g kg}^{-1}$) y AFB ₁ (89 $\mu\text{g kg}^{-1}$).....	69
27	Clara de huevo de la gallina 3 alimentada con 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ AFB ₁ , del día 1 con AFM ₁ (559 $\mu\text{g kg}^{-1}$) y AFB ₁ (23 $\mu\text{g kg}^{-1}$).....	70
28	Clara del huevo de la gallina 1 del 14 de agosto alimentada con 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₁ , donde se recuperó AFB ₁	70
29	Clara de huevo de la gallina 1 alimentada con 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ AFB ₁ , del día 1 con AFB ₁ (59 $\mu\text{g kg}^{-1}$).....	70
30	Clara de huevo de la gallina 2 alimentada con 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ AFB ₁ , del día 1 con AFM ₁ (304 $\mu\text{g kg}^{-1}$) y AFB ₁ (21 $\mu\text{g kg}^{-1}$).....	70
31	Clara de huevo de la gallina 8 alimentada con 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₁ , del día 3 con AFB ₁ (70 $\mu\text{g kg}^{-1}$).....	71
32	Yema de huevo Bachoco Rojo, otoño 2005, con AFB ₁ (5.28 $\mu\text{g kg}^{-1}$).....	71
33	Clara de huevo Calvario blanco, verano 2005 con AFB ₁ (27.9 $\mu\text{g kg}^{-1}$).	71

N°	Figuras	Página
34	Yema de huevo Bachoco blanco, otoño 2005, con AFP ₁ (1050 µg kg ⁻¹).	72
35	Clara de huevo Bachoco blanco, otoño 2005, con AFP ₁ (568.3 µg kg ⁻¹), AFG2 (2.7 µg kg ⁻¹) y AFL (48.15 µg kg ⁻¹).....	72
36	Yema de huevo San Juan blanco, verano 2005, con AFB ₁ (3.7 µg kg ⁻¹)...	72
37	Clara de huevo San Juan blanco, primavera 2005, con AFB ₁ (19.3 µg kg ⁻¹) y AFP ₁ (557µg kg ⁻¹).....	72
38	Análisis de una vía de la media de la Aflatoxina por tratamiento en yema y clara del experimento.....	77

RESUMEN

Se determinó la transferencia de aflatoxina B₁ (AFB₁) del alimento al huevo de gallina y su distribución en yema y clara, identificando y cuantificando las aflatoxinas (AF) en huevos de 3 grupos experimentales de gallinas. El grupo control formado por 9 gallinas con alimento libre de AFB₁; el grupo formado por 8 gallinas con alimento contaminado con 30 µg kg⁻¹ de AFB₁ y el grupo con alimento contaminado con 500 µg kg⁻¹ de AFB₁. Para la extracción química, concentración y purificación de las AF se utilizó el método de Trucksess & Stoloff (1984) acoplado a columnas de inmunoafinidad y para identificar y cuantificar las AF se usó la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). El porcentaje de recuperación de AFB₁ en yema fue 95% y el de clara fue del 91%. Se identificaron 4 AF provenientes del sorgo del alimento: AFB₁, AFB₂, AFG₁, y AFG₂, y 4 metabolitos hidroxilados formados en el hígado de la gallina: AFM₁, AFM₂, AFP₁ y AFL. La yema fue la porción de huevo más contaminada en los tres grupos experimentales en comparación con la clara. En la yema del grupo control, la AFM₁ fue el metabolito más concentrado (21.5 µg kg⁻¹), en el grupo alimentado con 30 µg kg⁻¹ de AFB₁ fue de 100.7 µg kg⁻¹; y en el grupo alimentado con 500 µg kg⁻¹ de AFB₁ la AFP₁ (48.4 µg kg⁻¹) tuvo la mayor concentración. En la clara el grupo control presentó mayor concentración de AFG₁ (4.6 µg kg⁻¹), en el grupo de 30 y 500 µg kg⁻¹ de AFB₁ el metabolito de mayor concentración fue AFM₁ con 81.6 y 35.9 µg kg⁻¹ respectivamente. En términos de AF totales (AFt) el grupo control presentó una concentración de 38 µg kg⁻¹ en el 76% de los huevos; el grupo alimentado con 30 µg kg⁻¹ de AFB₁ presentó 398 µg kg⁻¹ de AFt en el 86% de huevos y el grupo de 500 µg kg⁻¹ de AFB₁ el 100% de los huevos estuvo contaminado con una concentración promedio de 205 µg kg⁻¹ de AFt. Se analizaron 3 marcas de huevo comercial, durante las 4 estaciones del año, con cascarones rojo y blanco. La marca más contaminada por AFt, fue Bachoco blanco (192 µg kg⁻¹), y la mayor contaminación por AFB₁ fue en Bachoco rojo (45.8 µg kg⁻¹). Todas las marcas estuvieron fuera de norma con AFt (µg kg⁻¹): Bachoco rojo (81.2), San Juan blanco (145.8), San Juan rojo (40.8) y Calvario blanco (112.5). Todas las concentraciones de AF encontradas en huevo comercial representan un riesgo para la salud de humanos, cuya cantidad máxima tolerada de AFt en México es de 20 µg kg⁻¹

ABSTRACT

The transfer of AFB₁ from feed to hens' egg and its distribution in yolk and white was determined, identifying and quantifying aflatoxins (AF) in eggs from three experimental groups of hens. The control group consisted of 9 hens fed with AFB₁-free feed, the two other experimental groups of 8 hens, had their feed spiked with two different dosages of 30 and 500 µg kg⁻¹ of AFB₁ respectively. For the chemical extraction, concentration and AF purification the Trucksess & Stoloff (1984) method was used coupled to immunoaffinity columns and for the AF identification and quantification, High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was used. The recovery percentage of AFB₁ in yolk was 95% and from the white was of 91%. The four AF from the feed sorghum were identified (AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂), and four hydroxylated metabolites formed in the hen's liver (AFM₁, AFM₂, AFP₁ and AFL). The yolk was the most contaminated egg portion in the three experimental groups in comparison with the white. In the yolk of the control group, the AFM₁ was the most contaminated hydroxylate (21.5 µg kg⁻¹). In the group treated with 30 µg kg⁻¹ of AFB₁ the yolk contamination was of 100.7 µg kg⁻¹; and finally in the group feed with 500 µg kg⁻¹ AFB₁, the AFP₁ was the most concentrated one (48.4 µg kg⁻¹). In the white the control group had AFG₁ (4.6 µg kg⁻¹) and the metabolite AFM₁ was the most concentrated in the groups of 30 (81.6 µg kg⁻¹) and in the 500 µg kg⁻¹ AFB₁ group (35.9 µg kg⁻¹). In terms of total Aflatoxins (AFt) the control group had 38 µg kg⁻¹ in the 76% of eggs, in the group fed with 30 µg kg⁻¹ AFB₁ the AFt were 398 µg kg⁻¹ in 86% of the eggs and 100% of the eggs of the 500 group was contaminated with an average concentration of AFt of 205 µg kg⁻¹. Three commercial trademarks of eggs, with white and red eggshells, were analyzed during 4 seasons of the year 2005-2006. The most contaminated trademark with AFt was white eggshell Bachoco (192 µg kg⁻¹), and the most contaminated with AFB₁ was red eggshell Bachoco (45.8 µg kg⁻¹). All the trademarks were out of the tolerable limits on respect to AFt (µg kg⁻¹): Bachoco red eggshell (81.2), San Juan white eggshell (145.8), San Juan red eggshell (40.8) and Calvario White eggshell (112.5). All these concentrations represent health risk for humans, as the maximum tolerable amount in Mexico is 20 µg kg⁻¹ of total AF.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. La avicultura

I.1.1. Origen e importancia de la avicultura

La avicultura se originó en el año 3200 AC., cuando pobladores de la India y China iniciaron la domesticación de *Gallus gallus*, las gallinas cruzaron desde Mesopotamia y llegaron a Grecia. Los celtas propagaron por toda Europa a las gallinas primitivas que ponían alrededor de 30 huevos al año. En 1902, la avicultura industrial se inicia con la Exposición Avícola en Madrid, con razas de gallinas ponedoras de todo el mundo, con aceptable nivel de producción donde Salvador Castelló seleccionó razas de gallinas autóctonas catalanas y a quien se le conoce como líder de la avicultura española, a quien se deben la mayor parte de las iniciativas encaminadas a alcanzar el nivel de modernización y desarrollo del que actualmente goza esta importante rama de la Producción Animal. A partir de 1960, surge la avicultura intensiva y la producción de huevos superaba los 7200 millones. En la década de 1990, España ocupó el cuarto lugar en producción entre los países europeos, con 40 millones de ponedoras abasteciendo la demanda del mercado nacional (IEH, 2008a).

I.1.2. La avicultura en México

En México la avicultura es la principal industria transformadora de proteína vegetal en proteína animal. La avicultura tiene una participación muy importante en el Producto Interno Bruto Total, en 2011 aportó el 0.7% al PIB total y en el 38% al PIB pecuario. En la **Tabla 1** se presenta la participación del sector avícola mexicano en la producción pecuaria, (SAGARPA, 2007; UNA, 2011).

La avicultura mexicana productora de huevo y carne es la rama de la ganadería con mayor crecimiento en los últimos años con una tasa de crecimiento anual de 4.5% en la producción de pollo y 3.3% en huevo, dinamismo que ha permitido que México se ubique internacionalmente como el cuarto productor avícola de carne de pollo y sexto en huevo. En 2011 la avicultura generó 1'154,000 empleos. La rama avícola de pollo genera el 60 % de empleos directos e indirectos, el 38% la de huevo y sólo un 2% la de pavo. México

cuenta con una parvada de 477 millones de aves, de las cuales hay 145 millones de gallinas ponedoras, (UNA, 2011).

Tabla 1: Participación de la avicultura en la producción pecuaria 2011 (UNA, 2011).

Producción Pecuaria (%)		
Producto	Ganadería	Avicultura
Res	20.93	
Puerco	13.76	
Caprino	0.51	
Ovino	0.65	
Miel de abeja	0.67	
Pavos		0.15
Huevo		29.52
Pollo		33.80
Total del sector avícola		63.47

I.1.3. Producción y consumo de huevo a nivel mundial y en México

En 2011, México se ubicó como el sexto productor de huevo a nivel mundial, (113 millones de cajas) después de China (1,100 millones de cajas), La Unión Europea (295 millones de cajas), EUA (214 millones de cajas), India (159 millones de cajas) y Japón (118 millones de cajas). La producción mundial de huevo de China significó el 42.1%. Cada caja de huevo consta de 360 unidades (30 docenas de huevos). En la **Tabla 2** se presenta la producción de huevo en México de la última década (UNA, 2011).

Tabla 2: Producción de huevo en México (2001-2011) (UNA, 2011).

Año	Toneladas
2001	2,010,540
2002	2,040,579
2003	2,063,386
2004	2,198,276
2005	2,276,865
2006	2,307,525
2007	2,278,477
2008	2,306,744
2009	2,383,864
2010	2,475,400
2011	2,538,137

En 2011, el 96% de la producción de huevo fue en 7 Estados, localizados cerca de los centros de consumo, **Tabla 3**; el 85% lo producen Jalisco, Puebla, Sonora y la Región Lagunera; quienes siguen siendo las principales zonas productoras desde hace varios años (UNA, 2011).

Tabla 3: Estados productores de huevo (UNA, 2011).

Estados	Participación en la producción (%)
Jalisco	55
Puebla	17
Sonora	8
La Laguna	5
Yucatán	4
Guanajuato	3
Sinaloa	2
Nuevo León	2
Resto	4
Total	100

México es el principal consumidor de huevo fresco en el mundo con 2, 398,000 ton, con 22.4 kg por habitante, cifra relevante en este país con más 112,336,554 personas. (INEGI, 2012). China ha quedado en segundo lugar, seguido de Singapur, Japón, y Colombia. En la **Tabla 4** se compara, además, el consumo a nivel mundial en el año 2006 y 2011 (UNA, 2011; Márquez, 2008).

Tabla 4: Principales consumidores de huevo (2006 y 2010) (*per capita*) (UNA, 2011; Márquez, 2008).

País	Consumo <i>per capita</i> 2006 (Kg)	País	Consumo <i>per capita</i> 2011 (Kg)
México	22.0	México	22.4
China	18.0	China	20.4
Japón	18.8	Singapur	18.8
EUA	17.7	Japón	16.3
Unión Europea	14.2	Colombia	14.5

Los factores que favorecen la preferencia por el consumo de huevo en México son (INA, 2011):

- Más puntos de venta cerca del consumidor.
- Confianza en la calidad de los productos (frescura).

- Incremento de restaurantes de comida rápida.
- Alimento práctico, rápido y versátil en su preparación.
- Producto nutritivo de alta calidad a precios accesibles, lo hace accesible para el ama de casa.

I.1.4. Anatomía y fisiología del huevo de gallina

El huevo de gallina es de los alimentos más completos con gran contenido y variedad de nutrientes: proteína, lípidos, hidratos de carbono, vitaminas y minerales cumpliendo funciones importantes para la salud. Además, da origen a un sector específico de la producción ganadera y la industria alimentaria (Astiasarán & Martínez, 2000; IEH, 2008a y 2008d).

El proceso de formación del huevo, las partes anatómicas, tiempo de permanencia en las mismas y formación de los distintos componentes se representan en la **Figura 1**, (IEH, 2008 b).

Sólo el ovario izquierdo de la gallina es funcional, ya que el derecho tiende a desaparecer.

1. En la ovulación, la superficie del ovario se rompe y el óvulo cae al infundibulum del oviducto y se le llama ovum.
2. Después de permanecer 18 minutos en el infundíbulo, el ovum pasa al mágnum por 3 horas, en esta porción del oviducto se forma el huevo; el ovum se rodea de capas de clara densa, la primera unida a la yema y otra capa externa de clara consistente más extensa, y se forman las chalazas que sostienen a la yema.
3. En seguida, el ovum pasa al istmo, donde permanece una hora; ahí se secretan grandes cantidades de gluconato cálcico, sustancia filamentosa que constituye la membrana testácea, compuesta de dos fárfaras que cubren la clara y que en el polo mayor del huevo se separan del cascarón, para formar la cámara de aire.
4. Luego, el ovum pasa al útero, donde permanece 20 horas y 30 minutos, ahí se secreta una sustancia viscosa impregnada de partículas calizas que envuelven al huevo y constituyen el cascarón. En esta porción del oviducto se regula el contenido salino y acuoso del huevo (penetra la clara acuosa), y se pigmenta el cascarón.

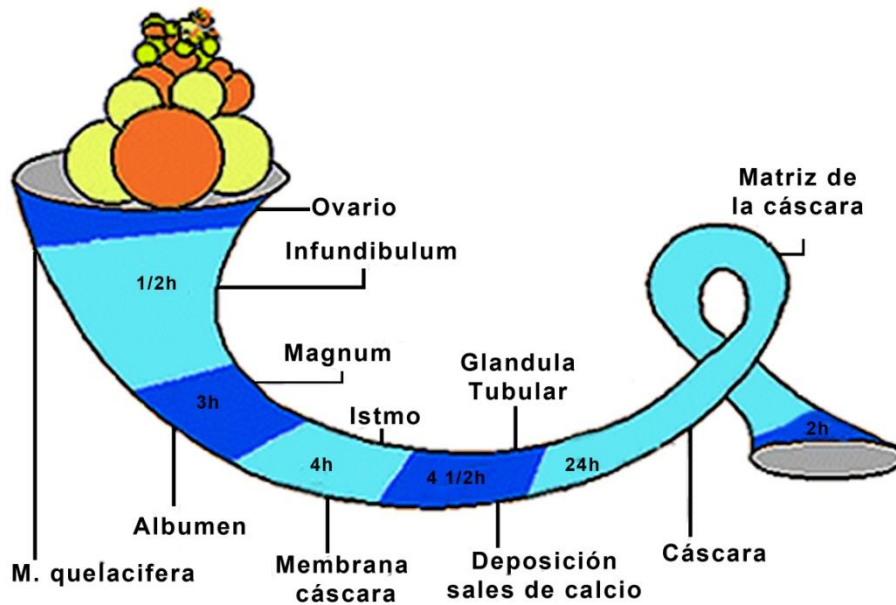


Figura 1: Proceso de formación del huevo (IEH, 2008 b).

5. El huevo de forma oval pasa más tarde a la vagina y finalmente es expulsado al exterior por la cloaca. Finalmente, lo que se produce en 24 horas es un óvulo o un huevo no fértil (IEH, 2008 b).

El peso promedio del huevo es de 60g y sus dimensiones están en la **Tabla 5**.

Tabla 5: Características físicas del huevo (INA, 2008 b).

Característica	Dimensión
Peso promedio	60g
Volumen	53 cm ³
Circunferencia a lo largo	15.7 cm
Circunferencia a lo corto	13.5 cm
Área del cascarón	68 cm ²

En el huevo de gallina, la clara representa el 58.5% (35.1 g) del peso total, la yema el 31.0% (18.6 g) y el cascarón el 10.5% (6.3 g), **Tabla 6**. Al separar cada una de estas partes, se producen pérdidas que se aproximan al 0.3% (INA, 2008b; IEH, 2008c).

Tabla 6: Proporción porcentual de las partes del huevo (INA, 2008 b; IEH, 2008 c)

Proporción	Contenidos sólidos (%) (INA, 2008b)	Contenidos sólidos (%) (IEH, 2008c)
Huevo entero	100	100
Cascarón	10.5	11,5
Yema	31.0	30,9
Clara	58.5	57,3
Porción comestible	89.5	No reportado

El corte transversal de un huevo de gallina permite diferenciar sus partes fundamentales, **Figura 2** (IEH, 2008c).

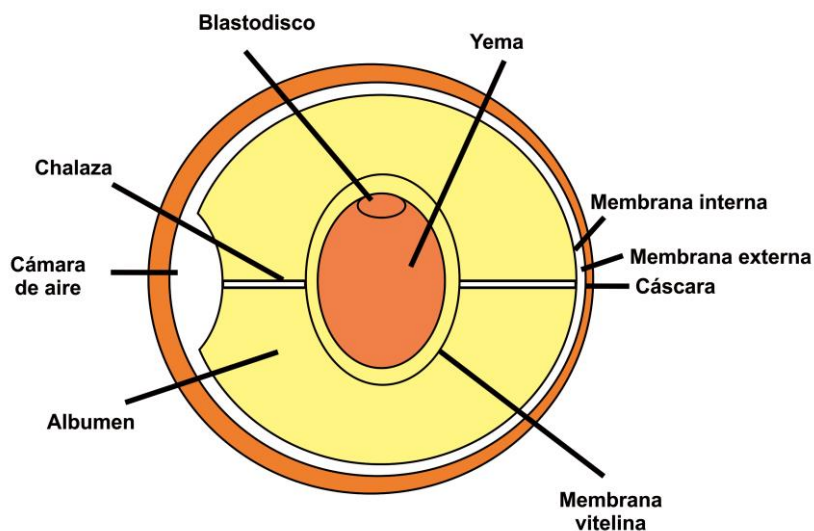


Figura 2: Corte transversal y partes del huevo (IEH, 2008 c).

La albúmina o clara es una solución viscosa (coloidal), que rodea a la yema y se encuentra contenida entre las membranas del cascarón. Se distinguen tres capas: dos densas y una acuosa. La clara densa va perdiendo su consistencia al transcurrir el tiempo después de haber sido puesto el huevo, y por lo tanto va perdiendo también su capacidad de mantener a la yema en la posición central normal. Con el paso del tiempo la clara espesa se transforma en fluida y el pH se incrementa de 7.6 a 9.3 (INA, 2008b). La clara está constituida por 88% agua, 11% proteínas, 1% carbohidratos y 0.5% minerales. Se trata de una solución de proteínas globulares con fibras de ovomucina, con más de treinta

proteínas diferentes y ricas en aminoácidos esenciales. Tres glucoproteínas suman más del 80% de proteínas en la clara de huevo (INA, 2008 b).

La yema, es la porción amarilla del huevo, está recubierta por la membrana vitelina que la separa de la clara y la protege de una posible ruptura. El color está determinado por la dieta de la gallina, y puede presentar una mancha rojiza, o disco germinativo, que origina al pollo en caso de los huevos fecundados. Son diferentes tipos de partículas suspendidas en una solución proteica. La cantidad de proteína sobre sustancia seca es de 31.1% y la de grasa del 65.8%, con gran cantidad de lipoproteínas de baja densidad (LDL) ricas en colesterol. La fase continua (78%) está formada por un extracto seco de proteínas globulares y LDL, mientras que la fase dispersa (20%) tiene proteínas globulares y lipoproteínas de baja densidad (HDL). La principal proteína de la yema es la vitelina (INA, 2008 b).

El cascarón es la primera barrera de defensa del huevo, lo contiene y transporta, excluye patógenos y microbios y soporta al desarrollo embrionario, es poroso, con 7,000 a 17,000 poros, actúa como un revestimiento. Está constituido por carbonato de calcio (94%) como componente estructural, con pequeñas cantidades de carbonato de magnesio y fosfato de calcio (Astiasarán & Martínez, 2000; INA, 2008 b).

El color del cascarón, lo determina la raza de la gallina (blancos o marrones), **Tabla 7**, pero el valor nutricional del huevo, su sabor, grosor del cascarón, las características culinarias, y su calidad son iguales (INA, 2008c).

Tabla 7: Líneas genéticas de gallina, para la producción de huevo (INA, 2008 c).

HUEVO BLANCO		HUEVO ROJO	
Raza de gallina	Participación	Raza de gallina	Participación
Babcock	40%	Hisex Brown	4%
Hy Line	28%	Babcock B-380	2.5%
Dekalb XL	15%	Rhode Island Red	2%
Shaver White	7%	Hy Line Brown-36	1%
		Dekalb XL-36	0.5%
Subtotal	90%	Subtotal	10%

I.1.5. Composición y propiedades nutricionales del huevo

Una dieta equilibrada tiene todos los macro y micronutrientes (hidratos de carbono, proteínas, lípidos o grasas, vitaminas y minerales), en proporciones y cantidades adecuadas. El huevo aporta 70 calorías y provee proteína de alta calidad nutricional, el mejor perfil de aminoácidos y de fácil digestión. Las proteínas del huevo son tan buenas que la Organización Mundial de la Salud las propuso como patrón de referencia para determinar la calidad proteica de otros alimentos, además de tener vitaminas y minerales, es un alimento natural y "envasado en origen" (Astiasarán & Martínez, 2000; IEH, 2007; INA, 2008 d).

Una clara de huevo grande aporta alrededor de 17 calorías, el mejor perfil proteico y numerosas vitaminas y minerales. La yema aporta alrededor de 59 calorías, con 4 a 4.5 g de grasa por unidad, de las cuales 1.5 g son grasa saturada y el resto insaturada (predominando las monoinsaturadas, benéficas para el organismo), con vitaminas A, E y D en la yema y cantidad importante de minerales (Hierro, Fósforo y Zinc) (INA, 2008 d). En la **Tabla 8** se presenta la composición nutricional del huevo.

La colina es una amina secundaria saturada, contenida en la yema (la clara presenta sólo trazas), y que influye en el desarrollo de la memoria durante la etapa embrionaria y es un componente esencial de la dieta para el funcionamiento de todas las células (INA, 2008 d). La principal proteína de la yema es la vitelina, y también tiene fosfivitina (4%), proteína con grandes cantidades de fósforo, rica en serina (30%), y fija fácilmente el hierro; lipovitelina (68%): es una proteína alta en azufre, lipoproteína de alta densidad (HDL) rica en cisteína, presenta un 20% de lípidos (dos tercios de fosfolípidos y uno de colesterol, lípidos neutros y triglicéridos); lipovitelina (16%): es una lipoproteína de baja densidad pobre en cisteína, presenta un 88% de lípidos (un tercio de fosfolípidos y dos de lípidos neutros y colesterol), contienen restos glucídicos, hexosas y ácido neuramínico; livitelina (10%): proteínas globulares alfa, beta, gamma; ovovitelina: rica en aminoácidos fosforilados y azufrados (INA, 2008 b).

La vitelina está en la fase acuosa de la yema, se encuentra dispersa sólo en pequeña cantidad. Las proteínas y grasas están en partículas suspendidas ó gránulos (INA, 2008 b).

Tabla 8: Composición nutricional del huevo entero, clara y yema, por 100 g (Astiasarán & Martínez, 2000).

HUEVO DE GALLINA (composición por 100 g de porción comestible)			
Ingrediente	Huevo entero	Clara	Yema
Porción comestible	88	100	100
Energía (kcal)	167	55	377
Agua (g)	74.1	87.3	50
Proteínas (g)	12.9	11.1	16.1
Hidratos de carbono (g)	0.5	0.7	0.3
Lípidos (g)	11.2	0.2	31.9
Ácido palmítico (g)	2.3	---	6.5
Ácido esteárico (g)	0.8	---	2.2
Ácido oleico (g)	4.2	---	11.7
Acido linoleico (g)	1.35	---	3.8
Acido linolénico (g)	0.07	---	0.21
Ácido araquidónico (g)	0.07	---	0.21
AGP ¹ (g)	1.2	---	4.5
AGM ² (g)	4.4	---	13
AGS ³ (g)	3.5	---	8.8
Colesterol (mg)	400	0	1170
Minerales		11	
Calcio (mg)	56	21	140
Fósforo (mg)	210	12	590
Magnesio (mg)	13	0.2	16
Hierro (mg)	2.1	0.02	702
Zinc (mg)	1.4	6.8	3.8
Yodo (µg)	6.9	7	7
Selenio (µg)	10.4		30
Vitaminas			
A (µg)	0.22	---	0.3
D (µg)	1.8	---	2.5
E (µg)	1.1	---	3.1
B ₁ (mg)	0.1	0.022	0.3
B ₂ (mg)	0.3	0.3	0.4
B ₆ (mg)	0.12	0.012	0.3
B ₁₂ (mg)	1.2	0.1	2
C (mg)	65	16	150
Ácido fólico (µg)	25	7	50
Biotina (µg)	---	0.3	0
Nicotinamida (µg)	83	65	90
Ácido Pantoténico (mg)	1.6	0.14	3.72

¹ AGP= ácidos grasos o poliinsaturados.

² AGM= ácidos grasos monoinsaturados.

³ AGS= ácidos grasos saturados.

Entre otras ventajas, el huevo contiene dos carotenoides llamados luteína y zeaxantina (xantófilas) que intervienen en la salud visual pues previenen el riesgo de cataratas y la degeneración macular relacionada con la edad), y que podrían prevenir la ceguera en los adultos mayores (Moeller *et al.*, 2000).

a. El huevo como fuente de anticuerpos

Los anticuerpos favorecen, estimulan o mantienen la respuesta inmune frente a determinados procesos infecciosos. La inmunoglobulina IgY extraída del huevo tiene ventajas mayores que la de la sangre de los mamíferos (IEH, 2008 d). La clara contiene concentraciones bajas de anticuerpos IgA y de IgM, mientras que en la yema la concentración del anticuerpo IgG es elevada (25 mg mL^{-1}). Los principales componentes de la fracción soluble en agua de la yema del huevo son las livetinas, con tres variedades (α alfa, β beta, y γ gamma) (IEH, 2007).

b. Antioxidantes del huevo

La riqueza del huevo en fosfolípidos, lecitinas y sustancias antioxidantes, como el selenio (Se) y la vitamina E, ó la presencia en la yema de carotenoides muestran la importancia del huevo como alimento antioxidante (IEH, 2007). El selenio del huevo favorece la acción antioxidante de la vitamina E a nivel tisular, oligoelemento relacionado con la prevención de ciertos tipos de cáncer, y que enriquece su valor nutritivo (IEH, 2007).

I. 2. Las micotoxinas

I.2.1. Definición, historia e importancia

La palabra micotoxina deriva del griego *mikes*= hongo y *toxina*= veneno. Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos producidas por hongos filamentosos desarrollados en productos vegetales y pueden contaminar diversos sustratos, incluyendo los alimentos, que al ser ingeridos por humanos y animales causan intoxicaciones denominadas *micotoxicosis* (Vaamonde, 1995; Gilbert, 2002; Binder 2007 b), además de causar pérdidas económicas en las cosechas de granos (García & Heredia, 2006).

