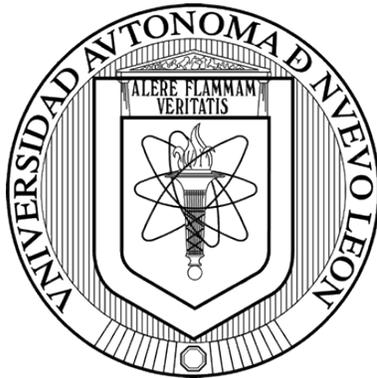


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

FACULTAD DE AGRONOMÍA



TESIS

**CARACTERIZACIÓN Y EFECTIVIDAD DE ADSORBENTES DE AFLATOXINAS
PARA INCLUSIÓN EN DIETAS ANIMALES**

PRESENTA

MVZ. RAMÓN SANTIAGO TREVIÑO ESPINOSA

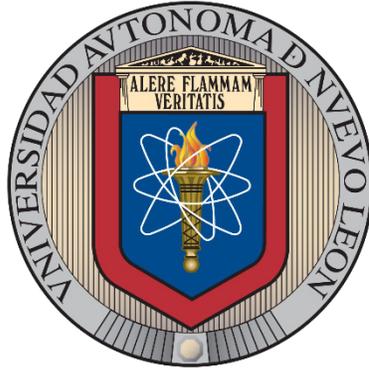
**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO
DE MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

MARZO, 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



TESIS

**CARACTERIZACIÓN Y EFECTIVIDAD DE ADSORBENTES DE AFLATOXINAS
PARA INCLUSIÓN EN DIETAS ANIMALES**

PRESENTA

MVZ. RAMÓN SANTIAGO TREVIÑO ESPINOSA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO
DE MAestrÍA EN CIENCIA ANIMAL**

GENERAL ESCOBEDO, NUEVO LEÓN, MÉXICO

MARZO, 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA



**CARACTERIZACIÓN Y EFECTIVIDAD DE ADSORBENTES DE AFLATOXINAS
PARA INCLUSIÓN EN DIETAS ANIMALES**

Aprobación de tesis en Maestría en Ciencia Animal por el comité particular de
MVZ. RAMÓN SANTIAGO TREVIÑO ESPINOSA

Dra. Alicia Guadalupe Marroquín Cardona
Director de Tesis

Dr. Gustavo Hernández Vidal
Co-director

Dr. Rafael Ramírez Romero
Co-director

Dr. Francisco Javier Picón Rubio
Co-director

"No hay ninguna diferencia fundamental entre el hombre y los animales en su capacidad de sentir placer y dolor, felicidad y miseria".

- Charles Darwin

DEDICATORIA

¿Cuándo llegue a este punto?!... bueno, exactamente el 22 de marzo de 2019 a las 2:37am y vaya cuantas traspasadas me costó llegar aquí. ¡Ha sido provechoso cada valioso minuto!

Quiero dedicar este trabajo a las personas involucradas sustancialmente en mi existencia, (con vehemencia)... ¡a mis padres!

Al mencionar a mis padres, estoy siendo amplio, ustedes entenderán (tíos, tías). Sin el apoyo de todos ustedes habría sido más difícil.

Le quiero dedicar este trabajo también a mis asesores y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por ser mi hogar durante estos últimos casi 8 años y por aguantarme en ocasiones 24/7, hemos pasado grandes y gratos momentos.

AGRADECIMIENTOS

Principalmente quiero agradecer a mi mentora, Dra. Alicia Marroquín, gracias por darme la oportunidad de crecer en esto y gracias por su confianza. Gracias por los consejos de todos estos años, por el apoyo en general. De igual manera gracias al Dr. José García, por todo el apoyo, las pláticas que han sido muy útiles. A ambos gracias por enseñarme acerca de la ciencia.

Gracias a mi familia entera por aguantar en ocasiones mi carácter cuando las cosas no salen bien, ¡los amo!

A mis papás, Santiago y Mirna, mis hermanos Santiago y Laura, Agustín y Marlene, Ale y Diego, a todos mis tíos, tías, primas por todo su apoyo. A mis sobrinitos por distraerme cuando lo necesito, Alejandrino, Gaby y Dieguito, ¡Los amo pequeños!

A mi novia Faby por estar a mi lado incondicionalmente y a su familia por su apoyo y consejos.

Al Posgrado Conjunto FA-FMVZ y sus docentes por estar siempre a disposición del alumno.

A los grandes amigos que he hecho durante estos años en la facultad, gracias por su amistad médicos, sus palabras de ánimo y su compañía.

A mis co-asesores por su tiempo y sus enseñanzas como profesores, Dr. Rafael Ramírez, Dr. Gustavo Hernández y Dr. Francisco Picón.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de toxicología, por su ayuda y su apoyo cuando fue necesario, gracias Renata, Charly y Nacho.

Por último gracias al CONACYT por la beca otorgada durante la realización de esta investigación.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE CONTENIDO	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ABREVIATURAS	xi
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivo general.....	3
1.2. Objetivos específicos.....	4
1.3. Hipótesis.....	5
1.4. Justificación.....	6
2. REVISIÓN DE LITERATURA	7
2.1. Aflatoxinas.....	7
2.1.1. Biosíntesis.....	7
2.1.2. Características químicas.....	9
2.1.3. Efectos biológicos.....	9
2.1.4. Exposición, absorción y distribución.....	11
2.1.5. Metabolismo.....	11
2.2. Enteroadsorbentes de AFB ₁	12
2.2.1. Mecanismo de acción de enteroadsorbentes.....	13
2.2.1.1. Adsorbentes minerales.....	13
2.2.1.2. Adsorbentes orgánicos.....	14
2.2.2. Interacciones con nutrientes.....	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1. Fase I. Caracterización.....	10
3.1.1. Caracterización física.....	16
3.1.1.1. Análisis de humedad.....	16

3.1.1.2. Análisis de granulometría.....	17
3.1.1.3. Análisis de volumen de expansión.....	18
3.1.2. Caracterización química.....	19
3.1.2.1. Análisis de reacción a H ₂ O ₂ y HCl.....	19
3.1.2.2. Análisis de pH y conductividad eléctrica.....	19
3.1.3. Caracterización mineralógica.....	19
3.1.3.1. Difracción de rayos X.....	19
3.1.4. Isotermas de adsorción.....	20
3.2. Fase II. Simulación digestiva.....	20
3.2.1. Obtención de líquido ruminal (LR).....	21
3.2.2. Simulación digestiva con LR.....	21
3.2.2.1. Descripción de unidad experimental.....	21
3.2.2.2. Incubación.....	22
3.2.3. Purificación de AFs de líquido ruminal.....	22
3.2.3.1. Columna de inmovinoafinidad.....	23
3.2.4. Determinación de AFs por cromatografía de líquidos.....	24
3.2.5. Análisis estadístico.....	24
4. RESULTADOS.....	25
4.1. Resultados de caracterización física.....	24
4.2. Resultados de caracterización química.....	26
4.3. Resultados de caracterización mineralógica.....	27
4.3.1 Análisis de difracción de rayos X.....	27
4.4. Resultados de isotermas de adsorción.....	28
4.5. Resultados de simulación digestiva con LR.....	30
5. DISCUSIÓN.....	33
6. CONCLUSIONES.....	35
7. BIBLIOGRAFÍA.....	36

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Dosis letal media de AFB ₁ en animales domésticos.....	10
Tabla 2. Resultados de caracterización física.....	25
Tabla 3. Resultados de caracterización química.....	26
Tabla 4. Valores de capacidad máxima de adsorción, constante de distribución y r^2 .	30

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Pasos importantes de la biosíntesis de AFB ₁ , G ₁ , B ₂ , G ₂ , M ₁ y M ₂	8
Figura 2. Estructuras químicas de AFB ₁ y AFM ₁	9
Figura 3. Estructura de esmectita (montmorillonita).....	14
Figura 4. Análisis de granulometría.....	18
Figura 5. Análisis de volumen de expansión.....	18
Figura 6. Sondeo oro-ruminal y extracción de líquido ruminal.....	21
Figura 7. Purificación de AFs con columnas de inmunoafinidad.....	23
Figura 8. Difractogramas de adsorbentes minerales.....	27
Figura 9. Difractogramas de adsorbentes de origen orgánico.....	28
Figura 10. Gráfico de equilibrio isotérmico 1.....	29
Figura 11. Gráfico de equilibrio isotérmico 2.....	29
Figura 12. Porcentajes de adsorción para cada AF en simulación digestiva con LR.	31
Figura 13. Porcentaje de adsorción de AFs totales en simulación digestiva con LR.	32

ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
AFB ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ , M ₁ , M ₂	Aflatoxina B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂
AFB ₁ -FAPY	Aflatoxina B ₁ - Formamidopirimidina
AFBO	Aflatoxina B ₁ -8,9 epóxido
AFs	Aflatoxinas
C4, 22, 1, 11	Carbono 4, 22, 1, 11
CE	Conductividad eléctrica
CYP450, 1A2, 3A4	Citocromo P450, 1A2, 3A4
DHST	Dihidroesterigmatocistina
DRX	Difracción de rayos X
G	Guanina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HCl	Ácido clorhídrico
HSCAS	Aluminosilicatos hidratados de Na y Ca
JCPDS	Joint Committee on Powder Diffraction Standards
Kd	Parámetro de afinidad
LD ₅₀	Dosis letal 50
LR	Líquido ruminal
M	Molar
mV	Milivolts
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sodio
ng/kg	Nanogramo / kilogramo
nm	Nanómetros
PC	Peso corporal
pH	Potencial de hidrógeno
Q _{max}	Capacidad máxima de adsorción
ST	Esterigmatocistina

T	Timina
TGI	Tracto gastrointestinal
TO	Tetraédrica Octaédrica
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
VA, VB	Versicolorina A, Versicolorina B
V _{ex}	Volumen de expansión
μg/kg	Microgramo / kilogramo

RESUMEN

El presente estudio fue realizado para evaluar la composición mineral y capacidad de adsorción de doce productos comercializados en México como adsorbentes para aflatoxinas (AFs), comparados con un adsorbente bajo investigación, aún no disponible comercialmente. Las muestras analizadas fueron etiquetadas de C-1 a C-12 y se analizó el adsorbente Novasilect® AF como referencia. La composición mineral fue determinada por difracción de rayos X (DRX). Para evaluar la capacidad como adsorbente de AFB₁, se llevaron a cabo análisis de isothermas de adsorción por triplicado en diluciones de 0.4, 0.8, 1.6, 2.4, 3.6, 4, 4.8, 5.6, 6.4, 7.2, 8 mg AFB₁/L H₂O. Se evaluó la capacidad de adsorción de las muestras C-3, C-5, C-12 y Novasilect® AF en dosis de 105 y 420 mg de material adsorbente en soluciones digestivas con líquido ruminal (LR) en un simulador de digestibilidad y determinación de AFs presentes mediante cromatografía de líquidos. Los patrones de DRX mostraron la presencia de picos compatibles con esmectitas en diez muestras (C-1, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-9, C-10, C-11 y Novasilect® AF), mientras que el resto de las muestras solo mostraron la presencia de materia orgánica (pared celular de levadura y β-glucanos). Las isothermas de adsorción para AFB₁ mostraron que las muestras Novasilect® AF y C-5 tuvieron la mayor capacidad de adsorción (Q_{max}) de 0.38 y 0.3 mol/kg, respectivamente mientras que C-12 tuvo el valor más bajo de 0.04 mol/kg. Los patrones del equilibrio isotérmico fueron ajustados a un modelo de ecuación tipo Langmuir para ser comparados. Las muestras Novasilect® AF y C-5 mostraron un patrón compatible con la ecuación Langmuir-2 ($R^2= 0.99$, ambas) mostrando un proceso saturable, lo que sugiere una interacción estable. Mientras que C-12 mostró una tendencia lineal, compatible con un modelo Freundlich ($R^2= 0.96$) que sugiere una interacción débil entre el adsorbente y AFs. Las simulaciones digestivas con LR mostraron que los adsorbentes Novasilect® AF y C-5 tuvieron una capacidad de adsorción significativamente ($p<0.05$) mayor que las muestras C-3 y C-12, ambas de origen orgánico. Entre las muestras Novasilect® AF y C-5 no hubo una diferencia significativa ($p>0.05$). Los adsorbentes que contienen esmectitas tuvieron una mayor capacidad de adsorción y mostraron un proceso saturable que sugiere una fuerte interacción entre AFB₁ y el agente adsorbente.

Palabras clave: Adsorbentes, Aflatoxinas, Dietas animales, Líquido ruminal.

