

EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE AFLATOXINAS EN MUESTRAS DE HÍGADO Y MÚSCULO DE CERDOS

Extraction and Determination of Aflatoxins in Liver and Muscle Samples in Swine

María del Carmen Bermúdez-Almada, Angélica Espinosa-Plascencia, Ana Isabel Valenzuela-Quintanar y Luz Vázquez-Moreno

*Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Apdo. Postal 1735, Hermosillo, Sonora, México C.P. 83000.
E-mail: cbermudez@cascabel.ciad.mx. Tel. (6) 289-24-00. Tel/Fax (6) 280-00-58.*

RESUMEN

La determinación de aflatoxinas en tejidos animales es compleja debido a la interferencia ocasionada por otros compuestos presentes, difíciles de eliminar. Sin embargo, su análisis es esencial para el establecimiento de regulaciones, control de calidad e investigación. Algunos reportes indican que la concentración de aflatoxinas en tejidos de animales que han consumido dietas contaminadas, es generalmente baja, sin embargo, el significado toxicológico para humanos de estos bajos niveles aún no se ha establecido. Algunos procedimientos que se han desarrollado para la determinación de aflatoxinas en alimentos se basan en cromatografía de capa fina. Estos métodos están limitados por la precisión del procedimiento de detección y los compuestos interferentes presentes en los tejidos, que ocasionan una separación inadecuada. Además se requiere de una prueba confirmatoria, ya que se considera como un método semicuantitativo. La aplicación de la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) para la determinación de aflatoxinas en alimentos para humanos y animales ha representado un avance significativo sobre otros métodos de análisis, por su sensibilidad y precisión en la detección de diversos compuestos. Este trabajo describe una modificación al método de la AOAC, para la cuantificación de aflatoxinas G₁ (AFG₁), B₁ (AFB₁), M₁ (AFM₁), G₂ (AFG₂) y B₂ (AFB₂) por CLAR en fase reversa y detección fluorométrica, empleando un nuevo procedimiento de limpieza de la muestra. El método establecido fue sensible, con un límite mínimo de detección de 0.04-0.25 ng/ml. Se obtuvieron recuperaciones de 85 y 96% para hígado y músculo, respectivamente. Se logró extraer las aflatoxinas sin interferencias y con un adecuado grado de recuperación.

Palabras clave: Aflatoxinas, tejido animal, porcino, CLAR.

ABSTRACT

The determination of aflatoxin residues in animal tissues is troublesome because such tissues contain substances that are difficult to eliminate. However, the analysis is essential for regulatory, quality control, and research purposes. Some reviews indicate that concentration of aflatoxins in the tissues of animals consuming contaminated ration is generally low, however, the human toxicological significance of these low levels has not yet been established. Some developed procedures for the determination of aflatoxins in foods have been largely based on thin layer chromatography. These methods are limited by the precision of detection procedures and often inadequate separation from potentially interfering compounds present in tissues. The application of high performance liquid chromatography (HPLC) for the determination of aflatoxins in foods and feeds has represented a significant advance over previous methods by the sensitivity and precision. This paper describes a modification of the AOAC method to permit the determination of aflatoxins G₁ (AFG₁), B₁ (AFB₁), M₁ (AFM₁), G₂ (AFG₂) and B₂ (AFB₂) by reverse phase and fluorometric detection HPLC. The method was sensitive, with a detection limit of 0.04-0.25 ng/ml for each aflatoxin. The mean recoveries of added aflatoxins were 85 and 96% for liver and muscle, respectively. The proposed method allows aflatoxin to be extracted without interferences and appropriate recovery grade.

Key words: Aflatoxins, animal tissue, swine, HPLC.