Los hongos requieren nutrientes para crecer, como son los ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos y lípidos principalmente, y su uso se asocia con la fase exponencial de rápido crecimiento. Los metabolitos secundarios son una serie de compuestos no esenciales para el crecimiento y fisiología del hongo (Soriano del Castillo, 2007; Vaamonde, 1995), y dentro de este grupo, se encuentran los antibióticos y las micotoxinas. Las micotoxinas son moléculas pequeñas ($P_m < 700$) que se suelen formar cuando la fase de crecimiento de los hongos micotoxicogénicos llega a su etapa final y al principio de la fase estacionaria (Soriano del Castillo, 2007) (**Figura 3**).

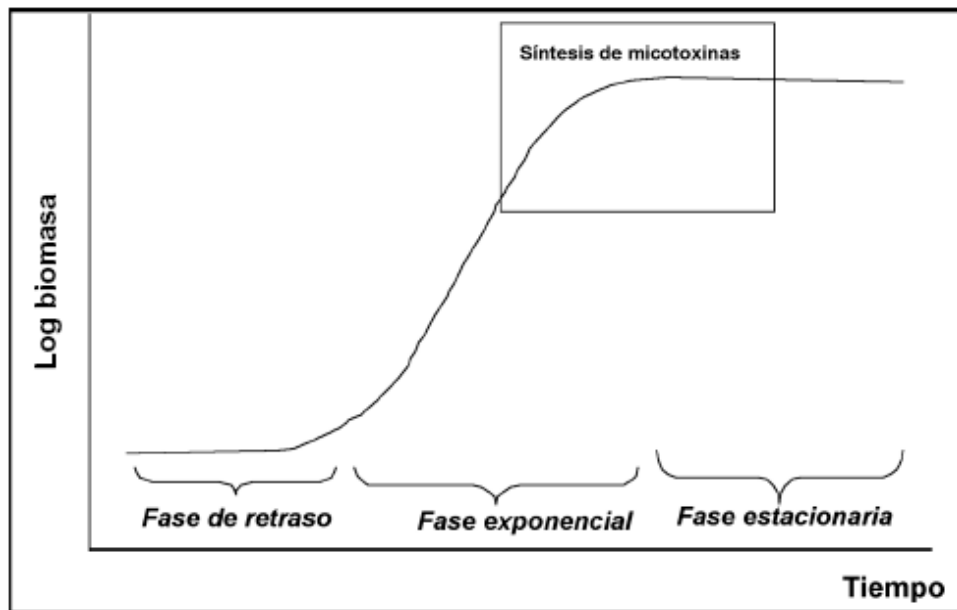


Figura 3: Fases de crecimiento fúngico y localización de la síntesis de micotoxina (Soriano del Castillo, 2007).

Desde la Edad Media en Europa se reportan casos de micotoxicosis, como es el ergotismo producido por ingestión de centeno contaminado por el hongo *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. Los brotes de ergotismo, *Fuego de San Antonio*, dieron lugar durante siglos a epidemias, de origen desconocido, provocadas por los alcaloides Ergotamina y Ácido Lisérgico Dietilamida (LSD), producidos por este hongo, que devastaron Europa Occidental (Soriano del Castillo, 2007).

En Rusia, en 1932, hubo una micotoxicosis en humanos con 60% de mortalidad debida al consumo de granos enmohecidos de cereales por *Fusarium sporotrichioides* Sherb. y *F. poae* (Pk.) Wr. productores de tricotecenos, que provocó la muerte de millones

de rusos de Siberia en el distrito de Orenburgo. En sus orígenes se confundió con la escarlatina, difteria, pelagra e incluso escorbuto, pero fue hasta 1943 cuando el gobierno ruso lo nombró Aleucia Tóxica Alimentaria (ATA) (Joffe, 1950).

Otro ejemplo de micotoxicosis sucedió en 1960 cuando Gran Bretaña importó harina de cacahuete de Brasil, y que al ser ingerida por aves, mató a 100,000 pavos, patos y otros animales domésticos a causa de una enfermedad conocida como “Enfermedad X de los pavos”, causada por las aflatoxinas de los hongos *Aspergillus parasiticus* y *A. flavus* (D’Mello & Macdonald, 1997; Jaimez *et al.* 2000; Soriano del Castillo, 2007).

I.2.2. Especies de hongos productores de micotoxinas

Las especies toxicogénicas más importantes pertenecen a tres géneros de hongos: *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, contaminantes frecuentes de los alimentos. Los hongos producen toxinas en el cultivo en el campo, en la cosecha, almacén, transporte, procesado, en los alimentos y piensos. La ausencia de hongos toxicogénicos no garantiza que el alimento esté libre de micotoxinas, pues las toxinas pueden persistir aún cuando el hongo haya muerto (Vaamonde, 1995; Binder, 2007b) (**Tabla 9**).

Los efectos tóxicos de las micotoxinas varían según su estructura química, concentración, duración de exposición, y especie afectada (sexo, edad y susceptibilidad).

La micotoxicosis aguda es generalmente un problema de salud animal, ya que los alimentos deteriorados por hongos se desechan o se destinan a consumo animal. El hombre sufre más toxicidad crónica, asociada al consumo de pequeñas cantidades de micotoxinas durante periodos prolongados (Soriano del Castillo, 2007). Hay efectos crónicos en humanos, observados por el consumo de alimentos contaminados con micotoxinas (Aflatoxinas, ocratoxina A, fumonisina, patulina) en forma prolongada y en trazas (Kovács, 2004; Denli & Pérez, 2006) (**Tabla 9**).

Tabla 9. Micotoxinas involucradas en micotoxicosis (Vaamonde, 1995).

Micotoxina	Micotoxicosis	Hongo productor	Especies afectadas	Efectos biológicos
Alcaloides del ergot	Ergotismo	<i>Claviceps purpurea</i>	Hombre, ganado, caballos	Ataxia (forma nerviosa o gangrenosa)
Aflatoxinas	Aflatoxicosis	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomius</i>	Hombre; aves (pato, pavo, pollo); peces (trucha); mamíferos (cerdo, bovino, gato, oveja, y mono).	Hepatotoxicidad aguda, hiperplasia de conductos biliares, hepatocarcinoma hemorragia intestinal.
Ocratoxina A	Ocratoxicosis; nefropatía porcina	<i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Penicillium verrucosum</i>	Hombre, cerdos, pavos, pollos, caballos.	Nefropatía, tumores intestinales, daño hepático, enteritis, teratogénesis, nefropatía
Citrina		<i>Penicillium citrinum</i> <i>P. verrucosum</i>	Cerdos	Nefropatía.
Zearalenona	Hiperestrogenismo	<i>Fusarium graminearum</i> <i>F. culmorum</i>	Cerdos	Síndrome estrogénico, vulvovaginitis, prolapso rectal o vaginal
Tricotecenos: Deoxinivalenol (vomitoxina ó DON)	Fusariotoxicosis	<i>F. graminearum</i> <i>F. sporotrichioides</i> <i>F. tricinctum</i> , <i>F. poae</i>	Hombre, ganado, aves	Rechazo del alimento, náuseas, hemorragias, leucopenia, vómitos, inmunosupresión, diarrea.
Toxina T-2 Diacetoxiscirpenol (DAS)	Leucopenia tóxica alimentaria (ATA)	<i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. poae</i>	Hombre, ganado	Leucopenia, inflamación, hemorragia, angina necrótica, muerte

1.2.3. Factores ambientales en la producción de micotoxinas

La temperatura, humedad, pH y el daño por insectos son factores ambientales que favorecen la diseminación y crecimiento del hongo y la producción de micotoxinas. La actividad de agua óptima para la proliferación de *Aspergillus spp.* es alta (± 0.82 a 0.99), y la temperatura de desarrollo está entre 12 y 40 °C siendo el óptimo alrededor de 37 °C, sin embargo, la mayor producción de toxinas se alcanza a una temperatura de 27 a 33 °C. Por esto los problemas asociados a AFB₁ son más frecuentes en climas tropicales (Denli & Pérez, 2006) (Tabla 10).

Tabla 10. Condiciones de producción de micotoxinas por hongos (Denli & Pérez, 2006).

Especie	Temperatura °C		pH		Actividad agua (a _w)	
	Rango	Mayor producción de toxina	Rango	Mayor producción de toxina	Rango	Mayor producción de toxina
<i>Aspergillus spp</i>	12 a 40	27 a 33	2.2 a 8.0	5 a 6	0.77 a 0.88	0.82 a 0.99
<i>Fusarium spp</i>	0 a 31	22 a 28	2.0 a 6.0	3 a 4	0.85 a 0.97	0.85 a 0.87
<i>Penicillium spp</i>	-3 a 40	15 a 30	2.1 a 10.0	5 a 7	0.80 a 0.95	0.80 a 0.86

I.3. Las Aflatoxinas (AF)

I.3.1. Definición e importancia

Las AF son micotoxinas, son alrededor de 15 metabolitos secundarios derivados de las difurano cumarinas que contaminan alimentos de consumo animal y humano. Las AF pueden ser producidas por tres especies del hongo *Aspergillus* que son *A. flavus*, *A. parasiticus* y la poco común *A. nomius* (Vaamonde, 1995; Sweeney & Dobson, 1999; Jaimez *et al.*, 2000; Creppy, 2002; Unusan, 2006).

Las AF son el grupo de micotoxinas más importantes en alimentos (Sweeney & Dobson, 1999), pertenecen a cancerígenos humanos comprobados, clasificados como Clase 1 por la Agencia Internacional para la Investigación sobre Cáncer (IARC, 2002).

Las AF contaminan los granos de oleaginosas, cereales y especias, pasando a los alimentos balanceados de animales domésticos y a sus productos derivados como son huevo, carne y leche, que al ser ingeridos por el hombre pueden causarle problemas de salud (Trucksess *et al.*, 1983; Trucksess & Stoloff, 1984).

I.3.2. Estructura, tipos y propiedades fisicoquímicas

Estructura. Las AF son una serie de compuestos policíclicos que químicamente corresponden a bis-dihidro-furano cumarinas (**Figura 4**).

Tipos. De acuerdo con su característica de fluorescencia azul (**Blue**) o verde (**Green**) al iluminarlas con luz ultravioleta, recibieron los nombres de Aflatoxinas B y G (Vaamonde, 1995; Shibamoto & Bjeldanes, 1996).

Las cuatro principales aflatoxinas son B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁) y G₂ (AFG₂), son derivados de difuranocumarinas. *A. flavus* produce sólo Aflatoxinas **B**, mientras que las especies *A. parasiticus* y *A. nomius* producen ambas Aflatoxinas **B** y **G** (Sweeney & Dobson, 1999; Creppy, 2002; Unusan, 2006).

También se han aislado sus derivados hidroxilados que han recibido los nombres de aflatoxinas M₁ (AFM₁), M₂ (AFM₂), P₁ (AFP₁), Q₁ (AFQ₁) y aflatoxicol (AFL).

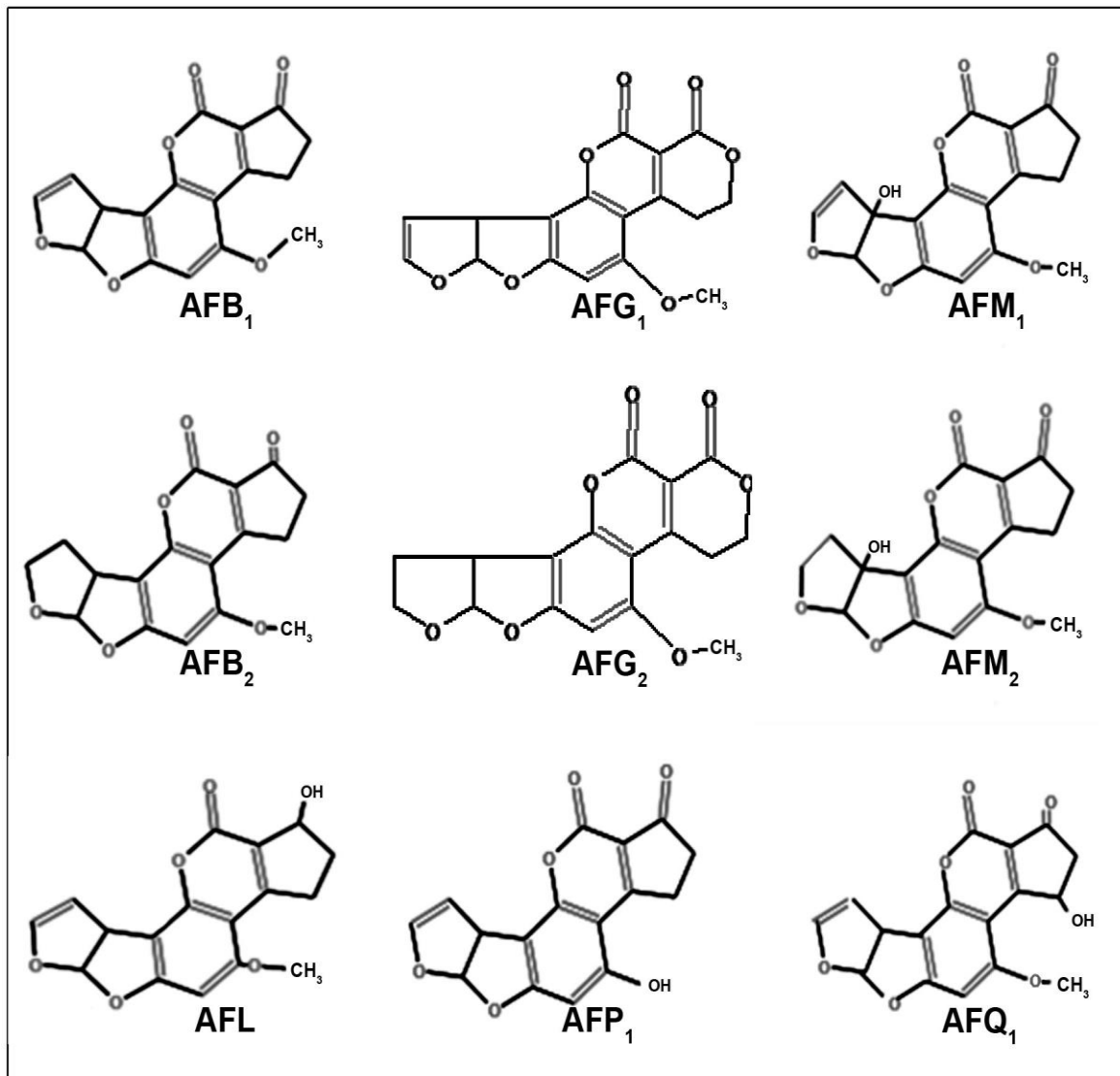


Figura 4: Fórmulas químicas de las Aflatoxinas (Soriano del Castillo, 2007).

Propiedades fisicoquímicas. Las AF son liposolubles, termo-resistentes, e inestables a la luz ultravioleta de onda larga. Algunas de sus propiedades se detallan en la **Tabla 11** (Shibamoto & Bjeldanes, 1996; Sweeney & Dobson, 1999).

Tabla 11. Propiedades físicas y químicas de algunas Aflatoxinas y sus metabolitos (OPS, 1983).

AF	Fórmula molecular	Masa molecular relativa	Temperatura de fusión (°C)	Absorción ultravioleta (ϵ) ^c		Emisión de fluorescencia (nm)
				265nm	360-362 nm	
B ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	269-269	12400	21 800	425
B ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	286-289	12100	24 000	425
G ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	244-246	9600	17 700	450
G ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	237-240	8200	17 100	450
M ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	299	14150	21 250 (357nm)	425
M ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	293	12100 (264nm)	22 900 (357nm)	--- ^b
P ₁	C ₁₇ H ₁₀ O ₆	298	>320	11200 (267nm)	15 400 (362nm)	--- ^b
				14900 (342 nm)		
Q ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	--- ^a	11450 (267nm)	17 500 (366 nm)	--- ^b
Aflatoxicol	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	230-234	10800 (261nm)	14 100 (325 nm)	425

^a No disponible

^b Fluorescencia violeta de AF M₂ y fluorescencia amarillo-verdosa de AF P₁ y Q₁.

^c Compuestos disueltos en metanol, salvo por la AF P₁ que, en este caso, se disolvió en etanol.

I.3.3. Metabolismo de las Aflatoxinas

El metabolismo de la AFB₁ se ha estudiado en muchas especies y bajo condiciones distintas. La AFB₁ se transforma, al menos, en siete metabolitos, incluidos uno inestable, el epóxido 8,9 que es el denominado última forma cancerígena (**Figura 5**). (Derache, 1990; Shibamoto & Bjeldanes, 1996).

Por simple hidroxilación en la posición 2, se genera un hemiacetal, la AFB₂, éste derivado aparentemente es inestable. Otra hidroxilación en la posición 4, da como resultado un la AFM₁. Las AFM₁ y AFM₂ son los metabolitos hidrolizados de las Aflatoxinas B₁ y B₂ (Creppy, 2002). La AFQ₁ se forma por hidroxilación del carbono de la función carbonilo de la ciclopentanona. La desmetilación de la AFB₁, forma un fenol, la AFP₁.

Finalmente tenemos el AFL, que se forma de la reducción de la ciclopentanona de la AFB₁, esta reacción está catalizada por una enzima soluble presente en el tejido de ciertas especies animales (Derache, 1990).

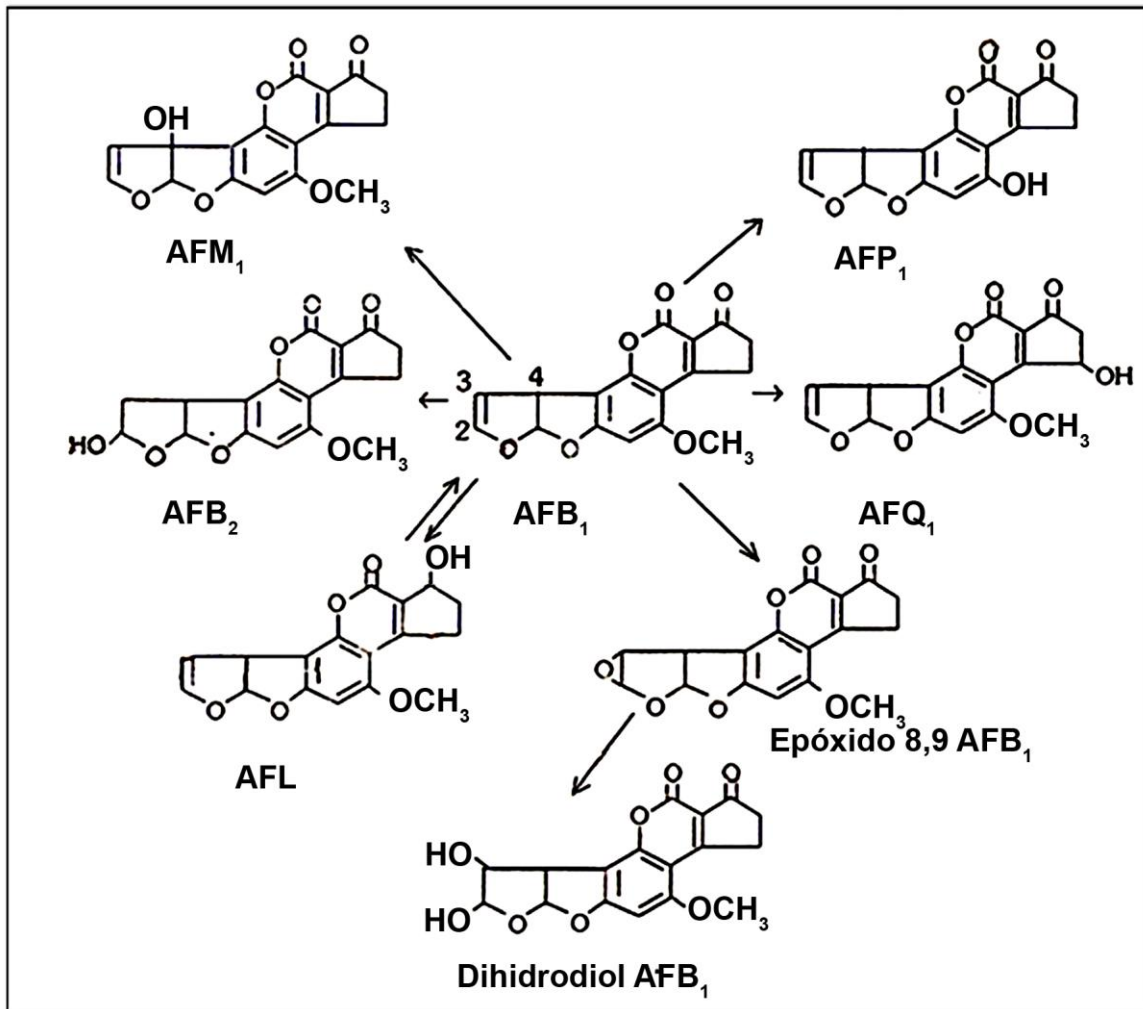


Figura 5. Metabolismo de la AFB₁ (Derache, 1990).

El hígado biotransforma a la AFB₁ como reacción de desintoxicación, generando los hidroxilados AFM₁, AFQ₁, AFB₂, AFP₁ y AFL, que al contener al grupo hidroxilo, se pueden diluir en agua y se excretan por orina, leche y bilis, o bien se distribuyen en forma sistémica en la sangre, **Figura 5**.

I.3.4. Toxicidad de las Aflatoxinas

Las AF son el grupo de micotoxinas más importantes y frecuentes en alimentos de consumo humano y animal (Sweeney & Dobson, 1999) por el hecho de que son cancerígenos probados y clasificados en la Clase 1 de cancerígenos humanos por la

Agencia Internacional para la Investigación sobre Cáncer (IARC, 2002) (**Tabla 12**) (Park & Liang, 1993; Chiavaro *et al.*, 2001; Binder, 2007 b). Las AF tienen actividad tóxica, son cancerígenas, mutágenas, teratógenas e inmunosupresoras para la mayoría de las especies animales (Chiavaro *et al.*, 2001). El hígado es el órgano blanco para las AF, y los segundos en ser afectados son el riñón y el sistema inmunológico (Gimeno, 2004).

Tabla 12. Clasificación de micotoxinas según su toxicidad (Binder, 2007 b).

Principales clases de micotoxinas	Micotoxinas más relevantes en granos y alimento animal	Hongos productores	Efectos observados en animales
Aflatoxinas	Aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	<i>Aspergillus flavus</i> ; <i>A. parasiticus</i>	En hígado (hepatotóxico), mutagenicidad, efectos cancerígenos y teratógenos.
Tricotecenos	Deoxinivalenol, Nivalenol, Fusarenona X, Toxina T-2, Diacetoxiscirpenol	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. sporotrichioides</i> ; <i>F. poae</i> ; <i>F. equiseti</i>	Efectos inmunológicos, edema, cambios hematológicos, desórdenes digestivos, dermatitis, hemorragias del tejido intestinal.
Zearalenona	Zearalenona	<i>Fusarium graminearum</i>	Atrofia de ovarios y testículos, síndrome estrogénico en cerdas, aborto.
Ocratoxinas	Ocratoxina A	<i>Aspergillus ochraceus</i> ; <i>Penicillium verrucosum</i> , <i>P. viridicatum</i> .	Daño al hígado, e inmunosupresión
Alcaloides del ergot	Ergotmetrina, ergosina, ergotamina, clarines.	<i>Claviceps purpurea</i> , <i>C. paspali</i> , <i>C. fusiformis</i>	Síndrome gangrenoso, nervios.
Fumonisina	Fumonisina B ₁ , B ₂ , B ₃	<i>Fusarium verticillioides</i> , <i>F. proliferatum</i>	Edema pulmonar en cerdos, leucoencefalomalacia en equinos, hepatotoxicidad, nefrotoxicidad.

Las AF se unen a los ácidos nucleicos, DNA y RNA; la AFB₁ se une al ADN, por el nitrógeno 7 de la guanina, con lo que se interrumpe la transcripción y disminuye la síntesis de ARN y de proteínas, y puede producir a una mutación o iniciación de cáncer (Vaamonde, 1995; Lindner, 1995).

La AFB₁ es el hepatocancerígeno más potente conocido en mamíferos (Sweeney & Dobson, 1999; Creppy, 2002; Binder 2007 b). Este efecto se ha demostrado en ratas, pato, trucha arco iris y mono rhesus (OPS, 1983). Aunque la AFB₁ causa principalmente carcinoma hepatocelular, también se ha reportado en varias líneas de ratas el adenocarcinoma renal. Otros tejidos afectados son la tráquea y se ha reportado que la AFB₁ se absorbe lentamente por piel, aunque esta absorción se ve afectada por la concentración, el solvente, la solubilidad y la especie (Shibamoto & Bjeldanes, 1996).

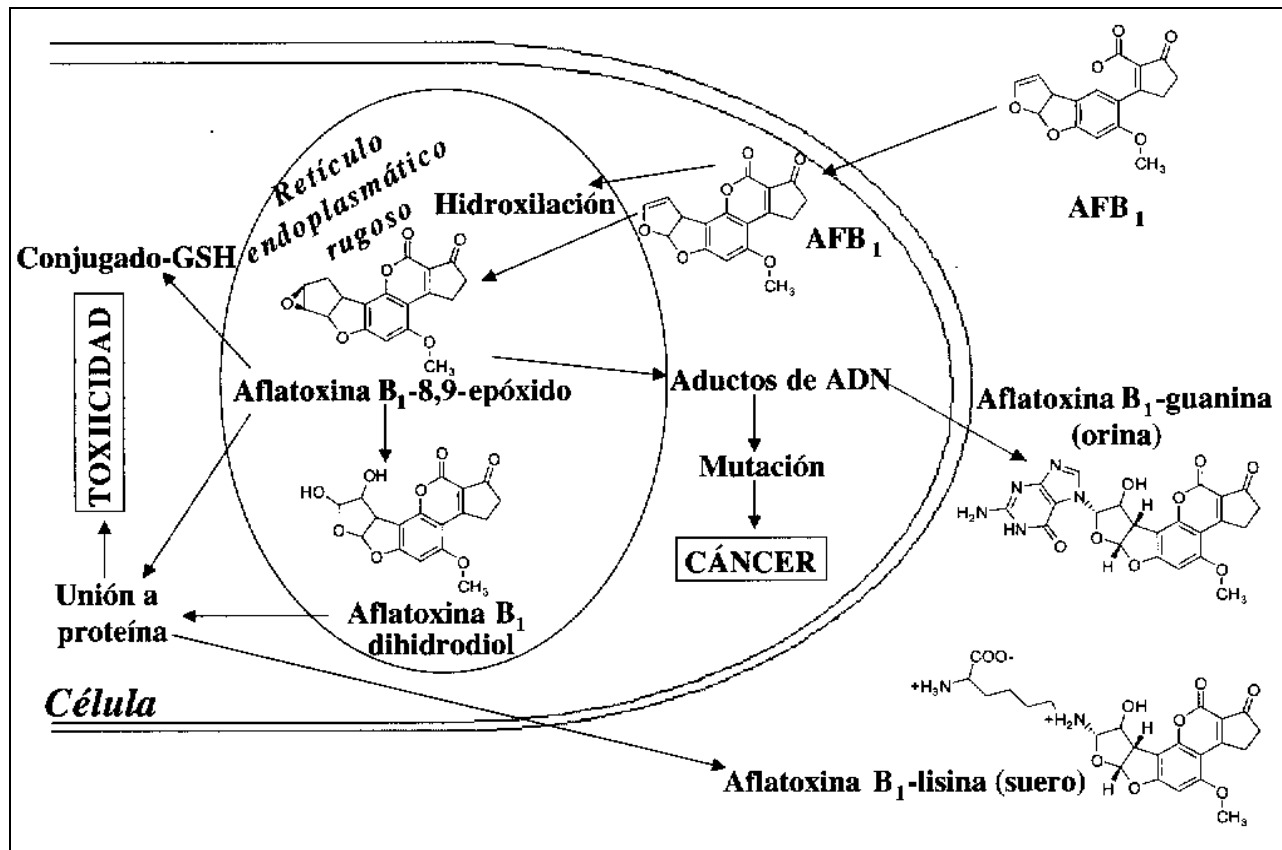


Figura 6. Mecanismo de acción de la AFB₁ (Juan *et al.*, 2007).