ABSTRACT

The present study was conducted to evaluate the mineral composition and adsorption capacity of twelve products marketed in Mexico as adsorbents for aflatoxins (AFs), and were compared with an adsorbent under investigation, not yet commercially available. The samples analyzed were labeled from C-1 to C-12 and the Novasilect® AF adsorbent was analyzed as a reference. The mineral composition was determined by X-ray diffraction (XRD). To evaluate the capacity as an AFB₁ adsorbent, analysis of adsorption isotherms was carried out in triplicate with dilutions of 0.4, 0.8, 1.6, 2.4, 3.6, 4, 4.8, 5.6, 6.4, 7.2, 8 mg AFB₁ / L H₂O. The adsorption capacity of samples C-3, C-5, C-12 and Novasilect® AF included at a dose of 105 and 420 mg, was evaluated in digestive solutions with ruminal fluid (RF) in a digestibility simulator and determination of AFs was done by liquid chromatography. The XRD patterns showed the presence of peaks compatible with smectites in ten samples (C-1, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-9, C-10, C- 11 and Novasilect® AF), while the rest of the samples only showed the presence of organic matter (yeast cell wall and β-glucans). The adsorption isotherms for AFB₁ showed that Novasilect® AF and C-5 samples had the highest adsorption capacity (Q_{max}) of 0.38 and 0.3 mol/kg, respectively. While C-12 had the lowest value of 0.04 mol/kg. The isothermal equilibrium patterns were adjusted to a Langmuir type equation model in order to be compared. The Novasilect® AF and C-5 sample showed a pattern compatible with the Langmuir-2 equation ($R^2 = 0.99$, both) showing a saturable process suggestive of a stable interaction, while C-12 showed a linear trend compatible with a Freundlich model ($R^2 = 0.96$) suggestive of weak interaction between the adsorbent and AFs. The digestive simulations with RF showed that the Novasilect® AF and C-5 had a significantly higher adsorption capacity ($p < 0.05$) than the samples C-3 and C-12, both of organic origin. There was no significant difference between the Novasilect® AF and C-5 sample ($p > 0.05$). The adsorbents containing smectites had a higher adsorption capacity and showed a saturable process that suggests a strong interaction between AFB₁ and the adsorbent.

Key words: Adsorbents, Aflatoxins, Animal diets, Ruminal fluid.

1. INTRODUCCIÓN

Las condiciones de almacenamiento de los granos y cereales, entre otros insumos, juegan un papel importante en la contaminación por micotoxinas, producidas principalmente por hongos filamentosos que prevalecen en condiciones de humedad y oscuridad. Las aflatoxinas (AFs) son micotoxinas producidas por los hongos del género *Aspergillus spp.* (Xu et al. 2016). Aflatoxina B₁ (AFB₁) es una toxina carcinogénica que está clasificada dentro del grupo 1 según la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (International Agency for Research on Cancer-IARC, 2002). Los animales, al igual que los humanos están altamente expuestos a la contaminación con AFs (Grant & Phillips 1998; Daković et al. 2008) y la principal fuente de exposición es mediante el consumo de granos y cereales contaminados por cepas aflatoxigénicas de *Aspergillus spp.* (Monge et al., 2016).

El consumo de alimento altamente contaminado con AFs refleja cuantiosas pérdidas económicas en las especies de producción y subproductos de origen animal, causando problemas de salud como inmunosupresión, anorexia, pérdida de peso, problemas reproductivos, etc. Los cerdos y aves son especies muy susceptibles. Sin embargo, el ganado lechero también es severamente afectado por el consumo de alimento contaminado con AFs, secretando sub-metabolitos como AFM₁ a través de la leche, después de su metabolismo hepático (Fu et al., 2013; Grant & Phillips, 1998; Rawal et al., 2010).

En nuestro país, la NOM-188-SSA1-2002 (Norma Oficial Mexicana) se encarga de regular la presencia de AFs totales en granos y cereales para consumo humano y animal describiendo que insumos contaminados con concentraciones mayores a 20 µg/kg son destinados únicamente para consumo animal, siendo 100 µg/kg su límite permitido para ganado bovino lechero o en reproducción y hasta 300 µg/kg para ganado bovino de engorda en etapa de finalización. La regulación de AFM₁ en productos lácteos por la NOM -243-SSA1-2010 permite hasta 500 ng/kg, mientras que la Comisión Europea (2006) permite un máximo de 50 ng/kg en productos lácteos.

Se han desarrollado gran cantidad de estrategias para reducir la exposición a micotoxinas, así como algunas otras para reducir los efectos tóxicos de algunas después de su ingestión. La inclusión de adsorbentes en las dietas para animales ha sido una estrategia eficiente y de bajo costo (Phillips et al., 1988). Existen agentes adsorbentes minerales y orgánicos, así como multi-

modulares que consisten en una combinación de ambas estrategias. Minerales arcillosos, como las esmectitas (e.g. montmorillonita) y el carbón activado poseen propiedades como adsorbentes de micotoxinas (Kubena et al., 1990; Phillips et al., 1988). Los adsorbentes orgánicos, son principalmente compuestos de pared celular de levaduras que también han sido reportados como adsorbentes de múltiples micotoxinas, aunque con evidencia más limitada (Yiannikouris et al., 2006). Las bentonitas naturales, como las montmorillonitas cálcicas y sódicas muestran una alta afinidad hacia AFB₁, demostrando ser muy eficaces *in vitro* e *in vivo* en la reducción de los efectos nocivos relacionados con la exposición a AFB₁, así como en la reducción de la secreción de sus metabolitos, como AFM₁ (Magnoli et al., 2011; Marroquin-Cardona et al., 2009; Miazzo et al., 2005; Rosa et al., 2001). Los componentes en las dietas de los animales de producción pueden afectar la eficacia de los adsorbentes de AFs (Monge et al., 2016). Las condiciones digestivas en el caso de los rumiantes, el líquido y contenido ruminal pueden ayudar a degradar parte de las AFs consumidas (Moschini et al., 2008). Los análisis de isotermas de adsorción son de los métodos más eficaces para investigar la capacidad de adsorción superficial de los adsorbentes (Grant & Phillips, 1998). Se han realizado estudios de isotermas de adsorción *in vivo* para demostrar que el sitio de unión de algunos adsorbentes con AFB₁, es principalmente en el tracto gastrointestinal, reduciendo la biodisponibilidad de AFB₁ hacia el hígado, entre otros órganos y facilitando su excreción (Phillips, 1999; Phillips et al., 2002). La utilización de modelos *in vitro* para simular la digestión de animales rumiantes y no rumiantes ha sido una herramienta que ayuda a la pre-selección de posibles agentes adsorbentes (Gallo & Masoero, 2009) y se han propuesto ya diversas ecuaciones para modelar el patrón de adsorción de compuestos en soluciones acuosas a las superficies de algunos sólidos (Kinniburgh, 1986).

1.1. Objetivo general

Caracterizar trece productos adsorbentes de AFs de acuerdo con su composición física, química y mineralógica, y determinar su capacidad de adsorción para aflatoxinas en análisis de isotermas de adsorción, simulaciones digestivas con líquido ruminal y detección de aflatoxinas mediante cromatografía líquida de ultra desempeño (UPLC).

1.2. Objetivos específicos

1. Caracterizar las propiedades físicas de los adsorbentes mediante análisis de volumen de expansión (V_{ex}) y análisis granulométrico para separar las porciones de arena, limo y arcilla presentes en los adsorbentes.
2. Caracterizar las propiedades químicas de los adsorbentes mediante análisis de reacción a HCl, H_2O_2 y con mediciones de pH y conductividad eléctrica (CE).
3. Caracterizar la composición mineral de los adsorbentes mediante difracción de rayos X (DRX).
4. Determinar la capacidad máxima de adsorción (Q_{max}) de los adsorbentes y un parámetro de afinidad (K_d) para AFB₁, mediante isotermas de adsorción y determinación de absorbancia con espectrofotometría de luz UV.
5. Obtener líquido ruminal de vacas lecheras para determinar la efectividad de los adsorbentes usando simulaciones digestivas con líquido ruminal y alimento contaminado con AFs.
6. Determinar las AFs en el líquido ruminal después de las simulaciones digestivas mediante cromatografía de líquidos (UPLC).

1.3. Hipótesis

Los productos que contienen esmectitas como ingrediente activo tienen una mayor efectividad como adsorbente para aflatoxinas en isotermas de adsorción y en simulaciones digestivas con líquido ruminal.

1.4. Justificación

El consumo de alimento contaminado con AFs tiene efectos muy perjudiciales en la salud de humanos y animales. En los animales de producción se refleja con cuantiosas pérdidas económicas y reducción en la ganancia de peso, inmunosupresión, problemas reproductivos y baja producción láctea.

La excreción del metabolito AFM₁ en la leche representa un potencial riesgo de exposición para los seres humanos a través de los productos lácteos, y debido a que las moléculas de AFs son termoestables, prevalecen aún después de los procesos de pasteurización y ultra-pasteurización. Investigaciones previas sugieren que la inclusión de enteroadsorbentes en las dietas para animales disminuye la biodisponibilidad de las AFs, ya que forman complejos adsorbente-AFs que reduce la tasa de absorción en el tracto gastrointestinal. La inclusión de enteroadsorbentes en las dietas para animales se considera una estrategia efectiva y de bajo costo para reducir los efectos nocivos de las AFs y otras micotoxinas.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Aflatoxinas

En Inglaterra, en el año 1960 surgió una “nueva” enfermedad que afectó al menos 100,000 pavos jóvenes mostrando una mortalidad del 100% y cuyo agente patógeno no pudo ser aislado satisfactoriamente. Los hallazgos histopatológicos como necrosis hepática, cambio de grasa e hiperplasia de los conductos biliares fueron atribuidos a dicha enfermedad, denominada “Enfermedad X de los pavos”. La patología se asoció al consumo de harina de cacahuate proveniente de Brasil que tenía presencia de hongos posiblemente productores de micotoxinas (Wannop, 1961).

El término “aflatoxina” consiste en una palabra compuesta, “a” del género *Aspergillus*, “fla” de la especie *flavus* (primer especie a la cual se asoció), y “toxina” de *toxicum* que en latín significa veneno.

2.1.1 Biosíntesis

La biosíntesis de las AFs está mediada por la composición nutritiva del sustrato donde crece el hongo, en el caso de la especie *Aspergillus flavus*, se ha observado que los azúcares como glucosa, fructosa y sacarosa incrementan la síntesis de aflatoxinas (Buchanan, R. L. and Lewis, 1984).

Las aflatoxinas principales están formadas por el mismo precursor, versiconal hemiacetal acetato, que se forma a partir de acetato y cuyas unidades se convierten en un policétido que posteriormente es metabolizado en una xantona. Mediante varios procesos enzimáticos, puede ser intermediario versicolorina A (VA) o versicolorina B (VB). VA puede ser convertida en esterigmatocistina (ST), mientras que VB puede ser convertida en dihidroesterigmatocistina (DHST). La ST se puede metabolizar a AFB₁ y AFG₁, para posteriormente ser biotransformada en AFM₁. AFB₂ y AFG₂ son formadas a partir de la DHST, y a su vez pueden formar AFM₂. AFB₁ mediante otros procesos puede ser transformada en AFB₂ y viceversa (Figura 1) (Yu et al., 2004).

En la biosíntesis de AFs ocurren aproximadamente 23 reacciones enzimáticas en las que se involucran 15 intermediarios que han sido identificados y bien definidos estructuralmente (Bhatnagar, Yu, & Ehrlich, 2002). Han sido secuenciados al menos 25 genes involucrados en la mayoría de los pasos de introconversión, confirmados por su disrupción génica y algunos estudios enzimáticos. Estos genes se encuentran agrupados en una región de ADN de 70 kb cercana al telómero del cromosoma 3 de *Aspergillus* (Georgianna & Payne, 2009; Yu et al., 2004).