INTRODUCCIÓN

Los ingredientes que se emplean en la elaboración de dietas balanceadas para cerdos constituyen un excelente medio de cultivo para el desarrollo de hongos como el *Aspergillus flavus* y el *A. parasiticus*; los cuales son capaces de sintetizar

micotoxinas como metabolitos secundarios, entre ellas las aflatoxinas. Estas no resultan afectadas por la cocción o el procesamiento que sufren los ingredientes en la elaboración de las dietas, lo que constituye un serio peligro para los animales que las consumen por los efectos adversos que les provocan [21]. Además, estas toxinas tienen implicaciones en salud pública, por sus efectos carcinogénicos. [17].

En México, es escasa la información disponible sobre la importancia en salud pública y el impacto económico de las aflatoxinas, sin embargo, varios de los estados productores de granos en este país, poseen características climáticas que favorecen la presencia y el crecimiento de los hongos productores de micotoxinas [18, 20]. En estudios realizados por Ochoa y col. [9] en el estado de Sonora, México, se encontró que de 137 muestras de trigo y 66 de maíz analizadas, el 20% presentó contaminación con AFB₁, el 6.1% tuvo niveles por arriba del máximo permitido por la Administración de Alimentos y Drogas (FDA) de los Estados Unidos de Norteamérica, que establece un valor máximo de 20 ng/g.

Dentro de las especies animales domesticadas para la alimentación humana, el cerdo mantiene el segundo lugar en la capacidad de conversión del alimento consumido en producción de carne [1]. Sin embargo, es también una de las especies más susceptible a las aflatoxinas con relación a otras especies animales. Investigaciones realizadas en cerdos han indicado que esta especie es muy susceptible a las aflatoxinas a edad temprana, entre 1 y 4 semanas [4]. Uno de los órganos más afectados por las aflatoxinas es el hígado, induciendo el desarrollo de cáncer hepático y en ocasiones la muerte del cerdo. También pueden causar la presencia de residuos tóxicos que permanecen en los tejidos comestibles [10, 13].

Hasta 1982, se creía que las aflatoxinas solo contaminaban cereales, nueces y frijol, sin embargo, en 1985 se reportó que las aflatoxinas también contaminan carne de res, cerdo, pollo, hígado de cerdo, huevo, carne para hamburguesa y otros alimentos [16].

Las concentraciones de aflatoxinas en el alimento, que causan toxicosis en porcinos son: en cerdos jóvenes niveles tan bajos como 0.051 µg/g, los que pueden eventualmente causar lesiones hepáticas [6]. En cerdos de engorde, 0.41 µg/g o más por 12-24 semanas y en cerdas gestantes, 0.3-0.5 µg/g por 4 semanas [6, 11].

La determinación de residuos de aflatoxinas en tejidos animales y sus productos, son esenciales para establecer regulaciones, para propósitos de control de calidad y de investigación. La complejidad de la matriz, la presencia de compuestos interferentes y la necesidad de una alta sensibilidad son problemas que se presentan en el análisis de aflatoxinas en tejidos animales.

Existen métodos para la determinación de aflatoxinas en tejidos animales que se basan en la extracción con metanol [14], limpieza del extracto por cromatografía en columna y

cuantificación por cromatografía de capa fina (CCF) [17]. Estos métodos generalmente están limitados por su baja precisión y relativamente baja eficiencia cromatográfica. La cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), ha sido ampliamente aplicada a la separación y determinación de aflatoxinas en productos de origen vegetal. Sin embargo, existen pocas investigaciones realizadas sobre la detección y cuantificación de aflatoxinas en tejidos animales, por lo complejo que resulta hacer este tipo de análisis, por lo que, el presente estudio se realizó con el propósito de establecer un método de extracción y determinación de aflatoxinas en hígado y músculo de porcinos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Los estándares de aflatoxinas utilizados se adquirieron de la casa comercial Sigma Chemical Company (St. Louis, MO.) Todos los solventes y reactivos químicos empleados fueron grado analítico y cromatográfico.