La AFB₁ sufre una doble hidroxilación en las posiciones 2 y 3 en el doble enlace, obteniéndose la AFB₁ dihidrodiol (AFB₁ DHD) más soluble. Esta transformación pasa por el epóxido de la AF, compuesto altamente electrofílico capaz de aceptar electrones, que puede unirse covalentemente a polímeros (ADN, ARN o proteínas) (Derache, 1990). Cuando la AFB₁ se une al ADN se forman aductos AFB₁-ADN que son los cancerígenos y mutágenos activos, biomarcadores de riesgo de cáncer por su unión con el N⁷-de la guanina del ADN. El hígado es el órgano que forma y acumula más aductos AFB₁-ADN (Figura 6).

Los efectos tóxicos de las AF en animales son de dos tipos: agudo y crónico. Los síntomas agudos son hemorragias, vómitos, dolor abdominal, diarrea, fiebre, etc. Entre los síntomas crónicos tenemos: hepatitis aguda, ictericia, cirrosis, fiebre, depresión, falta de apetito, cánceres, síndrome de Reye, Kwashiorkor y marasmo, estos tres últimos síntomas son formas de desnutrición aguda, etc. ambos síntomas agudos y crónicos pueden causar la muerte.

Los síntomas agudos y crónicos varían con la especie, edad y sexo y los patitos son la especie más sensible a las AF, y en ellos se basa la legislación mundial, ya que $21 \mu\text{g kg}^{-1}$ (partes por billón-ppb-) causan proliferación de conductos biliares, y se consideró que 20 ppb eran seguras en alimentos para el hombre, aves y vacas lecheras (Carvajal, 1994). En la **Tabla 13** se muestra el poder tóxico de la AFB₁ en diferentes animales.

Tabla 13: Letalidad de dosis únicas de AFB₁ (Shibamoto & Bjeldanes, 1996).

Animal	Edad	Sexo	LD ₅₀ (mg kg ⁻¹ de peso corporal)
Patito	1 día	M	0.37
Rata	1 día	M-H	1.0
Rata	21 días	M	5.5
Rata	21 días	H	7.4
Hámster	30 días	M	10.2

La trucha también es una especie susceptible a las AF, mientras las hembras de rata son relativamente resistentes (Shibamoto & Bjeldanes, 1996).

I.3.5. Impacto económico

El mayor impacto económico por contaminación de micotoxinas es la disminución de la producción de alimentos y pérdidas en ganado avícola, porcícola y bovino. La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), estima que más del 25% de la producción de alimentos en el mundo está contaminada por micotoxinas, incluyendo AF (Liu *et al.*, 2006; Denli & Pérez, 2006).

Cuando los hongos crecen en los cereales, producen ahí sus toxinas, los contaminan y esto es de importancia mundial por su elevado consumo por animales y el hombre (Denli & Pérez, 2006).

Aspergillus flavus es un moho normal de la micoflora del aire y del suelo de todo el planeta y daña al trigo, maíz, arroz, cebada, salvado, harina y semillas de soya. Este moho crece en productos en almacén con baja humedad relativa y esto impide el desarrollo de especies competidoras, como *Penicillium* y *Fusarium* (Shibamoto & Bjeldanes, 1996).

Los granos y alimentos contaminados con AF, representan un peligro 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, como la reducción en la producción de los animales, huevos, leche, falta de efecto de vacunas, inmunodepresión, falta de crecimiento y de peso (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.*, 2002; Abdolamir-Allameh *et al.*, 2005). **Tabla 14.**

Tabla 14. La AFB₁ y sus efectos en los animales domésticos (Denli & Pérez, 2006).

Micotoxina	Animales	Efectos observados
AFB ₁	Aves	Disminución del crecimiento, producción, peso y calidad de los huevos. Presencia de residuos de AFB ₁ y AFM ₁ en huevos y carne. Reducción de la inmunología e incremento en la mortalidad.
	Cerdos	Disminución del crecimiento, consumo, eficiencia de la utilización del alimento. Inmunosupresión, incremento en la incidencia de otras enfermedades, diarrea, desajustes reproductivos y mortalidad.
	Vacuno, ovino y caprino lechero	Reducción en crecimiento y la producción de leche, presencia de AFM ₁ en leche.
	Otros rumiantes	Reducción en el consumo, crecimiento y respuesta inmune.

I.4. Métodos de análisis para micotoxinas y aflatoxinas

La mayoría de los métodos analíticos detectan una micotoxina o una clase de ellas con un número limitado de analitos químicamente relacionados. La cromatografía es uno de los métodos físico-químicos de separación más utilizados en el mundo, ya que cubre todos los campos de análisis en las ciencias. El primer uso que tuvo esta técnica de separación fue realizada por el químico ruso Tswett, quien en 1903 separó extractos vegetales coloreados. La cromatografía líquida de alta eficiencia (High Performance Liquid Chromatography = HPLC) y la cromatografía de gases (CG), son los sistemas de elección para obtener resultados sensibles, confiables y reproducibles. La mayor desventaja del análisis de micotoxinas por CG, es la necesidad de derivatización, que requiere mayor tiempo de análisis y puede inducir a mayor error, por esto, la CG ya casi no se usa

(Binder, 2007a). Los métodos para determinar multitoxinas utilizando HPLC-MS (MS-espectrómetro de masas) son cada vez más importantes. La espectrometría de masas con HPLC puede determinar más de 40 micotoxinas en una sola corrida, aunque esta técnica está limitada por los efectos de las matrices durante la ionización producida en el MS (Freudenschuss, 2007).

El análisis de AF comprende el muestreo, extracción, purificación, identificación y cuantificación, siguiendo la metodología de los diversos métodos ya desarrollados. Es preferible que los métodos analíticos de AF se hayan validado por estudios colaborativos, aprobados por sociedades científicas reconocidas, como Asociación de Químicos Analíticos Oficiales Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1995).

Para la identificación y cuantificación de las AF se han desarrollado diversos métodos inmunológicos (Groopman & Donahue, 1988; Fan & Chu, 1984; Hsieh *et al.*, 1988), químicos (Jones, 1972; Romer, 1975) y biológicos (Carnaghan *et al.*, 1963; Holzapfel *et al.*, 1966; Purchase, 1967; Ames, 1971; Ames *et al.*, 1973 a y b). Los métodos inmunológicos tienen una alta sensibilidad, especificidad, y permiten procesar un gran número de muestras en corto tiempo.

Los métodos inmunológicos se basan en la reacción antígeno-anticuerpo. Los métodos químicos posibilitan la detección de las AF y su cuantificación. Los principales métodos cromatográficos son: en capa fina (CPF) (Peckok & Shields, 1983) y la HPLC (Yen & Bidasee, 1993; Quattrocchi, 1992).

I.4.1. Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC)

Según la IUPAC “La cromatografía es un método, usado para la separación de los componentes de una muestra, en la que los componentes se distribuyen en dos fases, una de las cuales es estacionaria, mientras la otra es móvil. La fase estacionaria puede ser un sólido, un líquido retenido sobre un sólido o un gel. La fase móvil puede ser líquida o gaseosa” (Noa-Pérez *et al.*, 2001).

En los años setenta se dispone con rellenos de columna, detectores de fluorescencia, automuestreadores y sistemas de recuperación de datos, tecnología necesaria para trabajar en HPLC, y actualmente alcanza niveles altísimos de resolución y

son la mejor opción para separación y análisis de micotoxinas en alimentos (Sogorb-Sánchez & Vilanova-Gisbert, 2005; FAO, 1991).

Los componentes imprescindibles en un equipo de HPLC son: 1) Bomba impulsora de disolvente; 2) Sistema de inyección de muestra; 3) Columna; 4) Detector. Desde principios de la década de los noventa en todos los equipos de HPLC estos componentes están comunicados entre sí y controlados desde un ordenador, el cual controla y sincroniza el funcionamiento de todos los módulos. El ordenador registra y almacena de forma digital toda la información que le llega al detector (Sogorb-Sánchez & Vilanova-Gisbert, 2005).

1) Bombas. Para forzar al disolvente a fluir a través de la fase estacionaria se requiere aplicar alta presión. La presión aumenta al disminuir el tamaño de partícula de la fase estacionaria. Dado que la resolución de la columna aumenta al disminuir el tamaño de partícula, la tendencia es a empaquetar columnas con un máximo de 10 μ de tamaño de partícula, lo cual obliga a utilizar sistemas de impulsión capaces de aplicar presiones de varias atmósferas. La bomba de HPLC debe cumplir los requisitos de: Flujo entre 0.05 y 10 mL min⁻¹; estabilidad del flujo con las menores variaciones posibles. Ser capaz de aplicar presiones de hasta 6500 psi.

2) Inyectores. El inyector es el dispositivo encargado de introducir la muestra en la corriente de fase móvil que fluye desde la bomba hacia la columna sin interrupción del flujo y sin alterar la presión. Hay inyectores manuales y automáticos.

3) Columnas. Las columnas analíticas para el análisis de micotoxinas son tipo C₁₈ de fase reversa, cilindros de acero de entre 10 y 25 cm de longitud y 4-5 mm de diámetro interno, llenos de partículas de gel de sílice (fase estacionaria) de entre 2 y 10 μ m. Estas dimensiones se consideran para la capacidad, consumo de fase móvil, velocidad de elución y resolución. Las columnas tienen incorporado un filtro a la entrada y salida, para protección del sistema.

4) Detectores. El detector es un dispositivo electrónico que registra por medio de luz ultravioleta o fluorescencia al material eluido por la columna en función del tiempo. Los detectores actuales tienen sensibilidad a nanogramos de material y admiten rápidamente el cambio de una fase móvil a otra (Sogorb-Sánchez & Vilanova-Gisbert, 2005; Garner *et al.*, 1993).

La intensidad de fluorescencia de las AFB₁ y AFG₁ puede ser incrementada por derivatización con ácido trifluoroacético o por derivatización postcolumna con yodo o perbromuro de potasio (Kok, 1994).

I.5. Métodos de control

Incluyen el establecimiento de límites regulatorios, monitoreos, procedimientos de descontaminación y estrategias para desviar el uso de productos contaminados con bajo riesgo a la ganadería (Park & Liang, 1993).

Si las medidas preventivas fallan, la AFB₁ puede ser reducida en alimento por mezcla o tratamiento físico o químico. Los tratamientos físicos incluyen microondas, rayos gamma, rayos X, luz ultravioleta, y adsorción. La adsorción de AF en aluminosilicatos y otros materiales inertes ha sido usada en la industria de alimentación animal para reducir las AF en alimentos balanceados y leche. Entre los procedimientos químicos más exitosos para degradar AF en alimento animal está la amonización, que descompone del 95-98% de la AFB₁, y se usa en varios países (Creppy, 2002).

La Comisión del Codex Alimentarius (CCA), cuenta con 168 países miembros y está apoyada por la FAO y la OMS, legisla el comercio mundial y protege la salud de los consumidores mediante el desarrollo de normas internacionales para los alimentos y las raciones. En la actualidad el Comité del Codex para Aditivos Alimentarios y Contaminantes de los Alimentos (CCFAC) establece límites máximos (normas) para los aditivos y los contaminantes en los alimentos los que resultan decisivos en caso de conflictos comerciales. El CCFAC desarrolla normas basadas en los principios del análisis de riesgos (HCCP), según las reglas y los métodos establecidos en el Manual de Procedimientos del Codex y en la Norma General del Codex para Contaminantes y Toxinas en los Alimentos (Codex, 1997; FAO, 2003).

El CCFAC puso atención al desarrollo de los Códigos de Práctica, con medidas para el control de las micotoxinas durante el cultivo, almacenamiento y procesamiento. Ejemplos son los códigos de práctica desarrollados para: i) reducir la AFB₁ en materias primas y raciones suplementarias para ganado lechero (Codex Alimentarius, 1997); y ii) la prevención y la reducción de la contaminación de los cereales con micotoxinas incluyendo anexos sobre la ocratoxina A, la zearalenona, las fumonisinas y los tricotecenos (Codex Alimentarius, 2003).

I.6. Legislación y límites de tolerancia

En el área de las micotoxinas el CCFAC (2003) ha establecido límites máximos de tolerancia para AF totales (AFt) en cacahuete sin procesar, para la AFM₁ en la leche y para la patulina en el jugo de manzana. (FAO, 2003).

Los reglamentos de AF en alimentos, productos lácteos y raciones animales son detallados y específicos. Una limitación, son los numerosos reglamentos de algunos países que especifican niveles de tolerancia diferentes para los alimentos y las raciones individuales, y otros fijan un solo nivel tolerable para todo alimentos y ración (FAO, 2003).

Los niveles máximos tolerados para la AFB₁ en alimentos casi no han cambiado desde 2003, son de 1 a 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$, o bien con 2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ como el límite de tolerancia actual en 29 países, la mayoría son de Europa, con límites similares, desde 1998, para la AFB₁ y para AFt en diversos productos. Otro límite importante es el de 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$, seguido por 21 países de África, de Asia/Oceanía, América Latina y Europa. Los Estados Unidos y Canadá no tienen un límite de tolerancia único para la AFB₁ (FAO, 2003), **Tabla 15**.

Tabla 15: Niveles máximos tolerados para la AFB₁ en alimentos (FAO, 2003).

Niveles de tolerancia de AFB ₁ $\mu\text{g kg}^{-1}$	Número de países
1	1
2	29
5	21
10	5
15	2
20	3

Desde 2003, los países cuentan con más reglamentos para más micotoxinas en más productos básicos y en general. En 1970 se fijó el primer valor límite para las micotoxinas y ha ido creciendo el número de países con legislación para las micotoxinas de 31 en 1981, a 99 en 2003 (FAO, 2003). Por disponer de técnicas analíticas sensibles para determinar las concentraciones de AF, la FDA ha establecido límites para las concentraciones de AF en los alimentos (Shibamoto & Bjeldanes, 1996).

Los niveles máximos difieren ampliamente por país, por la falta de acuerdo respecto al nivel máximo de seguridad para humanos (Díaz, 2005). Los límites de control para AF en alimentos de consumo humano, de algunos países (Liu *et al.*, 2006), **Tabla 16**.

Tabla 16: Máxima cantidad permitida de aflatoxinas ($\mu\text{g kg}^{-1}$) en comestibles para consumo humano y comercio de algunos países (Liu *et al.*, 2006).

País	ppb ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	País	ppb ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Alemania	5	India	30
Australia	1	Japón	10
China	20	Malasia	35
EU	2	México	20
Francia	10	UK	10
Holanda	5	US	20

La Norma Oficial Mexicana NOM-188-SSA1-2002, de Productos y Servicios es para el control de AF en cereales para consumo humano y animal, no deben exceder de $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFt. Con concentraciones de 21 hasta $300 \mu\text{g kg}^{-1}$, el cereal sólo podrá utilizarse para consumo animal directo o como parte de alimentos procesados (Apéndice Normativo A) (NOM, 2002), y deberán ajustarse a lo dispuesto en la **Tabla 17**.

Tabla 17: Límites de aflatoxinas totales permitidos en cereales para consumo animal (NOM188-SSA1-2002).

Especie/etapa de producción	Límite máximo μgkg^{-1}
Aves (excepto pollos de engorda)	100
Cerdos en engorda:	
Entre 25 y 45 kg	100
Mayores de 45 kg	200
Maduros destinados a reproducción	100
Rumiantes:	
Maduros destinados a reproducción	100
De engorda en etapa de finalización	300

II. OBJETIVOS

II.1. General

1. Identificar y cuantificar las aflatoxinas (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂) y los metabolitos hidroxilados formados en el hígado de la gallina (AFM₁, AFM₂, AFP₁ y AFL) que pasan del alimento contaminado al huevo en el experimento y su detección en muestras de huevo comercial.

II.2 Particulares

- a. Determinar la cantidad y tipo de aflatoxinas que pasan del alimento contaminado a la clara de huevo.
- b. Determinar la cantidad y tipo de aflatoxinas que pasan del alimento contaminado a la yema de huevo.
- c. Determinar la cantidad y tipo de aflatoxinas presentes en muestras (yema y clara) de huevo comercial.

III. HIPOTESIS

- a. Tanto la yema como la clara están contaminadas por diferentes tipos de aflatoxinas y sus hidroxilados.
- b. La yema, rica en grasa (66%) y proteínas (31%), es la porción del huevo más contaminada con aflatoxinas que son liposolubles y se fijan a proteínas.
- c. Si en el experimento con gallinas hubo transferencia de aflatoxinas de alimento a huevo, entonces en el huevo comercial habrá aflatoxinas.

Hipótesis negativas

- d. La yema y clara de huevo no tienen aflatoxinas ni en el experimento con gallinas , ni en el huevo comercial.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV. 1. Diseño experimental con gallinas ponedoras

Para identificar y cuantificar las AF que se transfieren del alimento contaminado, e ingerido por las gallinas experimentales, a los huevos y su distribución en yema y clara, se realizó un experimento con 25 gallinas de postura raza Hi/Line W36, de 121 semanas de edad con 26 semanas de producción de huevo, y se les sometió a una alimentación controlada. Este experimento se realizó del 8 al 15 de agosto de 2005, en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola (CEIEPA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, Delegación Tláhuac, Distrito Federal.

Las 25 gallinas se colocaron en jaulas individuales con bandeja de alimento y agua, y se dividieron en 3 grupos:

a) **Grupo Control** formado por 9 gallinas tratadas con alimento molido y homogeneizado libre de AFB₁; para asegurar la ingesta se colocaron 250 g de alimento por día a cada una, cada gallina comió en promedio 125 g diarios. Se usaron 2.250 kg de alimento limpio para las gallinas de este grupo.

b) **Grupo tratado con 30 µg kg⁻¹** de AFB₁ formado por 8 gallinas. Como la legislación Mexicana y del Tratado de Libre Comercio (TLC) indican el límite máximo de tolerancia de 20 µg kg⁻¹ de AFB₁ para el alimento de gallinas de postura, para asegurar su ingestión de al menos este límite y determinar su posible transferencia al huevo, así como su distribución en yema y clara, se contaminó el alimento con 30 µg kg⁻¹. Para este grupo se utilizaron diariamente 2.0 kg de alimento artificialmente contaminado.

c) **Grupo tratado con 500 µg kg⁻¹** de AFB₁ formado por 8 gallinas tratadas. Esta dosis se utilizó para asegurar la transferencia de AFB₁ al huevo y determinar su distribución en yema y clara. Se utilizaron diariamente 2.0 kg de alimento en este grupo de gallinas.

En la **Tabla 18** se presenta el registro de peso inicial de las gallinas de los tres grupos, así como el tratamiento al que se sometió cada uno.

Tabla 18: Peso inicial de las gallinas y los tres tratamientos del experimento.

Días del experimento	Grupo/Nº de gallina	Peso inicial (kg) de gallina el 8 de agosto	Tratamiento del alimento
1	Control		GRUPO A
	1	1.764	250 g de alimento base sin AFB ₁ , colocado en comedero
	2	1.482	
	3	1.440	
	4	1.724	
	5	1.602	
	6	1.652	
	7	1.782	
	8	1.682	
	9	2.128	
	30 µg kg⁻¹		GRUPO B
	1	1.602	250 g alimento base + 30 µg AFB ₁
	2	1.536	
	3	2.080	
	4	1.688	
	5	1.896	
	6	1.440	
	7	1.712	
	8	1.740	
	500 µg kg⁻¹		GRUPO C
	1	2.008	250 g alimento base + 500 µg AFB ₁
	2	1.654	
	3	1.414	
	4	1.946	
	5	1.876	
	6	1.604	
	7	1.958	
	8	2.194	
2 a 8	Control		
	1-9		250 g
	30 µg kg⁻¹		
	1-8		250 g + 30 µg AFB ₁
	500 µg kg⁻¹		
1-8		250 g + 500 µg AFB ₁	

IV.1.1. Composición del alimento base para las gallinas.

A continuación se presenta la composición del alimento balanceado de las gallinas que se mezcló y homogeneizó en el Centro de Enseñanza Investigación y Extensión en Producción Avícola (CEIEPA) y que sirvió de base para hacer el experimento (**Tabla 19**). Se preparó una tonelada de alimento con los siguientes ingredientes:

Tabla 19: Composición del alimento base para las gallinas.

Ingredientes	Cantidad (g kg⁻¹)
Sorgo (Siroga SA de CV)	675.82
Soya (Siroga SA de CV)	190.02
Carbonato de Calcio (Moliendas Tizayuca SA de CV)	89.21
Aceite vegetal crudo de soya (Siroga SA de CV)	24.35 L
Fosfato de calcio (Tecamac Industrial SA de CV)	12.35
Sal (El Elefante SA de CV)	3.88
DL metionina (Degusa SA de CV)	1.53
Pigmento extracto de flor de cempoalxóchitl (Pigmentos vegetales SA de CV)	1.50
Cloruro de colina (Celanece SA de CV)	0.50
Vitaminas de gallina de postura A, D, E, K y complejo B (Helm SA de CV)	0.25
Minerales: Zn, Mg, Mn, I, Fe, Cu, Co, Se (Helm SA de CV)	0.50
Antibiótico Bacitracina zinc (Insumos Químicos SA de CV)	0.10
Antioxidante BHT y BTQ (Insumos Químicos SA de CV)	0.15

IV.1.2. Preparación de las concentraciones de AFB₁ para la inoculación del alimento

Para preparar las dosis de los dos tratamientos (30 y 500 µg kg⁻¹) con que se contaminó el alimento balanceado se hizo una solución patrón o stock de 1 µg mL⁻¹ de AFB₁ a partir del estándar puro de AFB₁ (Sigma, N° Cat A-6636). Procediendo de la siguiente manera:

1°. Se midió la absorbancia de la AFB₁ a 362 nm en espectrofotómetro (Genesys 10 UV Thermo).

2°. Se aplicó la siguiente fórmula de acuerdo con el capítulo 49 inciso 49.9.01 de Natural Toxins, Métodos Oficiales AOAC 970.43 para micotoxinas (AOAC International, 1995).

$$X = \frac{\text{Absorbancia de AFB}_1 \text{ a } 362 \text{ nm} \times \text{peso molecular (PM) de la AFB}_1 \text{ (312 g mol}^{-1}\text{)}}{\text{Coeficiente de extinción de la AFB}_1 \text{ (21800)}}$$

3°. Se obtiene el inverso de x (1/x), el resultado es la cantidad de AFB₁ en microlitros (µL) necesarios para hacer una solución de 1 µg mL⁻¹ de AFB₁.

4°. Finalmente para saber la cantidad de solvente requerido se le resta a 1000 µL la cantidad de AFB₁ en el paso 3:

$1000 \mu\text{L} - \mu\text{L de AFB}_1 = \mu\text{L de solvente (MeOH)}$.

Para preparar el alimento con $30 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB_1 se tomaron 30 mL de la solución stock y se inocularon en cada kilogramo de alimento. Para el alimento de $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB_1 se concentró la solución stock a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AFB_1 , de la cual se tomaron 5 mL para inocular cada kilogramo de alimento.

Diariamente se prepararon 2 kg de alimento de cada dosis para colocar 250 g de alimento en los comederos de cada gallina durante los 8 días del experimento. El alimento se colocó en bolsas de plástico por separado con la dosis respectiva, se agitó manualmente por 15 minutos y se etiquetó cada bolsa con la dosis respectiva.

IV.2. Análisis químico

IV.2.1. Muestras de huevo

a. Del experimento

Las muestras de huevo provienen de los tres grupos de gallinas de postura raza Hi/Line W36, de 121 semanas de edad con 26 semanas de producción de huevo, especificadas en el diseño experimental.

Durante la semana del experimento se colectaron diariamente los huevos de cada gallina, estos fueron identificados y colocados en cajas de cartón subdivididas, para ser transportados al Laboratorio de Micotoxinas del Instituto de Biología, UNAM, en donde se pesaron (peso fresco) y se almacenaron en refrigerador a 4°C , hasta su análisis.

También, se colectó y pesó el alimento sobrante del día anterior en bolsas de plástico etiquetadas, registrándose la cantidad de alimento consumido por día, que fue de 125 g promedio de los 250 g colocados en cada comedero.

b. Muestras de huevo comercial de la Ciudad de México

Se realizó un muestreo de huevo durante las 4 estaciones del año 2005-2006 de establecimientos comerciales de la Ciudad de México, de 3 diferentes marcas Bachoco, San Juan y Calvario, con cascarón blanco o bien rojo. La marca Calvario sólo tuvo huevo blanco. Como muestra se compró una docena de huevos de cada marca y estación, y de ella se tomaron 3 huevos al azar un total de 60 huevos para su análisis químico, que se analizaron por separado (yema y clara).

IV.2.2. Método de extracción de Aflatoxinas en huevo

Se usó el método de extracción de Trucksess & Stoloff (1984) modificado para usar columnas de inmunoafinidad y HPLC por Mary W. Trucksess y Magda Carvajal (2005):

1. Se pesó el huevo entero con cáscara, se abrió y se separó la clara de la yema.
2. Se calculó la cantidad de agua basal sobre el peso de la porción a trabajar, (el contenido de agua: para clara es 86.7% y para yema es de 52.3%). Por ejemplo el peso de la clara de 50 g contiene: $(50 \text{ g} \times 86.7\% \text{ H}_2\text{O})/100 = 43.4 \text{ g}$ de agua, como se necesita un volumen de 100 mL, entonces se utilizaron 43 mL de agua y 56 mL de metanol, así la proporción metanol: agua fue de 57:43 v/v que es la proporción correcta para la extracción de AF. Se hizo el mismo cálculo para la yema.
3. Se colocó la porción de huevo a trabajar en licuadora, se añadió la mezcla de solventes correspondiente, se agregó 1 g de cloruro de sodio, y se licuó por 2 minutos.
4. Se centrifugó lo anterior a 4000 rpm por 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se midió el volumen. Se diluyó el sobrenadante con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) (1:3 v/v), con objeto de proteger al anticuerpo de la columna de inmunoafinidad. Se mezcló y filtró a través de papel filtro. El filtrado se pasó a través de una columna de inmunoafinidad activada (Easi-Extract Aflatoxin R-Biopharm Rhône Ltd) para AFt, con los anticuerpos específicos para todas las AF, usando una cámara de vacío (Vacuum Manifold Processing Station de Agilent Technologies) para 10 columnas. Se lavaron las columnas con 20 mL de agua destilada, y se secaron pasando aire a través de ellas.
5. Se eluyó la columna de inmunoafinidad con 1 mL de metanol, se esperó 1 minuto y se volvió a eluir con otro mililitro adicional de metanol y se colectaron en el mismo vial, para tener un volumen final de 2 mL.
6. El eluido se evaporó a sequedad en una estufa (Novatech BTC 9100) a 40°C.
7. El residuo se redisolvió en 2 mL de metanol y se inyectaron 50 μL al HPLC.

IV.2.3. Límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) para las AF

Por definición de la adoptada en 1975, el Límite de Detección (LOD), expresado como una concentración (CL) se deriva de la medida más pequeña, que puede detectarse para un procedimiento analítico dado, en este caso en el cromatógrafo de líquidos, se

determinó con base en la curva de calibración y en la desviación estándar. Mientras que el Límite de Cuantificación (LOQ) es la concentración mínima de analito que puede determinarse de las muestras. Estos datos se obtuvieron de las tablas de resultados. (Tablas 41-43) (IUPAC, 1976).

IV.2.4. Porcentaje de recuperación

El Porcentaje de Recuperación es la cantidad conocida de analito, en nuestro caso AFB₁, que se recupera con un método químico, y da evidencia de la validez y exactitud de los resultados. Se usaron 4 concentraciones diferentes de AFB₁, (0.5, 1.0, 2.0, 5.0 ng mL⁻¹) que se añadieron a 2 matrices independientes: yema y clara.

Se utilizó una muestra de clara y otra de yema, se mezclaron perfectamente por separado, se tomó una alícuota de 1.0 g por triplicado para el grupo control y otra alícuota de 1.0 g por triplicado fortificar con las 4 concentraciones de estándar de AFB₁, posteriormente se procesaron según el método de Trucksess & Stoloff (1984) modificado. Cada extracto purificado se inyectó al HPLC, y la contaminación basal del grupo control se escogió para conocer el porcentaje de recuperación de AFB₁ de nuestro método analítico.

IV.2.5. Cuantificación de AF por HPLC

a. Condiciones de la cromatografía de líquidos

La cuantificación de AF por HPLC se hizo en un cromatógrafo Agilent Series 1100, equipado con una bomba isocrática Modelo G1310A y una válvula de inyección con loop de 20µL. El detector de fluorescencia utilizado fue el Modelo LC-10 de Perkin-Elmer. Se usó una columna cromatográfica Phenomenex C₁₈ de 250 x 4.60 mm 5 µ. El integrador de datos fue el Modelo LCI 100 de Perkin-Elmer.

b. Reactivos

- **Solución isocrática**

Las características de los reactivos fueron: metanol (CH₃OH) (J.T. Baker Cat. 9093-03), acetonitrilo (CH₃CN) (J.T. Baker Cat. 9017-03) y agua destilada (H₂O_{dest}). Los solventes tuvieron pureza HPLC.

