

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
POSGRADO CONJUNTO AGRONOMÍA-VETERINARIA



EVALUACIÓN *IN VITRO* DE MOLÉCULAS DE QUITOSANO MODIFICADAS  
QUÍMICAMENTE COMO ADSORBENTES DE AFLATOXINA B<sub>1</sub>

Por

ARMANDO DELGADO CEDEÑO

Como requisito parcial para obtener el grado de

Maestro en Ciencia Animal

Marzo, 2022

EVALUACIÓN *IN VITRO* DE MOLÉCULAS DE QUITOSANO MODIFICADAS  
QUÍMICAMENTE COMO ADSORBENTES DE AFLATOXINA B<sub>1</sub>

Aprobación de tesis por el comité particular de

Armando Delgado Cedeño

**Comité de Tesis**



---

Ph.D. Jorge R. Kawas Garza  
Presidente



---

Ph.D. Alicia G. Marroquín Cardona  
Secretario



---

Dra. Yarellys Ramos Zayas  
Vocal



---

D.Ph. Gerardo Méndez Zamora  
Vocal



---

Dr. Uziel Castillo Velázquez  
Vocal



---

Dra. Sara P. Hernández Martínez  
Asesor externo

EVALUACIÓN *IN VITRO* DE MOLÉCULAS DE QUITOSANO MODIFICADAS  
QUÍMICAMENTE COMO ADSORBENTES DE AFLATOXINA B<sub>1</sub>

Aprobación de tesis por el comité particular de

Armando Delgado Cedeño

**Dirección de Tesis**



---

Ph.D. Jorge R. Kawas Garza

Director



---

Dra. Sara P. Hernández Martínez

Director Externo



---

Ph.D. Alicia G. Marroquín Cardona

Co-Director



---

Dr. Rogelio A. Ledezma Torres  
Subdirector de Posgrado e Investigación

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a mi familia, especialmente a mi mamá, papá, hermano y abuela por todos valores inculcados y el apoyo incondicional que me han brindado.

También quiero agradecer al Posgrado Conjunto de las facultades de Agronomía y Medicina Veterinaria y Zootecnia, por haberme ofrecido la oportunidad de ejercer junto a ellos la Maestría en Ciencia Animal.

Enorme agradecimiento a mi director de tesis Ph.D. Jorge R. Kawas Garza y asesores Dra. Sara P. Hernández Martínez, Dra. Yarellys Ramos Zayas, Ph.D. Alicia G. Marroquín Cardona, D. Ph. Gerardo Méndez Zamora, Dr. Uziel Castillo Velázquez por compartir sus conocimientos y ayuda brindada en nuestro proyecto de tesis.

También le agradezco al Conacyt por la beca ofrecida durante este periodo y al PAICYT por su colaboración con el proyecto de tesis.

Quiero agradecer a la empresa MNA de México, AQUA laboratorios, a los Laboratorios de Toxicología y Nutrición Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL, por ofrecerme sus instalaciones y equipos.

Por último y no menos importantes les agradezco a mis amigos de generación de maestría: Jocelyn, Pilar y Francisco, por haberme dado la oportunidad de formar parte de ese Team Máster 2020, y a todos mis amigos cubanos que estamos en el CDR Cuba en Monterrey, por haber creado esa familia que hoy somos.

## **DEDICATORIA**

Quiero dedicar esta tesis de maestría a mis padres, hermano, abuela y a toda mi familia por apoyarme y guiarme en cada etapa de mi vida.

A todos los profesores que han tenido participación en mis estudios de grados, los cuáles me fueron formando en mi perfil profesional.

A mi asesor de tesis, y comité de tesis por todo el esfuerzo, los conocimientos, recursos y tiempo brindado.

A todas mis amistades cubanas, mexicanas y puertorriqueña por compartir momentos inolvidables.

## ÍNDICE

SECCIÓN	PÁGINA
AGRADECIMIENTOS .....	i
DEDICATORIA.....	ii
ÍNDICE.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	viii
RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Factores predisponentes para la producción de micotoxinas en los alimentos.....	3
2.2. Clasificación de micotoxinas por su composición química.....	4
2.2.1. Aflatoxinas.....	4
2.2.2. Fumonisinias.....	6
2.2.3. Tricotecenos.....	6
2.2.4. Ocratoxinas.....	7
2.3. Daños causados por micotoxinas en pollos de engorda.....	8
2.4. Compuestos minerales (arcillas) cómo secuestrantes de micotoxinas.....	9
2.4.1. Esmectitas.....	10
2.5. Mecanismo de acción de los compuestos minerales (arcillas) como secuestrante de micotoxinas.....	11
2.6. Otros aditivos que aminoran el daño causado por las micotoxinas.....	12
2.6.1. Quitosano .....	12
2.6.2. B-glucanos.....	14
2.6.3. Carbón activado.....	15
2.7. Modelo <i>in vitro</i> para simular la digestión para aves.....	16
3. JUSTIFICACIÓN.....	17
4. HIPÓTESIS.....	18
5. OBJETIVOS.....	19
5.1. Objetivo general.....	19
5.2. Objetivos específicos.....	19

<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
6.1. Tratamientos.....	20
6.2. Síntesis de moléculas de quitosano.....	20
6.3. Caracterización de las moléculas de quitosanos por espectroscopía infrarroja transformada de Fourier (FTIR).....	21
6.4. Caracterización de dos esmectitas (montmorillonita y beidelita).....	21
6.5. Análisis de isothermas de adsorción de concentración única de aflatoxina B <sub>1</sub> dependiente de pH.....	22
6.6. Cuantificación de aflatoxina B <sub>1</sub> por cromatografía líquida de ultra-alta resolución (UPLC).....	23
6.7. Determinación de la capacidad de adsorción de microminerales por los secuestrantes.....	24
6.8. Análisis estadístico.....	25
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>26</b>
7.1. Determinación de micotoxinas.....	26
7.2. Caracterización de las moléculas de quitosano (QTS).....	26
7.3. Caracterización de la beidelita y montmorillonita .....	30
7.4. Isothermas de adsorción de AFB <sub>1</sub> .....	31
7.5. Cuantificación de aflatoxina B <sub>1</sub> por cromatografía líquida de ultra alta resolución (UPLC).....	33
7.5.1. Curva de calibración.....	33
7.5.2. Cuantificación de AFB <sub>1</sub> .....	34
7.5.3. Adsorción de microminerales por los secuestrantes.....	41
<b>8. DISCUSIÓN.....</b>	<b>43</b>
8.1. Caracterización de las moléculas de quitosano.....	43
8.2. Interacciones de AFB <sub>1</sub> con los secuestrantes evaluados.....	43
8.3. Caracterización de la beidelita y montmorillonita.....	44
8.4. Isothermas de adsorción.....	44
8.5. Cuantificación de AFB <sub>1</sub> .....	45
8.6. Adsorción de microminerales.....	46
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>48</b>
<b>10. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>49</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>50</b>

ÍNDICE DE FIGURAS	PÁGINA
Figura 1. Factores relacionados con la producción de micotoxinas.....	4
Figura 2. Estructuras químicas de aflatoxina B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> y G <sub>2</sub> .....	5
Figura 3. Estructura química de la fumonisina B <sub>1,2,3</sub> .....	6
Figura 4. Estructura química de tricoteceno tipo A y tipo B.....	7
Figura 5. Estructura química de ocratoxina A, B y C.....	8
Figura 6. Estructura básica de los silicatos.....	10
Figura 7. Estructuras de las principales esmectitas: beidelita y montmorillonita.....	11
Figura 8. Estructura química del quitosano.....	14
Figura 9. Fotografías de las síntesis de QTS purificado y QTS-SDS.....	21
Figura 10. Espectro IR de las moléculas de QTS modificados y montmorillonita.....	27
Figura 11. Estructura química de la molécula de quitosano químicamente modificada (QTS Purificado).....	29
Figura 12. Estructura química de la molécula de quitosano químicamente modificada insoluble (QTS-SDS).....	30
Figura 13. Porcentaje de adsorción para AFB <sub>1</sub> por cada secuestrante.....	32
Figura 14. Porcentaje de adsorción a diferentes valores de pH.....	33
Figura 15. Curva de calibración de AFB <sub>1</sub> .....	34
Figura 16. Concentración de AFB <sub>1</sub> secuestrada en un modelo <i>in vitro</i> para aves.....	35
Figura 17. Concentración de AFB <sub>1</sub> secuestrada por los tratamientos bajo condiciones de un modelo <i>in vitro</i> para aves.....	36
Figura 18. Cromatograma para la AFB <sub>1</sub> con 0 ppb.....	36
Figura 19. Cromatograma para la AFB <sub>1</sub> con 3.81 ppb.....	37
Figura 20. Cromatograma para la AFB <sub>1</sub> con 7.81 ppb.....	37
Figura 21. Cromatograma para la AFB <sub>1</sub> con 15.62 ppb.....	37
Figura 22. Cromatograma para la AFB <sub>1</sub> con 31.28 ppb.....	38
Figura 23. Cromatograma para la AFB <sub>1</sub> con 62.5 ppb.....	38
Figura 24. Cromatograma para la AFB <sub>1</sub> con 125 ppb.....	38
Figura 25. Cromatograma para la AFB <sub>1</sub> con 250 ppb.....	39
Figura 26. Cromatograma del secuestro de AFB <sub>1</sub> por el QTS .....	39
Figura 27. Cromatograma del secuestro de AFB <sub>1</sub> por el QTS-purificado.....	39
Figura 28. Cromatograma del secuestro de AFB <sub>1</sub> por el QTS-SDS .....	40

<b>Figura 29. Cromatograma del secuestro de AFB<sub>1</sub> por la montmorillonita.....</b>	<b>40</b>
<b>Figura 30. Cromatograma del secuestro de AFB<sub>1</sub> por la beidelita .....</b>	<b>40</b>
<b>Figura 31. Porcentaje de adsorción de microminerales .....</b>	<b>41</b>

<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>Tabla 1. Principales micotoxinas presentes en cereales.....</b>	<b>3</b>
<b>Tabla 2. Compartimientos simulados para el estudio <i>in vitro</i> de isothermas.....</b>	<b>22</b>
<b>Tabla 3. Compartimientos simulados para el estudio de cuantificación de           AFB<sub>1</sub> <i>in vitro</i>.....</b>	<b>23</b>
<b>Tabla 4. Fuentes y requerimientos nutricionales de la materia prima de los minerales...24</b>	
<b>Tabla 5. Resultados de la cuantificación de los subtipos de micotoxinas.....</b>	<b>26</b>
<b>Tabla 6. Grupos funcionales del QTS-purificado, QTS-SDS y montmorillonita.....</b>	<b>29</b>
<b>Tabla 7. Análisis químico cuantitativo de beidelita y montmorillonita.....</b>	<b>31</b>
<b>Tabla 8. Análisis mineralógico de beidelita y montmorillonita.....</b>	<b>31</b>
<b>Tabla 9. Datos de calibración para AFB<sub>1</sub> obtenidos por UPLC.....</b>	<b>33</b>

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

AFB <sub>1</sub>	Aflatoxina B <sub>1</sub>
AFB <sub>2</sub>	Aflatoxina B <sub>2</sub>
AFG <sub>1</sub>	Aflatoxina G <sub>1</sub>
AFG <sub>2</sub>	Aflatoxina G <sub>2</sub>
FB <sub>1</sub>	Fumonisina B <sub>1</sub>
FB <sub>2</sub>	Fumonisina B <sub>2</sub>
FB <sub>3</sub>	Fumonisina B <sub>3</sub>
DON	Deoxinivalenol
OTA	Ocratoxina A
OTB	Ocratoxina B
OTC	Ocratoxina C
QTS	Quitosano
QTS Purificado	Quitosano químicamente modificado y purificado
QTS – SDS	Quitosano químicamente modificado con dodecil sulfato sódico
SDS	Dodecil sulfato sódico
(SiO <sub>4</sub> ) <sup>4-</sup>	Grupo silicato
NH <sub>2</sub>	Grupo amino
HSCAS	Aluminosilicato de sodio y calcio hidratado
HCl	Ácido clorhídrico
NaOH	Hidróxido de sodio
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sodio
SO <sub>4</sub>	Grupo sulfato
Si <sup>+4</sup>	Grupo silicio
CH <sub>3</sub>	Grupo metilo
OH	Hidroxilo
Al	Aluminio
Fe	Hierro
Mg	Magnesio
Zn	Zinc
Mn	Manganeso
FTIR	Espectroscopia infrarroja transformada de Fourier

IR	Espectroscopia infrarroja
UPLC	Cromatografía líquida de ultra alta resolución
LC-MS-MS	Cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem
ICP-OES	Espectroscopía de emisión óptica acoplado a plasma
ppm	Partes por millón
ppb	Partes por billón
ng/ml	Nanogramos por mililitro
µg/ml	Microgramos por mililitro
mg/ml	Miligramos por mililitro
g/ml	Gramos por mililitro
rpm	Revoluciones por minuto
nm	Nanómetros
kg/ton	Kilogramos por tonelada
M	Mol
µV*Seg	Microvoltios por segundos
%	Por ciento
U	Unidades
v/v	Volumen por volumen
°C	Grados Celsius
<	Menor que
cm <sup>-1</sup>	Por centímetro

## RESUMEN

En este trabajo se sintetizaron y evaluaron dos moléculas modificadas a base de quitosano (QTS) para determinar su capacidad de adsorción hacia aflatoxinas. La capacidad de adsorción de las moléculas de quitosano (QTS), quitosano soluble (QTS-purificado), quitosano insoluble (QTS-SDS), y arcillas montmorillonita y beidelita, fue determinada *in vitro* mediante un modelo de digestión para aves. Primero, se determinaron los isoterma de adsorción de los secuestrantes QTS, QTS-purificado, QTS-SDS, montmorillonita a diferentes valores de pH (5.2, 2.5 y 6.6). Posteriormente, se cuantificó la cantidad de aflatoxina secuestrada por cromatografía líquida de ultra alta resolución (UPLC). Para esto fue simulado un modelo de digestión para aves a diferentes valores de pH y con la inclusión de enzimas digestivas como pepsina en el compartimiento del proventrículo y pancreatina en el intestino delgado. En esta etapa del estudio se incluyó otro secuestrante a base de la arcilla beidelita. Se realizaron diluciones seriadas de una solución de AFB<sub>1</sub> con concentraciones de 0, 3.9, 7.81, 15.62, 31.25, 62.5, 125 y 250 ng/ml (ppb), las cuales fueron analizadas por UPLC, determinando las áreas de los cromatogramas de cada una de las diluciones de trabajo, para obtener una curva de estandarización. Con las mismas condiciones del modelo de digestión para aves se determinó la adsorción de microminerales (hierro, manganeso, zinc, selenio) por los secuestrantes de aflatoxinas evaluados. Los isoterma de adsorción y la cuantificación por UPLC, mostraron que el QTS comercial tiene una menor capacidad de adsorción para AFB<sub>1</sub> en los tres compartimientos evaluados. Los secuestrantes que presentaron mejores resultados fueron la arcilla montmorillonita, la arcilla beidelita y el QTS-SDS. La arcilla montmorillonita y el QTS-SDS mantuvieron una capacidad de adsorción constante *in vitro* en los compartimientos que simulan al proventrículo y el intestino delgado. Todos los tratamientos evaluados secuestraron minerales, sin embargo, los tratamientos que menos secuestraron fueron el QTS-SDS y la arcilla montmorillonita. En conclusión, el QTS-SDS es una molécula químicamente modificada, con gran estabilidad y fácil de sintetizar, que *in vitro*, mostró ser una nueva alternativa, viable y efectiva para secuestrar aflatoxina B<sub>1</sub>.

## ABSTRACT

In this study, two modified chitosan-based molecules (QTS) were synthesized and evaluated to determine their aflatoxin B<sub>1</sub> adsorption capacity. The adsorption capacity of chitosan molecule (QTS), soluble chitosan (QTS-purified), insoluble chitosan (QTS-SDS), montmorillonite clay, and beidelite clay was determined *in vitro* using a bird-digestion model. First, the adsorption isotherms of QTS, QTS-purified, QTS-SDS, and montmorillonite, at different pH values (5.2, 2.5 and 6.6), were determined. The concentration of sequestered aflatoxin was then quantified by ultra-high performance liquid chromatography (UPLC). A bird-digestion model was simulated at different pH values for each compartment, with the inclusion of digestive enzymes such as pepsin and pancreatin for proventriculus and small intestine, respectively. In this phase of the study, another sequestrant based on beidelite clay was included. Serial dilutions of an AFB<sub>1</sub> solution were made with concentrations of 0, 3.9, 7.81, 15.62, 31.25, 62.5, 125 and 250 ng/ml (ppb), which were analyzed by UPLC determining the areas of the chromatograms of each dilution to obtain a standard curve. Under the same conditions of the digestion model for birds, the adsorption of microminerals (iron, manganese, zinc, selenium) by sequestrants was determined. The adsorption isotherms and UPLC quantification showed that the commercial QTS has a lower adsorption capacity for AFB<sub>1</sub> in the three compartments of the digestive tract. The sequestrants that presented the best results were montmorillonite clay, beidelite clay, and QTS-SDS. Montmorillonite clay; and the QTS-SDS maintain a constant adsorption capacity in the proventriculus and small intestine compartments. The QTS-SDS and montmorillonite clay sequestered minerals to a lesser extent than the other treatments. In conclusion, the chemical modified molecule QTS-SDS, with great stability and easy to synthesize, is a new, viable and effective alternative to sequester aflatoxin B<sub>1</sub>.

# 1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, la producción de pollo de engorda se ha mantenido en crecimiento, debido a los avances en la genética animal, nutrición y prácticas de producción (Godfray *et al.*, 2010). Además, por el alto valor nutritivo y bajo costo, la demanda de este va en aumento. Esta demanda se logra con la utilización de ingredientes alimenticios de alta calidad, principalmente soya y maíz, por lo que es de vital importancia mantener buenas medidas de calidad y bioseguridad en los alimentos que consumen los animales.