Recolección y preparación de las muestras

Se emplearon 14 muestras de hígado y 14 de músculo del diafragma de cerdos, procedentes de rastros Tipo Inspección Federal (TIF) del estado de Sonora, México. Las muestras congeladas fueron transportadas al laboratorio del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), y se almacenaron a -20°C. Posteriormente se descongelaron y se tomaron aproximadamente 150 g de cada muestra, los cuales se homogeneizaron (Cole Parmer Homogenizer EAL04719-00, Niles, IL.) para el análisis.

Preparación de estándares de aflatoxinas

Se prepararon soluciones patrón de cada uno de los estándares de AFG₁, AFB₁, AFM₁, AFG₂ y AFB₂ en una concentración de 500 µg/mL. A partir de éstas se realizaron diluciones para obtener las soluciones de trabajo, utilizando acetona grado cromatográfico (Aldrich, Inc. Milwaukee, WI.). Las soluciones preparadas se mantuvieron congeladas a -80°C.

Proceso de extracción de aflatoxinas

La metodología empleada para el proceso de extracción de aflatoxinas fue la propuesta por la A.O.A.C. [2], con las siguientes modificaciones. Se aumentó el volumen del solvente de extracción (cloruro de metileno) de 60 a 100 mL, se incrementó el tiempo de agitación con la celita hasta que esta quedara perfectamente incorporada con la muestra (aproximadamente 6 min). Posteriormente, se agitó la muestra (Barnstead/Thermolyne M49125), a una velocidad de 450 rpm por 30 minutos y se filtró con papel Whatman No.2, usando vacío. El ex-

tracto que se obtuvo mediante esta metodología se sometió a un proceso de limpieza.

Limpieza del extracto

El extracto obtenido se evaporó en un rotaevaporador Buchi R-114, Brinkman, Instruments (Westbury, NY.) a 40°C hasta un volumen aproximado de 0.5 mL. Posteriormente, se eliminaron lípidos y color del extracto, mediante una técnica de limpieza recomendada para plaguicidas en hígado [8], con las modificaciones que se detallan a continuación. Al extracto concentrado se le agregaron 8 mL de éter de petróleo y 7 mL de una solución de éter de petróleo:acetonitrilo 1:1 (v/v). Una vez formadas dos capas, se eliminó la superior (capa muy colorida), se agregaron 4 mL de éter de petróleo, se dejó reposar por 3 min y se eliminó nuevamente la capa superior. El contenido final del extracto se evaporó hasta un volumen de 1 mL, posteriormente se pasó por una columna de sílica gel 60 Å, (70-230 mesh ASTM, Baxter Diagnostics Inc., McGraw Park, IL.), para continuar con la fase de limpieza. En esta fase de limpieza se empleó una columna cromatográfica de 30 cm de longitud por 1.3 cm de diámetro, empacada con fibra de vidrio y 2 g de sílica gel previamente activada (calentamiento a 105°C/ 90 min.) y una humedad relativa de 78% (Thermohygro-meter Oakton, Mod. 37200-00, Cole-Parmer Instruments Co., Niles, IL.). Para la elución de las aflatoxinas se empleó una solución de 70 mL de cloruro de metileno:acetona 90:10 (v/v). El eluato que se obtuvo se llevó a sequedad total mediante un rotavapor a 40°C.

Detección y cuantificación de aflatoxinas por cromatografía líquida de alta resolución

Para la detección y cuantificación de aflatoxinas se empleó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución Varian Modelo 9010, conectado a un detector de fluorescencia Varian modelo 9070 (Varian Instruments, Inc. Palo Alto, CA.), con lámpara de xenón y un flujo celular de 70 µl/min, a una longitud de onda de excitación de 365 nm y emisión de 450 nm, con un rango de detección de 0.2 nm. Ambos equipos fueron conectados a un CPU Acer Power 333 S con una impresora Epson LX-810L y un paquete computacional Word Station LC 4.0 Varian. Se utilizó una columna Econosphere ODS de 5 µm C₁₈ fase reversa con una longitud de 25 cm y 4.6 mm de diámetro interno y una pre-columna C₁₈ de 4.5 cm de longitud y 4.6 mm de diámetro, un volumen de inyección de 200 µl y una velocidad de flujo de 1 mL/min. La fase móvil consistió en una solución de agua:acetonitrilo:metanol 66:25:9 (v/v/v), grado cromatográfico filtrada mediante filtros de celulosa, con un diámetro de poro de 0.22 µm y degasificada por 30 min. en un sonificador (Cole Parmer 8892, Niles, IL.).