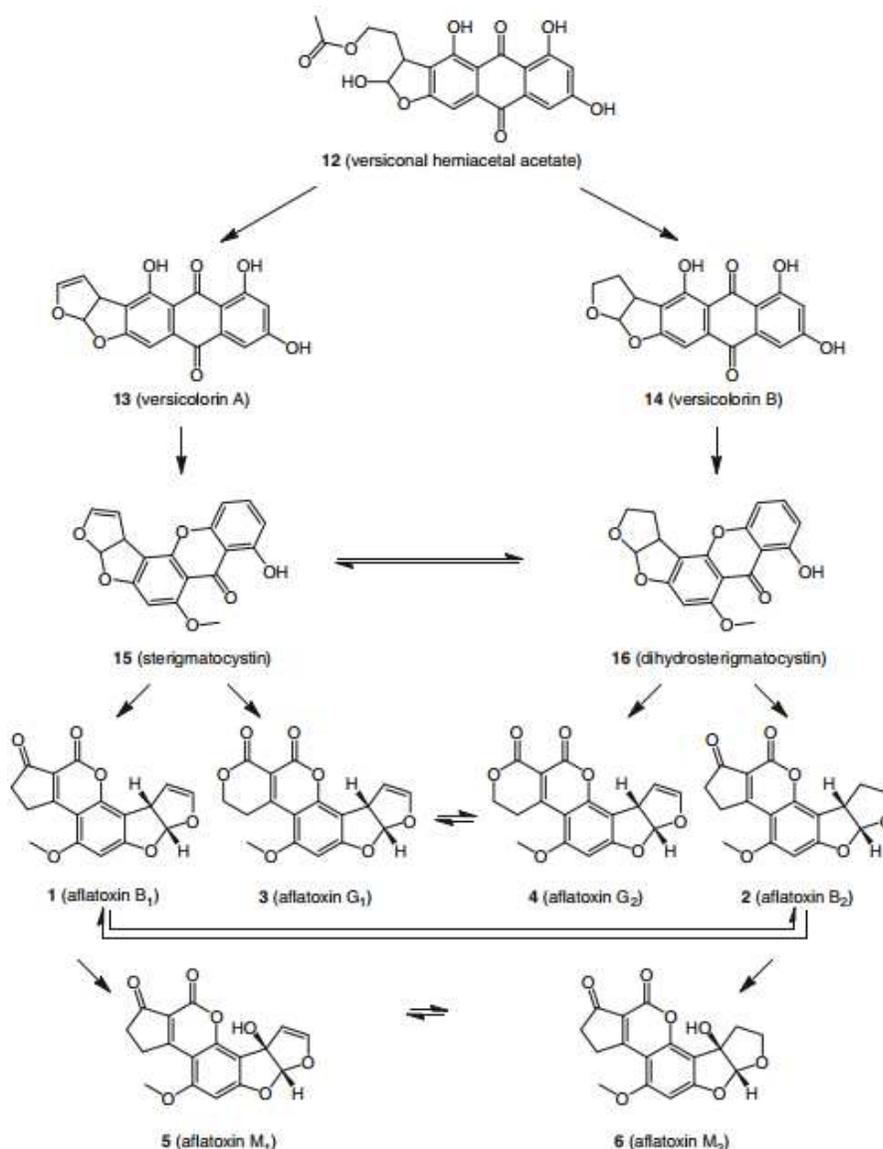


Figura 1. Pasos importantes de la biosíntesis de AFB₁, G₁, B₂, G₂, M₁ y M₂. Cada una de las flechas representa más de un proceso enzimático (Bräse et al., 2013).

2.1.2 Características químicas

La estructura química de las AFs está compuesta por un anillo dihidrofurano, unido a una cumarina y a una pentona o un anillo ciclohexanoico, dependiendo el tipo de AF, el grupo es llamado dihidro-furano-cumarinas (Chang et al., 1963). A su vez, este se divide en dos subgrupos (Figura 2), las difuranocumarinas-ciclopentanonas (compuesto por AFB₁, B₂, M₁, M₂, P₁, Q₁ y aflatoxicol) y el subgrupo de las lactonas-difuranocumarinas (compuesto por AFG₁, G₂ y G_{2a}). La existencia de un núcleo difurano confiere a las moléculas de AF una gran rigidez, lo que favorece la interacción con algunos componentes celulares (Palmgren & Hayes, 1987).

Se han detectado alrededor de 20 tipos diferentes de AFs, siendo AFB₁ la más carcinógena, mutágena y teratógena. A partir de AFB₁ se sintetizan naturalmente AFB₂, G₁ y G₂.

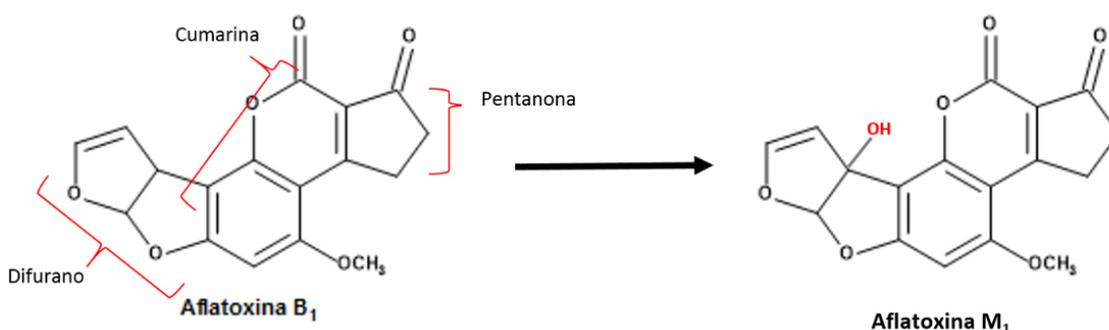


Figura 2. Estructuras químicas de AFB₁ y AFM₁. (Elaborado por R.S.T.E. con Accelrys®)

Las otras AFs (M₁, M₂, P₁, Q₁, G_{2a}, B_{2a} y aflatoxicol) son hidroxilados producidos por el metabolismo animal o microbiano (Soriano del Castillo, 2007). En estado natural, son polvos cristalinos termoestables que se descomponen al alcanzar su punto de fusión (B₁ 268-269°C, B₂ 286-289°C, G₁ 244-246°C, G₂ 237-240°C, M₁ 299°C, M₂ 330°C) (Carvajal, 2013).

2.1.3 Efectos biológicos

El grupo de compuestos al que pertenecen las AFs está involucrado en un potencial riesgo para la salud humana y animal, se han realizado considerables esfuerzos para investigar e informar

acerca de los riesgos que implica el consumo de alimentos contaminados con esta micotoxina. En los casos en que se consumen dosis altas causan un padecimiento agudo, que resulta en algunas alteraciones histológicas. La exposición crónica, consistente en dosis bajas por periodos prolongados, han resultado en el desarrollo de tumores en algunas especies animales (Wogan, 1966).

El envenenamiento con AFs es llamado “aflatoxicosis”, se ha reportado que principalmente causa lesiones hepáticas, esto depende de la dosis, especie, sexo y estado nutricional (Tabla. 1). Se ha reportado que la exposición crónica a las AFs causa toxicidad a nivel embrional y en general los animales jóvenes son los más afectados. Algunas de las manifestaciones clínicas son trastornos digestivos, infertilidad, baja eficiencia alimenticia, anemia e ictericia. Este tipo de problemas de salud afecta directamente la producción agropecuaria, por ejemplo, en aves de postura hay descenso importante en la producción de huevo y en ganado lechero se muestra disminución en la cantidad y calidad de la leche producida, además de los decomisos que merman la producción debido a la presencia de AFM₁ y AFM₂, las cuales no pueden ser eliminadas mediante los métodos de pasteurización y ultra-pasteurización. Esto se refleja en problemas de salud en los animales domésticos (Tabla 1) y refleja cuantiosas pérdidas económicas para los productores (Dhanasekaran et al., 2011).

Tabla 1. Dosis letal media de AFB₁ en animales domésticos.

Especie	Edad o peso	LD₅₀ (mg/kg PC)
Gatos	-	0.55
Cerdos	6-7 kg	0.62
Pavos	-	0.5-1.0
Perros	Cachorros	0.5-1.1
Bovinos	Becerros	0.5-1.2
Cuyos	-	1.4-2.0
Caballos	Jóvenes	2.0
Ovejas	Jóvenes	2.0
Pollos	Jóvenes	6.5-16.5

LD₅₀: Dosis letal media. PC: Peso corporal. (Dhanasekaran et al., 2011)

2.1.4 Exposición, absorción y distribución

La principal vía de exposición es mediante la ingestión de alimento contaminado con AFs, pero también existe la exposición por inhalación de polvo durante la molienda de granos. La exposición vía respiratoria en ocasiones puede ser más rápida, ya que puede pasar casi directamente al torrente sanguíneo. Después de ser ingerida, AFB₁ es absorbida en el tracto gastrointestinal mediante difusión pasiva, por su alta liposolubilidad no requiere de transportadores ni bombas y su bajo peso molecular permiten que su absorción sea muy eficiente (Roebuck & Maxuitenko, 1994), después pasa al torrente sanguíneo vía portal y una porción se une a algunas proteínas plasmáticas que evitan su difusión, otro porcentaje de AFB₁ queda libre en circulación sanguínea y es capaz de atravesar las membranas capilares y llegar a algunos órganos como pulmones, riñones, masa muscular y principalmente al hígado, el cual es el órgano blanco para metabolizar AFB₁ (Im et al., 1996; Valencia-Quintana et al., 2012).

2.1.5 Metabolismo

Al ocurrir su absorción, la concentración más alta de AFB₁ es en el hígado, donde es biotransformada por acción enzimática en un proceso de dos fases:

Fase I: La toxina es metabolizada por enzimas microsomales, presentes en los hepatocitos mediante procesos de hidroxilación, hidratación, desmetilación y epoxidación. La hidroxilación de AFB₁ en el carbono C4 o C22 da origen a AFM₁ y AFQ₁, respectivamente. La hidratación de doble enlace en carbono C2-C3 da lugar a la formación AFB_{2a}, que se forma en algunas especies de aves. La desmetilación da origen a AFP₁, la epoxidación da origen a AFB₁-epóxido, mientras que el aflatoxicol es producido por un complejo citoplasmático de una enzima reductasa (Patterson & Roberts, 1970).

El citocromo P450 (CYP) constituye una familia de enzimas muy importante que es capaz de catalizar la biotransformación oxidativa de la mayoría de los xenobióticos lipofílicos (Zanger & Schwab, 2013), por lo cual son esenciales para el metabolismo de las AFs.

La AFB₁ es bioactivada mediante enzimas del CYP450, formando un metabolito electrofílico altamente reactivo e inestable, que reacciona con el ADN produciendo una alquilación. El

metabolito formado, aflatoxina-8,9-epóxido (AFBO) tiene la capacidad de formar aductos con la guanina presente en el ADN, mismo que se nombra como 8,9 -dihidro-8-(N7-guanil)-9-hidroxaflatoxina B₁ (AFB₁-N7-guanidina), formándose entonces AFB₁-formamidopirimidina (AFB₁-FAPY), una molécula bioquímicamente más estable que AFBO, debido a la apertura del anillo imidazol. AFB₁-FAPY tiene la capacidad de causar errores transcripcionales subsecuentes del ADN y puede estar presente por más de una ronda de replicación del ADN. Debido a esto se le considera importante durante la carcinogénesis, dando lugar a una transversión G → T en la tercera base del codón 249 del gen p53 (Do & Choi, 2007; Eaton & Gallagher, 1994; Ferguson & Philpott, 2008; Gross-Steinmeyer & Eaton, 2012).

Fase II: Esta forma de epóxido puede conjugarse con glutatión para continuar con su vía de detoxificación y posterior eliminación, o bien puede ser hidrolizada por una epóxido-hidrolasa y generar un hidrodiole (AFB₁-8-9-dihidrodiole), compuesto que reacciona fuertemente con proteínas y genera efectos citotóxicos. Al contrario de este proceso, el epóxido puede conjugarse con glutatión y ser eliminado en orina, o la AFB₁ puede no sufrir epoxidación, sino adición de grupos OH⁻ y una posterior conjugación con sulfato o ácido glucorónico neutralizaría los efectos tóxicos de la molécula.(Eaton & Gallagher, 1994).

Los complejos enzimáticos del CYP450, específicamente el CYP1A2 y 3A4 son capaces de oxidar las formas reactivas de AFB₁, la AFB₁ endo-8,9-epóxido y AFB₁ exo-8,9-epóxido (más tóxico) a formas no activas que no son sustratos óptimos para la epoxidación, siendo AFM₁ uno de ellos (Gallagher et al., 1996; Guengerich et al., 1996).