Generalmente, una gran cantidad de materias primas y productos terminados para la producción animal presentan contaminación por micotoxinas. Reportes de la Organización de Alimentos y Medicamentos (FAO, por sus siglas en inglés) estiman que más del 25% de alimentos en el mundo están contaminados con micotoxinas, siendo los cereales los que presentan una mayor incidencia de contaminación, por lo que hay que darles una atención prioritaria al presentar un alto consumo por parte de humanos y animales.

Las micotoxinas son metabolitos secundarios de los hongos toxigénicos que crecen en el alimento durante el crecimiento del cultivo, después de la cosecha, durante el almacenamiento, transporte y procesamiento, esto al encontrar óptimas condiciones de pH, humedad y temperatura. Las micotoxinas más importantes en los alimentos contaminados naturalmente son aflatoxinas (AF), ocratoxinas, zearalenona, toxina T-2 y fumonisinas (Sultana y Hanif, 2009).

En el sector avícola, las micotoxinas producen pérdidas económicas altas, debido a la alta mortalidad causada por una supresión del sistema inmune, afectando la eficiencia alimenticia en el sistema de producción, y el costo de los programas diseñados para reducir riesgos a la salud animal y humana (Magnoli *et al.*, 2019).

Para contrarrestar los efectos dañinos de las micotoxinas, diversas opciones han sido planteadas, entre las cuales están el uso de secuestrantes que son aditivos especializados para su uso en alimentos. Estos productos son elaborados a base de arcillas

que comúnmente se combinan con minerales, levaduras o pared celular de levaduras que contienen  $\beta$ -glucanos, ácidos orgánicos, antioxidantes y biopolímeros. La función de estos productos es prevenir y tratar el daño causado por la micotoxicosis en las aves, al adsorber y neutralizar las micotoxinas presentes en los granos y alimentos balanceados en el tracto digestivo de los animales (Machado *et al.*, 2014).

La adición de bentonitas como montmorillonita y beidelita en alimentos contaminados ha demostrado ser eficaz para reducir el impacto de las aflatoxinas en los animales. Sin embargo, los resultados pueden variar según la procedencia de la fuente de las bentonitas (Barrientos *et al.*, 2011).

El quitosano es un poliaminosacárido natural que se obtiene del exoesqueleto de camarones, cangrejos y conchas, después de procesos de purificación, desmineralización y desacetilación. Este biopolímero no es tóxico, es biocompatible y biodegradable, y ha sido ampliamente utilizado como biosorbente prometedor para la eliminación de varios iones de metales pesados y tintes. El quitosano es sensible a variaciones de pH y por lo regular es soluble en medio ácido ( $\text{pH} < 3$ ), lo que limita su amplia aplicación en muchos campos. No obstante, la presencia de grupos amino ( $\text{NH}_2$ ) e hidroxilo ( $\text{OH}$ ) en su estructura química, permite la interacción con otros grupos funcionales, mejorando su estabilidad en medio ácido e incrementando la capacidad de adsorción (Yong *et al.*, 2013).

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Factores predisponentes para la producción de micotoxinas en los alimentos.

Existe una gran variedad de micotoxinas identificadas y estudiadas que provocan intoxicación y muerte en los animales (**Tabla 2**). Las micotoxinas son toxinas naturales producidas por ciertos hongos y se pueden encontrar en los alimentos. Los mohos crecen en una variedad de diferentes cultivos y alimentos, incluidos cereales, nueces, especias, frutas secas, manzanas y granos de café, a menudo en condiciones cálidas y húmedas. Las micotoxinas pueden causar una variedad de efectos adversos para la salud y representar una grave amenaza para la salud tanto de los seres humanos como de los animales domésticos. Los efectos adversos para la salud de las micotoxinas van desde el envenenamiento agudo hasta los efectos a largo plazo, como la inmunodeficiencia y el cáncer (OMS, 2018).

**Tabla 2.** Principales micotoxinas presentes en cereales (Daou et al., 2021).

Micotoxinas	Hongos que las producen	Alimentos que se contaminan	Factores predisponentes
<b>Aflatoxinas</b>	<i>Aspergillus flavus</i> y <i>Aspergillus parasiticus</i>	Maíz y granos en general	Condiciones de almacenamiento inadecuadas
<b>Zearalenona</b>	<i>Fusarium quiseti</i> y <i>F.verticilliodes</i>	Maíz	Baja temperatura con altos niveles de humedad
<b>Fumonisin</b>	<i>Fusarium ploriferatum</i> y <i>F.verticilliodes</i>	Maíz	Estación seca seguida de alta humedad y temperatura moderada
<b>Tricotecenas</b>	<i>Fusarium graminearum</i> y <i>F. culmorum</i>	Maíz	Baja temperatura, alta humedad
<b>Ocratoxina A</b>	<i>Aspergillus Penicillium</i>	Maíz y granos en general	Deficiencias de almacenamiento

Los factores que fomentan el desarrollo de hongos y la producción de micotoxinas son: deficiencias de almacenamiento, altos niveles de humedad, distribución desigual de cereales dentro de los silos, variaciones en la ventilación e incidencia de plagas (Mallmann y Dilkin, 2011).

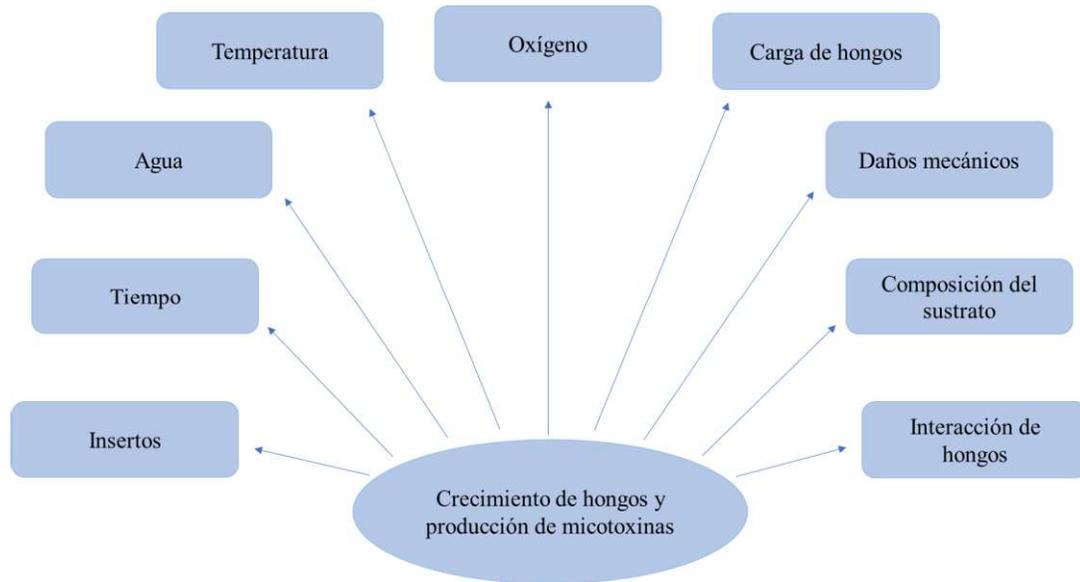


Figura 1. Factores relacionados con la producción de micotoxinas (Mallmann y Dilkin, 2011).

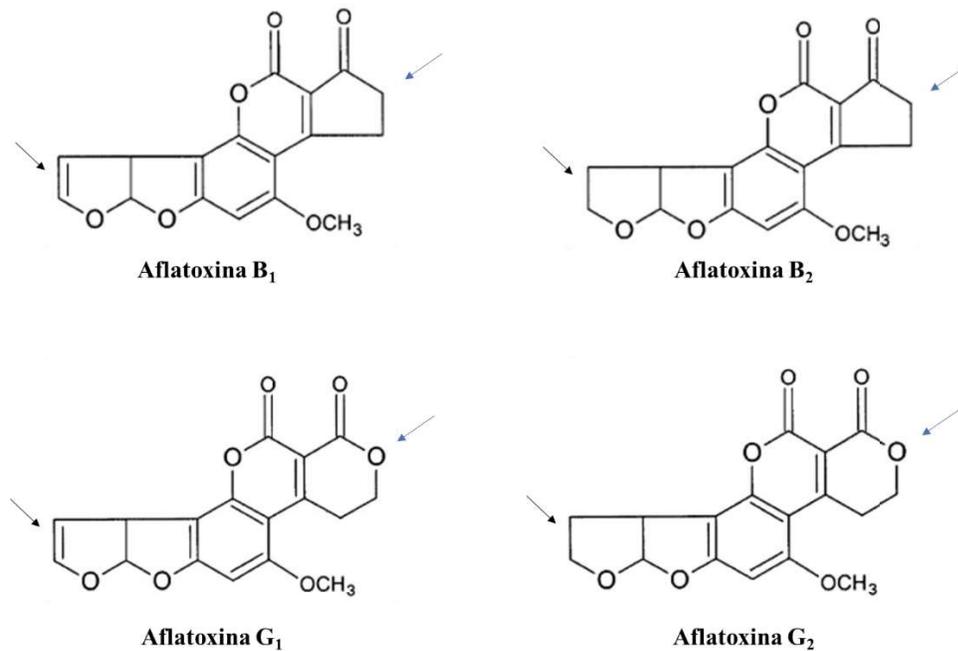
## 2.2. Clasificación de micotoxinas por su composición química

### 2.2.1. Aflatoxinas

Las aflatoxinas (AF) comprenden un grupo de aproximadamente 20 compuestos producidos por especies del género *Aspergillus*. Las AF se dividen en dos grupos químicos, la serie difurocumarociclopentenona que incluye aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), aflatoxina B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>), aflatoxina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>), aflatoxina M<sub>2</sub> (AFM<sub>2</sub>), aflatoxicol, y la serie difurocumarolactona que incluye aflatoxina G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>) y aflatoxina G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>) (Coppock *et al.*, 2018). Siendo los subtipos más comunes AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> y AFG<sub>2</sub> (Figura 2).

Las aflatoxinas son compuestos heterocíclicos que tienen un anillo bencénico común, con ligeras variaciones en la presencia de dobles enlaces, grupos cetónicos (C=O) y los metabolitos que tienen grupos hidroxilo (OH), con posiciones de hidroxilación que varían de un metabolito a otro. La AFB<sub>1</sub> es la más frecuente y potente, y tiene un enlace

doble peculiar en el anillo cíclico que también se observa en G<sub>1</sub> y M<sub>1</sub>. Las monooxigenasas microsomales del citocromo P450 (CYP450) biotransforman la toxina en los metabolitos menos tóxicos, las AFM<sub>1</sub> y G<sub>1</sub>. Las aflatoxinas son compuestos altamente oxigenados y de origen natural que se han separado en función de su fluorescencia bajo la luz ultravioleta y la presencia o ausencia de un doble enlace en los carbonos 8 y 9. Las aflatoxinas B<sub>1</sub> y G<sub>1</sub> tienen un doble enlace en los carbonos 8 y 9, lo que permite la formación de un epóxido, una forma más tóxica de AFB<sub>1</sub> y AFG<sub>1</sub>; mientras que AFB<sub>2</sub> y AFG<sub>2</sub> no lo hacen. Las aflatoxinas B<sub>2</sub> y G<sub>2</sub> se establecieron como los derivados dihidroxilados de B<sub>1</sub> y G<sub>1</sub>, respectivamente. Mientras que la AFM<sub>1</sub> es 4-hidroxiaflatoxina B<sub>1</sub>, la AFM<sub>2</sub> es 4-dihidroxiaflatoxina B<sub>2</sub>. La hidrogenación de B<sub>1</sub> y G<sub>1</sub> produce B<sub>2</sub> y G<sub>2</sub>, respectivamente (Owuor Lalah *et al.*, 2020).

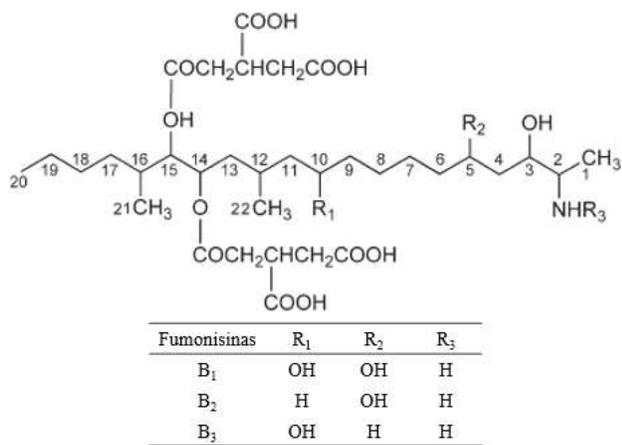


**Figura 2.** Estructuras químicas de aflatoxina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> (Urrego y Díaz 2006).

El término “aflatoxina” se usó por primera vez en Inglaterra en los años de 1960, para describir una enfermedad desconocida que afectó a pavos que habían sido alimentados con harina de cacahuete contaminada (Blount, 1961).

### 2.2.2. Fumonisin

Las fumonisinas son producidas por especies del género *Fusarium*. Estas contaminan principalmente maíz, aunque también se han encontrado en sorgo y arroz (Richard, 2007). Las fumonisinas fueron las primeras micotoxinas implicadas en el desarrollo de patologías en humanos en el año 1988, y en Estados Unidos, se detectaron en cerdos y caballos, donde provocaron la muerte de centenas de animales (Missmer *et al.*, 2006). Estos compuestos se caracterizan por una cadena aminopolihidroxiálquilo de 20 carbonos diesterificada con ácido propano-1,2,3-tricarboxílico (ácido tricarbálico). Las fumonisinas B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>), B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>) y B<sub>3</sub> (FB<sub>3</sub>) son los principales contaminantes de alimentos para humanos y animales (**Figura 3**). La más abundante y la más importante desde el punto de vista toxicológico es la FB<sub>1</sub> (Galaverna y Dall'Asta, 2012).

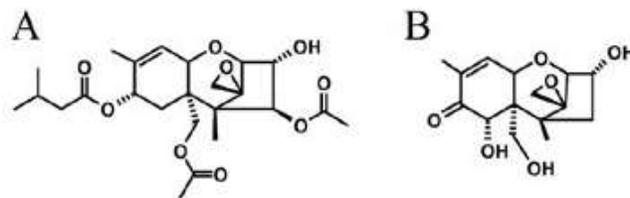


**Figura 3.** Estructura química de la fumonisin B<sub>1,2,3</sub> (Domijan y Peraica, 2010).

### 2.2.3. Tricotecenos

Los tricotecenos son metabolitos secundarios tóxicos producidos por una variedad de hongos del orden Hypocreales, que incluyen las especies *Fusarium*, *Myrothecium*, *Stachybotrys* y *Trichoderma*, que infectan a los cultivos de cereales. Las diferentes especies y cepas de *Fusarium* productoras de tricoteceno pertenecen a las clases tipo A y B. Los hongos *Fusarium* pueden infectar la estructura de la inflorescencia de los cereales de grano pequeño, incluidos el trigo, la cebada, la avena y el centeno en

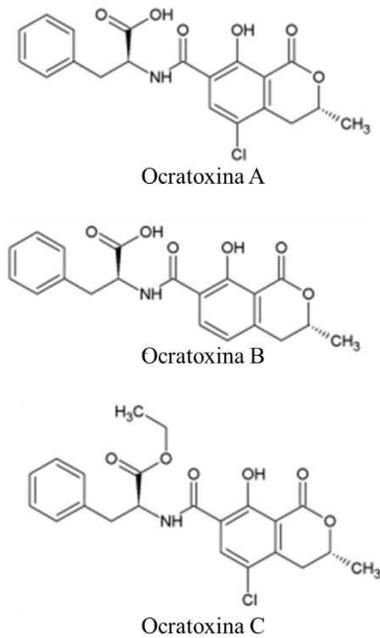
condiciones ambientales favorables para su crecimiento, como alta humedad. Los tricotecenos de tipo B se pueden distinguir del tipo A por una cetona (C=O) en el carbono 8 (**Figura 4**). Ejemplos del tipo A son toxina T-2 y diacetoxiscirpenol (DAS), y en el tipo B se incluye 4-desoxinivalenol (DON), también conocido como vomitoxina y su derivado acetilado 3-O-acetyl-DON (3-ADON). Los metabolitos del grupo B son producidos por especies de hongos patógenos de cereales y presentan menor toxicidad que los miembros del grupo A, pero se producen en grandes concentraciones (Richard, 2007; Wu *et al.*, 2014).



**Figura 4.** Estructura química de tricoteceno tipo A y tipo B (Foroud *et al.*, 2019).

#### 2.2.4. Ocratoxinas

Las especies más comunes que producen ocratoxina A (OTA) son *Aspergillus ochraceus* y *Penicillium verrucosum*. Estos hongos tienen un alto potencial de contaminación en los cereales como nueces, frutos secos, y productos finales como carne, leche, vino, cerveza, fórmulas infantiles y alimentos para bebés. Además, tienen la capacidad de acumularse en la sangre y leche de los animales expuestos a ellas (Wu *et al.*, 2014). *Aspergillus spp.* puede producir ocratoxinas en condiciones de alta humedad y temperatura, mientras que algunos *Penicillium spp.* pueden producir ocratoxinas a temperaturas tan bajas como 5 °C. La OTA es un resto de dihidroisocumarina derivada de pentaketida acoplado con un grupo 12-carboxi por un enlace peptídico a L-fenilalanina (**Figura 5**). Hay dos análogos de OTA comúnmente reconocidos, ocratoxina B (OTB) y ocratoxina C (OTC). Sin embargo, la presencia de OTB y OTC es rara, siendo OTA la que presenta mayor toxicidad (Gupta *et al.*, 2018).