El extracto de la muestra se derivatizó adicionándole 50 µl de ácido trifluoroacético, de acuerdo a la metodología propuesta por Gregory y Manley [5]. El análisis de las muestras se hizo por duplicado de extracción y determinación, utilizando además una muestra libre de aflatoxinas como blanco,

y otra adicionada de una mezcla de estándares de aflatoxinas con las siguientes concentraciones, AFG₁ y AFM₁:2 ng/g; AFB₁:0.5 ng/g y AFG₂; AFB₂:1 ng/g. Esto con la finalidad de establecer los porcentajes de recuperación del proceso de extracción. La cuantificación se realizó a través del método de estándar externo. Los datos obtenidos se analizaron mediante estadística descriptiva.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aseguramiento de la calidad

En este trabajo se establecieron las condiciones cromatográficas del equipo utilizado, así como los tiempos de retención para cada aflatoxina, AFG₁ tuvo un tiempo de 6.5 min, AFB₁ de 8.3; AFM₁, 10.4; AFG₂, 14.7 y AFB₂, 20.3 min. Los niveles mínimos de cuantificación obtenidos bajo las condiciones de operación establecidas fueron de 0.15 ng/mL para AFB₁, AFG₁, AFB₂ y AFG₂ y de 0.5 ng/mL para AFM₁. Sin embargo, se lograron detectar niveles de 0.078 ng/mL para AFG₁, AFG₂ y AFB₂, 0.039 ng/mL para AFB₁ y 0.25 ng/mL para AFM₁, TABLA I. En la FIG. 1 se muestra un cromatograma típico de una mezcla de aflatoxinas, donde se puede observar la adecuada resolución obtenida.

Con el propósito de asegurar la calidad de los resultados obtenidos en el análisis, se realizó la adición de una mezcla de estándares de aflatoxinas de concentración conocida en tejidos de hígado y músculo de porcino, para obtener el parámetro de exactitud. En la TABLA II se presentan los porcentajes promedio de las recuperaciones obtenidas, para cada una de las aflatoxinas. Los valores de recuperación fueron mayores para el caso de las muestras de músculo (85-109%), con respecto a las de hígado (76-98%), y ésto se debió a la mayor complejidad que presentan los tejidos de hígado, por su elevado contenido de grasa y pigmentos que interfieren en la determinación. Sin embargo, ambos rangos de recuperación se encuentran dentro de los establecidos como aceptables para este tipo de análisis, que son de 60 a 115%, con coeficiente de variación en la repetibilidad del método, menor o igual a 20% y de reproducibilidad menor o igual a 30%, cuando las concentraciones del analito se encuentran en el orden de ng/g [19].

Para el caso de hígado, los porcentajes de recuperación obtenidos en este estudio fueron mayores a los reportados por Stubblefield y Shotwell [15], ya que ellos obtuvieron porcentajes de 90-95% para AFB₁ y de 80-85% para AFM₁, con coeficientes de variación entre 10-15% para ambas aflatoxinas en muestras de hígado de cerdo. Estos autores publicaron que uno de los factores importantes en la homogeneización de los porcentajes de recuperación de aflatoxinas es el tamaño de muestra, obteniéndose resultados similares cuando las muestras tienen un peso por arriba de 100 g, lo que hace posible la detección de concentraciones bajas de aflatoxinas.