La fase móvil o solución isocrática para el HPLC se preparó con 65% de agua destilada (H_2O_{dest}), 20% de metanol (MeOH) y 15% de acetonitrilo (ACN), y se desgasificó filtrando al vacío con una membrana de 0.45 μm HV (Durapore, HVLPO4700). Las muestras rediluidas en MeOH, fueron inyectadas al HPLC con una microjeringa (Hamilton) de 50 μL .

Las columnas de inmunoafinidad tienen un gel de agarosa con anticuerpos anti-AFt que purifica y concentra a las AF por una reacción antígeno-anticuerpo, cuando el extracto diluido pasa por ellas. Los anticuerpos se rompen con metanol y para que no se dañen y puedan captar a las AF se requiere de un amortiguador de fosfatos (PBS) a un pH de 7.4, para que la muestra llegue a pH neutro a la columna de inmunoafinidad y no la dañe.

- **Solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS)**

Los reactivos usados para hacer el amortiguador de fosfatos PBS están en la **Tabla 20**.

Tabla 20: Reactivos para preparar 5L de solución amortiguadora PBS

Reactivo	Marca J.T. Baker	Fórmula	Cantidad
Cloruro de Potasio	N° Cat 3040	KCl	10.0 g
Fosfato de potasio monobásico	N° Cat 3246-20	KH_2PO_4	10.0 g
Fosfato de sodio monobásico hidrogenado	N° Cat.3818-01	Na_2HPO_4	58.0 g
Cloruro de sodio	N° Cat. 3624-19	Na Cl	400.0 g
Azida Sódica	N° Cat. V01	Na N_3	2.5 g
Agua destilada		H_2O	Aforar a 5L

Preparación: Las sales (excepto ázida sódica) son pesadas separadamente en recipientes previamente tarados en la balanza Triple beam marca Ohaus, series 700, exactos a 2 decimales. La ázida sódica es pesada en una balanza analítica (marca Denver Instrument Company, Series DE, Modelo 100A), con 4 decimales. Las sales son mezcladas y disueltas, usando un agitador magnético en 4.5 L de $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ y el volumen se afora a 5L con $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$, el pH de la solución se ajusta a 7.4.

IV.2.6. Curvas de Calibración.

El coeficiente molar de extinción (ϵ) ayudó a calcular el factor de corrección (FC) del espectrofotómetro con la siguiente ecuación: $FC = 3160/\epsilon_{\text{promedio}}$, donde: 3160 es el coeficiente de extinción teórico (ϵ) para las soluciones de dicromato de potasio y $\epsilon_{\text{promedio}}$ es el coeficiente experimental de extinción para las soluciones patrón de dicromato de potasio para calibrar el equipo. El valor de FC fue certificado para estar entre 0.95 y 1.05 de intervalo de aceptación para calcular la concentración real de cada AF (método 971.22 (B) (AOAC, 2005).

- **Medición de un microgramo ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, AFM₁, AFM₂, AFP₁ y AFL por espectrofotometría.**

Para elaborar las curvas de calibración se procedió a preparar una solución patrón de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada uno de los estándares por separado de AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, y de los productos del metabolismo animal de la AFB₁ que son los hidroxilados AFM₁, AFM₂, AFP₁ y AFL. La preparación de los estándares consistió en diluir cada estándar puro con 1 mL de benceno: acetonitrilo (98:2 v/v) (C₆H₆ 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 (AOAC, 1995). De ahí se tomó una cantidad pequeña al azar y se completó un mL con metanol HPLC. Se calibró el espectrofotómetro con un blanco de metanol HPLC y después 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 $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AF:

$$\mu\text{g mL}^{-1} \text{ of AF} = (\text{Abs} \times \text{PM} \times 1000 \times \text{FC})/\epsilon$$

Donde Abs = Absorbancia, PM = peso molecular, FC= Factor de corrección y ϵ = coeficiente de extinción. Ejemplo:

$$\frac{\text{Absorbancia de AFB}_1 \text{ a } 360\text{-}362 \text{ nm} \times \text{peso molecular (PM) de la AFB}_1}{\text{Coeficiente de extinción de la AFB}_1 \text{ (CE)}} = \frac{0.748 \times 312}{21800} = 0.0107053218$$

Después se divide 1 entre $0.0107053218 = 93.4$ que son los μL de AFB_1 que hay que poner para hacer la solución base de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Se resta $1000 \mu\text{L}$ menos $93.4 \mu\text{L}$ y da 907 que son los μL de MeOH que se pondrán en el vial para dar la solución de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Cada solución patrón se calculó con los pesos moleculares y coeficientes de extinción de cada AF. Se inyectaron al HPLC soluciones patrón originales y con las diferentes áreas bajo la curva de los picos cromatográficos se obtuvo la regresión lineal y el R^2 con el programa Excel. Para obtener la concentración de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ se realizaron los siguientes pasos:

- a. Se hizo un barrido automático en el espectrofotómetro (Genesys 10 UV Termo Electro Corporation UV/Vis) de 0 a 750 nm .
- b. Las celdas de cuarzo (Termo Electrón Corporation) de 1 mL , se lavaron con metanol.
- c. Se puso metanol en la celda usada para el blanco, se colocó en el espectrofotómetro, se midió la Absorbancia a 362 nm correspondiente a la AFB_1 , y se oprimió el botón "Medir blanco", y se le dio "-enter" con objeto de que la absorbancia del solvente no interfiriera ni se añada a la absorbancia de la solución estándar de AFB_1 .
- d. El estándar de AFB_1 previamente preparado y evaporado se diluyó en metanol, y esta solución se colocó en otra celda de cuarzo usada exclusivamente para los estándares, se midió su absorbancia a 362 nm de λ de longitud de onda. La obtención de la concentración de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AFB_1 se explicó anteriormente.

En la **Tabla 21** se mencionan los pesos moleculares y coeficientes de extinción de cada estándar de AF así como de los productos del metabolismo de la AFB_1 .

Tabla 21: Peso molecular y coeficientes de extinción de cada AF (OPS, 1983).

AF	Peso molecular (PM)	Absorción UV a 360 nm (Coeficiente de extinción o de absorción molar)
AFB_1	312	21,800
AFB_2	314	24,000
AFG_1	328	17,700
AFG_2	330	17,100
AFM_1	328	21,250 (357 nm)
AFM_2	330	22,900 (357 nm)
AFP_1	298	15,400
AFL	314	14,100 (325 nm)

Diluciones de AF

La curva de calibración se obtuvo a partir de diferentes diluciones del estándar de cada AF en metanol grado HPLC (MeOH). A partir de la concentración de 1000 ng mL^{-1} del estándar. Las diluciones fueron 1:1 (500 ng mL^{-1}), 1:2 (250 ng mL^{-1}), 1:4 (125 ng mL^{-1}), 1:8 (62.5 ng mL^{-1}), 1:16 (31.25 ng mL^{-1}), 1:32 (15.63 ng mL^{-1}) y 1:64 (7.8 ng mL^{-1}).

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

Preparación del estándar de AFB₁ de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$

Las características de los reactivos fueron: el estándar de AFB₁; metanol (CH₃OH) y acetonitrilo (CH₃CN) y benceno (C₆H₆) (N° Cat. 1783) de Merck. Todos los reactivos y solventes tuvieron pureza de cromatografía de líquidos (HPLC).

El estándar de AFB₁ en polvo se disolvió en una mezcla de benceno/ acetonitrilo (98:2 v/v) según indicaciones sugeridas en el capítulo 49 de Natural Toxins inciso 49.9.01 de los Métodos Oficiales AOAC 970.43 para micotoxinas (AOAC International, 1995), proceso que se realizó bajo campana de extracción y se homogeneizó en vortex 2 Genie (Modelo G-560, Volts 120 - Amperes 0.5 - Hertz 60). Con una jeringa de 1 mL se tomó un poco de dilución de AFB₁ en benceno/acetonitrilo y se pasó a un vial etiquetado. Se dejó evaporar el solvente a sequedad, con objeto de que no interfiriera en la redilución posterior del estándar en metanol.

IV.3. Análisis estadístico

a. Del experimento

Para el análisis estadístico se utilizó la prueba no paramétrica de rangos de Kruskal-Wallis, que compara si las muestras provienen de la misma población, utilizando los rangos y posteriormente si hay diferencias busca en cuales tratamientos. También se utilizó la prueba de análisis de varianza con un criterio de clasificación y posteriormente se utilizó la estadística de Tukey para encontrar las diferencias. Esto se hizo para cada una

de las AF. Los análisis se realizaron utilizando el promedio de observaciones por gallina como variable respuesta. Para ver si existe un efecto del tiempo y de la gallina se utilizaron modelos lineales mixtos, utilizando la gallina como efecto aleatorio y tiempo como variable explicativa.

b. De muestras comerciales.

Se realizó análisis de varianza (ANOVA) utilizando como variable respuesta las AF y como variables explicativas la marca, la estación y clara/yema.

V. RESULTADOS y DISCUSIÓN

V.1. Diseño experimental con gallinas.

En la **Tabla 22, 23 y 24** se muestra el peso fresco de los huevos, pertenecientes a los 3 grupos de gallinas.

Tabla 22. Peso fresco de huevos del grupo control.

Día del experimento	Nº de gallina	Peso fresco (g)		Día del experimento	Nº de gallina	Peso fresco (g)		
		Huevo 1	Huevo 2			Huevo 1	Huevo 2	
1	1	67.9	70.5	5	1	67.5		
	2	60.8 R	76.9		2	58.6		
	3	65.3 R	60.6 R		3	SH		
	4	SH			4	SH		
	5	63.2	70.4		5	63.1		
	6	74.6			6	67.4 R		
	7	71.6 R	73.7 R		7 a 9	SH		
	8	66.5 R	66.4		1	71.7		
	9	67.6	74.3		2	65.9		
2	1	73.8 R		6	3 y 4	SH		
	2	64.2			5	64.9		
	3	68.8			6 y 7	SH		
	4	67.6			8	67.7		
	5	SH			9	SH		
	6	60.4			7	1	69.1	
	7	SH				2	67.2	
	8	72.0 R				3 a 7	SH	
	9	58.5 R				8	71.4	
3	1	56.3		8		9	SH	
	2	57.8				1	SH	
	3	SH				2	65.1	
	4	56.1 R				3	64.4	
	5	68.0				4	SH	
	6	65.4			5	62.6		
	7	SH			6	70.4		
	8	SH			7	SH		
	9	SH			8	71.0		
4	1	SH		Peso promedio (48 huevos)	9	SH		
	2	59.0			66.3 g			
	3 y 4	SH						
	5	62.4						
	6 y 7	SH						
	8	67.1						
9	SH							

R = roto; SH = Sin huevo

Tabla 23: Peso fresco de huevos del grupo alimentado con $30 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁.

Días del experimento	Nº de gallina	Peso fresco (g)		Días del experimento	Nº de gallina	Peso fresco (g)		
		Huevo 1	Huevo 2			Huevo 1	Huevo 2	
1	1	SH		5	1	60.7		
	2	61.5			2 a 4	SH		
	3	52.4	59.5		5	67.8		
	4	73.3	67.6		6	SH		
	5	70.9			7	63.4		
	6	SH			8	SH		
	7	63.1	67.6		6	1	71.1	
	8	69.1	63.4			2	61.2	
2	1	69.8		3		59 R		
	2	59.0		4		68.9		
	3 y 4	SH		5 y 6		SH		
	5	77.5		7		68.1 R		
	6	68.1		8		61.0		
	7	65.2		7		1 a 3	SH	
	8	SH						
3	1	SH			4	67.4		
	2	SH			5	68.5		
	3	66.1 R	44.1 R		6	SH		
	4	67.5			7	63.3		
	5	SH			8	67.4		
	6	61.6			8	1	71.7	
	7	61.5		2 a 4		SH		
	8	68.9		5		71.7		
4	1 y 2	SH		6		70.2 R		
	3	63.3		7		SH		
	4	74.5		8		66		
	5	72.4		Peso promedio (44 huevos)		65.8 g		
	6	65.3						
	7	SH						
	8	62.7						

R = Roto; SH = Sin huevo

Tabla 24: Peso fresco de huevos del grupo alimentado con $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB_1 .

Días del experimento	Nº de gallina	Peso fresco (g)		Días del experimento	Nº de gallina	Peso fresco (g)	
		Huevo 1	Huevo 2			Huevo 1	Huevo 2
1	1	72.1 R	65.6 R	5	1	67.5	
	2	61.7 R	64.4		2 y 3	SH	
	3	58.0 R			4	58.2	
	4	62.8 R	62.0		5 a 7	SH	
	5	68.5 R	58.0	8	66.7		
	6	61.8 R	66.6 R	6	1 a 3	SH	
	7	65.7 R	71.6		4	64.0	
	8	SH			5	57.8	
			6		66.5		
2	1	71.3		7	65.1		
	2	60.3		8	74.8		
	3	SH		7	1	74.2 R	
	4	64.5			2	68.8 R	
	5	57.0			3	66.0	
	6	64.9			4	SH	
	7	SH			5	55.9	
	8	67.5 R			6	SH	
1	65.7		7		69.8		
2	65.8		8		72.6		
3	3	SH		8	1	69.0	
	4	60.4			2	64.8	
	5	51.2	25.4 Sin cascarón		3	SH	
	6	52.5 R			4	64.6	
	7	58.1			5	61.2	
	8	66.0 R			6	62.2	
	1	70.2			7	64.1	
	2	60.9			8	SH	
4	3 y 4	SH		Peso promedio (51 huevos)	63.6 g Hubo 14 huevos rotos y uno sin cascarón		
	5	60.5					
	6	65.2					
	7	67.7					
	8	SH					

R = Roto; SH = Sin huevo

No obstante que el grupo de gallinas alimentadas con $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB_1 tuvo mayor producción de huevos (51), el peso promedio fue menor y se presentó un mayor número de huevos rotos, incluso un huevo sin cascarón. Efecto y daño seguramente por la dosis

de aflatoxina en el alimento de éste grupo. También se puede observar que la producción baja conforme pasa el tiempo.

En la **Tabla 25** se presenta el peso inicial y final de los 3 grupos de gallinas.

Tabla 25: Peso inicial y final de las gallinas

Grupo de gallinas	Peso inicial (kg)	Peso final (kg)	Diferencia de peso inicial al final
Control			
1	1.764	1.774	+ 0.010
2	1.482	1.500	+ 0.180
3	1.440	2.014	+ 0.574
4	1.724	1.770	- 0.054
5	1.602	1.780	+ 0.058
6	1.652	1.720	+ 0.068
7	1.782	1.870	- 0.212
8	1.682	1.750	+ 0.068
9	2.128	2.294	+ 0.166
Suma	15.26	16.47	0.858
Promedio	1.70	1.83	0.0953
30 µg kg⁻¹			
1	2.008	1.870	+ 0.040
2	1.654	1.380	- 0.024
3	1.414	1.280	+ 0.300
4	1.946	1.650	- 0.060
5	1.896	1.524	+ 0.058
6	1.440	1.280	+ 0.054
7	1.712	1.415	+ 0.070
8	1.740	1.456	- 0.084
Suma	13.81	11.86	0.354
Promedio	1.73	1.48	0.0443
500 µg kg⁻¹			
1	1.502	1.214	+ 0.052
2	1.536	1.208	+ 0.172
3	2.080	1.629	- 0.068
4	1.688	1.320	+ 0.062
5	1.876	1.419	+ 0.030
6	1.604	1.316	+ 0.110
7	1.758	1.302	- 0.160
8	1.924	1.510	- 0.042
Suma	13.968	10.92	0.0156
Promedio	1.75	1.37	0.0195

* La gallina bajó de peso.

En las **Tablas 26 a 28** se presenta el peso de la porción comestible del huevo por tratamiento del experimento, donde **SH** significa sin huevo.

Tabla 26: Peso de yema y clara de los huevos de gallinas control.

Peso (g) de huevos del Grupo Control							
Día	Nº muestra	Huevo 1		Huevo 2		Huevo roto	Observaciones
		Yema	Clara	Yema	Clara		
1	1					48.4	Yema mezclada con clara
						62	Yema mezclada con clara
	2					50.2	Roto
				13.4	38.7		
	3					52.7	Roto y yema mezclada con clara
						48.1	Roto.
	4 SH						
	5	19.8	21.1				
				28.1	17.6		
	6					42.4*	Yema mezclada con clara
7	25.6	28.9				Cascarón roto con hongos negros.	
					53.8	Yema mezclada con clara	
8					53.3	Roto y yema mezclada con clara	
		21	36.9				
9		22.4	18.3				
						57.1	Yema mezclada con clara
2	1					43.5	Roto
	2	20.7	28.8			36	Yema mezclada con clara
	3	21	30.6				
	4	-	-				Piedrita no se pudo analizar.
	5, 7/SH						
	6					37	Roto y Yema mezclada con clara
	8	18.4	14.5				Roto
	9					30	Roto
3	1	21.2	16.7				
	2	9.5	35.4				
	3,7,9/SH						
	4	18.3	33				Roto
	5	24.2	19.3				
	6	23.5	24.6				
	8 SH						
4	1,3,4,6,7,9/SH						
	2	19.6	30.2				
	5	21	27.3				
	8	22.2	25.4				
5	1					26.5	Cascarón roto
	2					44.9	Yema mezclada con clara
	3,4,7-9/SH						
	5					19.8	Cascarón roto con hongos negros
	6					39.1	Cascarón roto
6	1	27	32.7				
	2	18.3	32.7				
	3,4,6,7,9/SH						
	5	25.5	18.7				
	8	24.1	30.5				
7	1	26.8	31.2				
	2	22.8	27				
	3 a 7 SH						
	8					40.2	Yema mezclada con clara
	9 SH						
8	1,4,7 SH						
	2	22.3	28.9				
	3	21.7	32.9				
	5	21.2	29				
	6	22.8	33.6				
	8	26	35				
	9 SH						

Tabla 27: Peso de yema y clara de los huevos de gallinas alimentadas con 30 μg kg^{-1} de AFB₁.

Peso (g) de huevos del Grupo tratado con 30 μg kg^{-1} de AFB ₁ .							
Día	Nº muestra	1		2		Huevo roto mezclado	Observaciones
		Yema	Clara	Yema	Clara		
1	1,6/SH						
	2	17.3	26.9				
	3	19.7	23.7				
	4	18.3	36.4			37.9	Huevo reventado.
	5	18	31				
	7			23.8	24.1		
	8	27.5	44.2			40.7	Cascarón roto, hongos negros
						42.4	Yema mezclada con clara
2	1			24.5	15.5		
	2	26.5	21			42	Yema mezclada con clara
	3,4,8/SH						
	5	18.7	24.9				
	6	19.8	14.5				
	7					38.3	Yema mezclada con clara
3	1,2,5/SH						
	3					38.7	Roto
	4	22.5	27.4			33.6	Roto
	6					38.2	Yema mezclada con clara
	7	23	29				
	8	17.3	33.3				
4	1,2,7/SH						
	3	22.7	29.1				
	4	24	34.8				
	5	20.4	32.8				
	6	19.8	28.5				
	8	22.6	24.2				
5	1	23.2	24.4				
	5	24.4	26.4				
	7	22.0	26.1				
	2-4, 6 y 8 SH						
6	1	24.8	33.5				
	2	20.5	25.6				
	3					35.4	Cascarón roto
	4	24	27.3				
	5, 6/SH						
	7	19	22.4				Roto
	8	28.1	19.6				
7	1-3,6/SH						
	4	20.2	36.3				
	5	28.6	33.9				
	7	23.5	25.9				Roto
	8	26.7	17.8				
8	1	21	38.5				
	2-4,7SH						
	5	23.3	36.6				Cascarón roto, con moho negro
	6					41.8	
	8	21	38.5				

Tabla 28: Peso de yema y clara de los huevos de gallinas con 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁.

Peso (g) de huevos del Grupo tratado con 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$								
Día	Nº muestra	Huevo 1		Huevo 2		Huevo Roto	Observaciones	
		Yema	Clara	Yema	Clara			
1	1	22.2	34.6			43.1	Huevo rotp Cascarón roto, hongos negros	
	2	17.7	24.5				Huevo roto	
		23.1	6.2				Huevo roto y la clara seca	
	3	17.4	21				Roto	
	4	16.3	22				Roto	
	5			18.7	20			
		23	17					roto
	6	27	23.1					Roto
				22.1	28.1			roto
7	18.7	24.2						
	8 SH					37.4	Cascarón roto con hongos.	
2	1					13	Yema seca piedra con hongos.	
	2	15.3	25.5					
	3,7/SH							
	4					31	Yema mezclada con clara	
	5	9.8	20.3					
	6	9	28.9					
	8					14.5	Roto	
3	1	14.7	23.2					
	2	18.2	26.7					
	3 SH							
	4	12.1	18.3					
	5	16.5	23.4					
	6					31.5	Roto	
	7 NA						Podrido con larvas cafés.	
	8	15	20				Roto	
4	1	26.7	31.4					
	2	24.5	25.2					
	3,4,8/SH							
	5	24.3	29.8					
	6	25.8	29.9					
	7	27.3	23.1					
5	1					44.6	Yema mezclada con clara	
	2,3, 5-7/SH							
	4					41.9	Yema mezclada con clara	
	8					35.7	Yema mezclada con clara	
6	1 a 3 SH							
	4	22.9	27.7					
	5	18.1	24.1					
	6	14.2	28.5					
	7	20	27.8					
	8					36.6		
7	1	18.6	26.2				Roto	
	2	28.6	23.4				roto	
	3					40.7	Yema mezclada con clara	
	4,6/SH							
	5	28.2	27.1					
	7	27.5	27.1					
	8	26.6	27.4					
8	1	25.7	19.8					
	2	27.6	20.2					
	3,8/SH							
	4	17.1	22.6					
	5					48.3	Yema mezclada con clara	
	6	27.6	19.1					
	7					41.8	Yema mezclada con clara	

La **Tabla 29** es el resumen de los promedios del consumo de alimento, peso inicial, final de gallinas, de los pesos del huevo sin cascarón, de la clara y de la yema.

Tabla 29: Promedios del consumo de alimento, pesos inicial y final de gallinas y de la clara y de la yema del huevo sin cascarón.

Tratamiento	Consumo de alimento (g) /día	Peso de gallina (kg)			Peso de porción comestible de huevos (g)		
		Inicial	Final	Diferencia	Clara	Yema	Huevo roto
Grupo control							
Peso promedio	148	1.70	1.83	+ 0.13	26.9	21.2	44.6
Grupo tratado con AFB₁ 30 µg kg⁻¹							
Peso promedio	147	1.73	1.48	-0.25	27.6	22.0	39.8
Grupo tratado con AFB₁ 500 µg kg⁻¹							
Peso promedio	129	1.75	1.37	-0.38	23.8	20.6	36.4

Tanto las gallinas como los huevos del grupo control incrementaron su peso, en comparación con las gallinas y huevos que recibieron 30 y 500 µg kg⁻¹ (**Tabla 29**).

V. 2. Identificación y cuantificación de aflatoxinas en huevo

V.2.1. Validación del método

V.2.2. Linealidad (curvas de calibración de Aflatoxinas).

Las curvas de calibración se elaboraron con las diluciones señaladas. Las AF se identifican según su tiempo de retención (**Tabla 30**), que debe coincidir con el rango dado por las concentraciones de los estándares, la cantidad de AF se obtiene con el área bajo la curva de los picos cromatográficos y los tiempos de retención identifican a la AF.

Tabla 30: Tiempos de retención cromatográficos de las AF.

Aflatoxina	Tiempo de retención en minutos
AFB ₁	11.61 a 12.91
AFB ₂	10.37 a 10.62
AFG ₁	8.65 a 9.17
AFG ₂	7.13 a 7.53
AFM ₁	6.44 a 6.59
AFM ₂	9.46 a 9.68
AFP ₁	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 AFM₂ y AFL, de modo que si es 9.39 a 9.45 corresponderá a AFL y de 9.61 a 9.68 será AFM₂.

a) **Curva de calibración de AFB₁.**

Las diluciones para elaborar la curva de calibración de AFB₁, obtenida con el área bajo la curva de los cromatogramas están dentro del intervalo de concentración de 7.8 a 1000 ng mL⁻¹ con tiempo de retención de 11.61 a 12.91 minutos, **Tabla 31**. Las diluciones para la curva de AFB₁ engloban las concentraciones de 30 y 500 µg kg⁻¹ empleadas para la contaminación del alimento para las gallinas del experimento. La curva de AFB₁ con un coeficiente de correlación de R²= 0.9977. **Figura 7**.

Tabla 31: Curva de calibración de AFB₁.

Dilución del estándar de AFB ₁	Concentración de AFB ₁ en la curva de calibración (ng mL ⁻¹)	Tiempo de retención (minutos)	Área
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

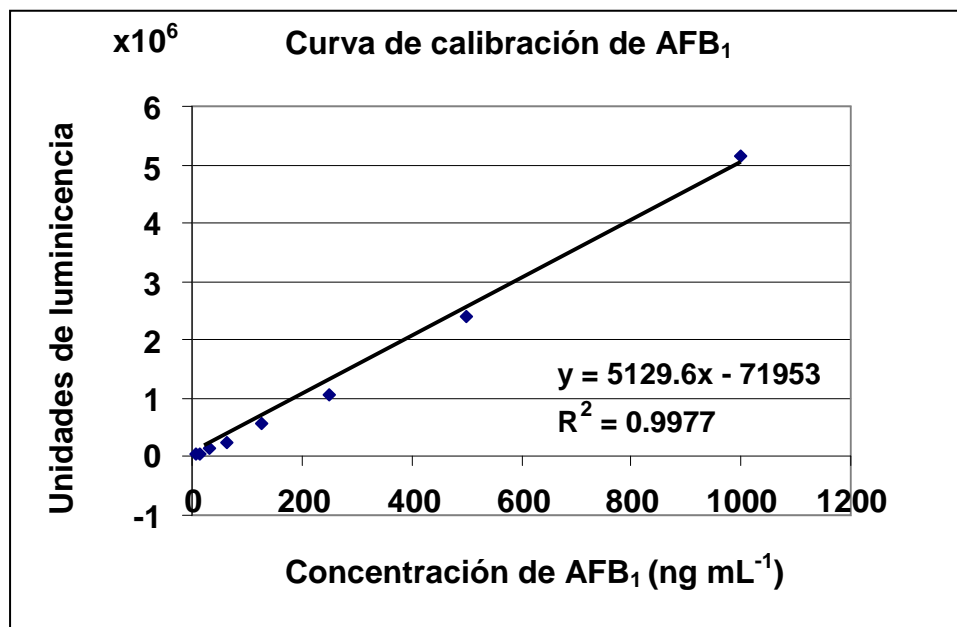


Figura 7: Curva de calibración para AFB₁.

b) Curva de calibración de AFB₂

La **Tabla 32**, muestra las diluciones de la curva de calibración de AFB₂ con intervalo de concentración de 7.8 a 500 ng mL⁻¹, su tiempo de retención está dentro del rango de 10.38 a 10.62 min, y las áreas bajo la curva de los cromatogramas para cada dilución. La **Figura 8** es la gráfica de la curva de calibración, con coeficiente de correlación de R²= 0.9948 analizado con una regresión lineal en el programa Excel de Word Office.

Tabla 32: Curva de calibración de AFB₂.