**Figura 5.** Estructura química de ocratoxina A, B y C (Richard, 2007).

### 2.3. Daños causados por micotoxinas en pollos de engorda.

Las micotoxicosis producidas por aflatoxina B<sub>1</sub> (aflatoxicosis), causan una variedad de signos como: daño hepático, disfunción gastrointestinal, reducción de la productividad, disminución de la utilización y eficiencia del alimento, disminución del rendimiento reproductivo, tumores y supresión de la función del sistema inmunológico. Esto varía según el animal, la dosis, la duración de la exposición, la especie, la raza y la dieta o el estado nutricional (Iheshiolor *et al.*, 2011). Por todo lo anterior, la carne de pollo puede contener residuos de aflatoxina especialmente en hígado, lo que representa un riesgo de salud pública, porque aún con cantidades mínimas en la dieta humana, pueden causar efectos irreversibles (Urrego y Días, 2006).

La aflatoxicosis en la mayoría de los animales ocurren con tres formas clínicas: aguda, subaguda y crónica. La forma aguda por lo general no se manifiesta en pollos de engorda, pero en otros animales se caracteriza por causar muerte sin signos clínicos presentes, después de una situación de estrés (Villar *et al.*, 2014). En la forma subaguda

se observan hematomas subcutáneos y subserosos, hipoprotrombinemia, ictericia, enteritis hemorrágicas con prolapso rectal y ascitis.

La forma crónica se caracteriza por hígado graso y hemorrágico, petequias en intestino, riñones hiperplásicos, baja ganancia de peso y alto índice de conversión alimenticia. Otra característica más destacada es la mala absorción del alimento provocada por la presencia de partículas mal digeridas o de alimento balanceado en las excretas de las aves, y esto puede estar asociado con esteatorrea o aumento de la excreción de lípidos. Esta forma clínica es la de mayor impacto para los productores debido a las pérdidas económicas que presenta (Díaz, 2000).

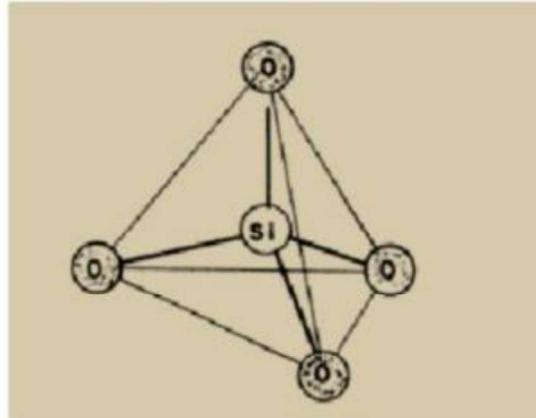
#### **2.4. Compuestos minerales (arcillas) como secuestrantes de micotoxinas**

Los agentes secuestrantes son compuestos de gran peso molecular que adsorben las toxinas presentes en el alimento, limitando su biodisponibilidad después de la ingestión y disminuyendo la exposición en el animal. Este complejo debe ser estable a cambios de pH dentro del tracto digestivo, lo cual se ve influenciado por su estructura física y las propiedades fisicoquímicas de las toxinas (Huwig *et al.*, 2001).

Las arcillas más estudiadas son los aluminosilicatos, los cuales se dividen en dos subclases de acuerdo con su estructura espacial: filosilicatos y tectosilicatos. Los filosilicatos incluyen adsorbentes importantes como el grupo de las esmectitas (montmorillonita y beidelita), el grupo caolinita y el grupo illita o arcilla-mica. Estos presentan una estructura cristalina en forma de lámina con un grupo químico en común, el óxido de silicio ( $\text{Si}_2\text{O}_5^{2-}$ ) (con una relación 2:5), los cuales adsorben sustancias en su superficie o dentro de su espacio interlamina (Wielogórska *et al.*, 2016).

Los tectosilicatos incluyen aluminosilicatos hidratados como las zeolitas, con estructura tridimensional en forma de tetraedros de óxido de silicio ( $\text{SiO}_4^{4+}$ ) y óxido de aluminio ( $\text{AlO}_4^{4+}$ ). Su estructura es similar a una jaula que es infinita en tres dimensiones, tienen una superficie de unión amplia y específica, pero también poseen gran selectividad de tamaño, forma y carga (**Figura 6**). En estos minerales, algunas siliconas tetravalentes son reemplazadas por aluminio trivalente, lo que da como resultado

cationes inorgánicas como iones Na, Ca y K que carecen de carga positiva (Mitchell, 1993).



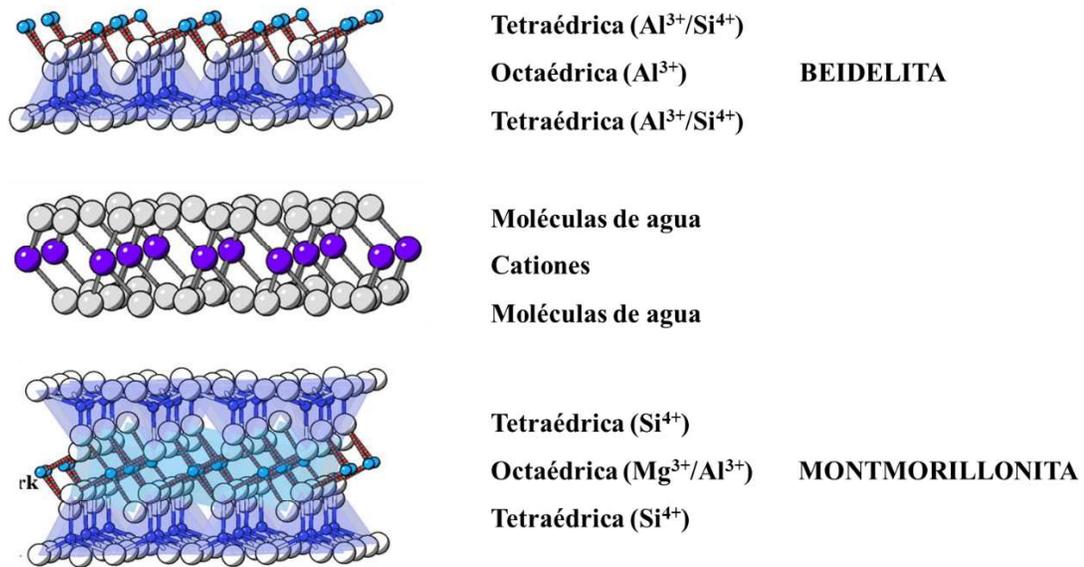
**Figura 6.** Estructura básica de los silicatos (Mitchell, 1993).

#### 2.4.1. Esmectitas

Las esmectitas se organizan en cuasicristales, estos son conjuntos de capas de filosilicato 2:1 en paralelo. Cada cuasicristal consta de entre dos y miles de capas individuales agrupadas, mientras que la capa individual consta de una hoja octaédrica intercalada entre dos hojas tetraédricas. Los reemplazos isomorfos con iones metálicos de menor valencia como magnesio ( $Mg^{2+}$ ) y hierro ( $Fe^{2+}$ ) que sustituyen al aluminio ( $Al^{3+}$ ) en la hoja octaédrica, y el  $Al^{3+}$  sustituye al silicio ( $Si^{4+}$ ) en las hojas tetraédricas, dando a la estructura una carga negativa total. La carga de la capa suele oscilar entre  $-0.4$  y  $-1.2^e$  por celda unitaria, y la carga negativa está equilibrada por los cationes de la capa intermedia, siendo los más comunes sodio ( $Na^+$ ), potasio ( $K^+$ ), calcio ( $Ca^{2+}$ ) y magnesio ( $Mg^{2+}$ ) (Linlin, 2016).

Dos minerales principales del grupo de las esmectitas son la beidelita y la montmorillonita, con una estructura en capas 2:1 (T – O – T) y un catión de contrapeso rodeado por moléculas de agua en capas intermedias expandibles. Específicamente, la montmorillonita muestra cambios predominantes de carga catiónica, principalmente

$\text{Si}^{4+}$  en el sitio tetraédrico, y  $\text{Al}^{3+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  en los sitios octaédricos, mientras que la beidelita presenta  $\text{Al}^{3+}$  en el sitio octaédrico (**Figura 7**) (Lee *et al.*, 2020).



**Figura 7.** Estructuras de las principales esmectitas: beidélita y montmorillonita. Círculos de color azul y cian representan el catión central en tetraedros y octaedros que comprenden una estructura en capas y los círculos blancos representan átomos de oxígeno de la estructura. Los círculos de color púrpura y gris ilustran cationes de capa intermedia de contrapeso y moléculas de agua (Lee *et al.*, 2020).

## 2.5. Mecanismo de acción de los compuestos minerales (arcillas) como secuestrantes de micotoxinas

Hay algunos estudios que demuestran que el mecanismo de adsorción ejercido por las arcillas sobre algunas micotoxinas se debe a interacciones débiles de los cationes de la lámina interna de las arcillas (Kolawole *et al.*, 2019). El mecanismo de acción de las arcillas para el sistema aflatoxina B<sub>1</sub>-esmectita, es uno de los más investigados y se lleva a cabo mediante dos oxígenos carbonílicos del adsorbato que son los principales promotores de la interacción intralaminar, preferentemente con los cationes de intercambio. Se trata de una interacción ion dipolo, coordinándose alrededor de los cationes ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) en función del grado de hidratación intracelular (Deng *et al.*, 2011). Consecuentemente, no es una reacción de intercambio, sino de adsorción en el

entorno hidrofílico/hidrofóbico generado por los cationes interlaminares y su entorno próximo.

La presencia de agua u otras especies que muestren efecto dipolo alrededor de los cationes interlaminares minimizará las posibilidades de adsorción de las micotoxinas, ya que reduce el número de sitios activos presentes. Este argumento corrobora el hecho de que los materiales adsorbentes presentan mayor actividad de retención de micotoxinas cuanto menor sea el grado de solvatación, y también explica la elevada actividad secuestrante de las HSCAS (Castañeda *et al.*, 2012), que se evidencian como arcillas activadas a través de un proceso de sustitución de cationes sodio por calcio. De hecho, la dosificación clásica de las bentonitas oscila entre 1 y 2%, mientras que las dosificaciones de HSCAS, con Novasil como principal producto comercial, oscilan entre 2 y 3%. Estas propiedades de retención unidas a su inercia química en el huésped convierten estos materiales en una gran promesa para obtener avances en la neutralización de las micotoxinas (Dixon *et al.*, 2008).

## **2.6. Otros aditivos que aminoran el daño causado por las micotoxinas**

El uso de aditivos o complementos alimenticios que reducen la exposición de los animales a las micotoxinas puede considerarse un medio para mejorar el bienestar animal. Entre estos se encuentran levaduras o pared celular de levaduras que contienen  $\beta$ -glucanos, ácidos orgánicos, antioxidantes y biopolímeros. El uso de estos complementos genera una adsorción de las micotoxinas en el tracto digestivo de los animales. Por lo que han recibido una atención cada vez mayor por parte de la industria alimenticia, y actualmente se han desarrollado numerosos productos que ya han sido probados y comercializados (Colovic *et al.*, 2019).

### 2.6.1. Quitosano

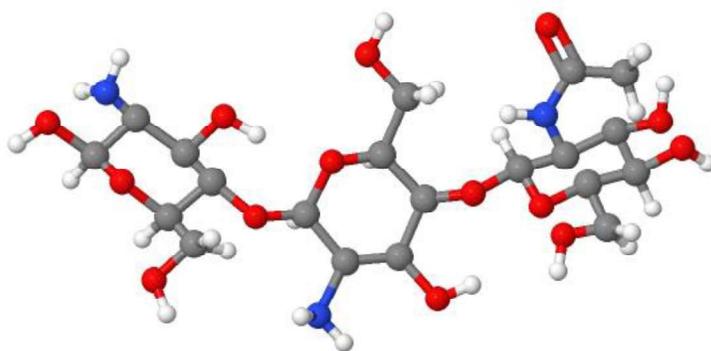
Actualmente, existe un interés en el uso de biopolímeros naturales como el quitosano (**Figura 8**), cuya principal fuente de obtención es el exoesqueleto de camarones. El quitosano se considera un biopolímero no tóxico, biocompatible y biodegradable que posee actividad antimicrobiana, y debido a estas propiedades se ha usado en composiciones farmacéuticas, alimentarias, cosméticas y domésticas (Aranaz *et al.*, 2018).

El quitosano es un copolímero lineal de  $\beta$ -(1,4) 2-acetamido-2-desoxi- $\beta$ -d - glucopiranososa y 2-amino-2-desoxi- $\beta$ -d - glucopiranososa, y sus propiedades biológicas se atribuyen a varias características, incluido el grado de desacetilación y la concentración de masa molecular. Últimamente, se ha incrementado el uso del quitosano como conservante de alimentos o coadyuvante en la agricultura para proteger o estimular la defensa de diferentes cultivos (Zachetti, 2019).

La actividad antimicrobiana del quitosano depende tanto de factores intrínsecos como extrínsecos. Entre los factores intrínsecos se encuentran el peso molecular y el grado de desacetilación del quitosano, mientras que los factores extrínsecos incluyen el pH, la temperatura y el tiempo de reacción (Hernandez *et al.*, 2018).

Recientemente se ha demostrado que el quitosano natural puede inhibir la producción de AFB<sub>1</sub>, así como el crecimiento del hongo que lo produce, con eficiencias superiores a las obtenidas con bentonitas y bagazo de uva (Cota, 2011; Balseca, 2015).

La capacidad de adsorción de micotoxinas del quitosano se debe a las interacciones electrostáticas. A pH alcalino, el quitosano tiene carga positiva, mientras que las micotoxinas como AFB<sub>1</sub>, FUB<sub>1</sub>, OTA y ZEA tienen carga negativa, y en el caso de DON y T-2, las interacciones fueron menores, provocando una mala adsorción. Por lo tanto, se podría decir que las interacciones iónicas son el principal mecanismo de adsorción de micotoxinas por el quitosano (Hernandez *et al.*, 2018).



**Figura 8.** Estructura química del quitosano, el código de color de los átomos es: nitrógeno (azul), oxígeno (rojo), carbono (gris) e hidrógeno (blanco).

El desarrollo de materiales basados en quitosano como útiles matrices poliméricas adsorbentes es un campo en expansión en el área de la ciencia de la adsorción. Los compuestos basados en quitosano son económicamente factibles porque son fáciles de preparar e involucran reactivos químicos económicos (Crini *et al.*, 2008).

El quitosano tiene una alta afinidad por la superficie de los minerales a base de sílice debido a la interacción entre parte de los grupos amino protonados del polímero y los grupos hidroxilo disociados de la sílice, que se forman en solución acuosa (Budnyak *et al.*, 2016).

En condiciones ligeramente ácidas, la mayoría de los grupos amino del quitosano se protonan y el quitosano resultante contiene múltiples cargas catiónicas. Basado en sus propiedades de biodegradabilidad, biocompatibilidad, efectos antimicrobianos, buena formación de película y alta carga positiva, el quitosano se ha mezclado con montmorillonita para fabricar películas compuestas, sensores, soportes de inmovilización de enzimas y nanocompuestos (Lertsutthiwong *et al.*, 2012).

### 2.6.2. Beta-glucanos

Los beta-D-glucanos de la pared celular de la levadura (*S. cerevisiae*) se han utilizado para secuestrar una amplia gama de micotoxinas en los alimentos. La afinidad

de los beta-D-glucanos por las micotoxinas varía entre las toxinas en función de su estereoquímica específica, con fuertes afinidades por las aflatoxinas, deoxinivalenol y zearalenona (Spring *et al.*, 2019).

La forma esterificada de los  $\beta$ -glucanos tiene una función protectora frente a la aflatoxina B<sub>1</sub>, la ocratoxina A y la toxina T-2, a las que están expuestos los pollos de engorda (Raju y Devegowda, 2000). Las AF se unen a los  $\beta$ -glucanos, mediante la unión a grupos funcionales como cetona, hidroxilo, fenilo y lactona, que están involucrados en la formación de enlaces de hidrógeno y en las interacciones electrostáticas (Pereyra *et al.*, 2013). El  $\beta$ -glucano de las paredes celulares de la levadura consisten principalmente en (1-3)- $\beta$ -glucano y (1-6)- $\beta$ -glucano. El (1-3)- $\beta$ -glucano interactúa con los enlaces de hidrógeno, así como por interacciones electrostáticas entre el glucano y la AFB<sub>1</sub>, mientras que el (1-6)- $\beta$ -glucano sólo interactúa por atracción electrostática (Mahmoud Amer *et al.*, 2021).

### **2.6.3. Carbón activado**

El carbón activado es un polvo altamente poroso, producido mediante pirólisis de varios compuestos orgánicos, seguido por una activación química o física. Éste, a pesar de poseer una efectividad como adsorbente de micotoxinas, carece de especificidad, provocando una disminución de los nutrientes de los alimentos (Van Alfen, 2014).

En el caso del carbón activado, el mecanismo de adsorción se explica a través de las interacciones débiles entre grupos aromáticos de las micotoxinas y el entorno hidrofóbico del carbón activo. Su naturaleza carbonosa y poliaromática asegura la presencia de menores cantidades de agua adsorbida en condiciones ambientales. La baja especificidad de estas interacciones y la elevada superficie origina al mismo tiempo la retención no específica de algunos nutrientes esenciales como minerales, por lo que no es recomendable su utilización (Huwig, 2001).