TABLA I
TIEMPOS DE RETENCIÓN Y LÍMITES MÍNIMOS DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS OBTENIDOS POR CLAR

Aflatoxina	Tiempo de retención (min)	Límite mínimo de detección (ng/mL)	Límite mínimo de cuantificación (ng/mL)
AFG ₁	6,5	0,078	0,15
AFB ₁	8,3	0,039	0,15
AFM ₁	10,4	0,250	0,50
AFG ₂	14,7	0,078	0,15
AFB ₂	20,3	0,078	0,15

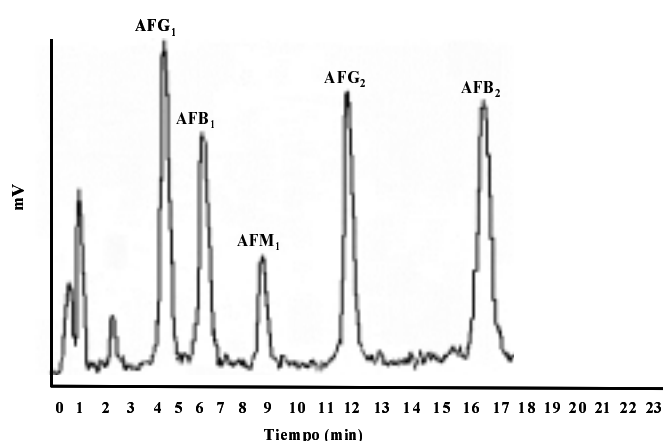


FIGURA 1. CROMATOGRAMA DE UNA MEZCLA DE ESTÁNDARES DE AFLATOXINAS ADSORBIDOS EN LA COLUMNA DE SÍLICA GEL. CROMATÓGRAFO DE LÍQUIDOS VARIAN 9010, DETECTOR DE FLUORESCENCIA VARIAN 9070, COLUMNA ECONOSFÉRICA C₁₈ DE 250 X 4,6 MM.

Gregory y Manley [5], utilizando cromatografía de líquidos para hacer la detección y cuantificación de aflatoxinas en hígado, reportaron porcentajes de recuperación del 85% para AFG₁, 81% para AFB₁ y 128% para AFM₁. Aún cuando utilizaron una mezcla de estándares con las cinco aflatoxinas no lograron detectar la presencia de AFG₂ y AFB₂ a una concentración de 6 ng/g, en tanto que en este estudio, se logró detectar las cinco aflatoxinas adicionadas, usando niveles de concentración para AFG₁ y AFM₁ de 2 ng/g, AFB₁ 0.5 ng/g y 1 ng/g para AFG₂ y AFB₂.

En un estudio Stubblefield y col. [14] realizaron modificaciones al método oficial de la AOAC [14], para adaptarlo a cromatografía de líquidos, obteniendo recuperaciones del 60% de aflatoxinas totales, para un grupo de seis muestras. Posteriormente, realizaron otros análisis obteniendo recuperaciones de 73.2, 71.8 y 69.8% para AFG₁, AFB₁ y AFM₁, respectivamente, no reportaron datos para AFG₂ y AFB₂.

En base a lo anterior, se puede indicar que las recuperaciones obtenidas en esta investigación fueron mejores que las

reportadas previamente por los autores citados. Sin embargo, los coeficientes de variación en las muestras de hígado fueron altos, con un promedio de 26%. Se considera que esto se debió a la composición compleja de la muestra y a la sensibilidad que presentan las aflatoxinas cuando se encuentran en forma pura. En estudios interlaboratorio realizados, se han reportado desviaciones estándar grandes, argumentando que esto es debido principalmente a las bajas concentraciones del compuesto a analizar y a la heterogeneidad con que se encuentra distribuido en la muestra, aunque también se considera que puede influir la matriz y el método de análisis utilizado [3,7].