Dilución del estándar de AFB ₂	Concentración de AFB ₂ en la curva de calibración (ng mL ⁻¹)	Tiempo de retención (minutos)	Área
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

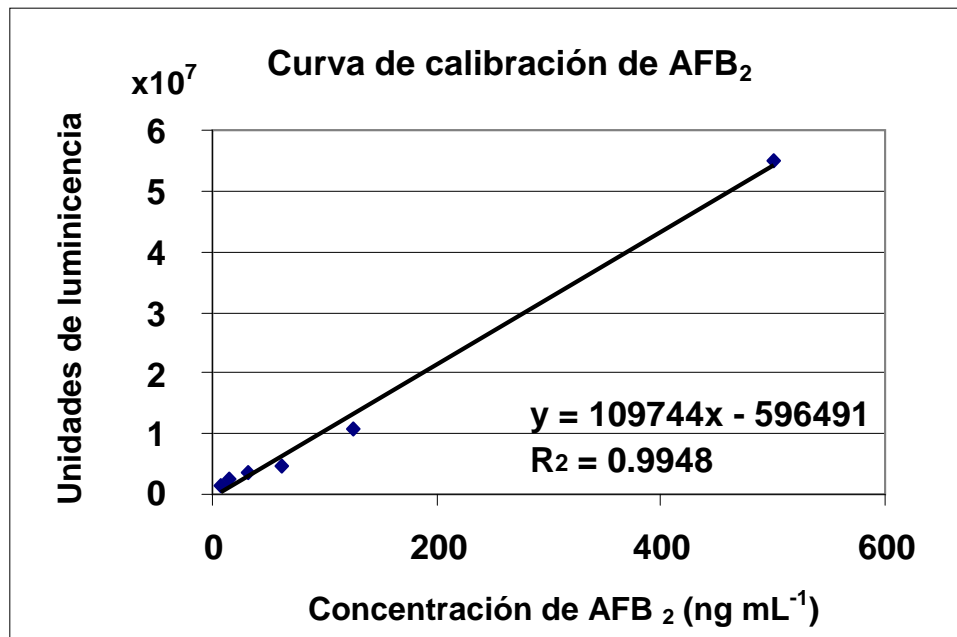


Figura 8: Curva de calibración para AFB₂.

c) Curva de calibración de AFG₁

Las diluciones utilizadas en la elaboración de la curva de calibración de AFG₁, se encuentran dentro del intervalo 1 a 1:32 v/v correspondientes a las concentraciones de 15.63 a 1000 ng mL⁻¹, el tiempo de retención para esta toxina se localiza en el rango de 8.65 a 9.17 minutos (**Tabla 33**) y se muestra el área bajo la curva obtenida en los cromatogramas para cada dilución. La dilución 1:64 (7.8 µg kg⁻¹) de AFG₁ no fue detectada por el HPLC. La regresión lineal de la curva de calibración de AFG₁, con un coeficiente de correlación de R² = 0.9968 se presenta en la **Figura 9**.

Tabla 33: Curva de calibración de AFG₁.

Dilución del estándar de AFG ₁	Concentración de AFG ₁ en la curva de calibración (ng mL ⁻¹)	Tiempo de retención (minutos)	Área
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

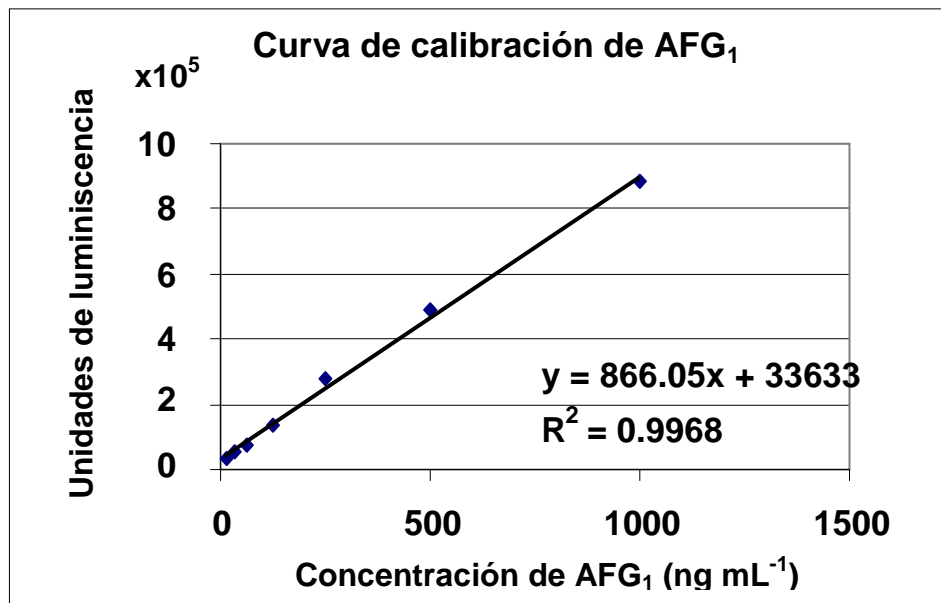


Figura 9: Curva de calibración para AFG₁.

d) Curva de calibración de AFG₂

Las diluciones utilizadas en la elaboración de la curva de calibración de AFG₂, se encuentran dentro del intervalo de 1 a 1:64 v/v correspondiente a las concentraciones de 7.8 a 1000 ng mL⁻¹, el tiempo de retención para esta toxina se localiza en el rango de 7.13 a 7.53 minutos como se observa en el **Tabla 34**, en la cual también se muestra el área bajo la curva obtenida en los cromatogramas para cada dilución. En la **Figura 10** se presenta la regresión lineal de la curva de calibración de AFG₂ con un coeficiente de correlación de $R^2 = 0.9959$.

Tabla 34: Curva de calibración de AFG₂.

Dilución del estándar de AFG ₂	Concentración de AFG ₂ en la curva de calibración (ng mL ⁻¹)	Tiempo de retención (minutos)	Área
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

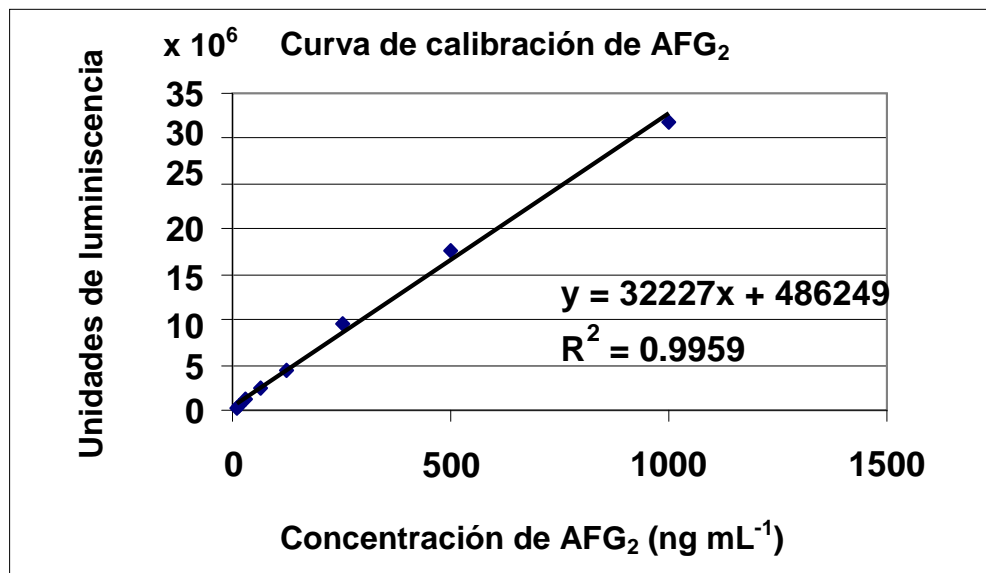


Figura 10: Curva de calibración para AFG₂.

e) Curva de calibración de AFM₁

Las diluciones utilizadas en la elaboración de la curva de calibración de AFM₁, se encuentran dentro del intervalo de 1 a 1:8 v/v correspondientes a concentraciones de 62.5 a 1000 ng mL⁻¹, el tiempo de retención para esta toxina se localiza en el rango de 6.44 a 6.59 minutos como se observa en el **Tabla 35**, en la cual también se muestra el área bajo la curva. Las diluciones 1:16 (31.2 µg kg⁻¹), 1:32 (15.6 µg kg⁻¹) y 1:64 (7.8 µg kg⁻¹) no se detectaron por el HPLC. En la **Figura 11** se presentan la línea de regresión de la curva de calibración de AFM₁ con un coeficiente de correlación de R² = 0.9837.

Tabla 35: Curva de calibración de AFM₁.

Dilución del estándar de AFM ₁	Concentración de AF en la curva de calibración (ng mL ⁻¹)	Tiempo de retención (minutos)	Área
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

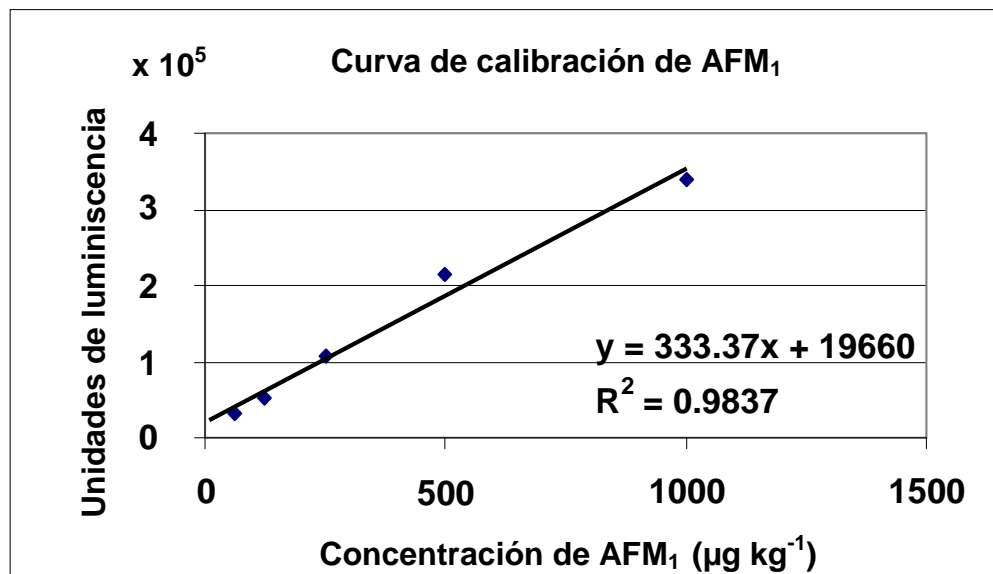


Figura 11: Curva de calibración para AFM₁.

f) Curva de calibración de AFM₂

En el **Tabla 36** se muestran las diluciones utilizadas en la elaboración de la curva de calibración de AFM₂ y están dentro del intervalo de 1 a 1:8 v/v correspondiente a las concentraciones de 62.5 a 1000 ng mL⁻¹, su tiempo de retención está dentro del rango de 9.46 a 9.68 minutos y sus áreas bajo la curva respectivas. Las diluciones 1:16 (31.2 µg kg⁻¹), 1:32 (15.6 µg kg⁻¹) y 1:64 (7.8 µg kg⁻¹) no se detectaron por el HPLC. En la **Figura 12** se presenta la regresión lineal de la curva de calibración de AFM₂, con un coeficiente de correlación de R² = 0.9981.

Tabla 36: Curva de calibración de AFM₂.

Dilución del estándar de AFM ₂	Concentración de AFM ₂ en la curva de calibración (ng mL ⁻¹)	Tiempo de retención (minutos)	Área
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

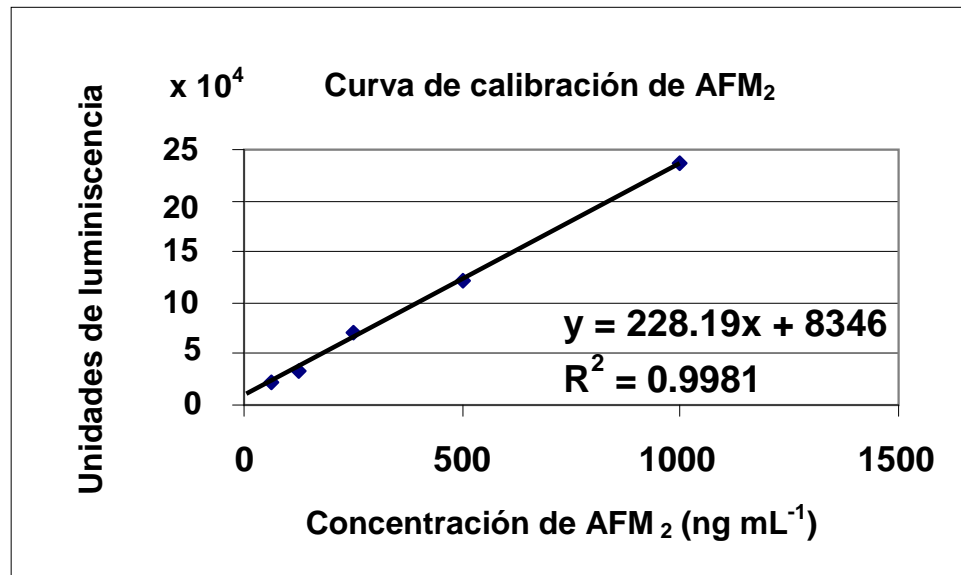


Figura 12: Curva de calibración para AFM₂.

g) Curva de calibración de AFP₁

En el **Tabla 37**, se observan las diluciones utilizadas en la elaboración de la curva de calibración de AFP₁, las cuales se encuentran dentro del intervalo de 1 a 1:32 v/v correspondientes a las concentraciones de 15.63 a 1000 ng mL⁻¹, su tiempo de retención está dentro del rango de 5.38 a 5.74 minutos y las áreas bajo la curva. En la **Figura 13** se presenta la regresión lineal de la curva de calibración **AFP₁**, con un coeficiente de correlación de $R^2 = 0.999$.

Tabla 37: Curva de calibración de AFP₁.

Dilución del estándar de AFP ₁	Concentración de AFP ₁ en la curva de calibración (ng mL ⁻¹)	Tiempo de retención (minutos)	Área
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

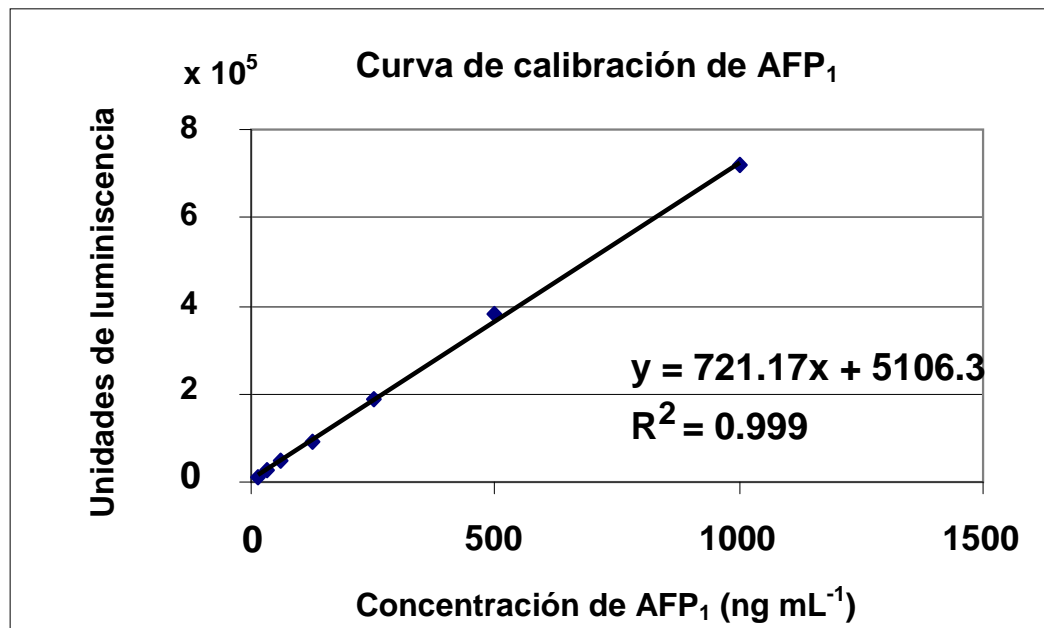


Figura 13: Curva de calibración para AFP₁.

h) Curva de calibración de AFL

En el **Tabla 38**, se observan las diluciones utilizadas en la elaboración de la curva de calibración de AFL, las cuales se encuentran dentro del intervalo de 1 a 1:64 v/v correspondientes a las concentraciones de 7.8 a 1000 ng mL⁻¹, su tiempo de retención está dentro del rango de 9.39 a 9.60 minutos, y las áreas bajo la curva obtenidas en los cromatogramas para cada dilución. La regresión lineal de la curva de calibración AFL, con un coeficiente de correlación de $R^2 = 0.998$ se presenta en la **Figura 14**.

Tabla 38: Curva de calibración de AFL.

Dilución del estándar de AFL	Concentración de AFL en la curva de calibración (ng mL ⁻¹)	Tiempo de retención (minutos)	Área
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

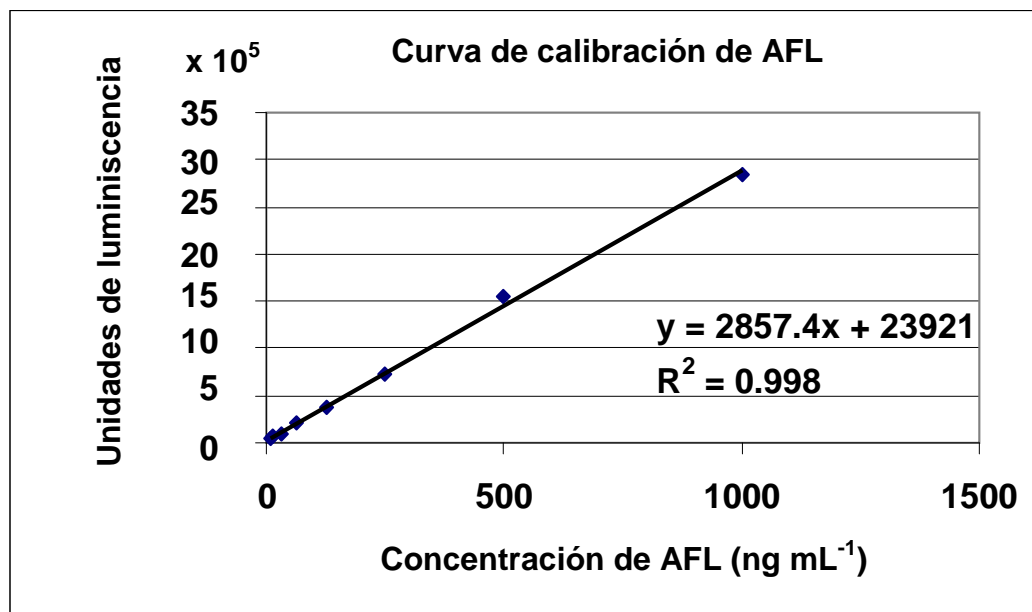


Figura 14: Curva de calibración para AFL.

V. 3. Límite de detección y cuantificación para las Aflatoxinas

El límite de detección de las AF se muestra en la **Tabla 39**.

Tabla 39: Límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) para las AF y sus metabolitos hidroxilados.

Aflatoxina	LOD	LOQ		
		Yema	Clara	Huevo con yema y clara mezcladas
AFB ₁	0.5	1.0	2.0	0.4
AFB ₂	0.1	0.04	0.03	0
AFG ₁	0.4	1.2	1.2	6.0
AFG ₂	0.2	0.5	0.5	0.03
AFM ₁	1.5	66.0	31	32
AFM ₂	1.6	2.0	1133	572
AFP ₁	1.5	3.0	9.0	10.0
AFL	1.2	0.3	57.0	1.0

V. 4. Porcentaje de recuperación de AFB₁ en yema y clara

El porcentaje de recuperación de AFB₁ y el promedio de cuatro diferentes concentraciones en yema y clara de huevo están en la **Tabla 40**.

Tabla 40: Porcentaje de recuperación de AFB₁ en yema y clara de huevo.

Recuperación de AFB ₁ en yema y clara (ng mL ⁻¹) (promedio de 3 repeticiones)				
Yema				
Contaminación basal	Concentración de AFB ₁ adicionada	Total de AFB ₁	Concentración AFB ₁ recuperada	% de AFB ₁ recuperado
0.43	0.5	0.93	0.87	93 %
0.43	1	1.43	1.375	96 %
0.43	2	2.43	2.280	94 %
0.43	5	5.43	5.180	95 %
			Promedio	95%
Clara				
0	0.5	0.5	0.450	90%
0	1	1	0.860	86%
0	2	2	1.872	91%
0	5	5	4.762	95%
			Promedio	91%

V.5.1. Detección de AF en huevo del experimento.

En las siguientes tablas se presentan los resultados de la cantidad de AF tanto en yema como en clara de los huevos de las gallinas control (**Tabla 41**); las alimentadas con 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁ (**Tabla 42**) y las alimentadas con 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (**Tabla 43**).

Tabla 41: Aflatoxinas ($\mu\text{g kg}^{-1}$) en yema y clara de gallinas control del experimento.

Día	Nº gallina/ huevos	Aflatoxinas en yema								Aflatoxinas en clara							
		B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	M ₁	M ₂	P ₁	AFL	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	M ₁	M ₂	P ₁	AFL
1	2/2	0	0	0	0	0	0	26	0	7	0	0	0	0	0	0	0
	5/1	4	0	118	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5/2	4	0	0	0	0	0	0	0	25	0	0	0	0	0	0	0
	7/1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	8/2	0	0.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	9/1	0	0.1	0	0	0	0	0	0	0	0.2	0	0	0	0	0	0
	1/1, 1/2, 2/1, 3/1, 3/2, 6/1, 9/2, 8/1*																
4/SH																	
2	2/1	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3/1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0
	8/1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1/1, 6/1 y 9/1*																
4, 5 y 7/SH																	
3	1/1	0	0	0	0.2	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0
	2/1	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4/1	4	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5/1	0	0	0	0.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6/1	2	0	0	0.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3, 7, 8 y 9/SH																
4	2/1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5	0	0	0	0
	5/1	5	0	0	1.2	0	21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	8/1	0	0	0	0	0	0	0	0	30	0	112	6	0	0	0	0
	1,3,4,6,7,9 SH																
5	1,2, 5, 6*																
	3, 4, 7 a 9 SH																
6	1/1	0	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2/1	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5/1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0
	8/1	0	0	0	1.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3, 4, 6, 7 y 9/SH																
7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	8/1*																
	3 a 7 y 9/SH																
8	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0.6	0	0	0	0	0	0	22	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	592	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0
1, 4, 7 y 9/SH																	

SH = Sin huevo; * Huevo roto con clara y yema mezcladas.

Tabla 42: Aflatoxinas ($\mu\text{g kg}^{-1}$) en yema y clara de gallinas alimentadas con $30 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁.

Día Agosto	N° de gallina/ huevos	Aflatoxinas en yema								Aflatoxinas en clara							
		B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	M ₁	M ₂	P ₁	AFL	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	M ₁	M ₂	P ₁	AFL
1	2/1	38	0	0	0	0	0	213	0	67	0	0	0	0	0	0	0
	3/1	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4/1	84	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5/1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	8/1	0	0	10	0	0	0	323	0	0	0	16	1.3	0	0	81	0
	8/2	21	0	0	0	0	0	438	0	24	0	0	0	0	0	187	57
2	3/2, 7/1 y 7/2*																
	1 y 6 SH																
	2/1	0	0	0	0	0	919	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5/1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6/1	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	3,4 y 8 SH																
	1 y 7*																
	4/1	37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	325	0	0	0
	7/1	69	0	0	0	0	0	0	0	98	0	0	0	0	0	0	0
4	8/1	76	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3/1, 3/2 y 6/1 *																
	1,2,5/SH																
	3/1	0	0	0	0	0	0	0	0	90	0	0	0	301	0	0	0
5	4/1	97	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5/1	90	0	0	0	0	0	0	0	92	0	0	0	0	0	0	0
	6/1	0	0	0	0	0	0	0	0	117	0	0	0	1309	0	0	70
	8/1	0	0	196	0	0	0	0	0	101	0	0	0	371	0	0	0
	1-2,7/SH																
6	1	0	0	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5/1	0	0	107	0	105	0	0	0	0	0	0	0	0	75	0	0
	7/1		0	0	3					90			3				
	8/1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	2-4, 6 y 8 SH																
	1/1	4	0	0	0	0	0	0	0	32	0	0	0	0	0	0	0
	2/1	0	0	0	0	0	0	0	0	22	0	0	0	221	0	0	0
	4/1	0	0	0	0	0	0	0	15	0	0	0	0	0	1133	0	0
	7/1	0	0	121	3	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0
	8/1	0	0	0	0	3145	0	0	0	89	0	0	0	0	0	490	0
8	3/1 *																
	5-6 SH																
	4/1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5/1	53	0	0	0	0	0	279	47	20	0	0	0	0	0	0	0
	7/1	5	0	0	0	0	0	0	0	58	0	0	0	0	233	0	0
9	8/1	0	0	0	0	0	0	0	0	21	0	36	0	0	0	0	0
	1-3 y 6 SH																
	1/1	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0
	5/1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	8/1	0	0	0	0	0	0	163	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6 *																
	2-4 y 7 SH																

SH = Sin huevo; * = Huevo roto con clara y yema mezcladas.

Tabla 43: Aflatoxinas ($\mu\text{g kg}^{-1}$) en yema y clara de gallinas alimentadas con $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁.

Día Agosto	N° de gallina/ Huevos	Yema								Clara							
		B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	M ₁	M ₂	P ₁	AFL	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	M ₁	M ₂	P ₁	AFL
1	1/1	33	0	0	0	0	0	174	0	75	0	0	0	0	0	0	0
	2/1	30	0	0	0	0	0	0	0	37	0	0	0	0	0	0	0
	2/2	16	0.2	0	0	0	0	0	0	21	0	0	0	304	0	0	0
	3/1	28	0	0	0	189	0	0	0	23	0	0	0	559	0	0	0
	4/1	0	0	164	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	120	0
	4/2	6	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	208	0	9	0
	5/1	86	0	0	0	0	0	455	0	5	0	0	0	0	0	0	0
	5/2	35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6/1	18	0	0	2	0	0	0	0	52	0	0	0	0	0	0	0
	6/2	0	0	28	0	248	0	53	0	36	0	0	0	0	0	0	0
	7/1	0	0	0	0	0	0	212	0	0	0	0	0	0	0	293	0
1/2 y 7/2*																	
8/SH																	
2	2/1	5	0	0	0	0	0	0	0	1	0	7	0	0	0	81	0
	5/1	0	0	0	2	0	0	0	42	28	0	0	0	0	0	0	0
	6/1	39	0	0	0	0	0	0	0	69	0	0	0	0	0	0	0
	1/1, 4 y 8/1* 3,7/SH																
3	1/1	0	0	0	0	0	0	60	0	0	0	0	0	0	0	162	0
	2/1	36	0	503	0	0	0	0	0	34	0	0	0	0	0	0	0
	4/1	0	0	179	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5/1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	8/1	0	0	0	0	0	0	522	0	70	0	0	0	0	0	0	0
	6/1* 3,7 y 5/2 SH																
4	1/1	31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	103	0	0	0	0	0
	2/1	7	0	0	0	0	0	22	0	7	0	0	0	140	0	0	0
	5/1	126	0.3	0	0	0	0	0	5	16	0	0	0	0	0	0	0
	6/1	6	0	0	0	0	0	0	0	15	0	0	0	0	0	0	0
	7/1	0	0	0	0	0	0	0	0	31	0	0	0	0	0	0	0
	3,4,8/SH																
5	1/1, 4/1 y 8/1 *																
	2,3,5-7/SH																
6	4/1	36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	147	0	0	0	0	0
	5/1	32	0	0	0	0	0	0	0	22	0	0	0	0	0	0	0
	6/1	6	0	0	0	0	0	0	0	23	0	0	0	0	0	0	0
	7/1	5	0	0	0	0	0	0	0	24	0	0	0	0	0	0	0
	8/1 * 1-3/SH																
7	1/1	29	0	0	0	0	0	61	0	57	0	0	0	0	0	0	0
	2/1	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5/1	21	0	0	0	0	0	0	0	75	0	0	0	0	0	0	0
	7/1	1	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0
	8/1	0	0	0	0	0	0	0	0	57	0	0	0	0	0	76	0
	3/1 * 4, 6 SH																
8	1/1	27	0	0	0	0	0	0	0	59	0	0	0	0	0	0	0
	2/1	88	0	0	0	0	0	0	0	35	0	0	0	0	0	0	0
	4/1	0	0	0	0	0	0	163	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6/1	72	0	0	0	0	0	0	0	31	0	0	0	0	0	0	0
	5/1 y 7/1* 3, 8 SH																

SH = Sin huevo; * = Huevo roto con clara y yema mezcladas.

En la **Tabla 44** se muestra el promedio de la concentración de AF ($\mu\text{g kg}^{-1}$) en yema y clara de los tres grupos de gallinas, así como el ajuste al 100% considerando el porcentaje de recuperación.