## 2.7. Modelo *in vitro* para simular la digestión para aves

Solís *et al.* (2017) diseñaron un modelo digestivo para aves en un estudio donde evaluaron varios agentes secuestrantes de micotoxinas. Para esto, simulaban tres compartimentos del sistema digestivo del ave, el primer compartimento fue el buche, donde ajustaron la solución de trabajo a pH 5.2 e incubaron durante 30 min. El segundo fue el proventrículo, donde añadieron 3000 U de pepsina por g de alimento y agregaron HCl (1.5 M), alcanzando un pH entre 1.4-2.0, e incubaron las muestras durante 45 min. El tercer compartimento fue el intestino delgado, en el que se añadió 6.84 mg de pancreatina por g de alimento, e incluyeron bicarbonato de sodio (1.0 M) hasta ajustar el pH a un valor entre 6.5-6.8, y, por último, las muestras se incubaron durante 30 min.

Vartiainen *et al.* (2020) simulaban un modelo *in vitro* para pollos de engorda donde las condiciones creadas simulaban el estómago gástrico, ajustando el pH a 2.5 con HCl (1 M), y agregaron pepsina a una dosis de 7.5 mg/ml. El segundo compartimento fue el intestino delgado, ajustando a un pH de 6.5 con NaOH (1 M) y agregando de 2.5 mg/ml de pancreatina.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

En la producción avícola, el mal manejo durante la cosecha y el almacenamiento de los cereales, principalmente del maíz, es un problema debido al crecimiento de hongos y producción de aflatoxinas. Considerando el alto nivel de inclusión del maíz (60%) en el alimento final de los pollos de engorda, la utilización de un maíz contaminado con aflatoxinas puede llegar a ser un problema grave.

Estas aflatoxinas presentes en los cereales pueden causar daño a nivel hepático en pollos de engorda, por lo que es común adicionar secuestrantes de aflatoxina como arcillas u otros compuestos. Actualmente, el uso de polímeros naturales modificados químicamente, con estructuras definidas y estables, pueden ser alternativas más efectivas para la captura de aflatoxinas, evitando su liberación durante su paso por el tracto gastrointestinal, de tal manera que estas sean excretadas y no puedan ser absorbidas en el intestino delgado.

## **4. HIPÓTESIS**

Las moléculas de quitosano químicamente modificadas tienen una mayor capacidad de adsorción de aflatoxinas en comparación con compuestos minerales como montmorillonita y beidelita, en un modelo *in vitro* de digestión para aves.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo general

Evaluar y comparar las moléculas de quitosano químicamente modificadas con dos compuestos minerales (montmorillonita y beidelita), como adsorbentes de aflatoxina B<sub>1</sub> en un modelo de digestión para aves *in vitro*.

### 5.2. Objetivos específicos

- Determinación mineralógica de dos arcillas esmectitas caracterizadas como beidelita y montmorillonita.
- Sintetizar y modificar moléculas de quitosano como adsorbentes de aflatoxina B<sub>1</sub>.
- Determinar el efecto del pH en la capacidad de adsorción de aflatoxina B<sub>1</sub> de los adsorbentes en un modelo de digestión *in vitro* para aves.
- Determinar la cantidad de aflatoxina B<sub>1</sub> secuestrada por los adsorbentes en un modelo de digestión *in vitro* para aves.
- Evaluar la capacidad de adsorción de microminerales (hierro, manganeso, zinc y selenio) de los adsorbentes en un modelo de digestión *in vitro* para aves.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Tratamientos

Para estudios posteriores *in vivo* con pollos de engorda, a partir de un lote de dos toneladas de maíz contaminado se obtuvieron 33 muestras de 1kg para determinar las micotoxinas con mayor presencia, encontrando una mayor concentración de la aflatoxina B<sub>1</sub>. La muestra de mayor concentración de aflatoxinas fue analizada por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para detección de aflatoxinas, y por cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem (LC-MS-MS) para detección de otras micotoxinas (Trilogy, Washington, USA). Debido a estos resultados, se decidió evaluar *in vitro* varios adsorbentes de micotoxinas.

Un estudio *in vitro* se realizó para determinar la efectividad de varios adsorbentes minerales y sintéticos para capturar AFB<sub>1</sub>. En un diseño completamente al azar, 5 adsorbentes se evaluaron usando un modelo de digestión *in vitro* para aves. Los adsorbentes que se evaluaron fueron: quitosano (QTS), QTS purificado, quitosano dodecil sulfato sódico (QTS-SDS), y dos esmectitas (montmorillonita y beidelita).

### 6.2. Síntesis de moléculas de quitosano

Para la síntesis del quitosano purificado, se preparó una solución de quitosano (Sigma-Aldrich; Beijing, China) en ácido acético 0.1 M, y se mantuvo en agitación a 200 rpm hasta su solubilización. Después se adicionó hidróxido de sodio a una concentración 1 M, estando en agitación a 200 rpm, formando un gel que se precipitó. El gel se lavó con agua destilada y se secó a 65 °C en un horno (Heratherm OGH180-S; Thermo Fisher Scientific; Langenselbold, Alemania). Una vez que se secaron las muestras, éstas fueron molidas y almacenadas. El objetivo de esta reacción fue dejar disponible los grupos aminos NH<sub>2</sub>, los cuales tienen gran afinidad para interactuar con las aflatoxinas presentes en el maíz contaminado.

Para la síntesis del quitosano-SDS, se utilizó el quitosano purificado y se solubilizó en ácido acético 0.1 M a 200 rpm. Una vez solubilizado se mezcló con una solución de dodecilsulfato sódico (SDS) para la formación de perlas de hidrogel, las

cuales fueron secadas a 65 °C en un horno (Heratherm OGH180-S, Thermo Fisher Scientific, Langensfeld, Alemania). Una vez que se secaron las muestras, estas fueron molidas y almacenadas. La incorporación de grupos sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) en los grupos aminos ( $\text{NH}_2$ ) del QTS tuvo como objetivo darle estabilidad a la molécula a diferentes pH.



**Figura 9.** Fotografías de la síntesis de quitosano. A (quitosano); B (quitosano purificado); C (quitosano-SDS).

### **6.3. Caracterización de las moléculas de quitosano por espectroscopia de infrarrojo transformada de Fourier (FTIR)**

La determinación de los grupos funcionales de cada molécula de QTS y las interacciones de estos con  $\text{AFB}_1$ , se realizó mediante reflectancia total atenuada (ATR), usada en conjunto con la técnica de espectroscopia de FTIR.

Las muestras se colocaron en el cristal ATR de diamante utilizando una placa superior y un brazo de presión, y los espectros de infrarrojo fueron obtenidos por un accesorio de muestreo ATR Perkin Elmer por 16 barridos a una resolución de  $4 \text{ cm}^{-1}$ . Los datos obtenidos fueron analizados con el software Perkin Elmer Spectrum 10 (Waltham, Massachusetts, EUA).

### **6.4. Caracterización de dos esmectitas (montmorillonita y beidelita)**

Para la caracterización de la montmorillonita y la beidelita se realizó un análisis mineralógico por difracción de rayos X (DRX) mediante espectroscopía de fluorescencia de rayos X (Madsen *et al.*, 2001).

## 6.5. Análisis de isotermas de adsorción de concentración única de aflatoxina B<sub>1</sub> dependiente de pH

La capacidad de adsorción de los diferentes secuestrantes se determinó mediante el análisis de isotermas de adsorción. Las variaciones de los valores de pH se realizaron simulando un modelo de digestión para aves descrito en la **Tabla 2**.

**Tabla 2.** Compartimientos simulados para el estudio *in vitro* de isotermas.

<b>Compartimiento del buche</b>	pH 5.2 ajustado con HCl a 0.03 M y una incubación de 30 min a 40 °C.
<b>Compartimiento del proventrículo</b>	pH 2.5 ajustado con HCl a 1.5 M y una incubación de 45 min a 40 °C.
<b>Sección intestinal</b>	pH 6.6 ajustado con NaOH a 1.0 M y una incubación de 2 h a 40 °C.

Para este ensayo se usó una solución de aflatoxina B<sub>1</sub> (*Aspergillus flavus*, Sigma-Aldrich, A6636; Beijing, China) con una concentración de 4 µg/ml, de la cual se tomó 1 ml y se mezcló con 4 ml de las soluciones a diferentes valores de pH (5.2, 2.5 y 6.6) en tubos cónicos de 5 ml, obteniendo una solución a una concentración de 0.8 µg/ml. Posteriormente, se añadieron 40 mg de cada secuestrante (Quitosano, QTS; QTS purificado; QTS-SDS; y Montmorillonita), para representar un nivel de inclusión de 2 kg/tonelada de alimento. De igual manera, bajo las mismas condiciones de variaciones de pH y tiempo de incubación, se analizaron las soluciones control: soluciones a diferentes valores de pH (5.2, 2.5 y 6.6) más 40 mg de secuestrante y una solución de AFB<sub>1</sub> (0.8 µg/ml) sin secuestrante.

Al final de cada periodo de incubación, las muestras se centrifugaron a 2,000 rpm durante 10 minutos, y la concentración de AFB<sub>1</sub> presente en el sobrenadante se cuantificó midiendo la absorbancia a 364 nm en un espectrofotómetro UV-visible (Shimadzu Scientific Instruments, UV-1800). Finalmente, el porcentaje de adsorción de AFB<sub>1</sub> para cada secuestrante se calculó mediante la siguiente ecuación (Solís., *et al* 2017):

$$\text{Adsorción (\%)} = \frac{(C_i - C_s)}{C_i} \times 100$$

Donde:  $C_i$  = concentración de AFB<sub>1</sub> en el control y  $C_s$  = concentración de AFB<sub>1</sub> en el sobrenadante.

## 6.6. Cuantificación de aflatoxina B<sub>1</sub> por cromatografía líquida de ultra-alta resolución (UPLC)

La cuantificación de AFB<sub>1</sub> adsorbida por los diferentes secuestrantes se determinó simulando un modelo de digestión para aves, de acuerdo con lo reportado por Solis *et al.* (2017) y con algunas modificaciones como se muestra en la **Tabla 3**.

**Tabla 3.** Compartimientos simulados para el estudio de cuantificación de AFB<sub>1</sub> *in vitro*.

<b>Compartimiento del buche</b>	pH 5.2 ajustado con HCl a 0.03 M y en agitación constante durante 30 min a 40 °C.
<b>Compartimiento del proventrículo</b>	pH 2.5 ajustado con HCl a 1.5 M, más 3,000 U de pepsina por gramo de alimento y agitación constante por 45 min a 40 °C.
<b>Sección intestinal</b>	pH 6.6 ajustado con NaHCO <sub>3</sub> 1 M, más 6.84 mg de pancreatina por gramo de alimento y agitación constante por 2 h a 40 °C.

Entre cada etapa de incubación y agitación, las muestras se centrifugaron a 2,000 rpm durante 10 min y el pH se ajustó de acuerdo con las condiciones del compartimiento siguiente.

Después de la incubación en el último compartimiento, el sobrenadante fue filtrado con un filtro de jeringa de 0.2 µm (Wathman<sup>®</sup> UNIFLO<sup>®</sup> 25 syringe filters; Darmstadt, Alemania). Enseguida, el sobrenadante filtrado se evaporó bajo una corriente de nitrógeno a 50 °C, y el residuo obtenido, se disolvió con 500 µl de fase móvil (6.4:1.8:1.8 agua/metanol/acetonitrilo).

Finalmente, las muestras fueron analizadas en el sistema Waters ACQUITY UPLC® H-Class Bio System (Waters; Milford, MA, USA), acoplado a un detector de fluorescencia y a una columna de fase reversa (Acquity UPLC Beh C18 de 2.1 x 50 mm, 1.7 µm). Para detectar la AFB<sub>1</sub> se inyectaron 10 µl de la muestra, que fueron eluidos con fase móvil a un rango de flujo de 0.5 ml/minuto, a una longitud de onda de excitación de 365 nm y de emisión de 429 nm. La AFB<sub>1</sub> presente en las muestras se identificó por un tiempo de retención de 4 minutos, la cual fue comparada con una solución estándar de AFB<sub>1</sub> (200 ng/ml). Cada muestra se analizó por cuadruplicado y la concentración de AFB<sub>1</sub> adsorbida por los diferentes secuestrantes se calculó de acuerdo con una curva de calibración de AFB<sub>1</sub> (0, 3.9, 7.81, 15.62, 31.25, 62.5, 125 y 250 ng/ml) en fase móvil con una R<sup>2</sup> = 0.999.

### 6.7. Determinación de la capacidad de adsorción de microminerales por los secuestrantes

Para la realización del ensayo se prepararon 500 ml de una solución de microminerales (Fe, Mn, Zn y Se), de acuerdo con los requerimientos necesarios establecidos en el Manual de Especificaciones de Nutrición para Pollos de Engorda Ross 2019 (Aviagen, USA) (**Tabla 4**).

**Tabla 4.** Fuentes y requerimientos nutricionales de la materia prima de los minerales

Materia prima	Porcentaje de la fuente (%)	Cantidad requerida (mg)	Adición de materia prima (mg/500 ml)
Sulfato de hierro	30	20	33.33
Sulfato de manganeso	32.5	120	184.62
Sulfato de zinc	36.3	110	151.52
Selenio de sodio	45.6	0.3	0.33

Posteriormente, de la solución de minerales se tomaron 6 ml y se agregaron a tubos cónicos que contenían 40 mg de cada secuestrante, y las muestras fueron procesadas bajo las mismas condiciones del modelo de digestión para aves que se presentan en la **Tabla 3**. Al final de cada etapa de incubación y agitación, las muestras se centrifugaron

a 2,000 rpm por 10 min, y después tomar 2 ml de muestra. Enseguida el pH se ajustó de acuerdo con las condiciones del compartimiento siguiente.

Finalmente, la cuantificación de los microminerales presentes en el sobrenadante de cada muestra se analizó con un espectrómetro de emisión óptica (Perkin Elmer OPTIMA 2000; Santa Clara, CA, USA).

### **6.8. Análisis estadístico**

Los valores obtenidos de la adsorción de AFB<sub>1</sub> y microminerales por cada secuestrante, fueron analizados usando un diseño completamente al azar mediante el software estadístico Statistics 9 (Analytical Software; Tallahassee, Florida, USA). La comparación de medias se realizó mediante la prueba Tukey cuando H<sub>0</sub> fue rechazada para las variables estudiadas por efecto ( $p < 0.05$ ) de los tratamientos.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Determinación de micotoxinas

La determinación de las diferentes micotoxinas presentes en el lote de maíz analizado se muestra en la **Tabla 5**, donde se observan subtipos de AFB<sub>1</sub> (249 ppb) y AFB<sub>2</sub> (21.8 ppb). Este último, se encuentra cerca del valor máximo permisible de hasta 20 ppb (Gimeno, 2009). De igual manera, se detectó la presencia de los subtipos FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub> y FB<sub>3</sub>, en concentraciones de 4.6, 1.3 y 1.3 ppb, Los cuales se encuentran dentro de los valores permitidos para pollos de engorda que es de 5 ppm (Gimeno, 2009).

**Tabla 5.** Resultados de la cuantificación de los subtipos de micotoxinas\*

<b>Análisis</b>	<b>Resultados</b>	<b>Unidades</b>	<b>Límite</b>	<b>Método</b>
<b>Aflatoxina B<sub>1</sub></b>	249	ppb	1 ppb	HPLC
<b>Aflatoxina B<sub>2</sub></b>	21.8	ppb	1 ppb	HPLC
<b>Aflatoxina G<sub>1</sub></b>	<sup>1</sup> ND	ppb	1 ppb	HPLC
<b>Aflatoxina G<sub>2</sub></b>	ND	ppb	1 ppb	HPLC
<b>Deoxinivalenol</b>	ND	ppm	0.1 ppm	LCMSMS
<b>Fumonisina B<sub>1</sub></b>	4.6	ppm	0.1 ppm	LCMSMS
<b>Fumonisina B<sub>2</sub></b>	1.3	ppm	0.1 ppm	LCMSMS
<b>Fumonisina B<sub>3</sub></b>	1.3	ppm	0.1 ppm	LCMSMS
<b>Ocratoxina A</b>	ND	ppb	1 ppb	LCMSMS
<b>Toxina T-2</b>	ND	ppb	5 ppb	LCMSMS
<b>Zearalenona</b>	ND	ppb	12.5 ppb	LCMSMS

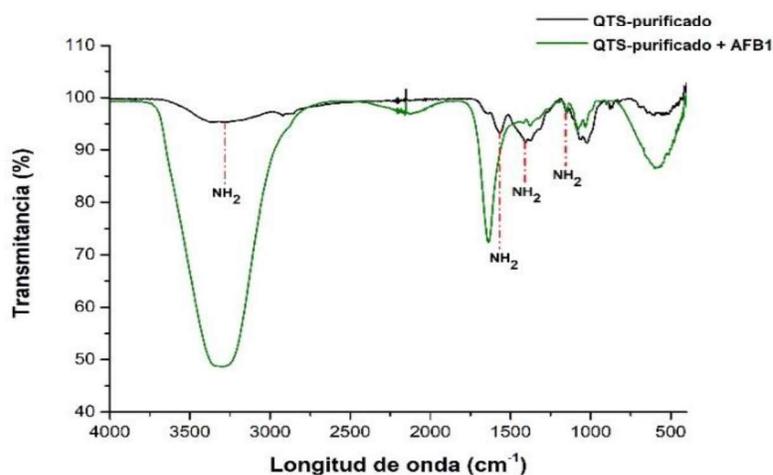
\* Certificado de análisis por Trilogy, Washington, USA.

Leyenda: <sup>1</sup>No detectable.