2.2 Enteroadsorbentes de AFB₁

La inclusión de enteroadsorbentes en dietas animales como estrategia para reducir los efectos tóxicos de algunas micotoxinas se ha probado desde hace tiempo (Phillips et al., 1988), algunos adsorbentes contienen arcillas cuyos componentes minerales tienen la capacidad de ligar las toxinas a sus moléculas, formando macromoléculas más complejas que evitan la absorción de las AFs en el tracto gastro-intestinal (TGI). Las bentonitas naturales, como la montmorillonita de calcio han demostrado ser una estrategia eficaz en la reducción de los efectos nocivos relacionados con la exposición a AFB₁, así como en la reducción de la secreción de sus

metabolitos, por ejemplo AFB₁ (Marroquin-Cardona et al., 2009). Diferentes tipos de bentonitas muestran una alta afinidad con AFB₁ *in vivo* (Magnoli et al., 2008) e *in vitro* (Magnoli et al., 2011; Masimango et al., 1978; Miazzo et al., 2005).

Por otro lado, existen los adsorbentes de origen orgánico, tal como la pared celular de levaduras, cuyos componentes se sugiere que forman complejos no-covalentes con las micotoxinas y del mismo modo son eliminados a través del TGI (Valencia-Quintana et al., 2012; Yiannikouris et al., 2006). También existen productos que combinan ambas estrategias, denominados adsorbentes multi-modulares.

2.2.1 Mecanismo de acción de enteroadsorbentes

2.2.1.1 Adsorbentes minerales

La estructura molecular de estos minerales aluminosilicatos (Figura 3) puede ser conformada por láminas simples o múltiples, formando átomos con una coordinación tetraédrica (T) y octaédrica (O), estas estructuras están unidas mediante puentes de hidrógeno o por fuerzas de Van der Waals. Este tipo de arcillas se caracterizan por su alta sensibilidad a presentar algunas sustituciones isomórficas en las láminas T y O generando cargas negativas, por consiguiente las esmectitas tienen una carga negativa alta y un elevado grado de expansión (Daza & Gallego, 2011).

El modo de acción sugerido es mediante un mecanismo aceptor de electrones, debido a la carga negativa de sus estructuras que permiten la atracción de iones cargados positivamente, tales como Na⁺, Ca²⁺, K⁺ y aún más importante, el sistema dicarbonil-β de AFB₁ conformado por los carbonos C1 y C11, estableciendo así una unión electrofílica (Phillips et al., 2008).

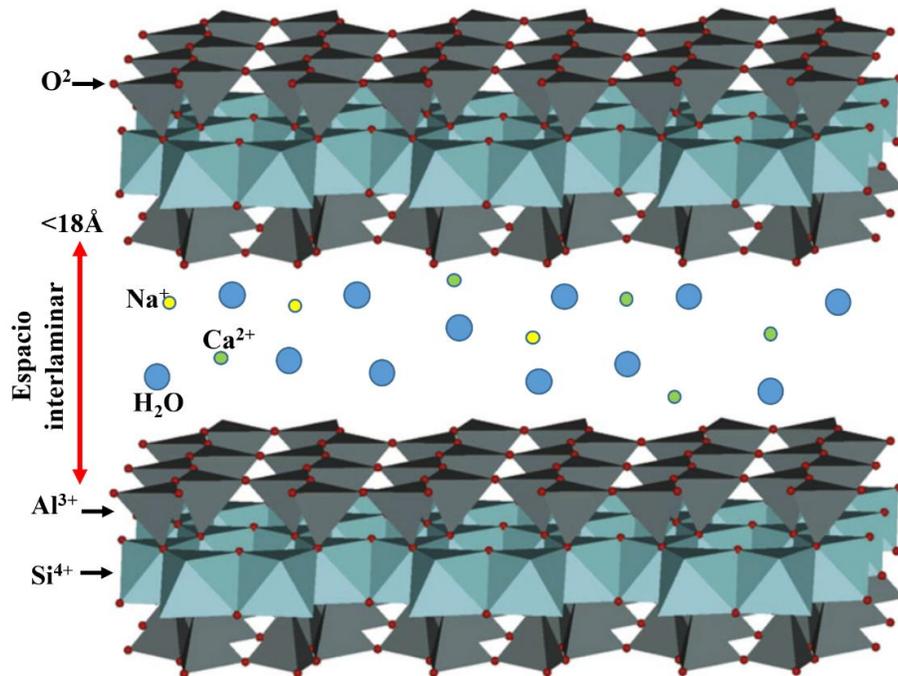


Figura 3. Estructura de esmectita (montmorillonita), con sus laminas tetraédricas (Aluminio) y octaédricas (Silicio) y presencia de cationes intercambiables de Na^+ y Ca^{2+} . Imagen modificada a partir de Deng et al., (2010).

2.2.1.2 Adsorbentes orgánicos

Hay investigaciones que sugieren que los componentes (mananos, glucanos y glucomananos) de la pared celular de levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, tienen la capacidad de interactuar con algunas micotoxinas como AFB_1 , deoxinivalenol y patulina. Estas interacciones consisten en la formación de complejos que no son absorbidos en el TGI y resisten las condiciones digestivas de pH y enzimas para ser eficientemente eliminadas (Yiannikouris et al., 2006).

2.2.2 Interacciones con nutrientes

Arcillas como los aluminosilicatos hidratados de sodio y calcio (HSCAS), son de las más investigadas como adsorbentes para AFs. Su inclusión en las dietas para animales representa un riesgo cuando su uso es indiscriminado o se exceden las dosis recomendadas. Estudios sugieren que la inclusión de 0.5-1% de arcilla en la dieta no representa alteraciones significativas con

nutrientes, sin embargo existe una ligera reducción en la utilización del zinc con inclusiones >1% de HSCAS (Phillips, 1999). La inclusión de 0.5-2% de HSCAS en la dieta disminuye significativamente los efectos nocivos causados por AFs en aves, cerdos, ovejas, así como disminución en la presencia de AFM₁ en leche de bovinos y cabras (Kubena et al., 1998) por lo que sus efectos benéficos superan los negativos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en los laboratorios de Toxicología y de Nutrición Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

3.1. Fase I. Caracterización

Se realizó la colecta de trece productos adsorbentes de micotoxinas, para determinar sus características físicas, químicas, y mineralógicas, así como determinar su capacidad de adsorción para AFB₁ *in vitro*. Doce de estos productos están disponibles comercialmente en México y uno de ellos (C-5) bajo investigación en el actual estudio.

La muestra Novasilect® AF fue analizada como referencia de adsorbente mineral, el resto de las muestras fueron etiquetadas de C-1 a C-12 y fueron caracterizadas de acuerdo con sus propiedades físicas, tales como análisis granulométrico y análisis de volumen de expansión (Vex).

3.1.1 Caracterización física

3.1.1.1 Análisis de humedad

En platos de aluminio previamente pesados ($W1$) se pesaron 10 g ($W2$) de cada una de las muestras individualmente. Los platos con las muestras fueron puestas en la estufa de secado (Precision, Thermo Scientific®) a 105°C durante 12 h, posteriormente la muestra fue enfriada a temperatura ambiente de 25°C en un desecador de acrílico (Nalgene®), 2 h después se registró el peso de las muestras secas ($W3$), todos los pesos fueron registrados con una balanza analítica (Adventurer, OHAUS®). El porcentaje de humedad en las muestras fue calculado con la fórmula:

$$\text{Humedad \%} = \frac{W2 - W3}{W3 - W1} \times 100\%$$

3.1.1.2 Análisis de granulometría

Para poder fraccionar los diferentes tamaños de partícula fue requerido hacer el proceso en base húmeda, se añadieron 50 mL de Na_2CO_3 (carbonato de sodio)(Fisher Chemical®) pH 10 como agente dispersante, a cada una de a las muestras (10 g) en botellas para centrifuga de 250 mL (Nalgene®), el adsorbente fue homogenizado completamente con el agente dispersante y posteriormente fue filtrado con un cedazo de 53 μm (#270, Fisherbrand®), dejando en la malla la fracción de arena presente en la muestra ($>53 \mu\text{m}$) y quedando en la solución resultante las fracciones de limo ($<53 \mu\text{m}$) y arcilla ($<2 \mu\text{m}$). Para separar la porción arcilla del limo se utilizó una centrifuga (SL-16, marca Thermo Scientific®), fueron realizados los cálculos para centrifugación con ayuda de la ecuación correspondiente a la “Ley de Stokes” para fraccionar partículas:

$$V_s = \frac{2 r^2 (2\pi N)^2 x (P_p - P_f)}{9 n}$$
$$t = \frac{6.299 * 10^9 n * \log\left(\frac{R}{S}\right)}{d^2 N^2 (P_p - P_f)}$$

$t =$ tiempo (min)
 $\eta =$ viscosidad (cm/seg)⁻¹
 $S =$ distancia del fluido al eje de rotación (cm)
 $R =$ distancia final a la posición de la partícula (cm)
 $N =$ rpm
 $d =$ diámetro de la partícula (μm)
 $P_p =$ densidad de la partícula (g/cm^3)
 $P_f =$ densidad del fluido (g/cm^3)

Posteriormente se recuperó la porción sobrenadante (arcilla) y el precipitado (limo) por separado por medio de un sifón (Figura 4). Las tres fracciones de la muestra, arena, limo y arcilla fueron secadas a 105°C en platos de aluminio, en la estufa de secado antes utilizada. Se realizaron los cálculos necesarios para determinar el porcentaje correspondiente a cada una de las fracciones.

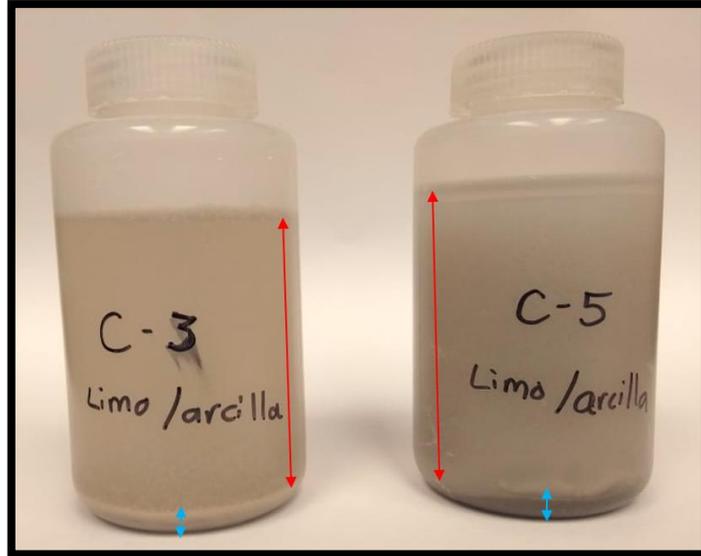


Figura 4. Análisis de granulometría. Las flechas color rojo indican el sobrenadante donde se encuentra la fracción de arcilla ($< 2\mu\text{m}$), las flechas azules indican el precipitado donde se encuentra la fracción de limo ($< 53\mu\text{m}$).

3.1.1.3 Análisis de volumen de expansión

Se realizó basado en el método descrito por Marroquín-Cardona et al. en 2009 donde fueron medidos 5 cm^3 de cada agente adsorbente en probetas graduadas de 25 mL, posteriormente se añadió agua destilada hasta cubrir el volumen de 25 mL y fue homogenizada con la muestra y se dejó reposar por 24 h, posteriormente fue medido el volumen de hidratación de cada muestra con ayuda de una regla graduada de 30 cm (Figura 5).

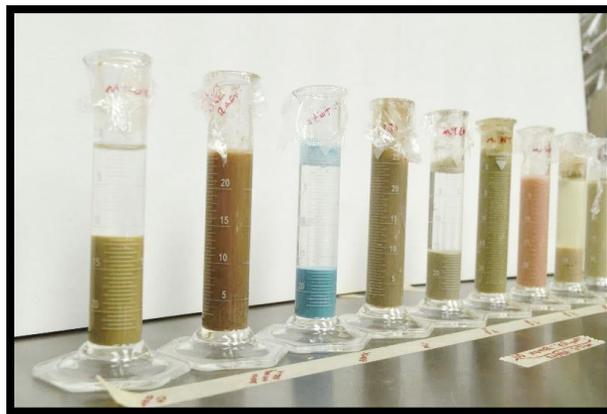


Figura 5. Análisis de volumen de expansión (Vex)

3.1.2 Caracterización química

3.1.2.1. Análisis de reacción a H₂O₂ y HCl

Para determinar la presencia de materia orgánica y carbonatos se evaluó cualitativamente la respuesta a la exposición a H₂O₂ y HCl del 0 al 5, siendo 0 una reacción nula y 5 una reacción violenta al producto químico. Para el análisis fue requerido 1 g de muestra (0.5g para cada reactivo), 100 mL de HCl 1 M Jalmek® (lote #1425-13) y H₂O₂ 30% Jalmek® (lote #17-2104-08H14). La reacción fue evaluada añadiendo gota a gota cada uno de los reactivos. Ambos reactivos fueron analizados por separado (Deng et al., 2009).