Análisis de aflatoxinas en tejidos de porcinos

Las modificaciones realizadas al método de extracción de aflatoxinas propuesto por la AOAC [14] fueron con la finalidad de aumentar la recuperación de éstas a partir de los tejidos, así como, realizar la detección y cuantificación mediante cromatografía de líquidos, en lugar de cromatografía de capa fina como lo indica la técnica. El principal problema que se presentó fue debido al alto contenido de grasa de las muestras, principalmente las de hígado, lo que ocasionó interferencias. La extracción de aflatoxinas a partir de tejidos animales es compleja debido a que estos tejidos contienen sustancias que son difíciles de eliminar, entre otras, se puede mencionar las proteínas y porfirinas, capaces de interferir en el procedimiento de detección [12].

Una vez establecida la metodología para la cuantificación de aflatoxinas, se analizaron 14 muestras de hígado y 14 de músculo de porcino con la finalidad de probar la metodología propuesta en esta investigación. Se detectó presencia de aflatoxinas en el total de las muestras de hígado analizadas, principalmente AFB₁, AFG₁ y AFM₁, haciendo las identificaciones preliminares por medio de cromatografía de capa fina. Se sabe que el hígado junto con el riñón toman parte en el proceso de detoxificación de las aflatoxinas y el primero es uno de los órganos donde se acumulan más estos residuos. Las concentraciones detectadas de aflatoxinas en hígado fueron de 0.3 y 0.5 ng/g de AFG₁, 0.3-4.5 ng/g de AFB₁ y de 0.9, 1.3 y 4.3 ng/g de AFM₁. En la TABLA III se presentan las concentraciones de aflatoxinas totales por muestra encontradas en hígado de porcino. Se pudo observar que los niveles más altos fue-

TABLA II
PORCENTAJES DE RECUPERACIÓN DE AFLATOXINAS OBTENIDOS EN HÍGADO Y MÚSCULO DE PORCINO MEDIANTE EL MÉTODO DE ADICIÓN DE ESTÁNDARES DE CONCENTRACIÓN CONOCIDA Y CUANTIFICACIÓN POR CLAR

Aflatoxina	% Recuperación en hígado X ± DE	Coficiente de Variación (%)	% Recuperación en músculo X ± DE	Coficiente de Variación (%)
AFG ₁	81,0 ± 28,9	35,6	109,0 9,3	8,5
AFB ₁	98,0 ± 14,4	14,5	85,0 3,6	4,2
AFM ₁	89,0 ± 18,5	30,1	95,0 3,5	3,6
AFG ₂	83,5 ± 21,8	26,0	94,0 19,6	20,0
AFB ₂	76,0 ± 16,9	23,5	98,0 15,6	16,0

Concentración de aflatoxinas: G₁ y M₁ 2 ng/g, G₂ y B₂ 1 ng/g y B₁ 0,5 ng/g Los valores reportados en la tabla corresponden al promedio de 10 repeticiones.

Condiciones Cromatográficas: Detector Varian 9070, Excitación 365 nm Emisión 450 nm, Rango de Sensibilidad 0,2; Cromatógrafo de Líquidos Varian 9010, Columna Econosférica C₁₈ de 25 cm x 4,6 mm, Atenuación 121, Volumen de Inyección 200 µl.

TABLA III
CONCENTRACIÓN DE AFLATOXINAS EN MUESTRAS DE HÍGADO DE PORCINO

Muestra	Aflatoxinas (ng/g) ¹			Aflatoxinas Totales (ng/g) ¹
	B ₁	M ₁	G ₁	
1	0,5	NC	ND	0,5
2	0,5	NC	ND	0,5
3	0,6	NC	ND	0,6
4	0,4	NC	ND	0,4
5	3,6	NC	ND	3,6
6	0,4	ND	ND	0,4
7	4,5	NC	ND	4,5
8	0,4	1,3	0,3	2,0
9	0,8	ND	ND	0,8
10	2,7	0,9	ND	3,6
11	4,5	NC	ND	4,5
12	4,0	4,3	ND	8,3
13	0,9	NC	ND	0,9
14	0,3	ND	0,5	0,8

NC: No Cuantificable ND: No detectado ¹ Base húmeda.

ron los de AFB₁ y AFM₁ y menores para AFG₁. No se detectaron AFG₂ y AFB₂ en ninguna de las muestras, esto puede ser debido a que el hongo *Aspergillus parasiticus* que es el que produce estas toxinas no es común en la región del estudio.