### 7.2. Caracterización de las moléculas de quitosano

Los espectros IR de las moléculas de quitosano modificadas (QTS-purificado y QTS-SDS) y montmorillonita se presentan en la **Figura 10**. En la **Figura 10<sup>a</sup>**, correspondiente al espectro del QTS-purificado, se observaron los grupos característicos del QTS a 1,662 cm<sup>-1</sup> (O=C-NH<sub>2</sub>) y 1,563 cm<sup>-1</sup> (NH<sub>2</sub>), y adicionalmente a 1,403 y 1,149

$\text{cm}^{-1}$  los grupos C-N y  $\text{NH}_2$ , como resultado de la purificación del QTS. La interacción de  $\text{AFB}_1$  con el QTS-purificado se identificó principalmente con la presencia de los grupos  $\text{O}=\text{C}-\text{NH}_2$  y  $\text{NH}_2$  presentes a  $1,662$  y  $1,563$   $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. El espectro del QTS-SDS (**Figura 10b**) muestra los principales grupos funcionales del QTS ( $\text{O}=\text{C}-\text{NH}_2$  a  $1,643$   $\text{cm}^{-1}$  y  $\text{NH}_2$  a  $1,547$   $\text{cm}^{-1}$ ), y los grupos sulfatos correspondientes a la interacción del SDS, los cuales se observan a  $1,222$   $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{S}=\text{O}$ ),  $1,063$   $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{R}-\text{O}-\text{S}$ ),  $1,018$   $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{R}-\text{O}-\text{S}$ ),  $627$   $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{S}=\text{O}$ ) y  $581$   $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{S}=\text{O}$ ). Cabe destacar que la interacción de la  $\text{AFB}_1$  se presenta con los grupos aminos ( $1,643$   $\text{cm}^{-1}$  y  $1,547$   $\text{cm}^{-1}$ ) y los grupos sulfatos ( $1,222$   $\text{cm}^{-1}$ ,  $1,063$   $\text{cm}^{-1}$ ,  $1,018$   $\text{cm}^{-1}$ ,  $627$   $\text{cm}^{-1}$  y  $581$   $\text{cm}^{-1}$ ). Finalmente, en la **Figura 10c** se presenta el espectro de la montmorillonita, donde se observaron los principales grupos funcionales a  $1,637$   $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{H}-\text{O}-\text{H}$ , molécula de agua), vibración de estiramiento de las moléculas de óxido de silicio ( $\text{Si}-\text{O}$ ) a  $798$   $\text{cm}^{-1}$  y  $688$   $\text{cm}^{-1}$ , y la vibración de flexión del óxido de aluminio ( $\text{Al}-\text{O}$ ) a  $515$   $\text{cm}^{-1}$ . En la **Tabla 6**, se presenta las bandas y los grupos funcionales observados en cada secuestrante.



**Figura 10a.** Espectro IR de la molécula de QTS-purificado

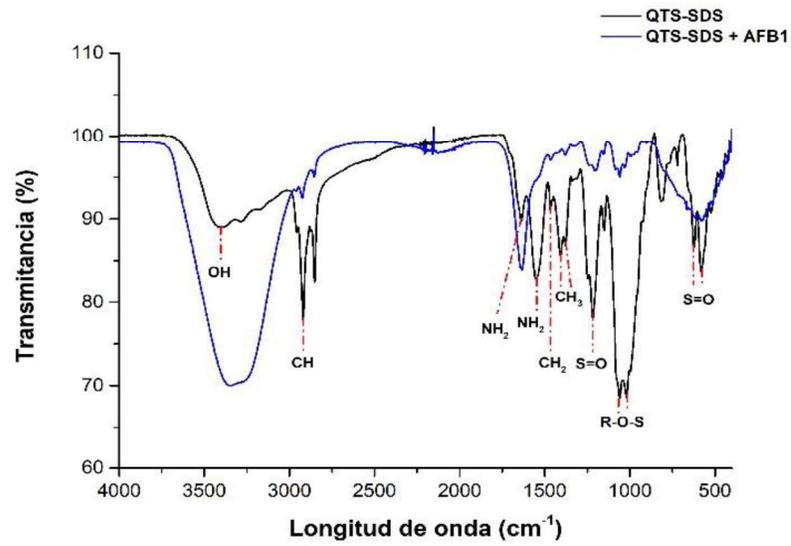


Figura 10b. Espectro IR de la molécula de QTS-SDS

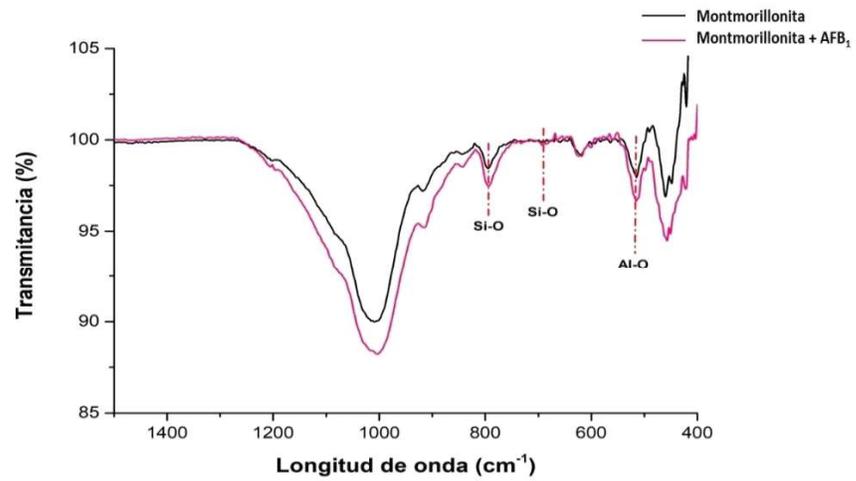
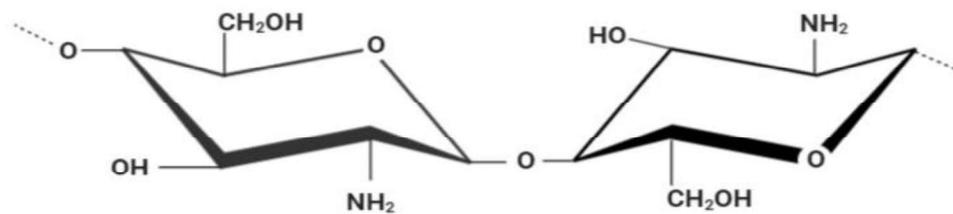


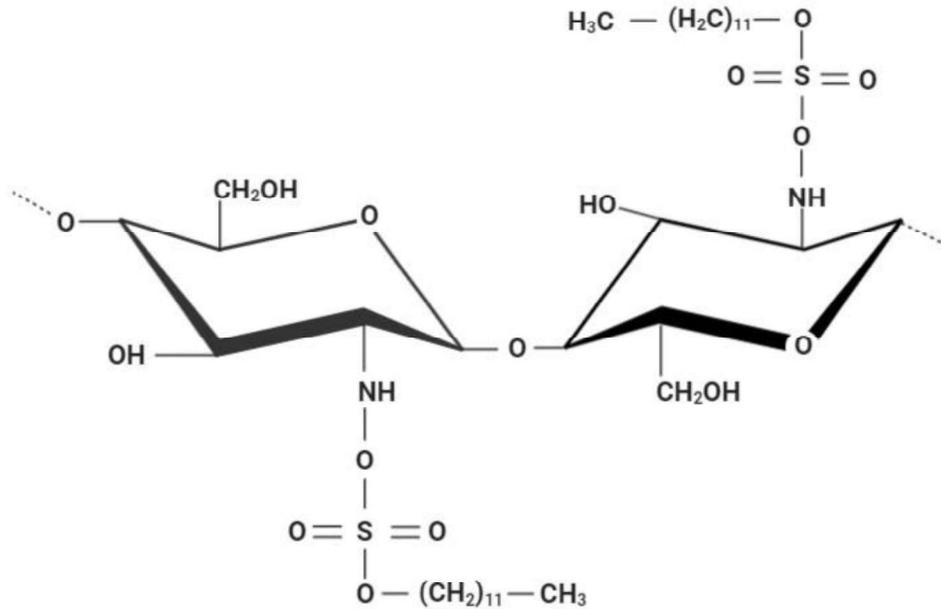
Figura 10c. Espectro IR de la arcilla montmorillonita.

**Tabla 6.** Bandas y grupos funcionales del QTS-purificado, QTS-SDS y montmorillonita.

Secuestrantes	Longitud de onda (cm <sup>-1</sup> )	Grupo funcional
QTS-purificado	3,312	OH
	1,667	O=C-NH <sub>2</sub>
	1,570	NH <sub>2</sub>
	1,412	C-N
	1,130	NH <sub>2</sub>
	3,312	OH
QTS-SDS	3,435	OH
	2,915	CH
	1,643	O=C-NH <sub>2</sub>
	1,547	NH <sub>2</sub>
	1,467	CH <sub>2</sub>
	1,411	CH <sub>3</sub>
	1,376	CH <sub>3</sub>
	1,222	S=O
	1,063	R-O-S
	1,018	R-O-S
	627	S=O
581	S=O	
Montmorillonita	1,637	OH
	798	Si-O
	688	Si-O
	515	Al-O



**Figura 11.** Estructura química de la molécula de quitosano químicamente modificada (QTS Purificado).



**Figura 12.** Estructura química de la molécula de quitosano químicamente modificada insoluble (QTS-SDS).

### 7.3. Caracterización de la montmorillonita y beidelita

Como se muestra en la **Tabla 7 y 8**, los resultados del estudio mineralógico por DRX, de las muestras sugieren que estas pertenecen al grupo de las esmectitas (beidelita y montmorillonita). Como componentes mineralógicos secundarios, se observan en ambas muestras, cristobalita, cuarzo y ortoclasa, entre otros. La presencia de yeso y pequeñas concentraciones de clinoptilolita (zeolita) solo son evidentes en la beidelita.

**Tabla 7. Análisis químico cuantitativo de beidelita y montmorillonita**

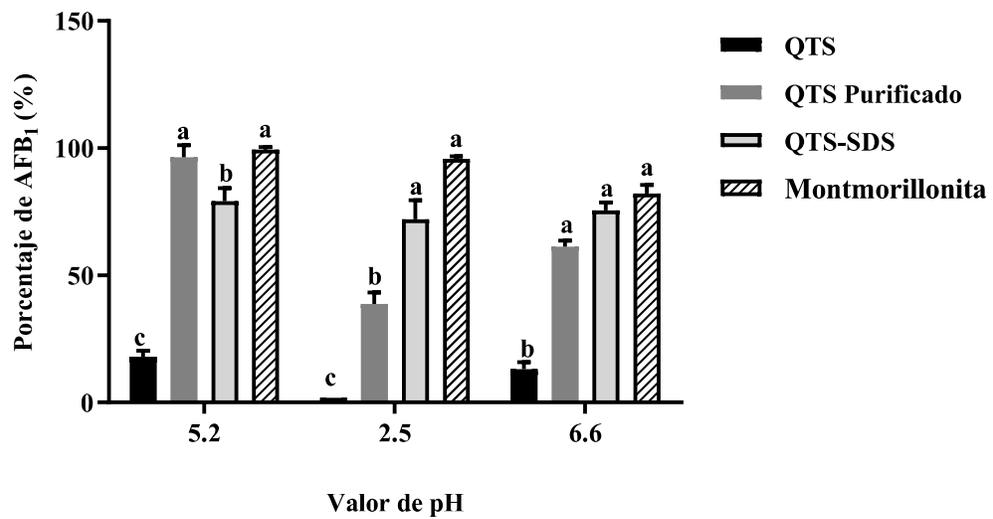
Minerales	Beidelita	Montmorillonita
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> %	2.31	2.56
TiO <sub>2</sub> %	0.20	0.19
CaO %	1.40	2.23
K <sub>2</sub> O %	1.21	0.48
SiO <sub>2</sub> %	72.7	69.37
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> %	11.07	9.14
MgO %	2.64	5.02
Na <sub>2</sub> O %	1.91	0.25
SO <sub>3</sub> %	1.05	0.10
Otros %	0.24	0.21
PXC %	5.27	10.45

**Tabla 8. Análisis mineralógico de beidelita y montmorillonita**

Especie identificada	Beidelita (%)	Montmorillonita (%)
Beidelita	55.0	10.0
Cristobalita	24.0	21.0
Ortoclasa	7.0	2.5
Cuarzo	6.0	5.5
Albita	3.5	-
Clinoptilolita	3.0	-
Yeso	1.5	-
Montmorillonita	-	61.0

#### 7.4. Isotermas de adsorción de AFB<sub>1</sub>

En la **Figura 13**, se muestran los porcentajes de adsorción de cada secuestrante para AFB<sub>1</sub> a diferentes valores de pH. A condiciones de pH 5.2, la montmorillonita ( $99.40 \pm 1.03$ ) y el QTS-purificado ( $96.43 \pm 4.72$ ) presentaron una mayor capacidad de adsorción ( $p = 0.00$ ) con respecto a QTS-SDS ( $79.17 \pm 5.15$ ) y QTS ( $17.88 \pm 1.89$ ). Sin embargo, a pH 2.5, la capacidad de adsorción del QTS ( $1.81 \pm 0.01$ ) y el QTS-purificado ( $38.71 \pm 4.44$ ) fue menor ( $p = 0.00$ ), en contraste con QTS-SDS ( $72.03 \pm 2.53$ ) y montmorillonita ( $95.83 \pm 1.03$ ). Finalmente, a pH 6.6, la capacidad de adsorción de la montmorillonita ( $82.14 \pm 3.40$ ), el QTS-SDS ( $75.60 \pm 3.08$ ) y el QTS-purificado ( $61.32 \pm 2.32$ ) fue mayor ( $p = 0.00$ ) en comparación con el QTS ( $13.05 \pm 2.30$ ).



**Figura 13.** Porcentaje de adsorción para AFB<sub>1</sub> por cada secuestrante.

En la Figura 14, se muestran los porcentajes de adsorción a diferentes valores de pH para AFB<sub>1</sub> con los diferentes secuestrantes. El QTS presentó una mayor adsorción ( $p = 0.05$ ) a un pH 5.2 ( $17.88 \pm 1.89$ ), seguido de pH 6.6 ( $13.05 \pm 2.30$ ) y pH 2.5 ( $1.81 \pm 0.01$ ). En el caso del QTS-purificado, la mayor capacidad de adsorción ( $p = 0.02$ ) se observó a un pH 5.2 con ( $96.43 \pm 4.72$ ), seguido de ( $61.32 \pm 2.32$ ) a pH 6.6, y ( $38.71 \pm 4.44$ ) a pH 2.5. Para el QTS-SDS se observó una capacidad de adsorción similar en los tres valores de pH empleados ( $p = 0.814$ ): ( $79.17 \pm 5.15$ ) a pH 5.2, ( $72.03 \pm 2.53$ ) a pH 2.5 y ( $75.60 \pm 3.08$ ) a pH 6.6. Finalmente, la montmorillonita presentó una mayor adsorción ( $p < 0.010$ ) a pH 5.2 ( $99.40 \pm 1.03$ ) y pH 2.5 ( $95.83 \pm 1.03$ ), en contraste con un pH 6.6 ( $82.14 \pm 3.40$ ).

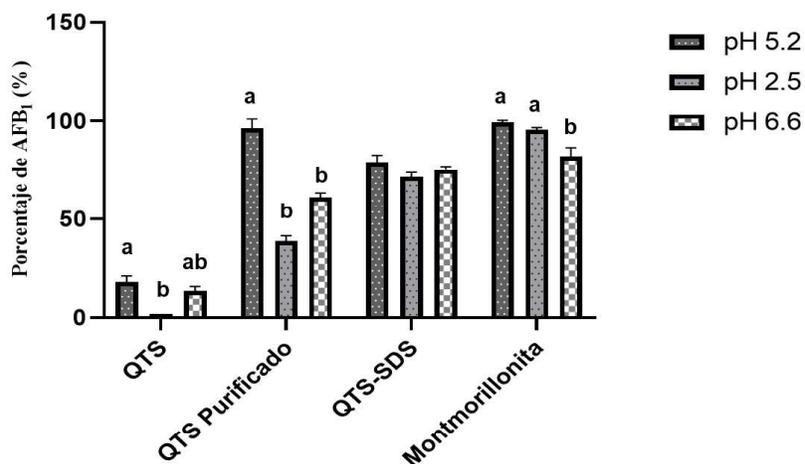


Figura 14. Porcentaje de adsorción a diferentes valores de pH.

## 7.5. Cuantificación de aflatoxina B<sub>1</sub> por cromatografía líquida de ultra alta resolución (UPLC)

### 7.5.1. Curva de calibración

En la **Tabla 9**, se muestran las áreas de los cromatogramas para cada dilución de AFB<sub>1</sub> utilizadas, y la **Figura 15** muestra la curva de calibración correspondiente con un coeficiente de regresión lineal de  $R^2 = 0.9998$ .