3.1.2.2. Análisis de pH y conductividad eléctrica.

Para estos análisis, 4 g de muestra fueron pesados y posteriormente se suspendieron en 200 mL de agua destilada, la suspensión fue reposada por 10 min. La medición de pH fue realizada con un potenciómetro ORION Star A121 (Thermo Scientific®). La conductividad eléctrica fue medida con el mismo potenciómetro, acoplado a un electrodo epóxico para ORP (ORION Thermo Scientific®) (Deng et al. 2009).

3.1.3. Caracterización mineralógica

3.1.3.1. Difracción de rayos X

Fue llevado a cabo por personal del laboratorio de Ecomateriales y Energía del Instituto de Ingeniería Civil (IIC-UANL), mediante un difractómetro de rayos X (D8 Advance, BRUKER®) para los cuales fueron requeridos 8g de muestra de adsorbente previamente pulverizado. El análisis fue llevado a cabo mediante las condiciones especificadas por el fabricante a una temperatura ambiente de 25°C. Los difractogramas obtenidos fueron analizados mediante el software DIFFRAC.EVA® y comparados con los parámetros correspondientes según las tarjetas de referencia de JCPDS (Joint Committee on Powder Diffraction Standards) de acuerdo con el método descrito por Deng et al., (2009).

3.1.4. Isotermas de adsorción

Para los análisis de equilibrio isotérmico fueron requeridos 100 mg de adsorbente suspendidos en 50 mL de H₂O (grado UPLC), como estándar se preparó una solución de AFB₁ a 8 µg/mL, a partir de la cual fueron preparadas diluciones de 8, 7.2, 6.4, 5.6, 4.8, 4, 3.6, 2.4, 1.6, 0.8 y 0.4 µg (AFB₁)/mL (H₂O UPLC). Cada dilución se realizó por triplicados con un volumen de 5 mL por repetición, mientras que los controles fueron de 8 µg AFB₁/mL, H₂O, y H₂O + agente adsorbente, respectivamente. A cada triplicado le fue añadido un volumen de 50 µL (0.1 mg) de solución del agente adsorbente y posteriormente fueron sometidos a agitación (1000 rpm) durante 60 min mediante un agitador de tubos (IKA®), después fueron centrifugados a 2500 rpm durante 15 min. El sobrenadante resultante fue analizado con un espectrofotómetro de luz UV (UV-1800 UV-VIS, marca Shimadzu®) para obtener la absorbancia de la muestra. Los datos obtenidos fueron analizados con una hoja de cálculo desarrollada por investigadores del área (Grant & Phillips, 1998). Fueron obtenidos los valores de capacidad máxima de adsorción (*Q_{max}*) y constante de distribución (*K_d*), utilizados para generar un diagrama de dispersión. Los datos obtenidos fueron ajustados a una ecuación de un modelo tipo Langmuir para determinar y comparar el equilibrio isotérmico en el software Table-Curve 2D para obtener los valores de *r*².

$$q = Q_{max} \left(\frac{KdCw}{1 + KdCw} \right)$$

Donde:

C_w: Cantidad de AFB₁ en dejada en solución

q: la cantidad de AFB₁ adsorbida por el aditivo

Q_{max}: capacidad máxima de adsorción

K_d: Afinidad de la interacción

3.2. Fase II. Simulación digestiva

Se comparó la capacidad de adsorción de 4 productos adsorbentes (C-3, C-5, C-12 y Novasilect® AF) mediante una simulación digestiva de bovino, utilizando líquido ruminal como medio de solución. Estos adsorbentes se seleccionaron en base a efectividad y representando una arcilla mineral, una orgánica y una multi-modular. La simulación digestiva se diseñó de

acuerdo a modificaciones en los métodos utilizados por Moschini et al., (2008) y Spotti et al., (2005).

3.2.1. Obtención de líquido ruminal

El líquido ruminal (LR) se obtuvo de vacas lecheras de raza Holstein, de la unidad de producción del campus de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en Marín, Nuevo León. La colección fue por medio de una sonda oro-ruminal Drench-Mate® (Figura 6). El líquido ruminal se obtuvo de vacas lactantes, fue depositado en un envase de 4 L y fue trasladado al laboratorio para su utilización. Posteriormente fue filtrado con filtro de gasa para eliminar sólidos presentes.



Figura 6. Sondeo oro-ruminal y extracción de líquido ruminal.

3.2.2 Simulación digestiva con LR

Para la fase II del experimento se seleccionó un adsorbente de cada clasificación: adsorbente mineral (C-5), adsorbente de origen orgánico (C-12) y multi-modular (C-3). Adicionalmente se analizó el adsorbente Novasilect® AF que se sabe contiene esmectita de Ca y que es parecido a NovaSil®, producto del cual se tiene referencia en estudios previos (Moschini et al., 2008).

3.2.2.1. Descripción de unidad experimental

Las unidades experimentales consistieron en tubos Falcon® de 50 mL de capacidad con 40 mL de líquido ruminal, 21 g de mezcla de alimento contaminado con 150.98 ng/g AFs totales. La inclusión de los 4 adsorbentes fue en 2 dosis: 105 mg y 420 mg, correspondientes al 0.5%, y

2.0% de inclusión de acuerdo con la cantidad de alimento (21 g). Cada unidad experimental se analizó por triplicado con sus respectivos controles.

3.2.2.2. Incubación

Una vez mezclados los componentes (líquido ruminal, alimento contaminado y adsorbente), las muestras se incubaron en baño maría en un simulador de digestibilidad DAISY II (Ankom®) por 2 h a 39°C en condiciones de CO₂. Después de 2 h de incubación se intervino el proceso para modificar el pH a 2, añadiendo HCl 1M y 50 mg de pepsina (Sigma® lote. #BCBW9186 St. Louis, MO), se incubó nuevamente por 2 h con las condiciones antes descritas. Finalmente se neutralizó a pH 7 con Na₂CO₃ (J.T. Baker® lote. #095455) y se añadieron 20 mg de pancreatina (Sigma® lote. #SLBW3957, St. Louis, MO) y 70 µL de bilis bovina para cada muestra, nuevamente se incubó por 2 h bajo las mismas condiciones.

3.2.3. Purificación de AFs de líquido ruminal.

Inmediatamente después de la simulación digestiva las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 10 min, el sobrenadante (LR) y precipitado (alimento + producto adsorbente) fueron separados en tubos de 50 mL. La extracción de las AFs del LR sobrenadante (LRS) se realizó mediante columnas de inmunoafinidad AflaTest® (Vicam®) mediante modificaciones en los métodos recomendados por el fabricante para muestras líquidas.

3.2.3.1 Columna de inmunoafinidad

Se añadieron 2 g de NaCl (Fisher Chemical®) a los 40 mL del LRS, agitando vigorosamente hasta disolver los gránulos. Se tomaron 10 mL de LRS y se diluyó con 40 mL de agua bidestilada, las mezclas se homogenizaron y posteriormente se pasaron a través de filtros de microfibra de vidrio de 1.5 μm (Vicom®). Se tomó una alícuota de 5 mL del filtrado resultante y se depositó en una jeringa de vidrio de 10 mL, después la solución se pasó a través de la columna de inmunoafinidad a un flujo de 1 gota/seg con ayuda de una bomba de aire (Figura 7). La columna se enjuagó 2 veces con 5 mL de agua bidestilada a un flujo de 2 gotas/seg hasta que el aire llegó a la columna. Después se eluyó el contenido de AFs con 1 mL de metanol grado HPLC (TEDIA®) y al final las muestras se sometieron a evaporación con nitrógeno en un equipo Evaporator System (Glas-Col®). Las muestras evaporadas fueron reconstituidas en 1 mL de fase móvil de agua/acetonitrilo/metanol (64:18:18) y posteriormente la solución reconstituida se pasó a través de filtros para jeringa de 0.2 μm (PALL®), depositando el filtrado en viales para cromatografía.



Figura 7. Purificación de AFs con columnas de inmunoafinidad.

3.2.4. Determinación de AFs por cromatografía de líquidos

La cuantificación de AFs fue determinada con un equipo de cromatografía líquida ACQUITY UPLC® (Ultra Performance Liquid Chromatography) H-Class (Waters®, Singapur), acoplado a un detector de fluorescencia FLR-Detector (Waters®, Irlanda). La columna cromatográfica utilizada fue ACQUITY UPLC® BEH C18 Column 2.1 x 100 mm, 1.7 µm (Waters®) a una temperatura de 30°C, con una fase móvil de agua:metanol:acetonitrilo (64:18:18) (todos grado HPLC) a un flujo constante de 0.4 mL/min. El tiempo de corrida para cada muestra fue de 5 min, se inyectó un volumen de 50 µL por muestra. Las cuantificaciones fueron realizadas a una excitación de 365 nm y valores de emisión de 429 nm (AFB₁ y B₂) y 455 nm (AFG₁ y G₂).

3.2.5. Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA de 2 factores no balanceado con interacciones, mediante el software SAS® University Edition. Utilizando un procedimiento “PROC GLM” y realizando un ajuste de comparación de medias por Tukey.

4. RESULTADOS

4.1. Resultados de caracterización física

La caracterización física (Tabla 2) fue útil para discernir entre las clasificaciones de adsorbentes de origen orgánico y los adsorbentes que contienen arcillas minerales. El análisis de volumen de expansión (Vex) determinó la capacidad de hidratación y el posible catión (Na y Ca²⁺) predominante en los espacios interlaminares de las arcillas, parámetro que no puede ser determinado correctamente en las muestras de origen orgánico. Algunas de las muestras que contenían materia orgánica mostraron una mayor humedad que las que solo son de origen mineral. Las muestras C-5, C-10 y C-7 estaban mayormente conformadas por partículas de arcilla, mientras que la mayoría estaba compuesta en mayor proporción por partículas de limo (>53µm).

Tabla 2. Resultados de caracterización física

Muestra	Humedad	Granulometría			Vex	Posible catión
		Arena	Limo	Arcilla		
C-1	9%	18%	45%	37%	1.7	Ca
C-2	12%	25%	53%	22%	0.7	Ca
C-3	8%	21%	44%	35%	0.9	Ca
C-4	9%	19%	54%	27%	1.7	Ca
C-5	9%	15%	5%	80%	4	Na
C-6	9%	47%	23%	30%	0.9	Ca
C-7	4%	7%	20%	73%	4	Na
C-8	6%	-	-	-	0.7	No mineral
C-9	8%	22%	55%	23%	4	Na
C-10	3%	10%	36%	54%	4	Na
C-11	2%	24%	45%	31%	4	Na
C-12	11%	-	-	-	1.5	No mineral
Novasilect® AF	10%	15%	49%	36%	1.3	Ca

Vex: volumen de expansión, se determina para estimar cualitativamente la presencia de esmectitas, debido a su capacidad de hidratación.

4.2. Resultados de caracterización química

La exposición de los adsorbentes al peróxido de hidrógeno (H_2O_2) causa la oxidación/reducción de materia orgánica y algunos componentes como óxidos de manganeso presentes en las muestras, reacción evidentemente mostrada en los adsorbentes C-8 y C-3. La reacción observada de la exposición al ácido clorhídrico (HCl) fue evidente en la mayoría de las muestras, lo que sugiere la presencia de calcita y otros carbonatos (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados de caracterización química

Muestra	Rx a H_2O_2	Rx a HCl	pH	mV
C-1	3	3	6.39	436.1
C-2	2	4	8.62	380.6
C-3	4	4	7.83	135.5
C-4	3	3	7.52	159.3
C-5	3	2	10.38	236.2
C-6	1	4	10.33	84.4
C-7	2	3	10.1	424
C-8	5	5	6.52	418.2
C-9	2	3	9.26	486
C-10	3	2	9.72	115.9
C-11	3	3	10.28	417.2
C-12	3	4	5.14	319.2
Novasilect® AF	3	4	8.92	218.2

Rx a H_2O_2 : reacción a H_2O_2 ; Rx a HCl: reacción a HCl; estos parámetros fueron evaluados cualitativamente del 0 al 5, siendo 0 una reacción nula y 5 una reacción muy evidente.

4.3. Resultados de caracterización mineralógica

4.3.1. Análisis de difracción de rayos X

En la Figura 8 se muestran los patrones de rayos X obtenidos, los cuales indicaron la presencia de esmectita en las muestras C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-9, C-10 y C-11, mientras que las muestras C-8 y C-12 (Figura 9) no mostraron patrones compatibles con esmectita, debido al origen y contenido de materia orgánica de estas muestras.