Los valores de aflatoxinas totales oscilaron en el rango de 0.4-8.3 ng/g. La concentración más alta, encontrada en la muestra número 12, corresponde a la suma de AFB₁ y AFM₁. Patterson y col. [12] reportaron que la conversión de AFB₁ presente en la dieta a AFM₁ está directamente relacionada con el estado nutricional, sexo y edad del animal, ya que esto influye en las funciones metabólicas del organismo, permitiendo la acumulación o eliminación del tóxico.

Para el caso de las 14 muestras de músculo de porcino analizadas, se detectó presencia de aflatoxinas en cinco de ellas, tres presentaron AFB₁ y AFM₁, en una muestra se identificó AFB₁ y en otra AFM₁. Los niveles detectados estuvieron por debajo de los límites mínimos de cuantificación.

CONCLUSIONES

El método para la cuantificación de aflatoxinas establecido en este estudio resultó ser adecuado para realizar los análisis, tanto de músculo como de hígado de porcino, dado que se obtuvieron extractos libres de compuestos interferentes, observándose mejores resultados en las muestras de músculo, de-

bido a la menor complejidad de este tejido. Los niveles mínimos de detección determinados en base a la sensibilidad del método para los estándares puros, fueron de 0.039 ng/mL (ppb) para la AFB₁, 0.078 ng/mL para AFG₁, AFG₂ y AFB₂ y de 0.25 ng/mL para AFM₁, por lo que se considera que el método es sensible.

La activación de la sílica gel a 105°C por 90 min y una humedad relativa de 78.0% fueron las condiciones más adecuadas para realizar la limpieza de los extractos y obtener las mejores recuperaciones de las cinco diferentes aflatoxinas estudiadas.

Los porcentajes promedio de recuperación de aflatoxinas obtenidos en hígado de porcino, fueron del 76 al 98%; en las muestras de músculo los valores resultaron más altos y estuvieron entre 85 y 109%.

Se comprobó la presencia de aflatoxinas en el total de las muestras de hígado analizadas y en cinco de las muestras de músculo. La AFB₁ que es la aflatoxina más tóxica, se detectó en todas las muestras de hígado con niveles de 0.3 a 4.5 ng/g (ppb). Además, se detectaron AFG₁ y AFM₁.

En las muestras de músculo no fue posible hacer la cuantificación de las aflatoxinas detectadas, dado que su concentración se encontró por debajo de los límites de cuantificación establecidos en este estudio.