Tabla 44. Promedios (Φ) de la concentración de AF ($\mu\text{g kg}^{-1}$) y ajuste al 100% según el porcentaje de recuperación en yema (95%) y clara (91%).

Φ AF Ajuste PR	Yema									Clara								
	Aflatoxinas ($\mu\text{g kg}^{-1}$)									Aflatoxinas ($\mu\text{g kg}^{-1}$)								
	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	M ₁	M ₂	P ₁	AFL	AFt	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	M ₁	M ₂	P ₁	AFL	AFt
Grupo Control																		
Φ 29 huevos	0.9	0.1	4.1	0.4	20.4	0.7	0.9	0.3	27.8	2.9	0	4.2	0.6	0	0	0	0	7.8
Ajuste al PR	1.0	0.1	4.3	0.4	21.5	0.7	1.0	0.3	29.3	3.2	0	4.6	0.7	0	0	0	0	8.6
Grupo alimentado con 30 ($\mu\text{g kg}^{-1}$) de AFB₁																		
Φ 33 huevos	17.1	0	12.8	0.4	95.6	27.0	41.7	2.0	196.6	27.3	0	1.5	0.1	74.3	34.3	32.3	3.9	173.7
Ajuste al PR	18.0	0	13.5	0.4	100.7	28.4	43.9	2.1	206.9	30.0	0	1.6	0.1	81.6	37.7	35.5	4.3	190.9
Grupo alimentado con 500 ($\mu\text{g kg}^{-1}$) de AFB₁																		
Φ 37 huevos	22.6	0	23.6	0.1	11.8	0	46.5	1.3	106.0	25.2	0	7.0	0	32.7	0	20.0	0	84.9
Ajuste al PR	23.8	0	24.8	0.1	12.4	0	48.4	1.4	111.6	27.7	0	7.7	0	35.9	0	22.0	0	93.3

PR = Porcentaje de recuperación al 100%.

En la **Tabla 44** se puede observar mayor contaminación de AFB₁ en yema en comparación con la clara, en los 3 grupos de gallinas; asimismo en términos de AFt la contaminación sigue siendo mayor en la yema, porque es rica en grasa (65.8%) y las AF son liposolubles, y tienen afinidad o solubilidad en ella (Ina, 2008 b; Shibamoto & Bjeldanes, 1996; Sweeney & Dobson, 1999). No hubo diferencia significativa entre las AF de yema y clara del experimento.

En la **Tabla 45** se resume el promedio de la concentración de las AF presentes en el huevo entero, es decir, la suma de yema y clara y el ajuste al 100% según su Porcentaje de Recuperación.

Tabla 45: Aflatoxinas ($\mu\text{g kg}^{-1}$) en huevo entero (yema + clara) y su ajuste con el porcentaje de recuperación.

$\Sigma\Phi$ AF/ grupo de gallinas	Huevo entero								
	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	M ₁	M ₂	P ₁	AFL	AFt
	Grupo control								
$\Sigma\Phi$	3.8	0.1	8.3	1	20.4	0.7*	0.9*	0.3*	35.6
$\Sigma\Phi$ ajustadas con PR	4.2	0.1	8.9	1.1	21.5	0.7*	1.0*	0.3*	37.9
	Grupo alimentado con 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁								
$\Sigma\Phi$	44.4	0	14.33	0.5	169.9	61.3	74.0	5.9	370.3
$\Sigma\Phi$ ajustadas con PR	48.0	0	15.1	0.5	182.3	66.1	79.4	6.4	397.8
	Grupo alimentado con 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁								
$\Sigma\Phi$	47.8	0	30.6	0.1	44.4	0	66.6	1.3	190.82
$\Sigma\Phi$ ajustadas con PR	51.5	0	32.5	0.1	48.3	0	70.4	1.4	204.9

* = Valores por debajo del límite de detección, los cuales no son confiables.
 $\Sigma\Phi$ = Suma de promedios; PR = Porcentaje de recuperación.

La **Tabla 45** muestra el resumen de las AF en el huevo entero (yema más clara), de los tres grupos de gallinas: el grupo control que consumió alimento libre de AF, y los grupos que consumieron alimento contaminado con 30 y 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁. Los huevos del grupo control muestran las AF acumuladas que probablemente vienen del sorgo o de la soya consumidos en los 2 años de vida de la gallina, anteriores al experimento y son AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ donde la mayor cantidad de AF fue AFG₁ (8.9 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Se encontró también la AFM₁ (21.5 $\mu\text{g kg}^{-1}$) como respuesta de desintoxicación de la AFB₁, en el hígado de la gallina donde se forman hidroxilados para bajar la toxicidad (Chiavaro *et al.*, 2001). La concentración AFt (37.9 $\mu\text{g kg}^{-1}$) representa un riesgo a la salud humana.

En la **Tabla 45** se muestra que el grupo de contaminación con 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$ pasó más AF del alimento al huevo, hay que considerar que quizá en el grupo de 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ las AF pasan más a gallinaza donde se ha reportado un promedio del 43.6 al 51.7% (Cortés *et al.*, 2010).

En los huevos del grupo alimentado con 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁, el 82 % de los huevos estuvo contaminado; con AFB₁ (60 %), con AFG₁ (17%), con AFM₁ (23%), con AFM₂ (7%), con AFP₁ (27%), y finalmente con AFL (17%).

Por su parte los huevos del grupo alimentado con $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB_1 , el 100% de los huevos estuvo contaminado; con AFB_1 (72%), con AFG_1 (18%), con AFG_2 (5%), con AFM_1 (13%), con AFP_1 (32%), y con AFL (5%).

Trucksess *et al.*, (1983) alimentaron a gallinas con $8000 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB_1 durante 10 días y encontraron sólo trazas en huevo con un máximo nivel de AF a los 8 días y esto coincide con el tiempo que duró nuestro experimento. Loetzsch y Leistner (1976) reportaron un promedio de $0.03 \mu\text{g}$ de $\text{AFB}_1 \text{ kg}^{-1}$ de huevo con ingestión de $3 \text{ mg } \text{AFB}_1 \text{ kg}^{-1}$ de alimento consumido. Estos autores, al igual que en el presente estudio, encontraron más contaminación de AFB_1 en yema ($3.6 \mu\text{g kg}^{-1}$) que en clara ($2.2 \mu\text{g kg}^{-1}$). Esto indica que de cada $100 \mu\text{g}$ de $\text{AFB}_1 \text{ kg}^{-1}$ de alimento pasan $5.8 \mu\text{g}$ a huevo distribuyéndose 3.6 en yema y 2.2 en clara.

V.5.2. Aflatoxinas del huevo comercial de la Ciudad de México.

Los resultados del muestreo de huevo comercial se presentan por separado. El análisis de AF de yema se presenta en la **Tabla 46** y las de clara en la **Tabla 47**.

El 58% de los huevos de Bachoco blanco están contaminados, el 66% de Bachoco cascarón rojo, el 83% de San Juan blanco y 50% de San Juan rojo y 56% de Calvario blanco. Fue interesante observar que la yema del huevo Bachoco blanco no tuvo AFB_1 , pero se puede apreciar que toda se metabolizó a AFP_1 que fue la cantidad más alta de AF de todos los huevos y marcas. El hidroxilado llamado AFP_1 fue el metabolito más abundante, indicando que los hígados de las gallinas recibieron mucha AFB_1 y trataron de bajar su toxicidad por vías biliares, dado que la AFP_1 es propia de los fenoles que salen por la bilis. La AFB_1 fue la más frecuente y abundante en huevo, especialmente en clara, y de los hidroxilados, el más frecuente fue la AFP_1 , también más abundante y frecuente en clara de huevos comerciales.

El resumen de las aflatoxinas ($\mu\text{g kg}^{-1}$) en yema y clara del huevo comercial se presentan en la **Tabla 48**. El resumen de las aflatoxinas ($\mu\text{g kg}^{-1}$) promedio en huevo comercial entero, la suma de yema más clara, se presenta en la **Tabla 49**.

Tabla 46: Aflatoxinas ($\mu\text{g kg}^{-1}$) en yema de huevo comercial de 4 marcas.

Marca	Estación	Nº de yema	Aflatoxinas en yema ($\mu\text{g kg}^{-1}$)								AFt
			B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	M ₁	M ₂	P ₁	AFL	
Bachoco cascarón blanco	Verano 2005	1 a 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Otoño 2005	1	0	0	0	0	0	0	1105.2	0	1105.2
		2 y 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Invierno 2005	1	0	0	0	0	0	0	127.5	0	127.5
		2 y 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Primavera 2006	1	0	0	0	0	0	0	102.7	0	102.7
2 y 3		0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Bachoco cascarón rojo	Verano 2005	1 y 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	3.2	0	0	0	0	0	0	0	3.2
	Otoño 2005	1	284	0	0	0	0	0	0	0	284.1
		2	4.9	0	0	0	0	0	0	0	4.9
		3	5.6	0	0	0	0	0	0	0	5.6
	Invierno 2005	1 y 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	27.1	0	27.1
	Primavera 2006	1 y 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		3	6.2	0	0	0	0	0	0	0	6.2
San Juan Blanco	Verano 2005	1	3.9	0	0	0	0	0	0	0	3.9
		2	5.8	0	13	0.5	0	0	0	0	19.2
		3	4.2	0	0	0.8	0	0	0	0	5
	Otoño 2005	1 y 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	29.2	0	0	4.8	0	0	0	0	34
	Invierno 2005	1 y 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	18.6	0	131	0	0	0	263.7	0	413.4
	Primavera 2006	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	84.6	0	84.6
3		0	0	0	0	0	0	204.4	0	204.4	
San Juan Rojo	Verano 2005	1 y 3	0	0	0	0	0	0	0	0	
		2	6.8	0	0	0	0	0	0	0	6.8
	Otoño 2005	1	2.4	0	0	0	134	0	0	0	130.4
		2 y 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Invierno 2005	1 y 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	18.7	0	0	0	0	0	0	0	18.7
Primavera 2006	1	9.3	0	0	0	0	0	0	0	9.3	
	2 y 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Calvario Blanco	Verano 2005	1	22.8	0	0	0	612	0	0	0	635.1
		2 y 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Otoño 2005	1	26.6	0	0	0	0	0	0	0	26.6
		2	32.1	0	0	5.2	0	0	0	0	37.3
		3	23.3	0	0	0	0	0	0	0	23.3
	Invierno 2005	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	26.2	0	0	0	0	0	0	0	26.2
		3	0	0	0	0	51	0	0	0	51
Primavera	1 y 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2	27	0	0	0	204	0	0	0	231	

Tabla 47: Aflatoxinas ($\mu\text{g kg}^{-1}$) en clara de huevo comercial de 4 marcas.

Tabla 48: Resumen de las aflatoxinas ($\mu\text{g kg}^{-1}$) en yema y clara del huevo comercial.

Marca	Aflatoxinas en yema ($\mu\text{g kg}^{-1}$)						Aflatoxinas en clara ($\mu\text{g kg}^{-1}$)							
		B ₁	G ₁	G ₂	M ₁	P ₁	AFt	B ₁	G ₁	G ₂	M ₁	M ₂	P ₁	AFt
Bachoco c. blanco	Σ					1335.4	1335.4	41.4		9.9		296.1	624.5	1051
	\emptyset					111.3	111.3	3.5		0.8		24.7	52.0	87.6
Bachoco c. rojo	Σ	304				27.1	331.1	246.4	232.2		54		112	644.8
	\emptyset	25.3				2.3	27.6	20.5	19.3		4.5		9.3	53.7
San Juan c. blanco	Σ	55.9	144	6.1		552.7	764.5	168		6.4		121.6	689.7	985.7
	\emptyset	5.08	12	0.5		46.1	69.5	14		0.6		10	57.5	82.14
San Juan c. rojo	Σ	37.2			133.6		165.2	193.7			128		852.3	1179.6
	\emptyset	3.1			11.1		13.7	16			10.6		71	98.3
Calvario c. blanco	Σ	158		5.2	867.4		1030.5	325.6						325.6
	\emptyset	13.2		0.4	72.3		85.8	27						27.1

Σ = Suma; \emptyset = Promedio; C. = cascarón.

Tabla 49: Resumen del promedio de aflatoxinas ($\mu\text{g kg}^{-1}$) en huevo comercial completo

Marca	Aflatoxinas ($\mu\text{g kg}^{-1}$) en huevo comercial (yema + clara)						
	B ₁	G ₁	G ₂	M ₁	M ₂	P ₁	AFt
Bachoco c. blanco	3.5		0.8		24.7	163.3	192.3
Bachoco c. rojo	45.8	19.3		4.5		11.6	81.2
San Juan c. blanco	19.1	12	1.1		10	103.6	145.8
San Juan c. rojo	19.1			21.7			40.8
Calvario c. blanco	40.2		0.4	72.3			112.5

c. = cascarón

Como se puede observar en la **Tabla 49** la marca Bachoco con cascarón blanco es la más contaminada en términos de AFt, le sigue San Juan con cascarón blanco; ambas marcas tuvieron principalmente al hidroxilado AFP₁, Bachoco blanco en un 85 % , y San Juan blanco un 71% de AFP₁. En el caso de Bachoco con cascarón blanco la cantidad de AFB₁, que es la más peligrosa, está en pequeña cantidad disminuyendo su peligrosidad frente a Bachoco con cascarón rojo que es la más contaminada con AFB₁ (56%). La marca menos contaminada fue San Juan de cascarón rojo. Tanto las marcas como los colores de cascarón no tuvieron una diferencia significativa.

Las AF son inmunosupresoras (Chiavaro *et al.*, 2001) e inhiben la fagocitosis y la síntesis proteica (los anticuerpos son proteínas) interrumpiendo la formación del ADN, ARN y proteínas en el ribosoma; la absorción de los aminoácidos se ve alterada y su retención hepática aumenta (Gimeno, 2004).

El grado de toxicidad decreciente es $AFB_1 > AFG_1 > AFB_2 > AFG_2$, indica que la fracción terminal de furano de AFB_1 es el punto crítico para determinar el grado de actividad biológica de este grupo de micotoxinas (Chiavaro *et al.*, 2001).

La AFM_1 es el principal metabolito derivado de la AFB_1 y es producido por hidroxilación de AFB_1 en el hígado de animales, incluyendo humanos. La AFM_1 , es menos cancerígena y mutagénica que la AFB_1 , y puede encontrarse en leche y productos lácteos (leche en polvo, suero de leche, mantequilla, queso, yogurt, helado, etc), junto con la AFM_2 , que es el metabolito análogo derivado de la AFB_2 (Chiavaro *et al.*, 2001).

Otros dos metabolitos importantes de la AFB_1 son las AFP_1 y AFQ_1 , sustancias cuya toxicidad aguda es mucho menor que la de la AFB_1 . La AFQ_1 no produce tumores en la trucha (Shibamoto & Bjeldanes, 1996).

En el hombre la AFB_1 tiene un papel importante en la etiología del cáncer hepático, sobre todo en individuos que tuvieron el virus de la hepatitis B (VHB) y que son portadores del antígeno del VHB. Finalmente, las AF se han asociado con desórdenes en el crecimiento, como enanismo en niños (Guzmán de Peña, 2007).

El AFL, tiene toxicidad casi 20 veces inferior a la de la AFB_1 (de acuerdo a bioensayos con patitos), mientras que en trucha tiene aproximadamente la mitad de dicha actividad cancerígena (Shibamoto & Bjeldanes, 1996).

Fernandes-Oliveira *et al.* (2000) reportan que en las gallinas ponedoras pueden pasar las AF y sus metabolitos a los huevos, principalmente la AFB_1 y AFL, en una proporción de 5000:1 de AF del alimento ingerido al huevo.

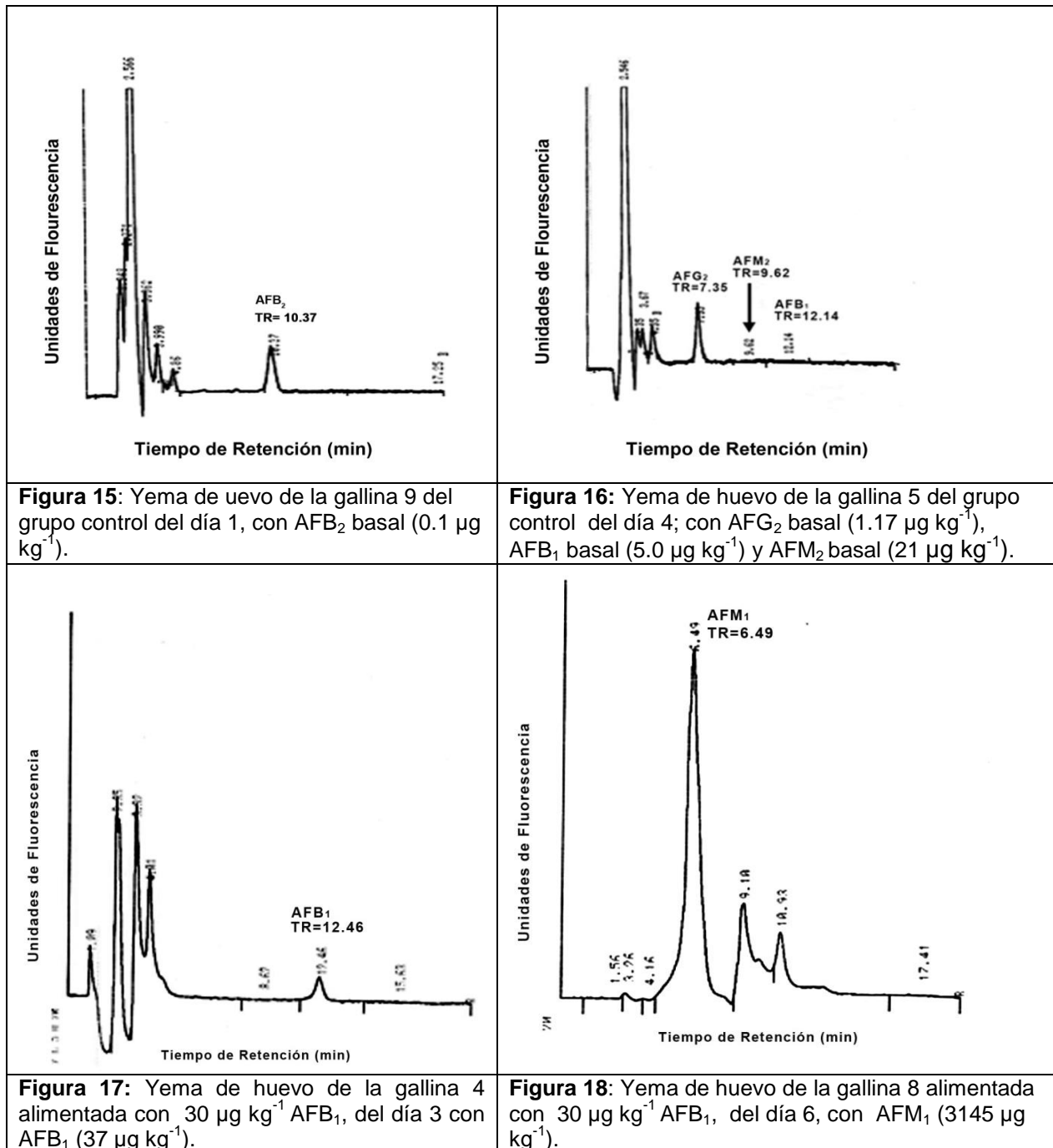
La presencia de AFB_1 y AFL en huevos es un peligro potencial para la salud humana, pues la AFB_1 es causa de cáncer hepático y el AFL es un metabolito que se reconvierte en AFB_1 y viceversa (Fernandes-Oliveira *et al.*, 2000; Carvajal *et al.*, 2003).

Los residuos hidroxilados van a la leche, huevo, músculo y tejidos comestibles contaminándolos (Derache, 1990; Gimeno, 2004).

V. 6. Cromatogramas de AF en yema y clara de huevo.

V.6.1. Del experimento.

Se presentan algunos cromatogramas (Figuras 15 a 31) de los resultados obtenidos de AF en yema y clara, según los tiempos de retención de la Tabla 28.



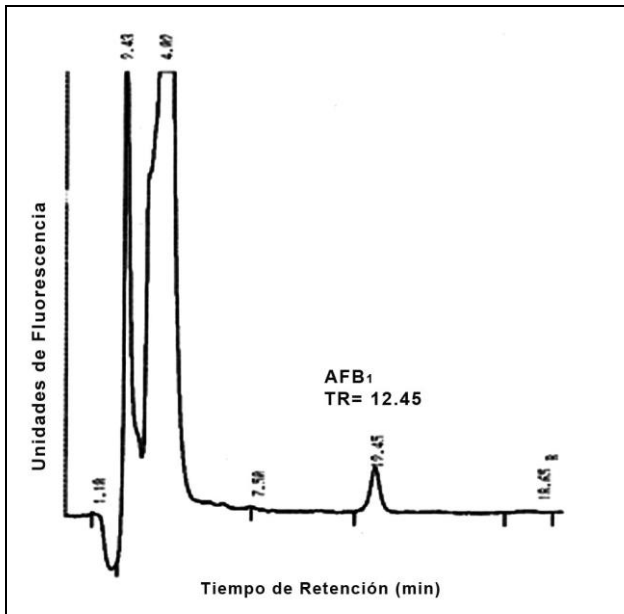


Figura 19: Yema de huevo de la gallina 6 alimentada con $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB_1 , del día 8 con AFB_1 ($72 \mu\text{g kg}^{-1}$).

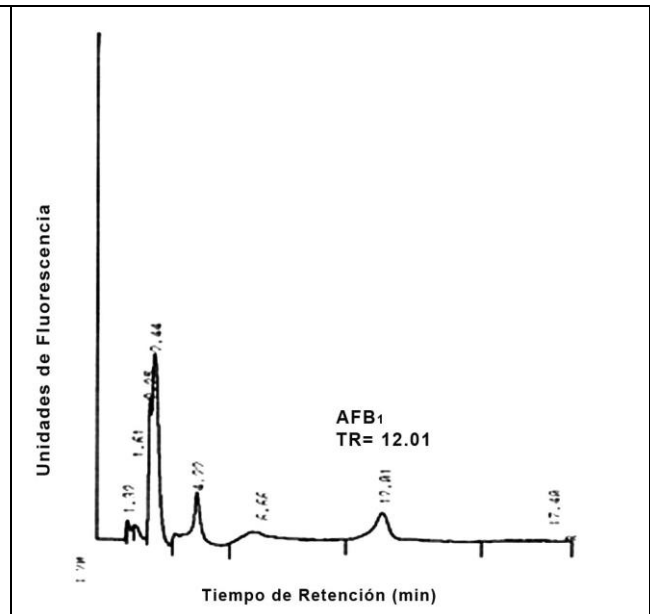


Figura 20: Yema de huevo de la gallina 2 alimentada con $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ AFB_1 , del día 1 con AFB_1 ($30 \mu\text{g kg}^{-1}$).

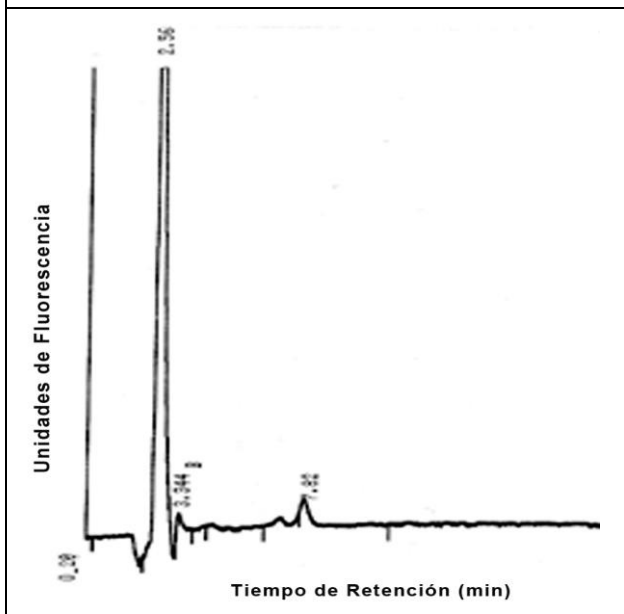


Figura 21: Clara de huevo de la gallina 8 del grupo control, del día 1 sin AF basales.

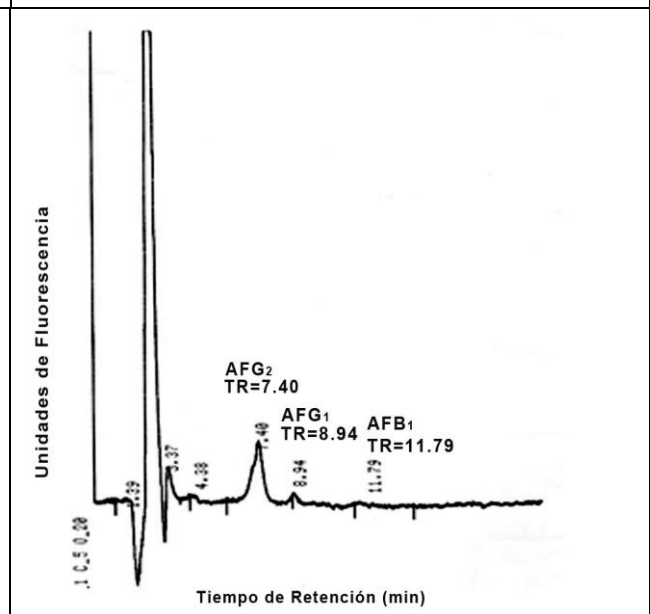


Figura 22 Clara d
e huevo de la gallina 8 del grupo control del día 4 con AF basales AFG_2 ($6 \mu\text{g kg}^{-1}$), AFG_1 ($112 \mu\text{g kg}^{-1}$) y AFB_1 ($30 \mu\text{g kg}^{-1}$).

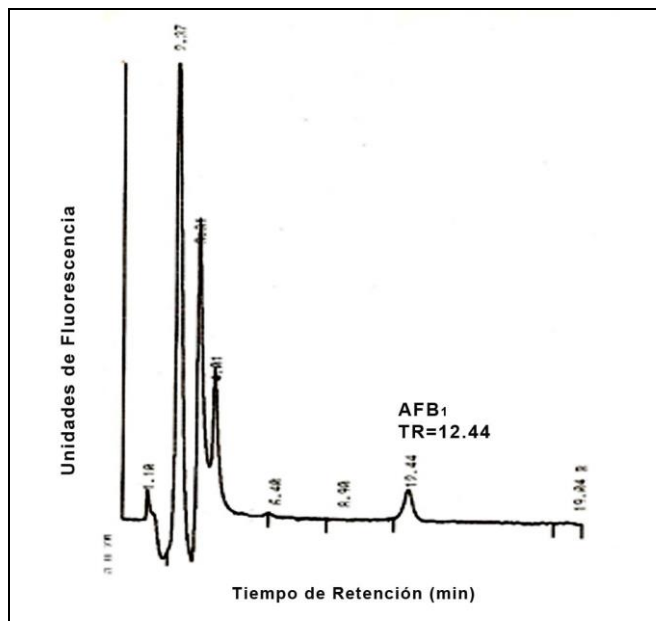


Figura 23 Clara de huevo de la gallina 2 alimentada con $30 \mu\text{g kg}^{-1}$ AFB₁, del día 1 con AFB₁ ($67 \mu\text{g kg}^{-1}$)

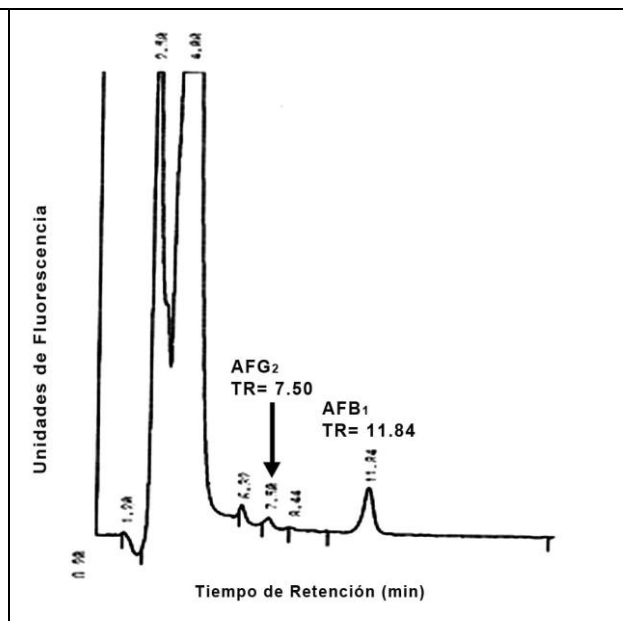


Figura 24: Clara de huevo de la gallina 7 alimentada con $30 \mu\text{g kg}^{-1}$ AFB₁, del día 5 con AFG₂ ($3 \mu\text{g kg}^{-1}$) y AFB₁ ($90 \mu\text{g kg}^{-1}$).