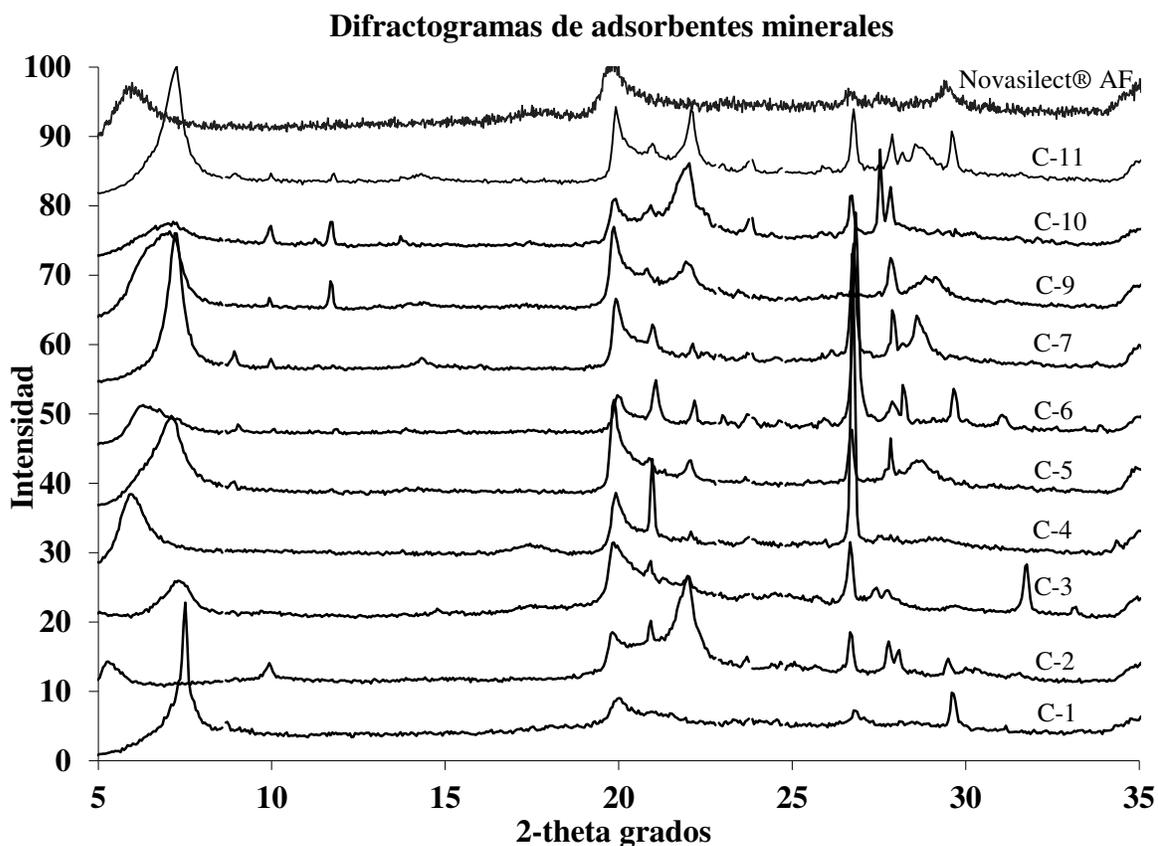


Figura 8. Difractogramas de adsorbentes minerales. Los picos mostrados entre 5 y 7 grados 2-theta representan patrones característicos de las esmectitas.

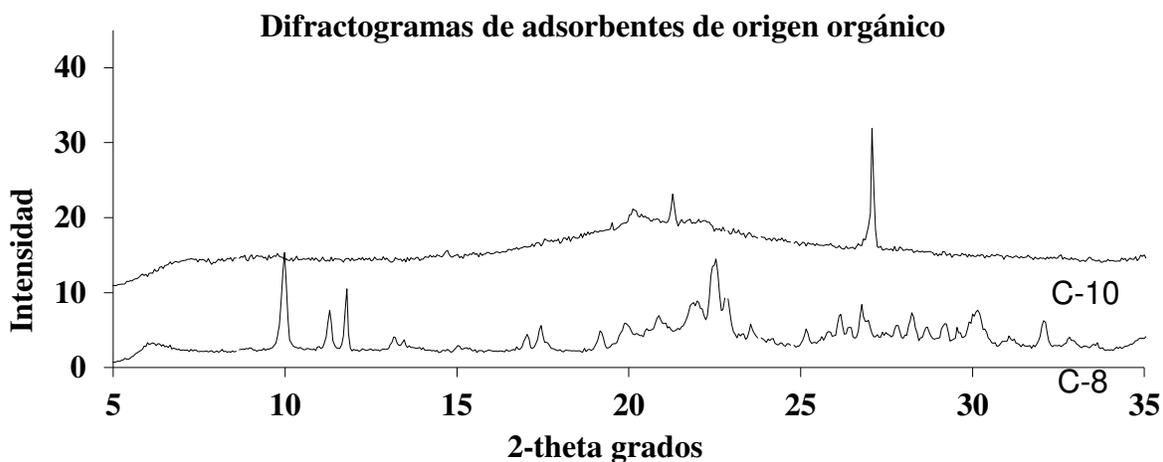


Figura 9. Los difractogramas de los adsorbentes de origen orgánico no muestran picos característicos de esmectitas o de algún mineral con propiedades adsorbentes.

4.4. Resultados de isothermas de adsorción

La muestra C-5 y Novasilect® AF mostraron una mayor capacidad de adsorción para AFB₁ (Q_{max}) expresada en mol / kg de arcilla (Figura 10 y 11, respectivamente). Los patrones de adsorción representados por estos adsorbentes se ajustan a un modelo de ecuación tipo L-2 (Langmuir) que indica un proceso saturable, esta ecuación fue requerida para obtener los valores de r^2 , así como los valores de Q_{max} y Kd de cada muestra que se presentan en la Tabla 4. El resto de las muestras fueron ajustadas al modelo Langmuir para ser comparadas. Las muestras C-12, C-9, C-8, C-3, C-2 y C-1 muestran una tendencia lineal y mayormente compatible con un modelo tipo Freundlich, cuya ecuación representa un proceso no saturable.

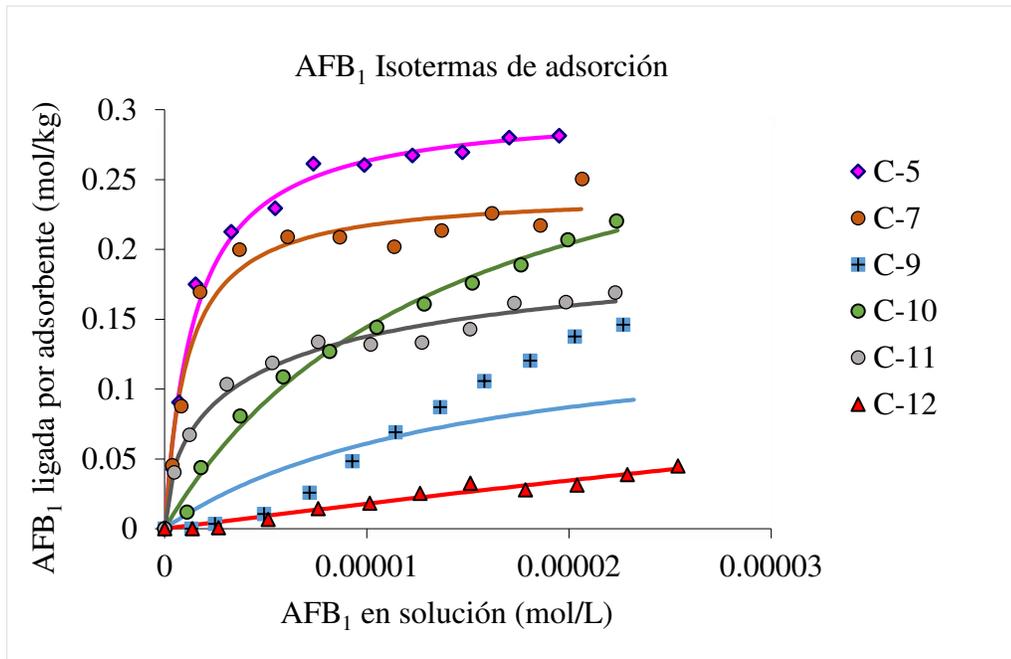


Figura 10. Gráfico de equilibrio isotérmico 1. En la presente figura el adsorbente C-5 muestra un proceso saturable y una mayor Q_{max} que el resto de las muestras.

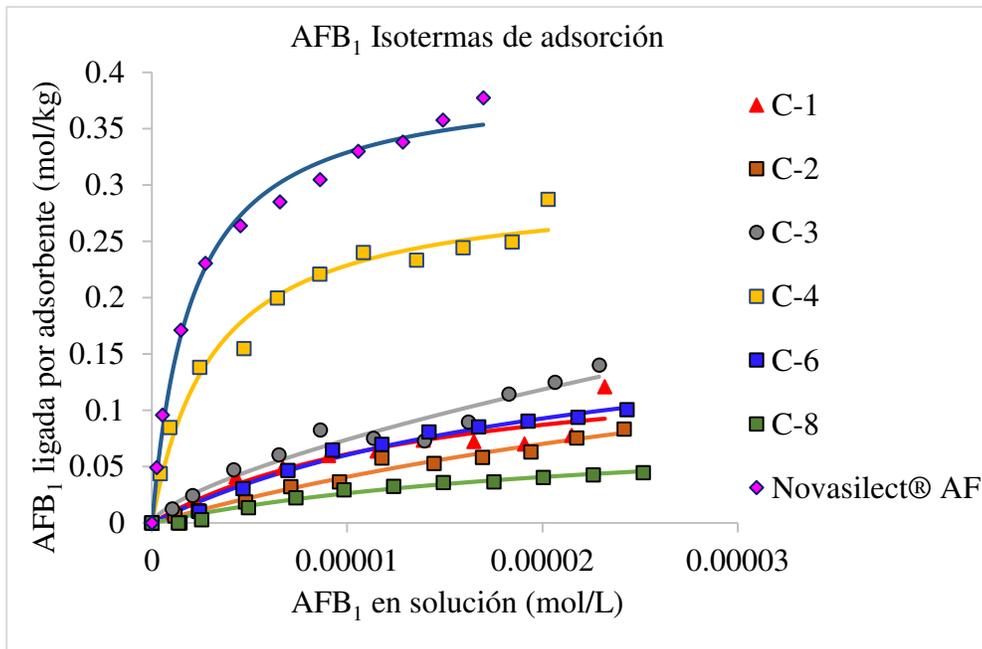


Figura 11. Gráfico de equilibrio isotérmico 2. Las muestras Novasilect® AF y C-4 muestran un proceso saturable y Q_{max} mayor que el resto, que presentan un comportamiento más lineal y una interacción débil.

Tabla 4. Capacidad máxima de adsorción, afinidad y r^2

Muestra	Q_{max}	Kd	r^2
C-1	0.15	6.75E+04	0.89
C-2	0.24	2.01E+04	0.97
C-3	0.26	4.05E+04	0.94
C-4	0.29	3.20E+05	0.98
C-5	0.30	6.74E+05	0.99
C-6	0.19	4.38E+04	0.97
C-7	0.24	8.98E+05	0.95
C-8	0.08	4.18E+04	0.97
C-9	0.15	6.75E+04	0.89
C-10	0.22	7.10E+04	0.99
C-11	0.17	4.89E+05	0.95
C-12	0.04	3.95E+03	0.96
Novasilect® AF	0.37	4.90E+05	0.99

Los valores de r^2 están ajustados a la ecuación del modelo Langmuir.

4.5. Resultados de simulación digestiva con LR

Mediante análisis de simulación digestiva con LR se evaluaron los productos Novasilect® AF, C-5, C-3 y C-12 para determinar su capacidad de adsorción para AFs totales (B_1 , B_2 , G_1 y G_2). Las muestras C-5 y Novasilect® AF, ambas de origen mineral mostraron mayor porcentaje de adsorción que las muestras con materia orgánica, como C-3 y C-12. Los cuatro adsorbentes evaluados mostraron un mayor porcentaje de adsorción para AFB_1 que por B_2 , G_1 y G_2 (Figura 12).