Se considera importante la contribución de este trabajo, ya que se estableció una metodología que permite aislar y cuantificar aflatoxinas en tejidos animales con una adecuada sensibilidad, especificidad y exactitud, lo que será de gran utilidad en investigaciones futuras.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ANÓNIMO. La Porcicultura en México, una Tradición Enclavada en la Modernidad. **Claridades Agropecuarias** 34:3-20. 1996.
- [2] ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the AOAC**. 15 th. Ed. Washington, DC. 1184-1205. 1990.
- [3] BOYER, W.K.; HORWITZ, W.; ALBERT, R. Interlaboratory Variability in Trace Element Analysis. **Anal. Chem.** 57:454-459. 1985.
- [4] EDDS, G.T.; OSUNA, O. **Aflatoxin B₁. Increases Infectious Disease Losses in Food Animals**. Abstract. Animal Health Association, 80 th Annual Meeting, Miami Beach, Fl. pp 434-441. 1976.
- [5] GREGORY, F.J.; MANLEY, D. HPLC Determination of Aflatoxins in Animal Tissues and Products. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 64(1):144-151. 1981.
- [6] GUMBANN, M.R.; WILLIAM, S.N. Biochemical Effects of Aflatoxin in Pigs. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 15:393-404. 1969.
- [7] HORWITZ, W.; ALBERT, R.; DEUTSCH, M. Precision Parameters of Methods of Analysis Required for Nutrition Labeling. Part II. Macroelements-Calcium, Magnesium, Phosphorus, Potassium, Sodium and Sulfur. **J. Assoc. Off. Anal. Chem. Inter.** 75:227-239. 1992.
- [8] NORMA OFICIAL MEXICANA. NOM-034-ZOO-1995. Detección de Residuos de Plaguicidas Organofosforados, en Hígado y Músculo de Bovinos, Equinos, Porcinos, Ovinos y Aves, por Cromatografía de Gases. Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. **Diario Oficial de la Federación**. México D.F.26-35.Junio de 1995.
- [9] OCHOA, M.A.; TORRES, P.; YEPIZ, G.S.; ALVAREZ R.; MARROQUI, J.A.; TEQUIDA, M.M.; SILVEIRA, G.M. Incidencia de Aflatoxinas B₁ y Zearalenona en Trigo y Maíz Almacenados en el Estado de Sonora. **Rev. Ciencia Alim.** 1:16-20. 1989.
- [10] OSUNA, O. Impacto de las Micotoxinas en la Producción Porcina. **Desarrollo Porcícola**. 21:19-21. 1994.
- [11] OSUNA, O.; EDDS, G.T. Toxicology of Aflatoxin B₁, Warfarina and Cadmium in Young Pigs: Performance and Hematology. **Am. J. Vet. Res.** 43:1395-1400. 1982.
- [12] PATTERSON, D.S.P.; GLANCY, E.M.; ROBERTS, B. A. The Carry-over of Aflatoxin M₁ Into the Milk of Cows. **J. Agric. Food Chem.** 22:635-638. 1980.
- [13] PEÑA, D.S.; DURÁN, D.M. Efecto Tóxico de las Aflatoxinas. **Ciencia y Desarrollo**, 16(94):61-70. 1990.
- [14] STUBBLEFIELD, D.R.; HONSTEAD, P.J.; SHOTWELL L.O. An Analytical Survey of Aflatoxins in Tissues From Swine Grown in Regions Reporting 1988 Aflatoxin-Contaminated Corn. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 74(6):897-899. 1991.
- [15] STUBBLEFIELD, D.R.; SHOTWELL, L.O. Determination of Aflatoxins in Animal Tissues. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 64(4):964-968. 1981.
- [16] TABATA, S.; KAMIMURA, H.; IBE, A.; HASHIMOTO, H.; IIDA, M.; TAMURA, Y.; NISHIMA, T. Aflatoxin Contamination in Foods and Foodstuffs in Tokyo: 1986-1990. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 76:32-35. 1993.
- [17] TEGLIA, M.C.; DE SANTORO, M.V.; GALICIO, M. and DE MARCO, N. Extraction and Determination of Aflatoxin B₁ in Animal Tissue by Thin Layer Chromatography. New Method for Clean-up. **An. Asoc. Quim. Argent.** 82(6):443-447. 1994.

- [18] TORRES, E.E.; ASKAR, A.K.; NACCHA, T.L.; MONTOYA, O.R.; CASTRELLÓN, S.P. Quantification of Aflatoxins in Corn Distributed in the City of Monterrey, Mexico. **Food Addit. and Contam.** 12 (3): 383-386. 1995.
- [19] USDA. **Food Safety and Inspection Service. Determining Acceptability of Methods for Regulatory Purposes.** (2.2.3). Chemistry Laboratory Quality Assurance Handbook. Vol. II. United States Department of Agriculture, Beltsville, MD. USA. 1987.
- [20] VALLADARES, J.C. Micotoxicosis, su Impacto en la Industria Pecuaria. **Nuestro Acontecer Avícola.** 4(20):14-18. 1996.
- [21] VELTMAN, J.R. Reducción de los Efectos de las Micotoxinas Mediante la Nutrición. **Industria Avícola.** 5:14. 1984.