**Tabla 9.** Datos de calibración para AFB<sub>1</sub> obtenidos por UPLC.

Concentración AFB <sub>1</sub> (ppb)	Áreas ( $\mu V*s$ )
0	0
3.81	223,836
7.81	958,527
15.62	1,969,915
31.25	4,008,014
62.5	8,243,742
125	16,584,722
250	32,583,810

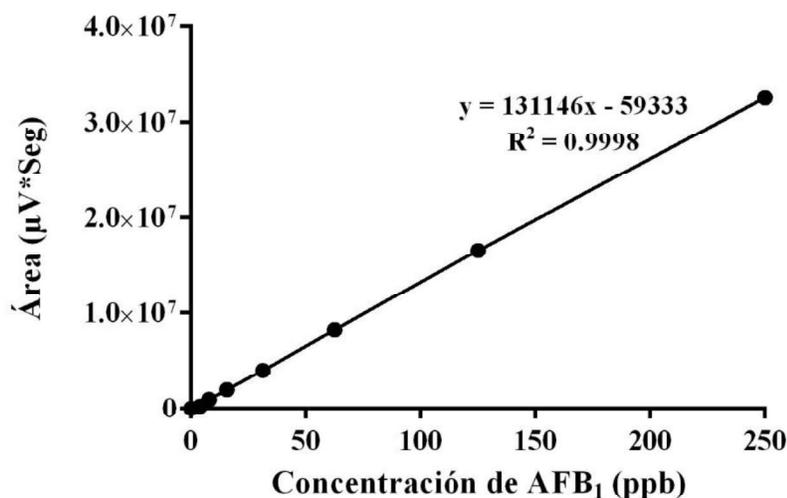
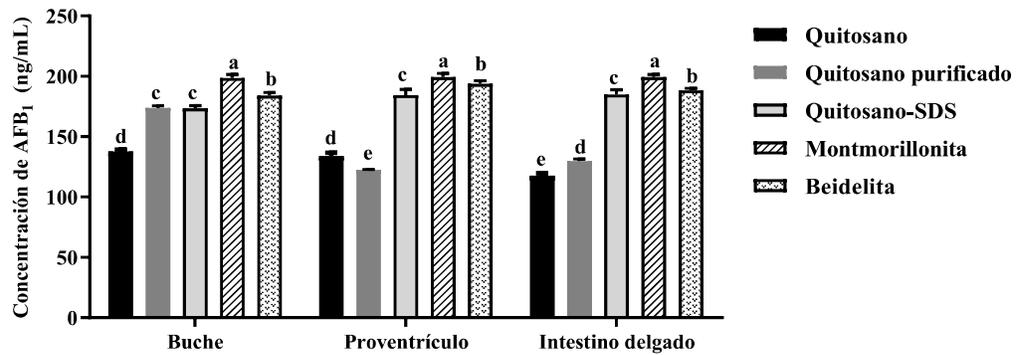


Figura 15. Curva de calibración de AFB<sub>1</sub>.

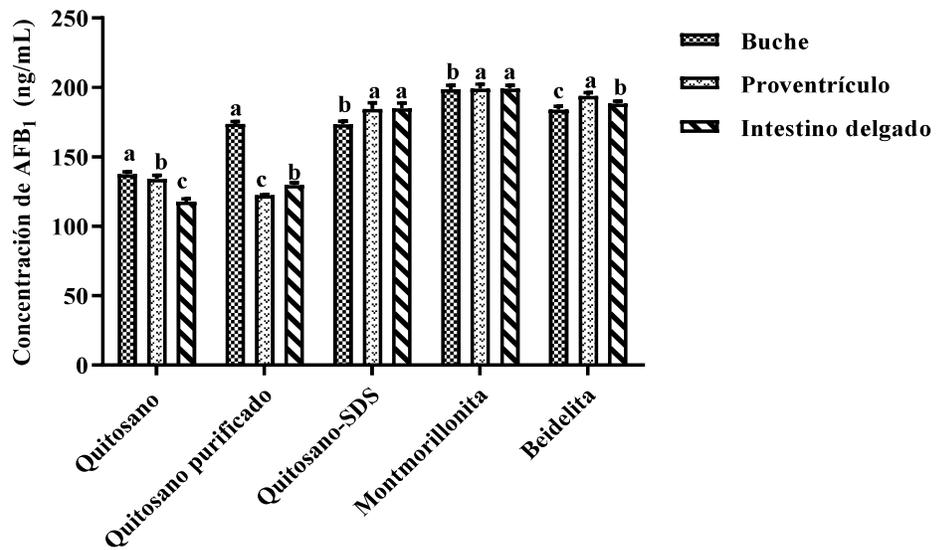
### 7.5.2. Cuantificación de AFB<sub>1</sub>

La cuantificación de AFB<sub>1</sub> analizada por UPLC en cada compartimiento simulado se muestra en la **Figura 16**. En esta se observó que en el buche la montmorillonita secuestró  $198.65 \pm 0.02$  ng/ml de AFB<sub>1</sub>, la cual fue significativamente mayor ( $p < 0.001$ ) que la secuestrada por la beidelita ( $184.07 \pm 0.47$  ng/ml), QTS-purificado ( $173.95 \pm 0.74$  ng/ml), QTS-SDS ( $173.47 \pm 0.58$  ng/ml) y QTS ( $137.65 \pm 0.25$  ng/ml). De igual manera, en el proventrículo, la montmorillonita secuestró una concentración de AFB<sub>1</sub> mayor ( $p < 0.001$ ) de  $199.17 \pm 0.05$  ng/ml, en contraste con beidelita ( $193.77 \pm 0.51$  ng/ml), QTS-SDS ( $184.52 \pm 0.08$  ng/ml), QTS ( $134.12 \pm 0.51$  ng/ml) y QTS-purificado ( $122.3 \pm 0.22$  ng/ml). Por último, en la sección intestinal, se observó el mismo comportamiento, donde la montmorillonita secuestró una mayor concentración ( $p < 0.001$ ) de AFB<sub>1</sub> ( $199.32 \pm 0.03$  ng/ml), seguido de la beidelita ( $188.5 \pm 0.85$  ng/ml), QTS-SDS ( $184.97 \pm 0.32$  ng/ml), QTS-purificado ( $129.62 \pm 0.21$  ng/ml) y QTS ( $117.85 \pm 0.33$  ng/ml).



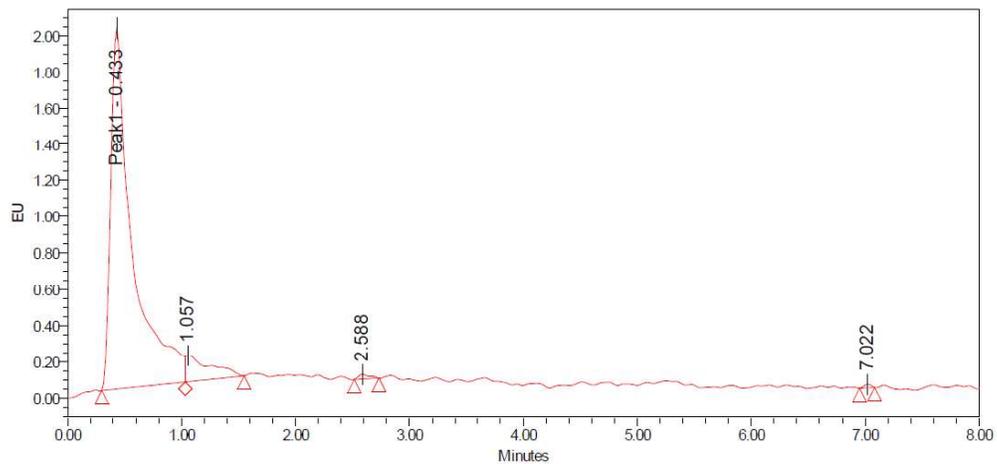
**Figura 16.** Concentración de AFB<sub>1</sub> secuestrada en un modelo *in vitro* para aves.

En la **Figura 17**, se presenta las concentraciones de AFB<sub>1</sub> secuestradas por cada tratamiento en los diferentes compartimentos simulados. El QTS secuestró más AFB<sub>1</sub> ( $p = 0.00$ ) en el buche ( $137.65 \pm 0.25$  ng/ml) en comparación con el proventrículo ( $134.12 \pm 0.51$  ng/ml) y la sección intestinal ( $117.85 \pm 0.33$  ng/ml). El QTS-purificado secuestró más AFB<sub>1</sub> ( $p = 0.00$ ) en el buche ( $173.95 \pm 0.74$  ng/ml), seguido de la sección intestinal ( $129.62 \pm 0.21$  ng/ml) y el proventrículo ( $122.3 \pm 0.22$  ng/ml). El QTS-SDS secuestró más ( $p = 0.00$ ) AFB<sub>1</sub> en el proventrículo ( $184.52 \pm 0.08$  ng/ml) y la sección intestinal ( $184.97 \pm 0.32$  ng/ml), en comparación con el buche ( $173.47 \pm 0.58$  ng/ml). La montmorillonita obtuvo un comportamiento similar al QTS-SDS, ya que el secuestro de AFB<sub>1</sub> fue mayor ( $p = 0.00$ ) en el proventrículo ( $199.17 \pm 0.05$  ng/ml) y la sección intestinal ( $199.32 \pm 0.03$  ng/ml), en comparación con el buche ( $198.65 \pm 0.02$  ng/ml). Finalmente, la beidelita mostró un secuestro de AFB<sub>1</sub> mayor ( $p = 0.00$ ) en el proventrículo ( $193.77 \pm 0.51$  ng/ml), en comparación con la sección intestinal ( $188.5 \pm 0.85$  ng/ml) y el buche ( $184.07 \pm 0.47$  ng/ml). Estos resultados demuestran que la montmorillonita, la beidelita y el QTS-SDS, son los tratamientos con mayor estabilidad para el secuestro de AFB<sub>1</sub>.



**Figura 17.** Concentración de AFB<sub>1</sub> secuestrada por los tratamientos bajo condiciones de un modelo *in vitro* para aves.

Las **Figuras** de la 18 a la 25, muestran los cromatogramas obtenidos de la curva de calibración de la AFB<sub>1</sub> con un tiempo de corrida de 8 minutos, observándose en todos los cromatogramas el pico característico de la AFB<sub>1</sub> entre el minuto 3 y 4.



**Figura 18.** Cromatograma para la AFB<sub>1</sub> con 0 ppb.

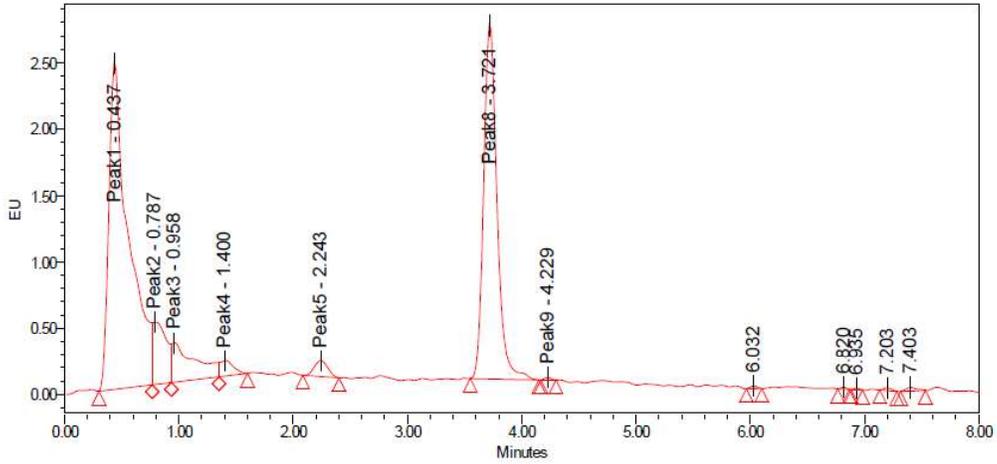


Figura 19. Cromatograma para la AFB<sub>1</sub> con 3.81 ppb.

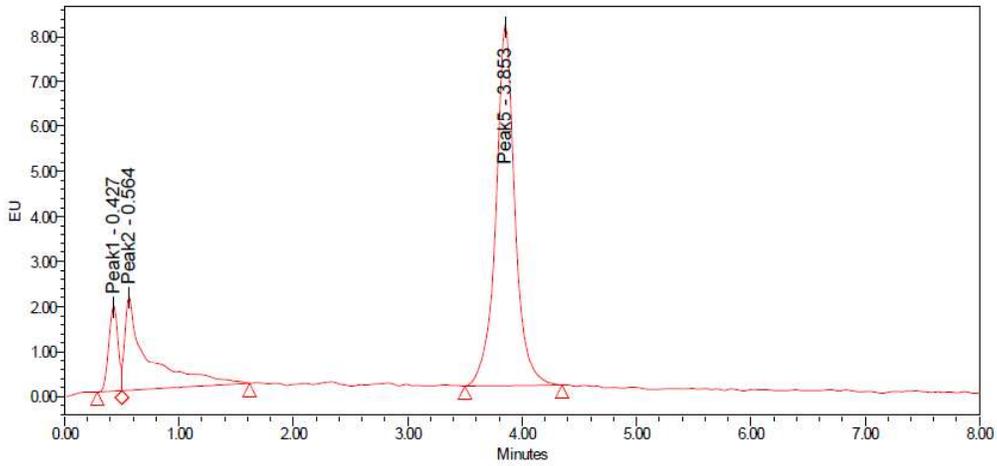


Figura 20. Cromatograma para la AFB<sub>1</sub> con 7.81 ppb.

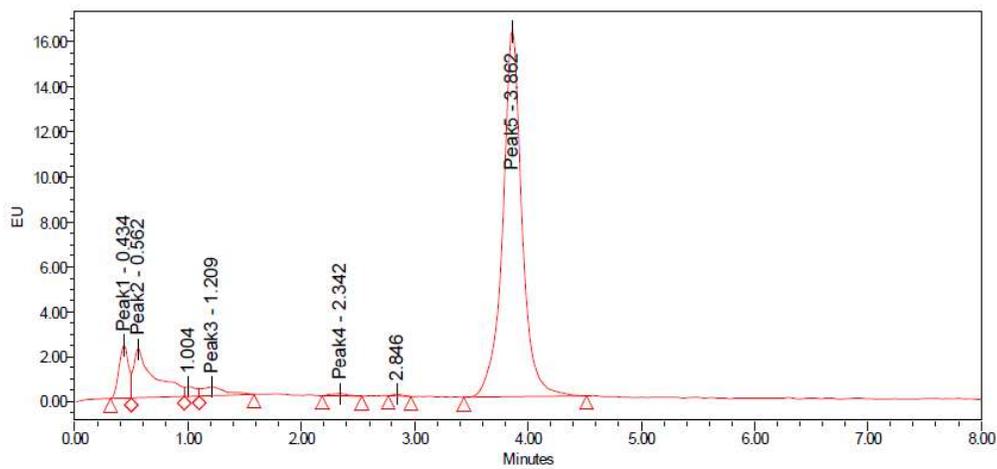


Figura 21. Cromatograma para la AFB<sub>1</sub> con 15.62 ppb.

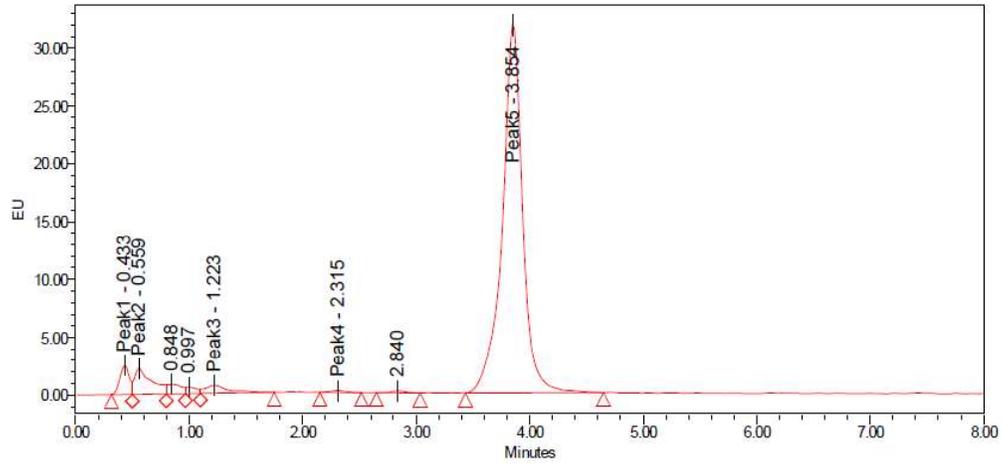


Figura 22. Cromatograma para la AFB<sub>1</sub> con 31.28 ppb.

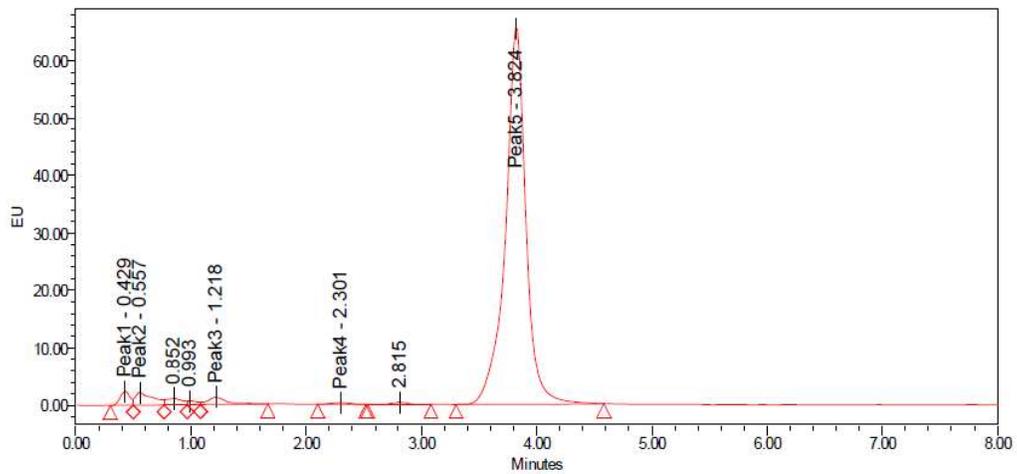


Figura 23. Cromatograma para la AFB<sub>1</sub> con 62.5 ppb.