En la Figura 13 se muestran los resultados de adsorción de AFs totales, donde las muestras Novasilect® AF y C-5 mostraron una capacidad de adsorción significativamente ($p < 0.05$) mayor que las muestras C-3 y C-12. Mientras que no hubo una diferencia significativa

($p > 0.05$) entre Novasilect® AF y C-5, al igual entre C-3 y C-12. Hubo efecto de adsorbente, sin embargo, en ningún tratamiento hubo efecto de dosis ($p > 0.05$).

Las muestras Novasilect® AF y C-5 tuvieron una capacidad de adsorción significativamente ($p < 0.05$) mayor para AFB₁, mostrando un efecto de agente adsorbente, pero no de dosis. Todos los adsorbentes mostraron ser iguales para la adsorción de AFB₂, G₁ y G₂ ($p > 0.05$).

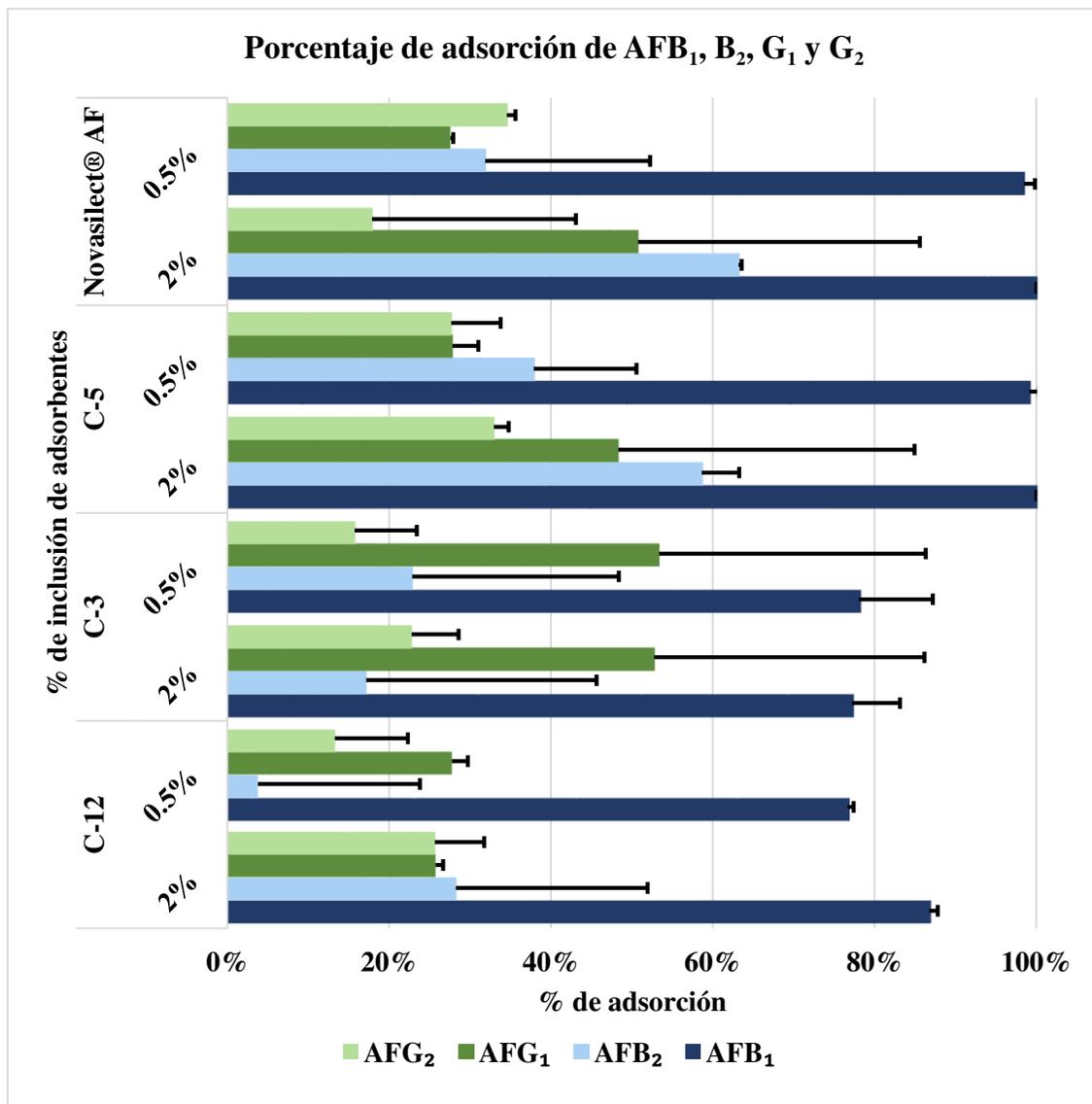


Figura 12. Porcentajes de adsorción para cada AF en simulación digestiva con LR.

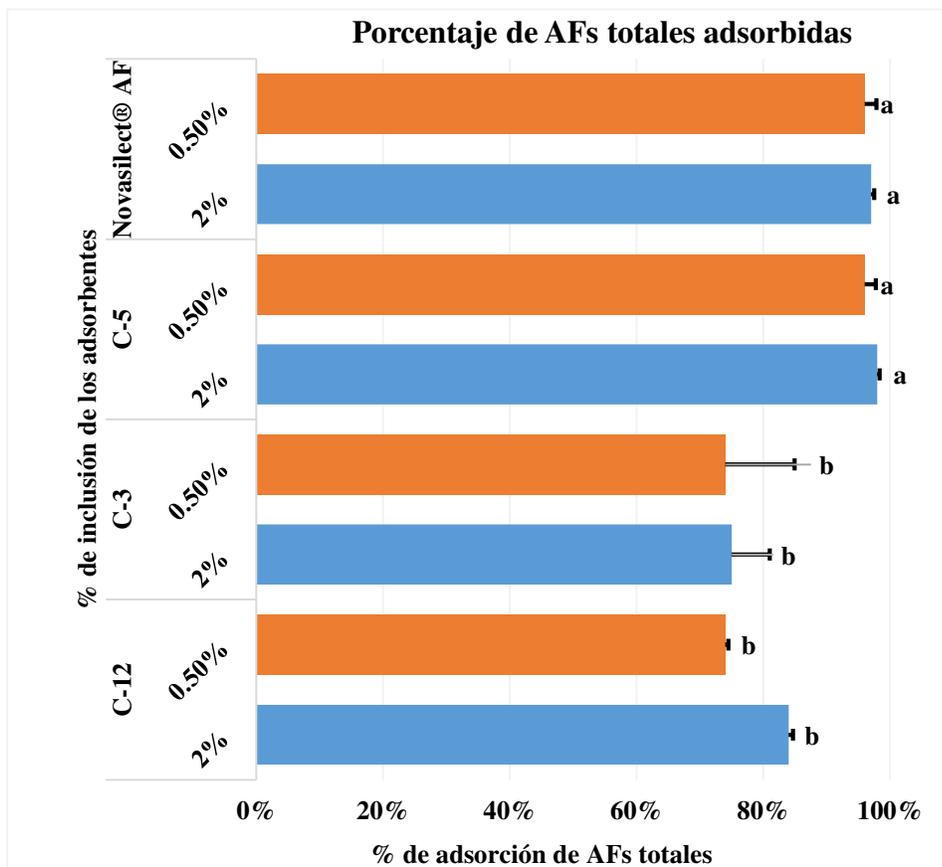


Figura 13. Porcentaje de adsorción de AFs totales con las respectivas dosificaciones de 0.5 y 2%. Las muestras de origen mineral (Novasilect® AF y C-5) tuvieron una capacidad de adsorción significativamente mayor que las de origen orgánico (C-3 y C-12) ($p < 0.05$).

5. DISCUSIÓN

Los resultados de caracterización mineralógica indicaron la presencia de esmectitas en las muestras C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-9, C-10, C-11, compatibles con el difractograma de la tarjeta JCPDS 29-1498, correspondiente a montmorillonita, similar a lo obtenido por Vargas-Rodríguez et al. en 2008. Mientras que las muestras C-8 y C-12, de origen orgánico no mostraron ningún patrón característico de algún mineral adsorbente, este tipo de productos pueden estar compuestas principalmente por pared celular de levadura y algunos β -glucanos, según Marroquin-Cardona et al. (2009) y Yiannikouris et al., (2006).

En la caracterización física la reactividad mostrada por C-5 y C-10 en la exposición a HCl, sugiere la presencia de calcita y otros carbonatos en las muestras, reacción que no fue tan evidente en el resto de las muestras. La reacción mostrada por la muestra C-5 al peróxido de hidrogeno (H_2O_2) fue moderada, mientras que las muestras C-3 y C-8 tuvieron una reacción evidente, este tipo de reacciones puede asociarse a la oxidación/reducción de componentes como óxidos de manganeso y materia orgánica según los procedimientos descritos por Deng et al., (2009).

Los resultados de pH y de volumen de expansión obtenidos concuerdan con lo observado por Marroquin-Cardona et al. (2009), obteniendo valores de pH más alcalinos en las muestras que contienen bentonitas sódicas, y pH menos alcalinos en los adsorbentes con bentonitas de calcio, excepto C-6 que mostró un valor de 10.33, debido posiblemente a la interferencia de algún compuesto del adsorbente.

Según los análisis de isotermas de adsorción para AFB_1 , las muestras con esmectitas (montmorillonita) mostraron una capacidad de adsorción mayor que las de origen orgánico para ligar AFB_1 , patrón de comportamiento observado por Grant & Phillips en 1998 y Marroquin-Cardona et al. en 2009. Las muestras que contienen esmectitas resultaron tener una mayor capacidad de adsorción para AFB_1 , sin embargo algunas mostraron un proceso no saturable, lo que indica que podría existir una interacción inestable entre el adsorbente y las AFs. Los patrones observados en las isotermas de adsorción de la muestra C-5 y Novasilect® AF indican que los espacios internos y externos de las arcillas pueden ser ocupados por AFB_1 . Este patrón sugiere una interacción estable y fuerte que puede persistir en las condiciones del tracto

gastrointestinal, y posiblemente podría evitar la absorción de AFB₁ en el intestino delgado (Grant & Phillips, 1998).

En la metodología utilizada para las simulaciones digestivas a diferencia de otros estudios similares (Gallo & Masoero, 2009; Moschini et al., 2008) se contempló el factor de dilución de las AFs totales presentes en la cantidad de alimento contaminado con la cantidad de LR.

Las muestras evaluadas en la simulación digestiva con LR mostraron un comportamiento similar al de las isotermas de adsorción, donde los adsorbentes de origen mineral C-5 y Novasilect® AF mostraron una capacidad de adsorción mayor al 98% de AFs totales y significativamente ($p < 0.05$) mayor que las muestras con materia orgánica (C-3 y C-12) de acuerdo con lo observado por Gallo & Masoero, 2009 y Moschini et al., 2008. Los componentes de estas muestras (C-3 y C-12) como pared celular de levadura y β -glucanos no establecen interacciones estables con las AFs para mantenerse en las condiciones del tracto gastrointestinal.

6. CONCLUSIONES

Los productos adsorbentes con esmectitas de Na y Ca (C-5 y Novasilect® AF, respectivamente) resultaron tener una mayor capacidad de adsorción para AFB₁ en simulaciones digestivas con líquido ruminal, así como una interacción estable en los análisis de isotermas de adsorción.

Las simulaciones digestivas con LR podrían ser un modelo *in vitro* de elección para determinar la efectividad de posibles agentes adsorbentes, antes de ser utilizados en análisis *in vivo*.

7. LITERATURA CITADA

- Bräse, S., Gläser, F., Kramer, C. S., Lindner, S., Linsenmeier, A. M., Masters, K.-S., ... Zhong, S. (2013). *Chemistry Of Mycotoxins*. New York.
- Buchanan, R. L. and Lewis, D. F. (1984). Regulation of Aflatoxin Biosynthesis : Effect of Glucose of Various Glycolytic Enzymes. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(2), 306–310.
- Carvajal, M. (2013). Transformacion de la AFB1 de alimentos, en el cancerigeno humano, aducto AFB1 -ADN. *Revista Especializada En Ciencias Quimico-Biológicas*, 16(2), 109–120.
- Chang, S. B., Abdel-Kader, M. M., Wick, E. L., & Wogan, G. N. (1963). Aflatoxin B2: Chemical Identity And Biological Activity. *Science (New York, N.Y.)*, 142(3596), 1191–1192.
- Comisión Europea. (2006). Reglamento (CE) 1881/2006. *Diario Oficial de La Unión Europea*, 2006(L364), 5–24. Obtenido de: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=URISERV:121290>
- Daković, A., Matijašević, S., Rottinghaus, G. E., Ledoux, D. R., Butkeraitis, P., & Sekulić, Ž. (2008). Aflatoxin B1 adsorption by natural and copper modified montmorillonite. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 66(1), 20–25. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.05.008>
- Daza, C. E., & Gallego, R. M. (2011). Estudio morfológico y estructural de una arcilla Colombiana pilarizada en presencia de ultrasonido y microondas ultrasound and microwaves. *Scientia et Technica Año XVI*, (49), 292–297.
- Deng, Y., Velázquez, A. L. B., Billes, F., & Dixon, J. B. (2010). Bonding mechanisms between aflatoxin B1 and smectite. *Applied Clay Science*, 50(1), 92–98. <https://doi.org/10.1016/J.CLAY.2010.07.008>
- Deng, Y., White, G. N., & Dixon, J. . B. (2009). *Soil mineralogy laboratory manual* (11th ed.). College Station, Texas: Published by the authors,.