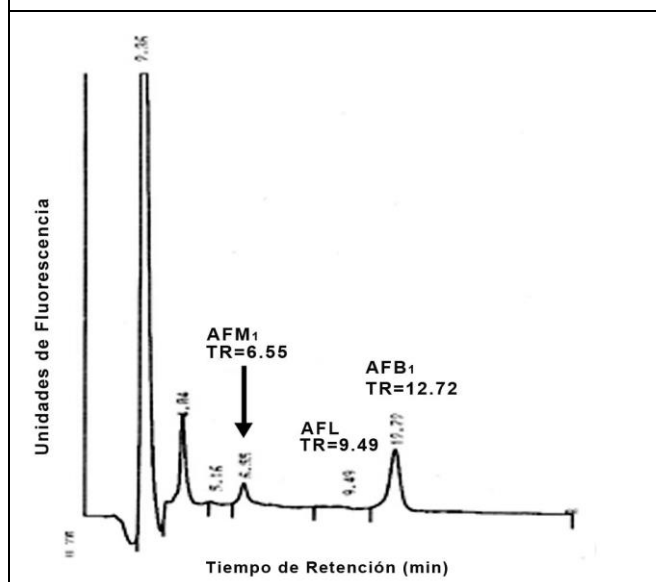


Figura 25: Clara de huevo de la gallina 6 alimentada con $30 \mu\text{g kg}^{-1}$ AFB₁ del día 4 con AFM₁ ($1309 \mu\text{g kg}^{-1}$), AFL ($70 \mu\text{g kg}^{-1}$) y AFB₁ ($117 \mu\text{g kg}^{-1}$).

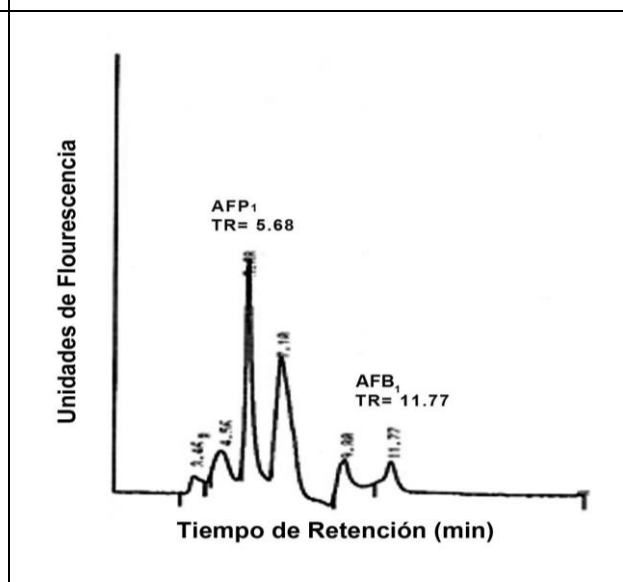


Figura 26: Clara de huevo de la gallina 8 alimentada con $30 \mu\text{g kg}^{-1}$ AFB₁, del día 6, con AFP₁ ($490 \mu\text{g kg}^{-1}$) y AFB₁ ($89 \mu\text{g kg}^{-1}$).

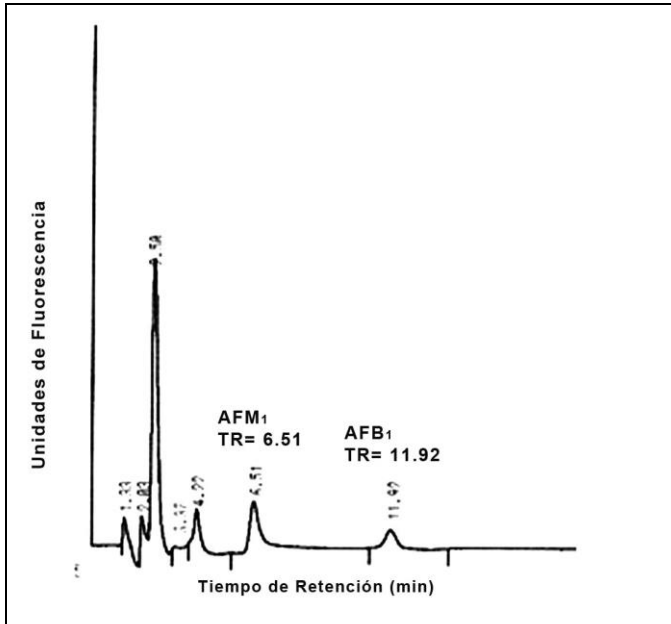


Figura 27: Clara de huevo de la gallina 3 alimentada con $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ AFB₁, del día 1 con AFM₁ ($559 \mu\text{g kg}^{-1}$) y AFB₁ ($23 \mu\text{g kg}^{-1}$).

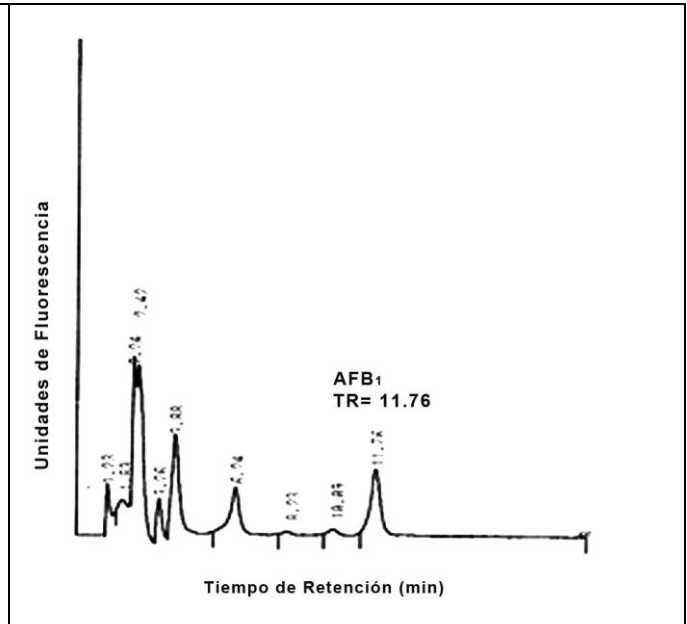


Figura 28: Clara de huevo de la gallina 1 del 14 de agosto alimentada con $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁, donde se recuperó AFB₁.

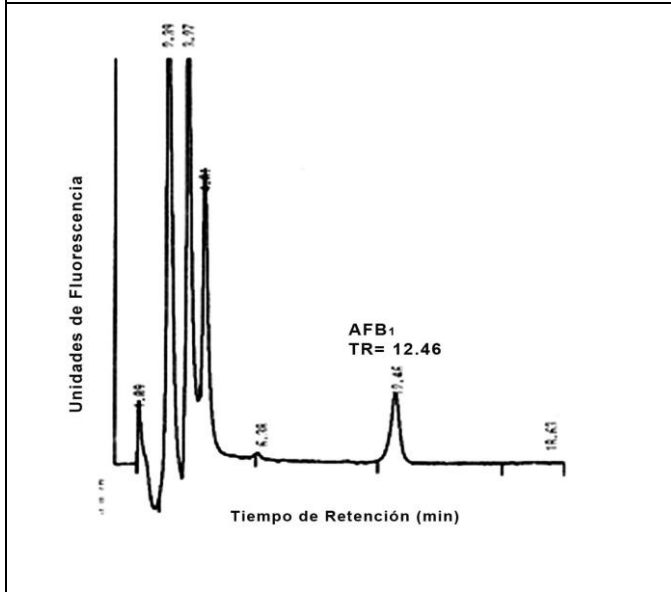


Figura 29: Clara de huevo de la gallina 1 alimentada con $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ AFB₁, del día 1 con AFB₁ ($59 \mu\text{g kg}^{-1}$).

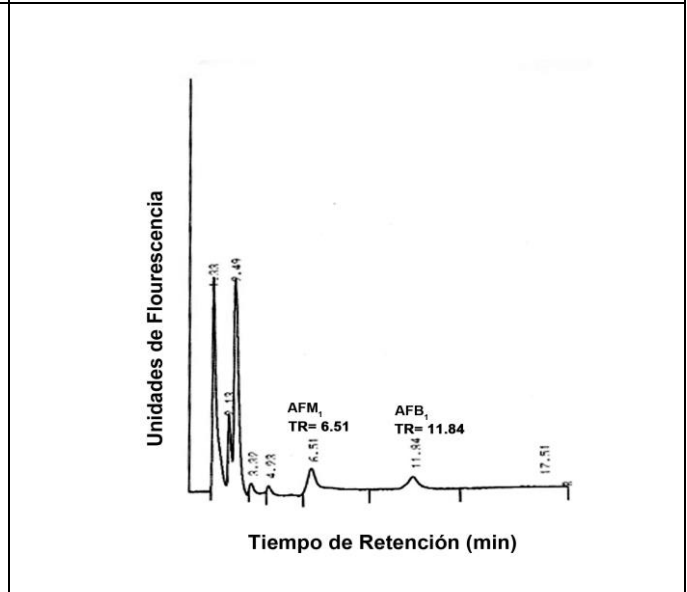
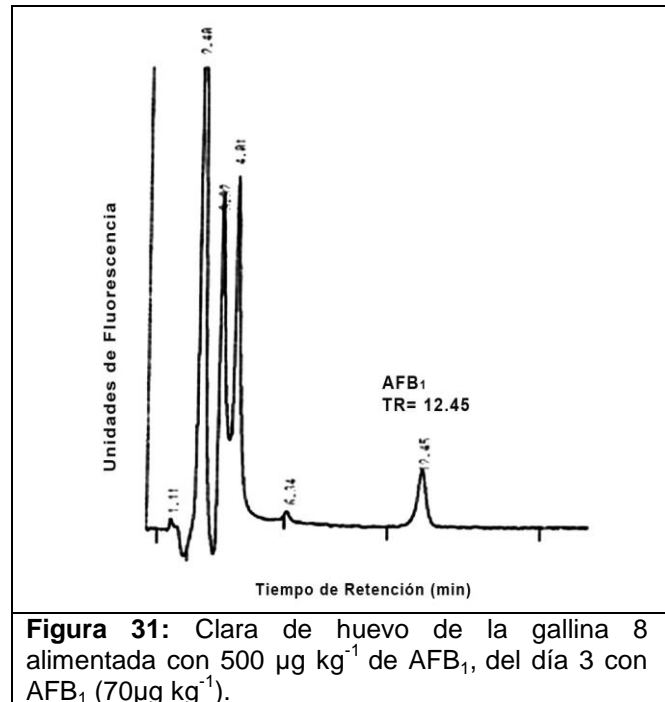
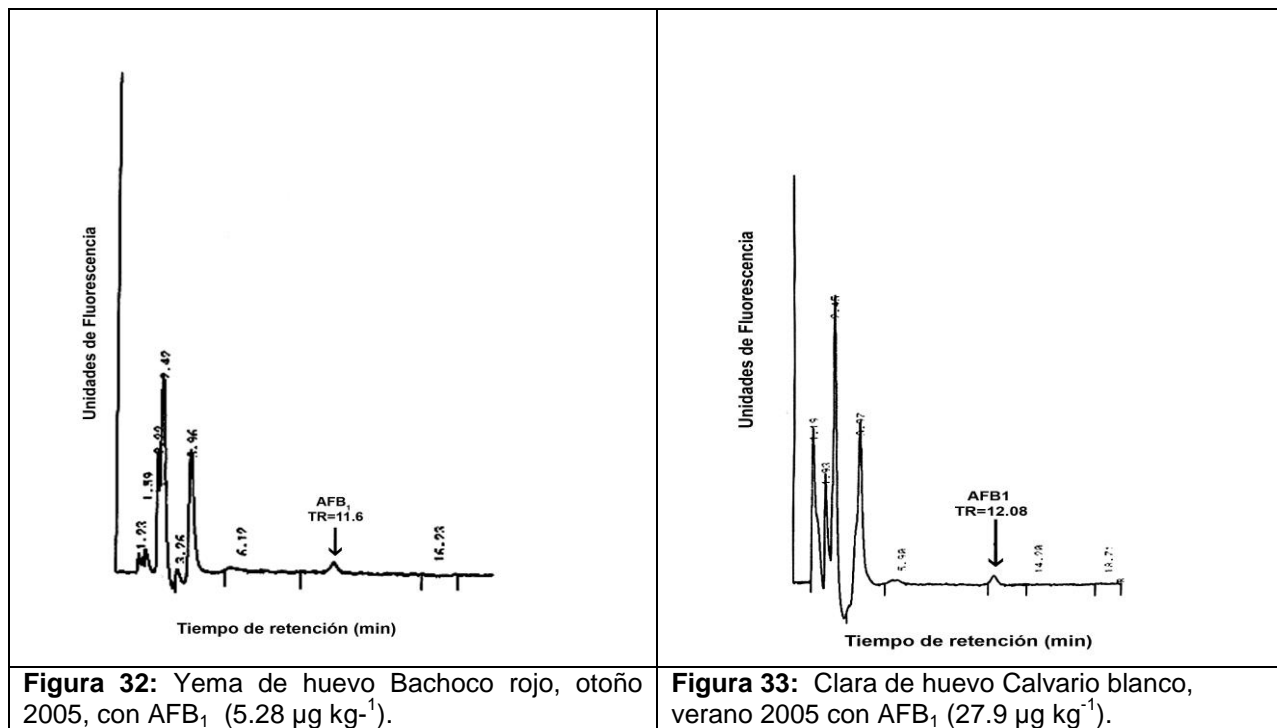


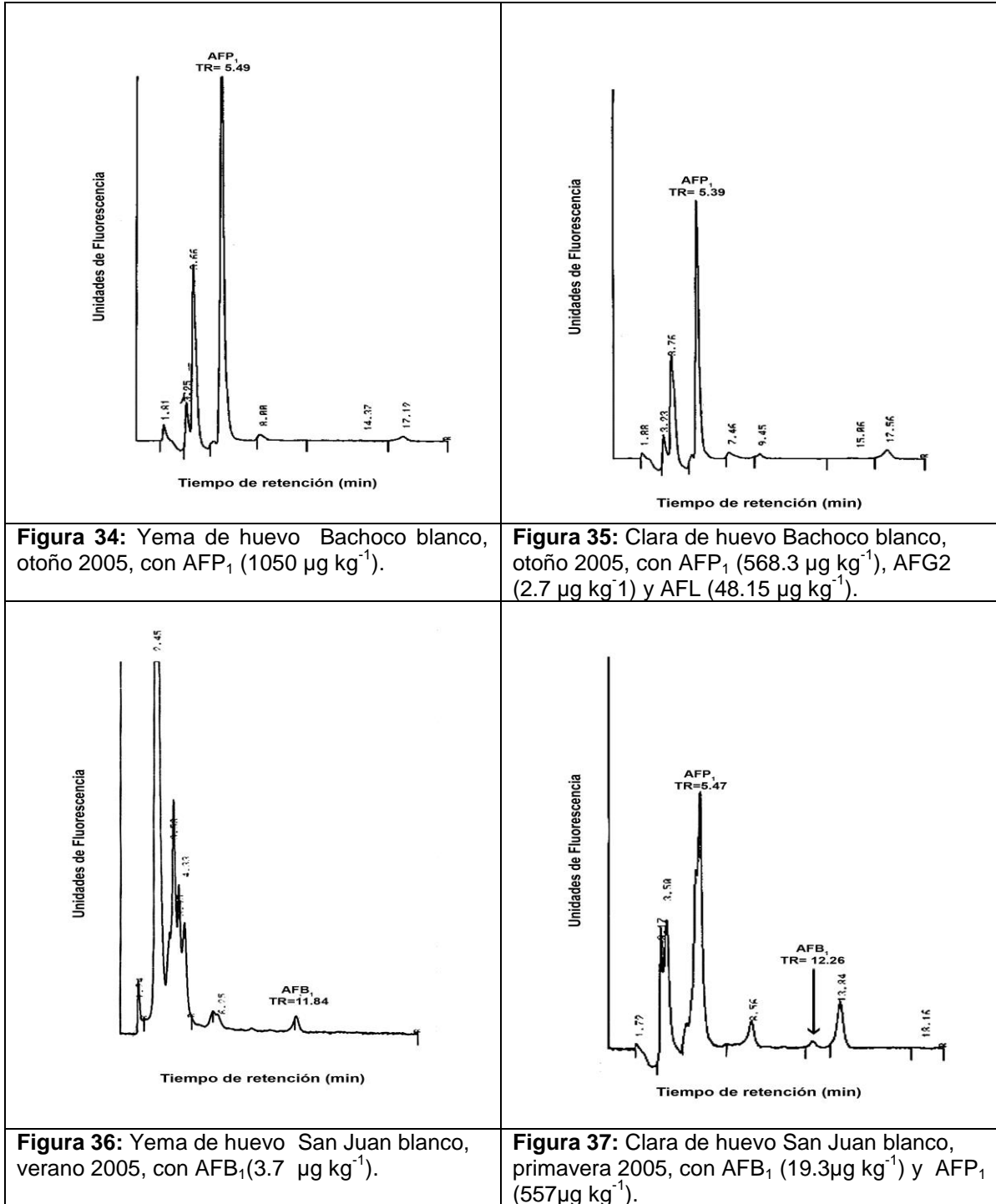
Figura 30: Clara de huevo de la gallina 2 alimentada con $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ AFB₁, del día 1 con AFM₁ ($304 \mu\text{g kg}^{-1}$) y AFB₁ ($21 \mu\text{g kg}^{-1}$).



V.6.2. De huevo comercial en la Ciudad de México.

De la **Figura 32 a 37** se muestran algunos cromatogramas del huevo comercial.





V. 7. Análisis estadístico de aflatoxinas en yema y clara.

a. Del experimento.

El análisis estadístico de cuantiles mostró distribuciones no simétricas que nos llevó a realizar la prueba no paramétrica de rangos Kruskal-Wallis (**Tabla 50**), se dan las diferencias en las distribuciones. Hubo diferencias significativas en AFB₁, para yema el control fue diferente del grupo de 500 µg kg⁻¹ y para clara el control fue diferente del grupo de 30 y 500 µg kg⁻¹. En AFP₁ hubo diferencias para yema, donde el control difirió del grupo de 500 µg kg⁻¹

Tabla 50: Pruebas de Wilcoxon / Kruskal-Wallis (Rango de Suma).

AF/ Trat	Conteo	Suma rangos	Media rangos	(Media-Mediana 0) ² / Estándar 0	Valor de la Estadística
Yema					
AFB₁					
Control	9	63.00	7.00	0.67	7.804*
30	8	119.00	14.88	0.07	
500	8	143.00	17.88	0.44	
AFB₂					
Control	9	119.50	13.28	0.001	0.014
30	8	98.50	12.31	0.01	
500	8	107.00	13.38	0.003	
AFG₁					
Control	9	97.00	10.78	0.09	0.871
30	8	112.50	14.06	0.02	
500	8	115.50	14.44	0.04	
AFG₂					
Control	9	128.00	14.22	0.028	0.371
30	8	112.00	14.00	0.02	
500	8	85.00	10.63	0.10	
AFM₁					
Control	9	111.00	12.33	0.01	0.0899
30	8	99.00	12.38	0.01	
500	8	115.00	14.38	0.04	
AFM₂					
Control	9	120.00	13.33	0.002	0.026
30	8	109.00	13.63	0.007	
500	8	96.00	12.00	0.02	
AFP₁					
Control	9	72.00	8.00	0.46	4.238*
30	8	107.00	13.38	0.003	
500	8	146.00	18.25	0.51	
AFL					
Control	9	103.00	11.44	0.05	0.402
30	8	118.00	14.75	0.06	
500	8	104.00	13.00	0	
Clara					
AFB₁					
Control	9	57.00	6.33	-3.41	11.546*
30	8	138.00	17.25	1.97	
500	8	130.00	16.25	1.50	
AFB₂					
Control	9	125.00	13.89	1.25	0.132
30	8	100.00	12.50	-0.60	
500	8	100.00	12.50	-0.60	
AFG₁					
Control	9	106.00	11.78	-0.85	0.351
30	8	96.50	12.06	-0.58	
500	8	122.50	15.31	1.50	
AFG₂					
Control	9	124.00	13.78	0.58	0.211
30	8	113.00	14.13	0.78	
500	8	88.00	11.00	-1.41	
AFM₁					
Control	9	81.00	9.00	-2.43	2.746
30	8	136.00	17.00	2.22	
500	8	108.00	13.50	0.25	
AFM₂					
Control	9	112.50	12.50	-0.67	0.048
30	8	112.50	14.06	1.37	
500	8	100.00	12.50	-0.60	
AFP₁					
Control	9	81.00	9.00	-2.43	2.926
30	8	112.00	14.00	0.53	
500	8	132.00	16.50	1.93	
AFL					
Control	9	112.50	12.50	-0.67	0.047
30	8	112.50	14.06	1.37	
500	8	100.00	12.50	-0.60	

* = Diferencia significativa; Trat = Tratamiento; AFL = Aflatoxicol.

La **Tabla 51** muestra el análisis de varianza de la media con cada aflatoxina por tratamiento en yema y clara, con un criterio de clasificación. En esta prueba la AFB₁ se encontró significativa.

Tabla 51: Análisis de varianza en yema y clara.

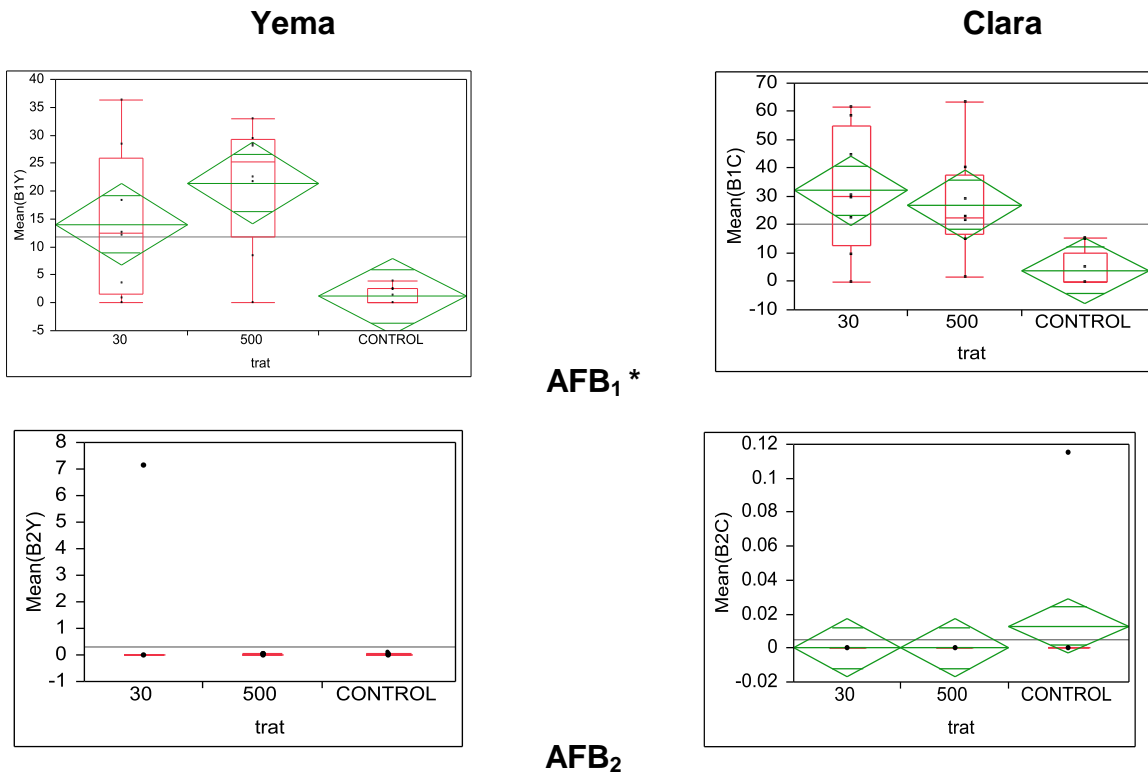
Análisis de varianza en Yema					
AF	GL	Suma de cuadrados	Media cuadrada	Radio F	Prob > F
AFB₁					
Tratamiento	2	1805.41	902.71	9.25	0.0012 *
Error	22	2147.28	97.60		
C. Total	24	3952.69			
AFB₂	Sin suficientes datos				
AFG₁					
Tratamiento	2	877.09	438.54	1.19	0.33
Error	22	8140.29	370.01		
C. Total	24	9017.38			
AFG₂					
Tratamiento	2	13278.80	6639.40	1.08	0.36
Error	22	134908.13	6132.19		
C. Total	24	148186.93			
AFM₁	Sin suficientes datos				
AFM₂					
Tratamiento	2	7878.63	3939.31	1.06	0.37
Error	22	82165.07	3734.78		
C. Total	24	90043.69			
AFP1					
trat	2	14326.50	7163.25	2.37	0.12
Error	22	66534.93	3024.31		
C. Total	24	80861.43			
AFL					
trat	2	8.16	4.08	0.72	0.50
Error	22	124.61	5.66		
C. Total	24	132.77			

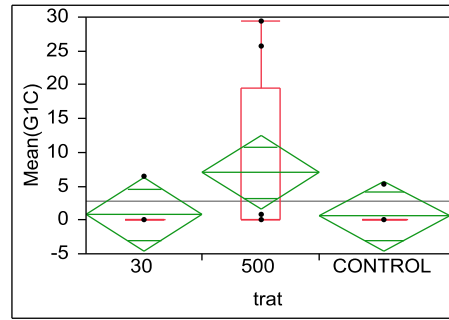
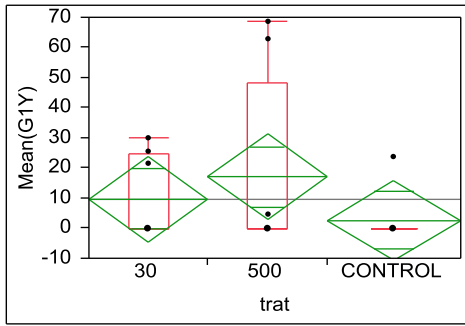
Análisis de Varianza en Clara					
AF	GL	Suma de cuadrados	Media cuadrada	Radio F	Prob > F
AFB₁					
Tratamiento	2	3875.62	1937.81	7.01	0.0044 *
Error	22	6081.69	276.44		
C. Total	24	9957.32			
AFB₂					
Tratamiento	2	0.001	0.001	0.88	0.43
Error	22	0.012	0.001		
C. Total	24	0.013			
AFG₁					
Tratamiento	2	217.52	108.76	2.00	0.16
Error	22	1195.76	54.35		
C. Total	24	1413.27			
AFG₂					
Tratamiento	2	0.11	0.05	0.58	0.57
Error	22	2.00	0.09		
C. Total	24	2.10			
AFM₁					
Tratamiento	2	59600.78	29800.40	1.06	0.36
Error	22	617564.05	28071.10		
C. Total	24	677164.83			
AFM₂					
Tratamiento	2	3030.40	1515.20	1.07	0.36
Error	22	31195.27	1417.97		
C. Total	24	34225.66			
AFP1					
Tratamiento	2	2872.49	1436.25	2.28	0.13
Error	22	13889.86	631.36		
C. Total	24	16762.35			
AFL					
Tratamiento	2	4.26	2.13	1.07	0.36
Error	22	43.80	1.99		
C. Total	24	48.05			

C. total = Suma de cuadrados totales; GL = Grados de libertad.

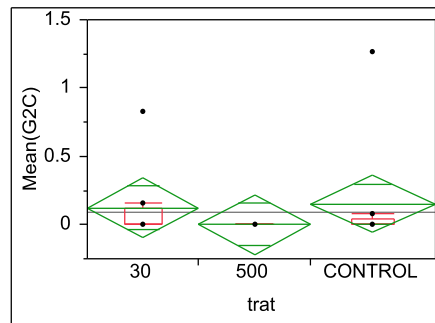
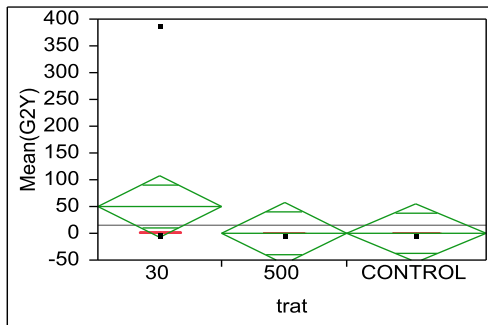
En las AF que se encontraron significativas (AFB_1) se utilizó la prueba de Tukey para encontrar la diferencia en las medias (**Figura 38**), tanto en yema como clara el control es significativamente diferente a los tratamientos con 30 y 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$. En AFB_1 hay diferencia significativa entre control y tratamientos en yema y clara, las demás AF no muestran una diferencia. La AFP_1 resultó una diferencia entre el grupo control de los 2 tratamientos, pero no fue significativa en yema y clara.