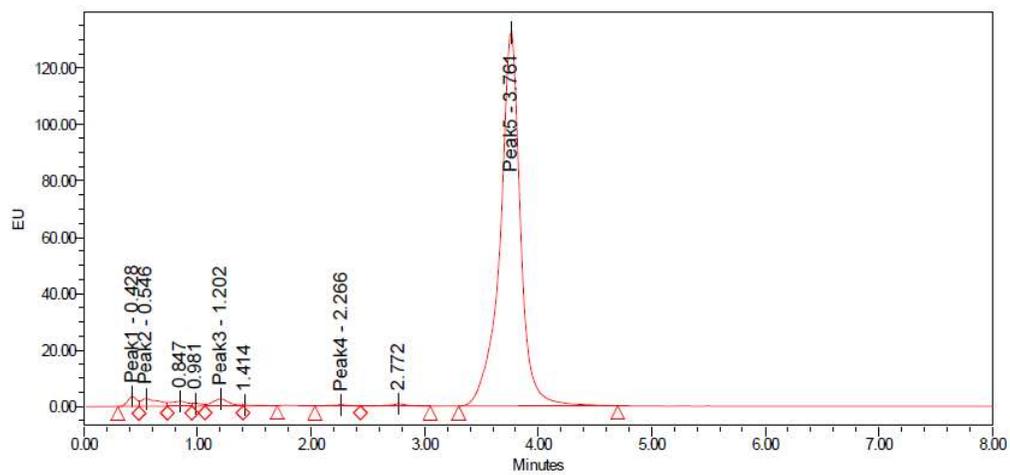


Figura 24. Cromatograma para la AFB<sub>1</sub> con 125 ppb.

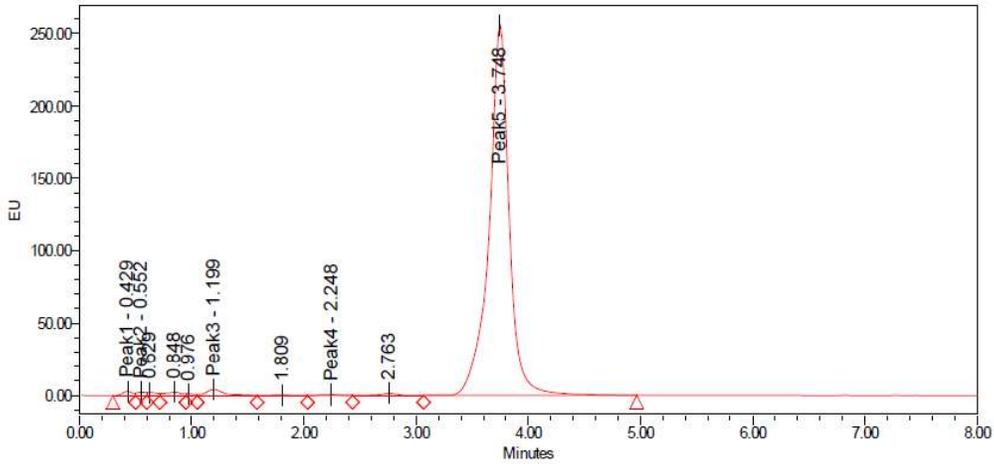


Figura 25. Cromatograma para la AFB<sub>1</sub> con 250 ppb.

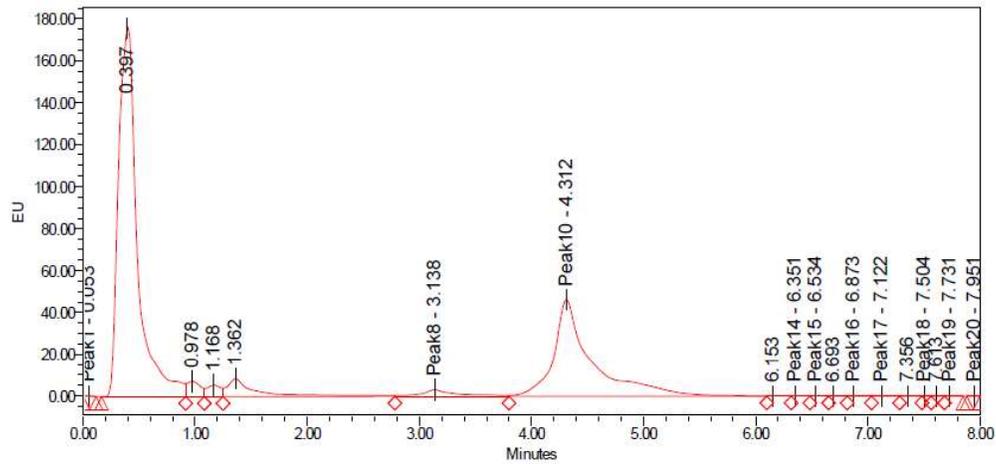


Figura 26. Cromatograma del secuestro de AFB<sub>1</sub> por el QTS.

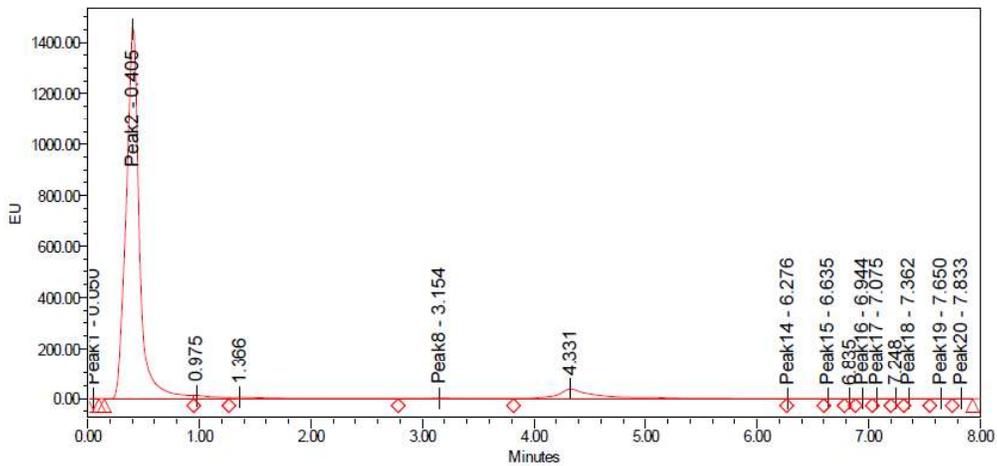


Figura 27. Cromatograma del secuestro de AFB<sub>1</sub> por el QTS-purificado.

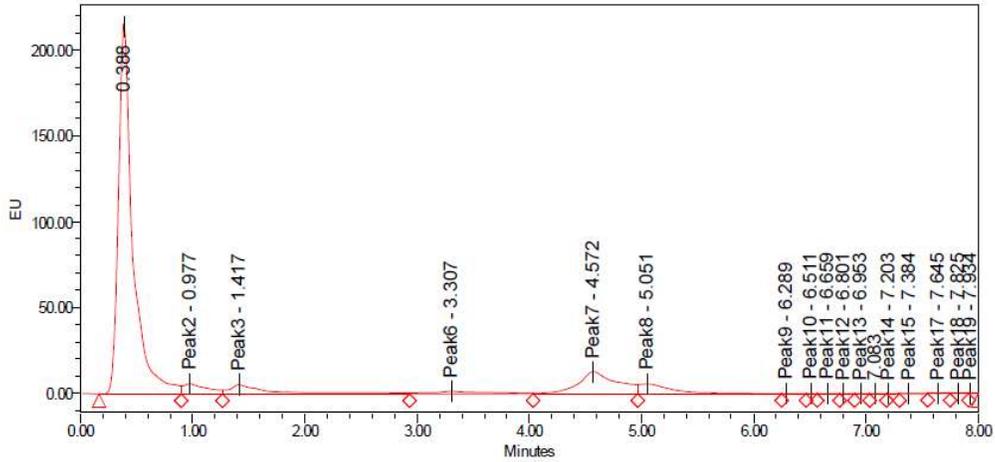


Figura 28. Cromatograma del secuestro de AFB<sub>1</sub> por el QTS-SDS.

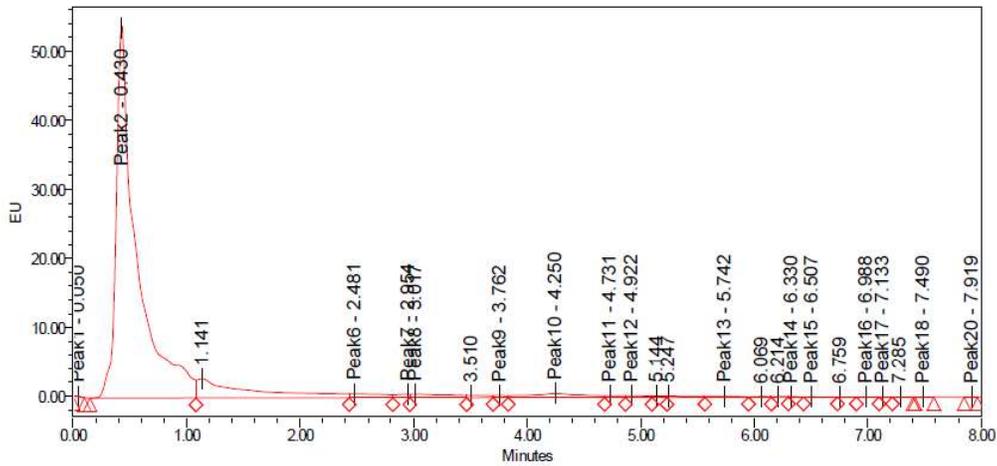


Figura 29. Cromatograma del secuestro de AFB<sub>1</sub> por arcilla montmorillonita.

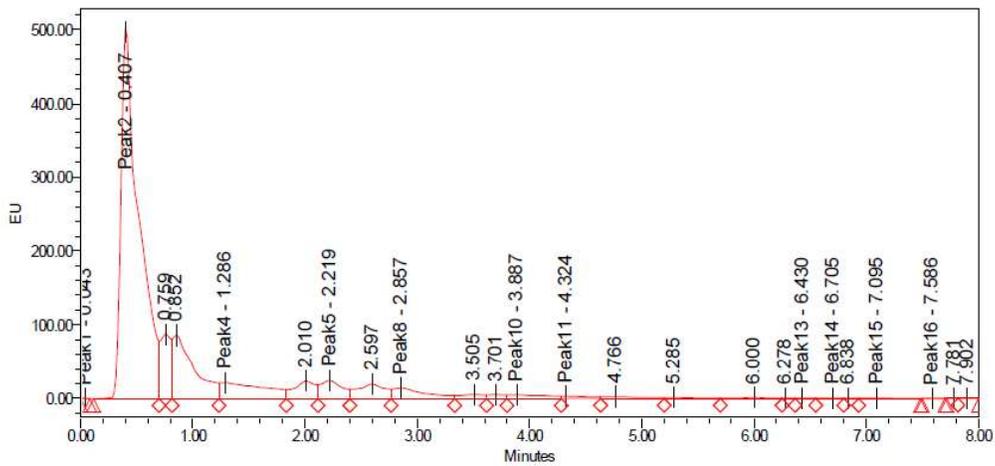
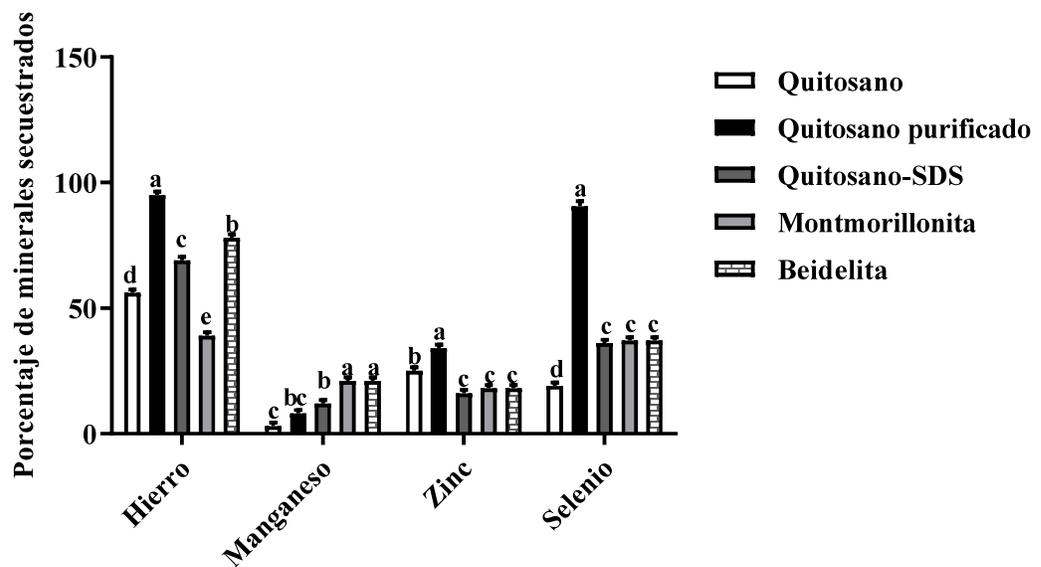


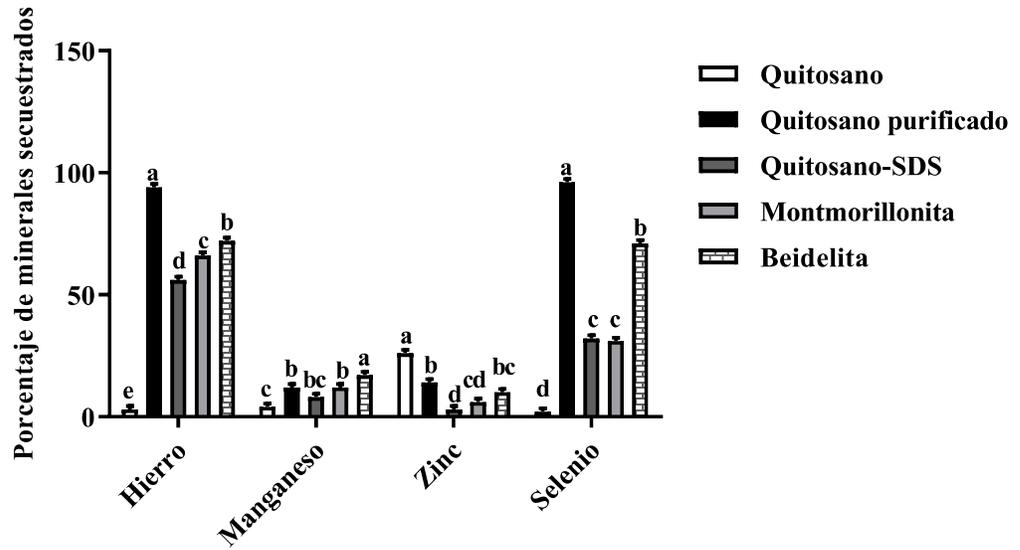
Figura 30. Cromatograma del secuestro de AFB<sub>1</sub> por arcilla beidelita.

### 7.5.3. Adsorción de microminerales por los secuestrantes

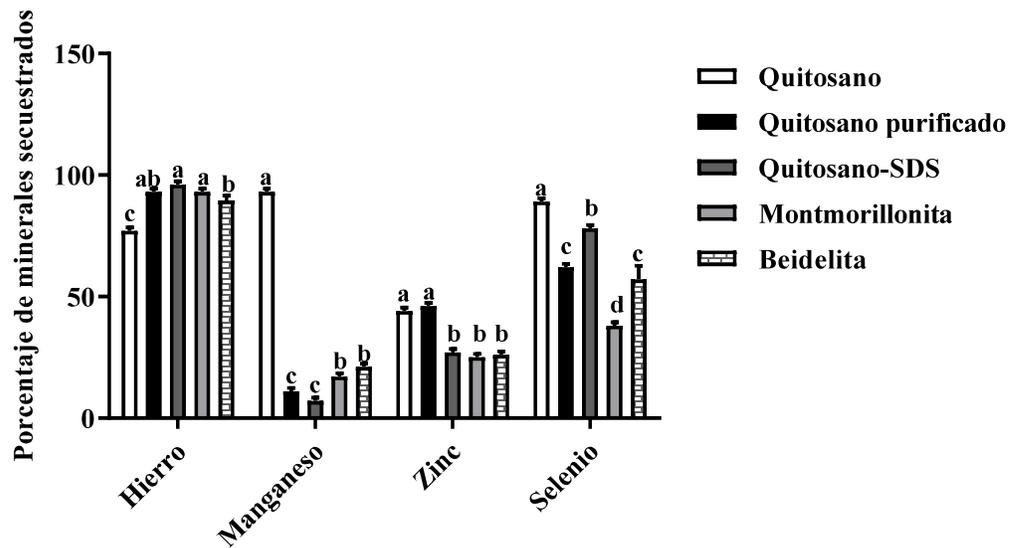
En la **Figura 31**, se presenta los porcentajes de adsorción de microminerales, donde se observó una mayor adsorción de microminerales ( $p < 0.001$ ) en el compartimento del buche. Con el QTS-purificado se obtuvo mayor porcentaje de adsorción ( $p = 0.00$ ) de Fe ( $95 \pm 1.41$ ), Se ( $90.5 \pm 2.12$ ) y Zn ( $34 \pm 0.41$ ), mientras que la adsorción de Mn fue mayor ( $p < 0.001$ ) para la montmorillonita y la beidelita ( $21 \pm 0.99$  y  $21 \pm 0.66$ , respectivamente). En el compartimento del proventrículo, de igual manera, el QTS-purificado presentó un mayor porcentaje de adsorción ( $p < 0.001$ ) para hierro ( $94 \pm 0.32$ ) y selenio ( $96 \pm 0.22$ ). El Zn fue adsorbido en mayor porcentaje por el QTS ( $26 \pm 0.11$ ) y el Mn por la beidelita ( $17 \pm 0.36$ ). Finalmente, en la sección intestinal, el QTS presentó mayor porcentaje de adsorción ( $p < 0.001$ ) de manganeso ( $93 \pm 0.86$ ) y selenio ( $89 \pm 1.2$ ), mientras que el QTS-SDS ( $96 \pm 0.76$ ) obtuvo una mayor ( $p < 0.001$ ) adsorción de hierro.