- Dhanasekaran, D., Shanmugapriya, S., Thajuddin, N., & Panneerselvam, A. (2011). Aflatoxins and Aflatoxicosis in Human and Animals. In R. G. Guevara-Gonzalez (Ed.), *Aflatoxins - Biochemistry and Molecular Biology* (InTech). <https://doi.org/10.5772/22717>
- Do, J. H., & Choi, D.-K. (2007). Aflatoxins: Detection, toxicity, and biosynthesis. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 12(6), 585–593. <https://doi.org/10.1007/BF02931073>
- Eaton, D. L., & Gallagher, E. P. (1994). Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 34, 135–172. <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.34.040194.001031>
- Ferguson, L. R., & Philpott, M. (2008). Nutrition and mutagenesis. *Annual Review of Nutrition*, 28, 313–329. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.28.061807.155449>
- Fu, J. C., Chen, Q., Du, J., Shi, B. M., & Shan, A. S. (2013). Effectiveness of maifanite in reducing the detrimental effects of aflatoxin B1 on hematology, aflatoxin B1 residues, and antioxidant enzymes activities of weanling piglets. *Livestock Science*, 157(1), 218–224. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2013.06.032>
- Gallagher, E. P., Kunze, K. L., Stapleton, P. L., & Eaton, D. L. (1996). The kinetics of aflatoxin B1 oxidation by human cDNA-expressed and human liver microsomal cytochromes P450 1A2 and 3A4. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 141(2), 595–606. <https://doi.org/10.1006/taap.1996.0326>
- Gallo, A., & Masoero, F. (2009). In vitro models to evaluate the capacity of different sequestering agents to adsorb aflatoxins. *Italian Journal of Animal Science*, 9(1), 109–116. <https://doi.org/10.4081/ijas.2010.e21>
- Georgianna, D. R., & Payne, G. A. (2009). Genetic regulation of aflatoxin biosynthesis: From gene to genome. *Fungal Genetics and Biology*, 46(2), 113–125. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.10.011>
- Grant, P. G., & Phillips, T. D. (1998). Isothermal Adsorption of Aflatoxin B1 on HSCAS Clay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(2), 599–605. <https://doi.org/10.1021/jf970604v>

- Gross-Steinmeyer, K., & Eaton, D. L. (2012). Dietary modulation of the biotransformation and genotoxicity of aflatoxin B1. *Toxicology*, 299(2–3), 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.05.016>
- Guengerich, F. P., Johnson, W. W., Ueng, Y. F., Yamazaki, H., & Shimada, T. (1996). Involvement of cytochrome P450, glutathione S-transferase, and epoxide hydrolase in the metabolism of aflatoxin B1 and relevance to risk of human liver cancer. *Environmental Health Perspectives*, 104(Suppl 3), 557–562. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1469621/>
- Im, S. H., Bolt, M. W., Stewart, R. K., & Massey, T. E. (1996). Modulation of aflatoxin B1 biotransformation by beta-naphthoflavone in isolated rabbit lung cells. *Archives of Toxicology*, 71(1–2), 72–79. <https://doi.org/10.1007/s002040050360>
- International Agency for Research on Cancer. (2002). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. *IARC Press*, 82, 171. <https://doi.org/10.1002/food.19940380335>
- Kinniburgh, D. G. (1986). General purpose adsorption isotherms. *Environmental Science & Technology*, 20(9), 895–904. <https://doi.org/10.1021/es00151a008>
- Kubena, L. F., Harvey, R. B., Bailey, R. H., Buckley, S. A., & Rottinghaus, G. (1998). Effects of a Hydrated Sodium Calcium Aluminosilicate (T-Bind[®]) on.pdf.
- Kubena, L. F., Harvey, R. B., Huff, W. E., Corrier, D. E., Phillips, T. D., & Rottinghaus, G. E. (1990). Efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the toxicity of aflatoxin and T-2 toxin. *Poultry Science*, 69(7), 1078–1086.
- Magnoli, A. P., Tallone, L., Rosa, C. A. R., Dalcero, A. M., Chiacchiera, S. M., & Torres Sanchez, R. M. (2008). Commercial bentonites as detoxifier of broiler feed contaminated with aflatoxin. *Applied Clay Science*, 40(1–4), 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2007.07.007>
- Magnoli, A. P., Texeira, M., Rosa, C. A. R., Miazzo, R. D., Cavaglieri, L. R., Magnoli, C. E., ... Chiacchiera, S. M. (2011). Sodium bentonite and monensin under chronic aflatoxicosis in broiler chickens. *Poultry Science*, 90(2), 352–357. <https://doi.org/10.3382/ps.2010->

- Marroquin-Cardona, A., Deng, Y., Taylor, J. F., Hallmark, C. T., Johnson, N. M., & Phillips, T. D. (2009). In vitro and in vivo characterization of mycotoxin- binding additives used for animal feeds in Mexico. *Food Addit Contam Part A*, 26:5(Jun), 733–743. <https://doi.org/10.1080/02652030802641872>
- Masimango, N., Remacle, J., & Ramaut, J. L. (1978). The role of adsorption in the elimination of aflatoxin B1 from contaminated media. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 6(1), 101–105. <https://doi.org/10.1007/BF00500861>
- Miazzo, R., Peralta, M. F., Magnoli, C., Salvano, M., Ferrero, S., Chiacchiera, S. M., ... Dalcero, a. (2005). Efficacy of sodium bentonite as a detoxifier of broiler feed contaminated with aflatoxin and fumonisin. *Poultry Science*, 84(1), 1–8.
- Monge, M. del P., Magnoli, A. P., Bergesio, M. V., Tancredi, N., Magnoli, C. E., & Chiacchiera, S. M. (2016). Activated carbons as potentially useful non-nutritive additives to prevent the effect of fumonisin B1 on sodium bentonite activity against chronic aflatoxicosis. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 33(6), 1043–1052. <https://doi.org/10.1080/19440049.2016.1185923>
- Moschini, M., Gallo, A., Piva, G., & Masoero, F. (2008). The effects of rumen fluid on the in vitro aflatoxin binding capacity of different sequestering agents and in vivo release of the sequestered toxin. *Animal Feed Science and Technology*, 147(4), 292–309. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2008.01.010>
- Palmgren, M. S., & Hayes, A. W. (1987). Aflatoxins in food. In P. Krogh (Ed.), *Mycotoxins in food* (pp. 65–95). London.
- Patterson, D. S. P., & Roberts, B. A. (1970). The formation of aflatoxins B2a and G2a and their degradation products during the in vitro detoxification of aflatoxin by livers of certain avian and mammalian species. *Food and Cosmetics Toxicology*, 8(5), 527–538. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0015-6264\(70\)80041-4](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0015-6264(70)80041-4)
- Phillips, T. D. (1999). Dietary clay in the chemoprevention of aflatoxin-induced disease. *Toxicol Sci.*, 52(2 Suppl), 118–126. https://doi.org/10.1093/toxsci/52.suppl_1.118

- Phillips, T. D., Afriyie-Gyawu, E., Williams, J., Huebner, H., Ankrah, N.-A., Ofori-Adjei, D., ... Wang, J.-S. (2008). Reducing human exposure to aflatoxin through the use of clay: A review. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 25(2), 134–145. <https://doi.org/10.1080/02652030701567467>
- Phillips, T. D., Kubena, L. F., Harvey, R. B., Taylor, D. R., & Heidelbaugh, N. D. (1988). Hydrated sodium calcium aluminosilicate: a high affinity sorbent for aflatoxin. *Poultry Science*, 67(2), 243–247.
- Phillips, T. D., Lemke, S. L., & Grant, P. G. (2002). Characterization of clay-based enterosorbents for the prevention of aflatoxicosis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 504, 157–171.
- Rawal, S., Kim, J. E., & Coulombe, R. (2010). Aflatoxin B1 in poultry: Toxicology, metabolism and prevention. *Research in Veterinary Science*, 89(3), 325–331. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.04.011>
- Roebuck, B. D., & Maxuitenko, Y. Y. (1994). 2 - Biochemical Mechanisms and Biological Implications of the Toxicity of Aflatoxins as Related to Aflatoxin Carcinogenesis A2 - Eaton, David L. In J. D. B. T.-T. T. of A. Groopman (Ed.) (pp. 27–43). San Diego: Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-228255-3.50007-6>
- Rosa, C. a, Miazzo, R., Magnoli, C., Salvano, M., Chiacchiera, S. M., Ferrero, S., ... Dalcero, a. (2001). Evaluation of the efficacy of bentonite from the south of Argentina to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broilers. *Poultry Science*, 80(2), 139–144. <https://doi.org/10.1093/ps/80.2.139>
- Secretaría de Salud. (2002). *NOM-188-SSA1-2002. Diario Oficial de la Federación* (Vol. 22). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.5.3456>
- Secretaría de Salud. (2010). *NOM -243-SSA1-2010. Diario Oficial de la Federación* http://dof.gob.mx/nota_detalle_popup.php?codigo=5160755
- Soriano del Castillo, J. M. (2007). *Micotoxinas en alimentos* (Ediciones). España.
- Spotti, M., Fracchiolla, M. L., Arioli, F., Caloni, F., & Pompa, G. (2005). Aflatoxin B1 binding to sorbents in bovine ruminal fluid. *Veterinary Research Communications*, 29(6), 507–515.

<https://doi.org/10.1007/s11259-005-1867-2>

- Valencia-Quintana, R., Sánchez-Alarcón, J., Tenorio, M. G., Deng, Y., Waliszewski, S. M., & Valera, M. Á. (2012). Preventive strategies aimed at reducing the health risks of Aflatoxin B1. *Toxicology and Environmental Health Sciences*, 4(2), 71–79. <https://doi.org/10.1007/s13530-012-0119-4>
- Vargas-Rodríguez, Y. M., Gómez-Vidales, V., Vázquez-Labastida, E., García-Bórquez, A., Aguilar-Sahagún, G., Murrieta-Sánchez, H., & Salmón, M. (2008). Caracterización espectroscópica de una montmorillonita mexicana. *Rev. Mex. Cienc. Geol.*, 25(1), 135–144. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmcg/v25n1/v25n1a8.pdf>
- Wannop, C. C. (1961). The Histopathology of Turkey “X” Disease in Great Britain. *Avian Diseases*, 5(4), 371–381. <https://doi.org/10.2307/1587768>
- Wogan, G. N. (1966). Chemical nature and biological effects of the aflatoxins. *Bacteriological Reviews*, 30(2), 460–70. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=441006&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Xu, L., Zhang, Z., Zhang, Q., & Li, P. (2016). Mycotoxin determination in foods using advanced sensors based on antibodies or aptamers. *Toxins*, 8(8), 1–16. <https://doi.org/10.3390/toxins8080239>
- Yiannikouris, A., Andr, G., Poughon, L., Franois, J., Dussap, C., Jeminet, G., ... Jouany, J. (2006). Chemical and Conformational Study of the Interactions Involved in Mycotoxin Complexation with β -d-Glucans Chemical and Conformational Study of the Interactions Involved in Mycotoxin Complexation with - D -Glucans. *Biomacromolecules*, 7, 1147–1155. <https://doi.org/10.1021/bm050968t>
- Yu, J., Chang, P., Ehrlich, K. C., Cary, J. W., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E., ... Bennett, J. W. (2004). Clustered Pathway Genes in Aflatoxin Biosynthesis MINIREVIEW Clustered Pathway Genes in Aflatoxin Biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(3), 1253–1262. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.3.1253>
- Zanger, U. M., & Schwab, M. (2013). Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism:

Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation.
Pharmacology and Therapeutics, 138(1), 103–141.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.12.007>