Los rombos verdes representan la estadística de prueba y los rectángulos rojos corresponden a las gráficas de bigotes que representan la media, las desviaciones estándar y las observaciones aberrantes.

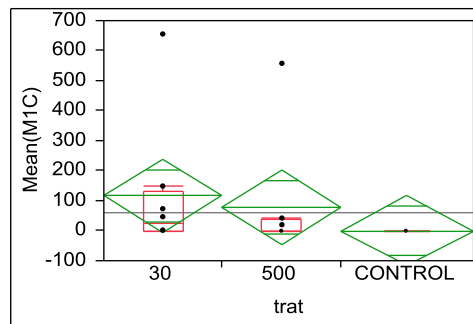
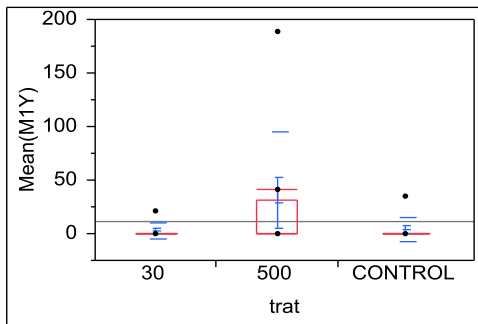




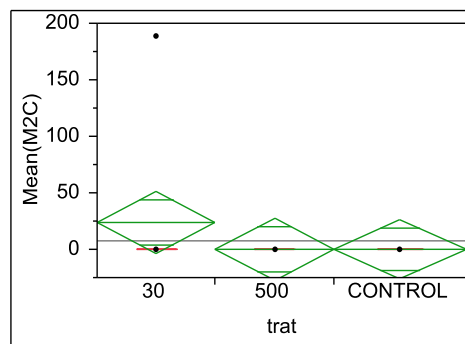
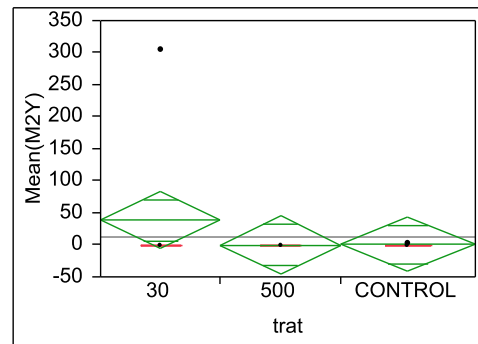
AFG₁



AFG₂



AFM₁



AFM₂

Yema

Clara

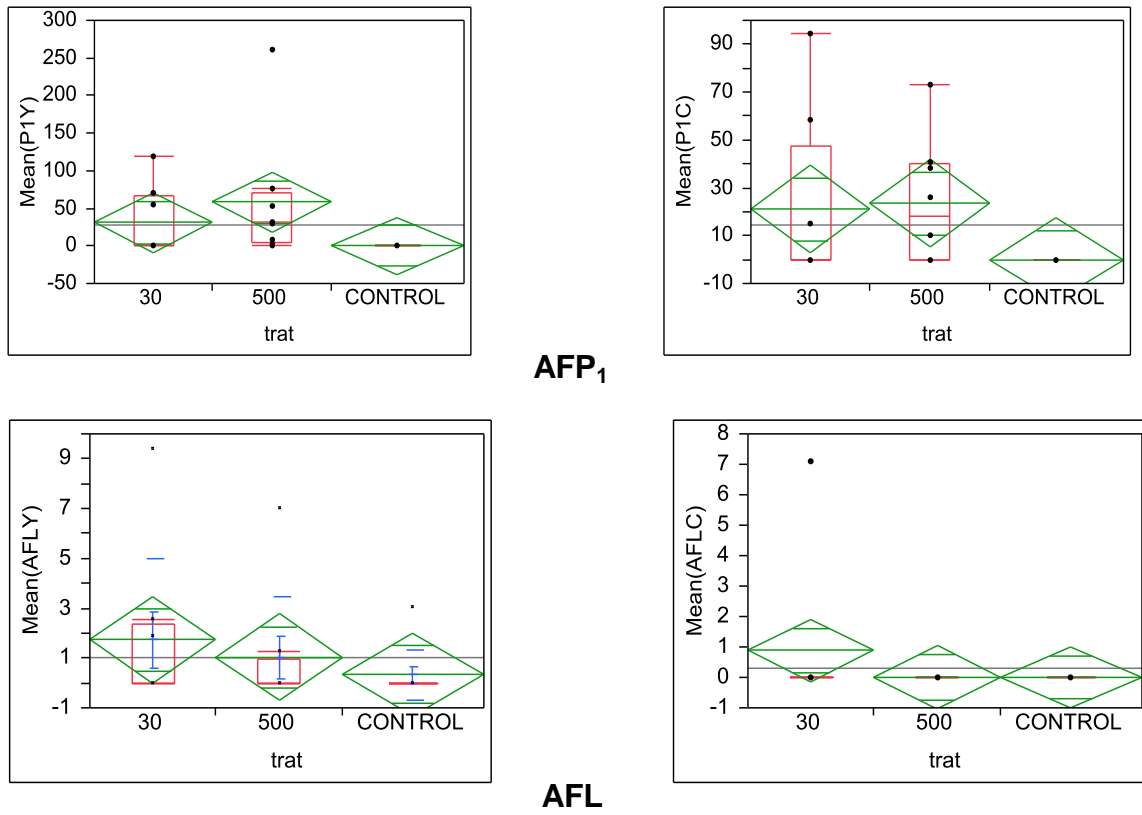


Figura 38: Análisis de una vía de la media de la Aflatoxina por tratamiento en yema y clara del experimento.

En los modelos mixtos se toma en consideración tanto la variabilidad por gallina como el efecto acumulativo de AF con el tiempo. Utilizando el modelo mixto se encontró que sólo existe efecto del tiempo en el caso de AFP₁ en yema y se encontró un efecto en AFG₂ en clara. **Tabla 52.**

Tabla 52: Modelos lineales mixtos controlados por el efecto de la gallina.

Análisis de varianza en clara			
AF	Grados de libertad	Estadística de Wald	Prob >F
AFB₁			
Tratamiento	2	19.23	0.0001 *
Efecto aleatorio gallina	1	1.64	0.05
AFG₂			
Tratamiento	2	6.23	0.044
Efecto aleatorio gallina	1	14.23	> 0.0001

Análisis de varianza en yema			
AF	Grados de libertad	Radio F	Prob >F
AFB₁			
Tratamiento	2	12.88	0.0016*
Efecto aleatorio gallina	1	1.52	0.06
AFP ₁			
Tratamiento + tiempo	9	17.57	0.0405
Efecto aleatorio gallina			.03

b. Del muestreo del huevo comercial en la Ciudad de México.

Se encontraron diferencias significativas en AFL ($P = 0.03$) en la interacción de marca y estación, esto es explicable porque sólo se presentan en una marca y en dos estaciones. En el caso de AFB₁ se encuentra que la interacción de marca y estación es significativa ($P = 0.02$); se ajustaron modelos tanto por marca y estación pero al disminuir los datos estas interacciones ya no son significativas. Este comportamiento es similar en AFt.

VI. CONCLUSIONES

1. Tanto la yema como la clara tuvieron aflatoxinas AFB₁, AFG₁ y AFG₂ y sus metabolitos AFM₁, AFM₂, AFP₁ y AFL, siendo la yema la más contaminada.
2. Hubo más biotransformación de la AFB₁ hacia la AFM₁ tanto en la **yema** del grupo control con 21.5 µg kg⁻¹ de AFM₁, como en la del grupo alimentado con 30 µg kg⁻¹ de AFB₁ que tuvo 100.7 µg kg⁻¹ de AFM₁, mientras que en el grupo alimentado con 500 µg kg⁻¹ de AFB₁ se biotransformó más hacia AFP₁ (48.4 µg kg⁻¹).
3. Las AF más abundantes en **clara** fueron en el grupo control la AFG₁ (4.6 µg kg⁻¹); en el grupo alimentado con 30 y 500 µg kg⁻¹ de AFB₁ fue la AFM₁ con 81.6 µg kg⁻¹ y 35.9 µg kg⁻¹ respectivamente.
4. El grupo control presentó un 76% de los **huevos** con alguna AF, el grupo alimentado con 30 µg kg⁻¹ de AFB₁ tuvo el 82% de los huevos con AF ó hidroxilados, y el grupo alimentado con 500 µg kg⁻¹ de AFB₁ tuvo el 100% de los huevos contaminados.
5. La presencia de los metabolitos hidroxilados AFM₁, AFM₂, AFP₁ y AFL en yema y clara es por la biotransformación de la AFB₁ en el hígado de la gallina como mecanismo de defensa y auto-desintoxicación.
6. En terminos de AFt el grupo control presentaron un promedio de 38 µg kg⁻¹ en el 76% de los huevos; el grupo alimentado con 30 µg kg⁻¹ de AFB₁ presentó 398 µg kg⁻¹ de AFt en el 82% de huevos y el grupo de 500 µg kg⁻¹ de AFB₁ el 100% de los huevos estuvo contaminado con un promedio de 205 µg kg⁻¹ de AFt.
7. La muestra comercial con más AFt fue Bachoco blanco (192.3 µg kg⁻¹) y con AFB₁ el Bachoco rojo (45.8 µg kg⁻¹). No hubo diferencias significativas ni en marca ni en color de cascarón. Todas las marcas estuvieron fuera de norma con AFt (µg kg⁻¹): Bachoco rojo (81.2), San Juan blanco (145.8), San Juan rojo (40.8) y Calvario blanco (112.5).
8. Todas las concentraciones de AFt de los 3 grupos de huevos experimental y comercial representan riesgo para la salud en consumo humano, según la tolerancia máxima permitida en México que es 20 µg kg⁻¹ de AFt.
9. El huevo aporta AF a la dieta del mexicano, que además las recibe de otros alimentos contaminados como chile, tortillas de maíz, lácteos, pollo, arroz, especias, etc.; y colabora a que México tenga el primer lugar en enfermedades hepáticas de América.

VII. BIBLIOGRAFÍA.

Abdolamir-Allameh, Alireza-Safamehr, Mirhadi, S.A., Mahmmoud-Shivazad, Razzaghi-Abyaneh, M. & Aflatoxinashar-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.

Ames, B.N. 1971. The detection of chemical mutagens with enteric bacteria in A. Hollaender (Ed.), *Chemical Mutagens: Principles and Methods for their Detection*, *Plenum*, 1 : 267-282.

Ames, B.N., Lee, F.D. & Durston, W.E. 1973 a. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proceedings of Natural Academy of Sciences*, 70: 782-786.

Ames, B.N., Durston, W.E., Yamasaki, E. & Lee, F.D. 1973 b. Carcinogens are mutagens: A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proceedings of Natural Academy Sciences*, 70: 2281-2285.

AOAC, Association of Official Analytical Chemist International. 1995. Natural Toxins. In: *Official Methods of Analysis of AOAC International* AOAC International, vol. II, Cap. 49 (pp. 1-3). Virginia, USA.

AOAC, Association of Official Analytical Chemist International. 2005. Natural toxins in *Official Methods of Analysis of AOAC international*. Horwitz, W (Ed.). 17th edition. Trucksess, M.W. Chapter Editor. Chapter 49: Natural Toxins. Vol.II Food Composition Additives; Natural contaminants. Washington, D.C. USA. p. 1-42.

Astiasarán, A.I. & Martínez, H.A. 2000. Alimentos: Composición y propiedades, Editorial McGraw-Hill Interamericana, pp. 11, 53-60.

Binder, E.M. 2007 a. LC/MS/MS ¿El Nuevo Método de Referencia para la Detección de Micotoxinas?. *Los Avicultores y su entorno*, 10 (55): 38-42.

Binder, E.M. 2007 b. Managing the risk of mycotoxins in modern feed production, *Animal Feed Science and Technology*, 133 (2007): 149–166

Calnek, B.W., Barnes, H.J., Beard, C.W., Mc Dougald, L.R. & Saif, Y.M. 1997. Diseases of poultry, 9^a Edition. Editorial Board for the American Association of Avian Pathologist. Ames, IOWA, USA. 929 pp.

Carnaghan, R.B.A., Hartley, R.D. & O'Kelly, J. 1963. Toxicity and fluorescence properties of the aflatoxins. *Nature*, 200: 1101.

- Carvajal, M. 1994. Micotoxicosis. Sección B. Capítulo 87: Micetismos, Micotoxicosis y Alergias por hongos. En: Microbiobiología y Parasitología Médicas. Tay Zavala, J. Ed. Méndez y Cervantes Editores, S.A. de C.V. 2ª. Edición. México, D.F. 4.141-4.151.
- Carvajal, M., Rojo, F., Méndez, I., & Bolaños A. 2003. Aflatoxin B₁ and its interconverting metabolite aflatoxicol in milk: the situation in Mexico. *Food Additives and Contaminants*, 26 (11): 1077-1086.
- Charmley, L.L., Trenholm, H.L., Prelusky, D.B. & Rosenberg, A. 1995. Economic losses and decontamination. *Natural Toxins*, 3 (4):199-203.
- Chiavaro, E., Dall'Asta C., Galaverna G., Biancardi A., Gambarelli E., Dossena A., & Marchelli, R. 2001, New reversed-phase liquid chromatographic method to detect aflatoxins in food and feed with cyclodextrins as fluorescence enhancers added to the eluent. *Journal of Chromatography A*, 937: 31-40.
- Codex Alimentarius 1997. Higiene dos Alimentos. Textos básicos. Termo de Coperação 37. Agência Nacional de Vigilância Santária. OPS. 1-65 pp.
- Codex Alimentarius. 2003. Código de práctica para prevenir y reducir la contaminación con micotoxinas en cereales, incluyendo apéndices relativos a la ocratoxina A, la zearalenona, las fumonisinas y los tricotecenos. CCA/RCP-2003. Publicación preliminar. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma, Italia. Consultada el 11 de Octubre del 2011.
- Cortés, G., Carvajal, M., Méndez-Ramírez, I., Ávila-González, E., Chilpa-Galván, N., Castillo-Urueta, P., and Flores, C.M. 2010. *et al.* Identification and quantification of aflatoxins and aflatoxicol from poultry feed and their recovery in poultry litter. □ *Poultry Science*, 89 (2010), pp. 993–1001.
- Creppy, E.E. 2002. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. Review article. *Toxicology Letters*, 127 (2002): 19–28.
- D'Mello, J.P.F & Macdonald, A.M.C. 1997. Mycotoxins. *Animal Feed Science Technology*, 69:155-166.
- Denli M. & Pérez J.F. 2006. Contaminación por micotoxinas en los piensos: efectos, tratamiento y prevención, Departamento de Ciencia Animal y de Alimentos, Facultad de Veterinaria: UAB, 1-18.
- Derache, R. 1990. Toxicología y Seguridad de los Alimentos. Ediciones Omega Barcelona. 172-183.
- Díaz, D.E. 2005. The Mycotoxin Blue Book. Nottingham University Press. 1, 77-80.

- Fan, T.L. & Chu, F. 1984. Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for detection of aflatoxin B₁ in corn and peanut butter. *Journal of Food Protection*, **47** (4): 263-266.
- FAO, Food and Agriculture Organization. 1991. Estudio FAO: Alimentación y Nutrición. Manuales para el control de calidad de los alimentos. 10. Capacitación en análisis de micotoxinas. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación. 6-10, 37-39.
- FAO, Food and Agriculture Organization. 2003. Estudio: Alimentación y Nutrición. Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones en el año 2003. *Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación*. pp. 60.
- Fernandes-Oliveira, C.A., Kobashigawa E., Alves-Reis, T., Mestieri L., Albuquerque R. & Corrêa B. 2000. Aflatoxin B₁ residues in eggs of laying hens fed a diet containing different levels of the mycotoxin. *Food Additives and Contaminants*, **17** (6): 459-462.
- García S. & Heredia N. 2006. Mycotoxins in Mexico: Epidemiology, management, and control strategies, *Mycopathologia*, **162**: 255-264.
- Garner, R.C., Whattam, M.M., Taylor, P.J.L. & Stow, M.W. 1993. Analysis of United Kingdom purchased spices for aflatoxins using an immunoaffinity column clean-up procedure followed by high-performance liquid chromatographic analysis and post-column derivatisation with pyridinium bromide perbromide. *Journal of Chromatography*, **648**: 485-490.
- Gilbert, J. 2002. Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs. *Trends in Analytical Chemistry*, **21** (6,7): 468-486.
- Gimeno, A. 2004. Aflatoxina M₁ en la Leche. Riesgos para la Salud Pública. *Prevención y Control, Alimentação Animal*, **49**: 32-44.
- Groopman, J. D. & Donahue, K. F. 1988. Aflatoxin, a human carcinogen: determination in foods and biological samples by monoclonal antibody affinity chromatography. *Journal of the Association of Official of Analytical Chemists*, **71**:861.
- Quattrocchi, O.A., Abelaira de Andrizzi, S.I. y Alba, R.F. 1992. Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica. Artes Gráficas Farro, Buenos Aires. Argentina. 422 pp.
- Guzmán de Peña, D. 2007. La exposición a la AFB₁ en animales de laboratorio y su significado en la salud pública. *Salud Pública de México*, **49** (3): 227-235.
- Holzapfel, C.W., Steyn, P.S. & Purchase, I.F.H. 1966. Isolation and structure of aflatoxins M₁ and M₂. *Tetrahedron Letters*, **25**: 2799-2803.
- Hsieh, L.L., Hsu, S.W., Chen, D.S. & Santella, R.M. 1988. Immunological detection of aflatoxin B₁-DNA adducts formed "in vivo". *Cancer Research*, **48**: 6328-6331.
- http://institucionacionalavicola.org.mx/index.php?option=com_content&task=view&id=9&Itemid=9

IARC, International Agency for Research on Cancer. 2002. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. *In*: Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. IARC, **82**: 171.

INEGI, Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Población, Censo de Población y Vivienda 2012.

Dirección de página electrónica:

http://www.google.com.mx/search?q=inegi+2012&rls=com.microsoft:es-mx:IE-SearchBox&ie=UTF-8&oe=UTF-8&sourceid=ie7&rlz=117WZPA_en&redir_esc=&ei=RpaUT9avCsjm2gXap fiSBQ

IEH, Instituto de Estudios del Huevo. 2007. Seguridad Alimentaria en huevos y ovoproductos, ¿Qué es el huevo? Composición del huevo,

Dirección de página electrónica: [//www.institutohuevo.com/scripts/formacion.asp](http://www.institutohuevo.com/scripts/formacion.asp)

IEH, Instituto de Estudios del Huevo. 2008 a. Seguridad Alimentaria en huevos y ovoproductos, Sector económico. Historia: El origen de la avicultura y la producción de huevos en España.

Dirección de página electrónica: [//www.institutohuevo.com/scripts/formacion.asp](http://www.institutohuevo.com/scripts/formacion.asp)

IEH, Instituto de Estudios del Huevo. 2008 b. Seguridad Alimentaria en huevos y ovoproductos, ¿Qué es el huevo? Formación: Proceso de Formación,

Dirección de página electrónica: <http://www.institutohuevo.com/scripts/formacion.asp>

IEH, Instituto de Estudios del Huevo. 2008 c. Seguridad Alimentaria en huevos y ovoproductos, ¿Qué es el huevo? Estructura.

Dirección de página electrónica: <http://www.institutohuevo.com/scripts/estructura.asp>

IEH, Instituto de Estudios del Huevo. 2008 d. Seguridad Alimentaria en huevos y ovoproductos, El huevo en la alimentación y la Salud: la alimentación saludable.

Dirección de página electrónica: [//www.institutohuevo.com/scripts/formacion.asp](http://www.institutohuevo.com/scripts/formacion.asp)

INA, Instituto Nacional Avícola, 2008 a, Huevo, El huevo en la Alimentación: México es el primer consumidor de huevo en el mundo. Dirección de página electrónica: <http://www.institutonacionalavicola.org.mx/>

INA, Instituto Nacional Avícola, 2008 b, ¿Qué es el Huevo?: Estructura y composición del huevo.

Dirección de página electrónica: <http://www.institutonacionalavicola.org.mx/>

INA, Instituto Nacional Avícola, 2008 c, ¿Qué es el Huevo?: El color de la cáscara.

Dirección de página electrónica: <http://www.institutonacionalavicola.org.mx/>

INA, Instituto Nacional Avícola, 2008 d, ¿Qué es el Huevo?: Perfil Nutricional.
Dirección de página electrónica: <http://www.institutonacionalavicola.org.mx/>

INA, Instituto Nacional Avícola, 2011, Resultados del estudio sobre el consumo de huevo en México realizado por Gallup de México. Dirección de página electrónica:
http://www.institutonacionalavicola.org.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=63&Itemid=76

Jaimez, J., Fente C.A., Vazquez B. I., Franco C.M., Cepeda A., Mahuzier G. & Prognon P. 2000. Application of assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescent detection in food analysis, *Journal of Chromatography A*, **882** (2000) 1-10.

Joffe, A.Z. 1950. Toxicity of fungi on cereals overwintered in the field (on the etiology of alimentary toxic aleukia). Dissertation, Inst. Bot. Acad. Sci. U.S.S.R., Leningrad. 205 p.

Jones, B.D. 1972. Methods of aflatoxin analysis. Tropical Products Institute. London, 58.

Juan, C., Soriano, J.M. & Burdaspal, P. 2007. Aflatoxinas del grupo B y G. En: Micotoxinas en Alimentos. Capítulo 8. Editor. Soriano Del Castillo, J.M. Ediciones Díaz de Santos, España.167-184.

Kok, W. Th. 1994. Derivatization reactions for the determination of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection, *Journal of Chromatography Biomedical Sciences and Applications*, **659** (1-2):127-137.

Kovács, M. 2004. Dirección: Kaposvári Egyetem, Allattudományi Kar. Mikotoxinok táplálkozás-egészségügyi vonatkozásai (Nutritional health aspects of mycotoxins), **4**, **145** (34):1739-46.

Lindner, E. 1995. Toxicología de los alimentos. 2ª. Ed. Acribia. Zaragoza, España. 117-125.

Liu Z., Gao J., & Yu J. 2006. Aflatoxins in stored maize and rice grains in Liaoning Province, China. *Journal of Stored Products Research*, **42**: 468–479.

Loetzsch R. & Leistner L. 1976. Aflatoxin-Rueckstaende in Huehnereiern und Eiprodukten (Aflatoxin residues in hens' eggs and egg products). *Fleischwirtschaft* (Germany, F.R.) **56**(12): 1777-1785.

Márquez, M.A. 2008. Historia de la Unión Nacional de Avicultores de México. 1958-2008. Unión Nacional de Avicultores. 297 pp. ISBN 607000325X, 786070003257

Dirección de página electrónica:

<http://books.google.com.mx/books?id=DTdJewAACAAJ&dq=inauthor:%22Miguel+%C3%81ngel+M%C3%A1rquez%22&hl=es&sa=X&ei=-JCUT7WED8nU2AWXxIGfBQ&ved=0CD0Q6AEwAg>

Moeller, S.M., Jacques, P.F. & Blumberg J.B., 2000. The potential role of dietary xanthophylls in cataract and age-related macular degeneration. *Journal of the American College of Nutrition*, **19**: 522S-527S.

- Noa-Pérez, M. 2001. Cromatografía de gases y de líquidos de Alta resolución, aplicación en el análisis de alimentos, Serie Académicos CBS. Universidad Autónoma Metropolitana, División de Ciencias Biológicas y de la Salud. p. 15-17 y 128-214.
- NOM, Norma Oficial Mexicana. 2002. NOM-188-SSA1-2002: Productos y Servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones sanitarias, 1, 15.
- Oğuz, H., Kurtoğlu F. & Birdane Y.O. 2002. Evaluation of biochemical characters of broilers chickens during dietary aflatoxin (50 and 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$) and clinoptilolite exposure. *Research in Veterinary Science*, 73: 101-103.
- OPS, Organización Panamericana de la Salud. 1983. Criterios de Salud Ambiental 11: Micotoxinas, Publicación Científica N° 453, 131 pp.
- Park, L. D. & Liang B. 1993. Perspectives on AF control for human food and animal feed. *Trends in Food Science & Technology*, 4: 334-342.
- Peckok, R.L. & Shields, D. 1983. Métodos de análisis químicos. Limusa. México. 487 p.
- Purchase, I.F.H. 1967. Acute toxicity of aflatoxins M1 and M2 in one-day-old ducklings. *Food Cosmetics and Toxicology*, 5: 339-342.
- Romer, T.R. 1975. Screening method for the detection of aflatoxins in mixed feeds and other agricultural commodities with subsequent confirmation and quantitative measurement of aflatoxins in positive samples. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 58: 500-506.
- SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2007. Servicio de información Agroalimentaria y Pesquera 2007. Avance acumulado de la producción pecuaria, Elaborado por el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), con información de las Delegaciones de la SAGARPA. Dirección de página electrónica: <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/>
- Shibamoto, T. & Bjeldanes L. F. 1996. Introducción a la toxicología de los alimentos, Editorial Acribia, España, páginas consultadas: 99-105.
- Sodhi, S., Brar A.P.S., Ghai J.K. & Brar R.S. 2005. Biochemical and immunological effects of dietary exposure to aflatoxin B1 in broiler chicks. *Indian Journal of Poultry Science*, 40(2):155-157.
- Sogorb-Sánchez, M.A. y Vilanova-Gisbert E. 2005. Técnicas analíticas de contaminantes químicos, aplicaciones toxicológicas, medioambientales y alimentarias. Ediciones Díaz de Santos, España. p. 173-185.

- Soriano del Castillo, J.M. *et al.* 2007. Micotoxinas en Alimentos. Ediciones Díaz de Santos, páginas consultadas: 3-16, 167-170.
- Sweeney, M.J. & Dobson A.D.W. 1999. Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters*, 175: 149-163.
- Trucksess, M.V. & Stoloff, L. 1984. Determination of aflatoxicol and AFB₁ and M₁ in eggs. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 67 (2): 317-320.
- Trucksess, M.V., Stoloff, L., Young, K., Wyatt, R.D., & Miller, B.I. 1983. Aflatoxicol and AFB₁ and M₁ in eggs and tissues of laying hens consuming aflatoxin-contaminated feed. *Poultry Science*, 62: 2176-2182.
- UNA, Unión Nacional de Avicultores. 2011. Indicadores Económicos. Dirección de página electrónica:
http://www.una.org.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=180&Itemid.
- Unusan, N., 2006. Occurrence of aflatoxin M₁ in UHT milk in Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 44: 1897–1900.
- Vaamonde, G. 1995. Micotoxinas. En: Toxicología de los Alimentos. Capítulo VIII. Editor y Coordinador Silvestre A. A., Editorial Hemisferio Sur, 429 pp, páginas consultadas: 153-157, y 165-173.
- Wolzak A., Pearson A.M., Coleman T.H., Pestka J.J., Gray J.I. 1985. Aflatoxin deposition and clearance in the eggs of laying hens. *Food and Chemical Toxicology*, 23 (12):1057–1061
- Yen, I.C. & Bidasee, K.R. 1993. Liquid chromatographic determination of aflatoxins in animal feeds and feed components. *Journal of AOAC International*, 76 (2): 366-370.
- Trucksess, M. W., Stoloff, L., Young, K. 1983. Aflatoxicol And Aflatoxins B and M₁ in eggs and tissues of laying hens consuming aflatoxin contaminated feed. *Poultry Science*, 62 (11): 2176-2182.