**Figura 31a.** Porcentaje de adsorción de microminerales en el compartimento simulado para el buche.



**Figura 31b.** Porcentaje de adsorción de microminerales en el compartimiento simulado para el proventrículo.



**Figura 31c.** Porcentaje de adsorción de microminerales en el compartimiento simulado para el intestino delgado.

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1. Caracterización de las moléculas de quitosano

Los resultados obtenidos de los espectros IR del QTS-purificado y QTS-SDS coinciden con lo reportado por Abbasi *et al.* (2020), quienes plantearon que el quitosano es un buen eliminador de contaminantes debido a la presencia de grupos amino ( $-NH_2$ ) e hidroxilo ( $-OH$ ) en su estructura, ya que funcionan como sitios de coordinación y reacción. La modificación química realizada al quitosano hace que la molécula sea soluble a pH ácidos, permitiendo un mayor tiempo de acción para secuestrar la aflatoxina. Claesson y Ninham (1992) también reportaron que a un pH relativamente bajo ( $< 6.5$ ) el quitosano tiene carga positiva y tiende a ser soluble en soluciones acuosas diluidas.

Geetha *et al.* (2012) reportaron que el SDS, un modelo tensioactivo aniónico, se une fuertemente al quitosano catiónico, formando complejos insolubles a través de atracción electrostática. Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con estas observaciones ya que el complejo QTS-SDS mostró estabilidad tanto en medio ácido como en medio básico, esto favorece la adsorción de diferentes moléculas como la aflatoxina.

### 8.2. Interacciones de AFB<sub>1</sub> con los secuestrantes evaluados

La AFB<sub>1</sub> interactúa con los grupos amino del QTS-purificado ( $O=C-NH_2$  y  $NH_2$ ), y grupos amino ( $O=C-NH_2$  y  $NH_2 S=O$ ) y sulfato ( $S=O$  y  $R-O-S$ ) del QTS-SDS. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Hernández *et al.* (2018), quienes observaron una interacción electrostática entre el átomo de hidrógeno de los grupos amino del quitosano con el átomo de oxígeno de AFB<sub>1</sub>.

Los resultados observados de la interacción de la arcilla montmorillonita y la AFB<sub>1</sub> se atribuyen a la interacción ion-dipolo entre los mismos, coincidiendo con Deng *et al.* (2010), quienes reportaron que el mecanismo de adsorción está principalmente dado por una interacción entre el oxígeno del carbonilo de la aflatoxina B<sub>1</sub> y los cationes intercambiables de la bentonita, en este caso con grupos  $Si^{4+}$  y  $Al^{3+}$ .

### 8.3. Caracterización de la beidelita y montmorillonita

Las muestras analizadas en este estudio sugieren que ambas arcillas son del grupo esmectitas, clasificándolas en su mayor proporción como beidelita (55%) y montmorillonita (61%), y en ambas muestras se encontraron porciones de cristobalita (24%), cuarzo (6%) y ortoclasa (7%). Estos resultados coinciden con Belousov *et al.* (2020), quienes reportaron que en varias muestras de esmectitas, el 70% correspondía a montmorillonita. Además, encontraron como impurezas, cuarzo (15%), feldespato (6%) y calcita (3%).

### 8.4. Isotermas de adsorción

Los porcentajes de adsorción del QTS coinciden con Solís *et al.* (2017), quienes reportaron en un estudio similar, que el quitosano comercial tuvo una baja capacidad de adsorción de AFB<sub>1</sub> frente a otros compuestos celulósicos evaluados. En el caso del QTS-purificado, se observó que a pH de 5.2 y 6.6, hubo un efecto secuestrante de AFB<sub>1</sub>. Esto resulta debido a que en el quitosano reticulado quedan los grupos aminos más disponible para interactuar con la AFB<sub>1</sub>. Resultados similares fueron reportados por Juárez *et al.* (2017), quienes observaron mediante un análisis computacional de las principales interacciones del quitosano con la AFB<sub>1</sub>, que los grupos amino (NH<sub>2</sub>) del quitosano tienen gran afinidad por el grupo oxígeno (O<sub>2</sub>) de la aflatoxina. Por otra parte, el QTS-SDS también presentó una gran capacidad secuestrante de la AFB<sub>1</sub>. Esto se debe a la formación de un complejo insoluble con la molécula de SDS, incrementando el tiempo de contacto con la AFB<sub>1</sub>. Kotz *et al.* (2001) plantearon que una molécula SDS se une al quitosano formando un complejo insoluble y proporcionándole mayor estabilidad en su estructura.

En el presente estudio, la montmorillonita tuvo una adsorción de AFB<sub>1</sub> de 99%. Otros autores (Desheng *et al.*, 2005; Dakovic *et al.*, 2008) han obtenido resultados similares. Desheng *et al.* (2005) observaron un secuestro de AFB<sub>1</sub> del 80% en una solución acuosa a pH 2, y 90% en una solución a pH 8. De igual manera, Dakovic *et al.* (2008) obtuvieron porcentajes de adsorción de AFB<sub>1</sub> por encima del 93% a pH 3, 7 y 9 con dos montmorillonitas (natural y modificada). Esto se atribuye a la estructura

octaédrica de la montmorillonita lo que permite intercambiar los cationes de la lámina interna con el oxígeno de la AFB<sub>1</sub>.

En este estudio se observó que el porcentaje de AFB<sub>1</sub> secuestrada a pH 2.5, 6.6 y 5.2 por QTS-SDS fue constante, sin embargo, en el caso de la montmorillonita, se observó una menor adsorción a pH 6.6. Esto difiere con lo reportado por Zhao *et al.* (2015), quienes observaron que la adsorción *in vitro* de AFB<sub>1</sub> es dependiente del pH.

### 8.5. Cuantificación de AFB<sub>1</sub>

Los resultados de la cuantificación de AFB<sub>1</sub> mostraron que la montmorillonita presentó un mayor secuestro de AFB<sub>1</sub> en comparación con los otros secuestrantes evaluados. Varios autores (Wang *et al.*, 2018 y Li *et al.*, 2018) han reportado que la montmorillonita secuestra AFB<sub>1</sub> por la interacción ion-dipolo entre los cationes intercambiables de la montmorillonita y los grupos carbonilo de la AFB<sub>1</sub>.

La beidelita fue el segundo secuestrante que presentó mejor adsorción de AFB<sub>1</sub>, lo que demuestra una buena capacidad de intercambio catiónico entre el Si y los grupos carbonilo de la AFB<sub>1</sub>. Barrientos *et al.* (2016) reportaron que la beidelita, una esmectita con capas tetraédrica, adsorbió AFB<sub>1</sub> en menor proporción que la montmorillonita, una esmectita con capas octaédrica.

Con las moléculas de quitosano evaluadas en este estudio se observó que el QTS-SDS, presentó una adsorción de AFB<sub>1</sub> de 93%. Esto se debe a la incorporación de grupos SDS a la cadena polimérica del quitosano que brindan estabilidad y una alta capacidad de adsorción de AFB<sub>1</sub>. Worthen *et al.* (2019) reportaron que perlas de quitosano preparadas con SDS son complejos muy estables en rangos de pH de 1 hasta 5, y se requieren de dos días para observar una solubilización completa a pH 1.

Por otro lado, la molécula de QTS-purificado presentó un 61 % de AFB<sub>1</sub> secuestrada, esto se debe a que la modificación química de esta molécula neutralizó los grupos amino lo que causó una disminución en la interacción con la AFB<sub>1</sub> y por consiguiente su adsorción Takara *et al.* (2015).

Finalmente, la molécula de QTS presentó el menor porcentaje de adsorción de AFB<sub>1</sub> (58 %). Este resultado difiere por lo reportado con Abbasi *et al.* (2020), quienes

reportaron que el quitosano comercial presentó resultados positivos como secuestrante simultáneo de 11 micotoxinas, incluyendo la AFB<sub>1</sub>, con una dieta a base de torta de palmiste.

En base al porcentaje secuestrado de la AFB<sub>1</sub> por cada tratamiento, se probó que la montmorillonita y el QTS-SDS fueron los mejores secuestrantes, aunque hubo menor secuestro de AFB<sub>1</sub> en el compartimiento *in vitro* que simula el buche con respecto a los otros compartimientos (proventrículo e intestino delgado). En los demás tratamientos se observaron diferencias en su capacidad secuestrante, ya que la variación de pH influyó en la concentración de AFB<sub>1</sub> secuestrada. Estos resultados coinciden con Zahoor y Ali Khan (2018), quienes reportaron que el pH es un factor importante que afecta el proceso de adsorción, debido a que afecta la carga superficial del adsorbente y el grado de ionización de los adsorbentes.

## **8.6. Adsorción de microminerales**

Existen pocos reportes sobre la interacción entre los adsorbentes de micotoxinas y los microminerales. En este estudio se realizó una prueba para comprobar si los secuestrantes utilizados capturaran microminerales. Los resultados obtenidos mostraron que todos los secuestrantes capturan microminerales de manera significativa, pero en menor proporción por el QTS-SDS y la montmorillonita. Chung *et al.* (1990) reportaron que pollos de engorda alimentados con 0.5 % o 1.0 % de HSCAS, en dietas libres de micotoxinas, no alteraron la utilización del manganeso (Mn) y vitamina A, pero condujo a una disminución del zinc (Zn) en la tibia. En este estudio se utilizó una inclusión de 0.2 % de cada secuestrante, observándose una alta adsorción de microminerales que se atribuyó a la alta capacidad de intercambio catiónico de los secuestrantes. Esto contrasta con lo reportado por la European Authority for Food Safety (EFSA, 2011), que advirtió de un riesgo potencial de secuestro del manganeso al utilizar una dosis superior al 0.5% de inclusión de bentonita en el alimento.

## 9. CONCLUSIONES

La micotoxina con mayor concentración en el lote de maíz contaminado fue la AFB<sub>1</sub>. Los secuestrantes con mejor capacidad de adsorción para AFB<sub>1</sub> fueron la montmorillonita, la beidelita y el QTS-SDS. La capacidad de adsorción de la AFB<sub>1</sub> por la montmorillonita y el QTS-SDS se mantuvo constante en los compartimientos que simulan *in vitro* el proventrículo e intestino delgado. Aunque todos los tratamientos tuvieron la capacidad de secuestrar microminerales, estos fueron secuestrados en menor proporción por el QTS-SDS y la montmorillonita.

## 10. PERSPECTIVAS

En base a los resultados obtenidos en este estudio, el quitosano químicamente modificado con SDS (QTS-SDS) tuvo excelentes resultados *in vitro* como adsorbente de AFB<sub>1</sub>. El próximo objetivo es probarlo en un estudio *in vivo* con pollos de engorda, usando un alimento contaminado con AFB<sub>1</sub>. Sí se obtienen resultados positivos con el QTS-SDS, se realizaría un estudio a escala mayor, y si los resultados son favorables en este último estudio, se introduciría este adsorbente sintético en el mercado de los secuestrantes de aflatoxinas.

## 11. BIBLIOGRFÍA

- Abbasi Pirouza, A., Selamat, J., Zafar Iqbal, S., Iskandar Putra, S.N. (2020). Efficient and simultaneous chitosan-mediated removal of 11 mycotoxins from palm kernel cake. *Toxins* 12, 115-129; doi:10.3390/toxins12020115.
- Aranaz, I., Acosta, N., Civera, C., Elorza, B., Mingo, J., Castro, C., Llanos Gandía, M., Heras, A. (2018). Cosmetics and cosmeceutical applications of chitin, chitosan, and their derivatives. *Polymers* 10, 1-25; doi:10.3390/polym10020213.
- Balseca, D.M., Hernández, H., Tenorio, M.G., Águila, E., Esparza, I. (2015). Adsorción de la aflatoxina B<sub>1</sub> mediante quitosano. Tesis de grado, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Ingeniería Química, Colegio de Ingeniería Ambiental.
- Barrientos, A.L., Kakani, R., Fowler, J., Haq, A., Bailey, C.A., Dixon, J.B., Deng Y. (2011). Aflatoxin adsorption by bentonites in poultry feed. Master of Science Thesis, Texas A&M University.
- Barrientos, A.L., Marroquin, A., Liu, L., Phillips, T., Deng, Y. (2016). Influence of layer charge origin and layer charge density of smectites on their aflatoxin adsorption. *Applied Clay Sci.* 132-133, 281-289; doi:10.1016/j.clay.2016.06.014.
- Belousov, P.E., Pokidko, B.V., Zakusin, S.V., Krupskaya, V.V. (2020). Quantitative methods for quantification of montmorillonite content in bentonite clays. *Georesursy = Georesources* 22, 38–47; doi:10.18599/grs.2020.3.38-47.
- Blount, W. P. (1961). Turkey “x” disease. *Journal of British Turkey Federation.* 9, 52-61.
- Budnyak, T.M., Yanovska, E.S., Kichkiruk, O.Y., Sternik, D., Tertykh, V. A. (2016). Natural minerals coated by biopolymer chitosan: synthesis, physicochemical, and adsorption properties. *Nanoscale Res. Letters* 11, 492-504; doi.org/10.1186/s11671-016-1696-y.
- Castañeda, R., Chirivella, J., Carbonell, E. (2012). Neutralización de micotoxinas por sustancias adsorbentes. *Rev. Iberoamericana Interdisciplinar de Métodos, Modelización y Simulación* 4, 77-88.

- Chung, T.K., Erdman, J.W., Baker, D.H. (1990). Hydrated sodium calcium aluminosilicate: Effects on zinc, manganese, vitamin A and riboflavin utilization. *Poultry Sci.* 69, 1364-1370; doi: 10.3382/ps.0691364.
- Claesson, P. M., Ninham, B. W. (1992). pH-dependent interactions between adsorbed chitosan Layers. *Langmuir* 5, 1406-1412; doi:10.1021/la00041a027.
- Colovic, R., Puvaca, N., Cheli, F., Avantaggiato, G., Greco, D., Duragic, O., Kos, J., Pinotti, L. (2019). Decontamination of mycotoxin-contaminated feedstuffs and compound feed. *Toxins* 11, 617-635; doi:10.3390/toxins11110617.
- Coppock, R. W., Christian, R. G., Jacobsen, B. J. (2018). *Veterinary Toxicology*. Chapter 69, Aflatoxins. Elsevier Inc. 983-994; doi:10.1016/b978-0-12-811410-0.00069-6.
- Cota, O., Cortez, M.O., Rosas, E.C., Burgos, A., López, Y.L., Plascencia, M. (2011). Antifungal effect of chitosan on the growth of *Aspergillus parasiticus* and production of aflatoxin B<sub>1</sub>. *Polym. Int.* 60, 937-944; doi.org/10.1002/pi.3054.
- Crini, G., Badot, P. M. (2008). Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies: a review of recent literature. *Prog Polym. Sci.* 33, 399-447; doi:org/10.1016/j.progpolymsci.2007.11.001.
- Dakovic, A., Matijasevic, S., Rottinghaus, G. E., Ledoux, D. R., Butkeraitis, P., Sekulic, Z. (2008). Aflatoxin B<sub>1</sub> adsorption by natural and copper modified montmorillonite. *Colloids Surf B Biointerfaces* 66, 20-25; doi:10.1016/j.colsurfb.2008.05.00.
- Daou, R., Joubrane, K., Maroun, R.G., Khabbaz, L., Ismail, A., Khoury, A. (2021). Mycotoxins: Factors influencing production and control strategies. *AIMS Agriculture and Food* 6, 416-447; doi:10.3934/agrfood.2021025.
- Deng, Y., Velázquez, A. L. B., Billes, F., Dixon, J. B. (2010). Bonding mechanisms between aflatoxin B<sub>1</sub> and smectite. *Applied Clay Sci.* 50, 92-98; doi:10.1016/j.clay.2010.07.008.
- Deng, Y., Szczerba, M. (2011). Computational evaluation of bonding between aflatoxin B<sub>1</sub> and smectite, *Applied Clay Sci.* 54, 26-33; doi.org/10.1016/j.clay.2011.07.007.

- Desheng, Q., Fan, L., Yanhu, Y., Niya, Z. (2005). Adsorption of aflatoxin B<sub>1</sub> on montmorillonite. *Poultry Sci.* 84, 959-961; doi:10.1093/ps/84.6.959.
- Díaz, G.J. (2000). Micotoxinas y micotoxicosis en salud humana y animal. Segunda Parte. *Veterinaria al Día* 2, 3-8.
- Dixon, J. B., Kannewischer, I., Tenorio-Arvide, M. G., Barrientos-Velázquez, A. L. (2008). Aflatoxin sequestration in animal feeds by quality-labeled smectite clays: An introductory plan, *Applied Clay Sci.* 40, 201-208; doi.org/10.1016/j.clay.2007.10.010.
- Domijan, A.M., Peraica, M. (2010). Carcinogenic mycotoxins. *Comprehensive Toxicology*. Elsevier Ltd, 125-137; doi:10.1016/b978-0-08-046884-6.01408-1.
- EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). (2011). Scientific Opinion on the safety and efficacy of bentonite (dioctahedral montmorillonite) as feed additive for all species. *EFSA Journal* 9, 2007-2031; doi:10.2903/j.efsa.2011.2007.
- Foroud, N.A., Baines, D., Gagkaeva, T.Y., Thakor, N., Badea, A., Steiner, B., Burstmayr, M., Burstmayr, H. (2019). Trichothecenes in cereal grains - an update. *Toxins* 11, 634-682; doi:10.3390/toxins11110634.
- Galaverna, G., Dall'Asta, C. (2012). Sampling techniques for the determination of mycotoxins in food matrices. *Comprehensive Sampling and Sample Preparation* 381-403; doi:10.1016/b978-0-12-381373-2.00140-x.
- Geetha, G., Kumar, C. S., Devanna, N. (2012). Characterization of molecular interactions between chitosan and sodium dodecyl sulfate (SDS). *International Journal of Science & Technology* 2, 8-15.
- Gimeno, A. (2009). Revisión de las concentraciones máximas tolerables para ciertas micotoxinas. [www.engormix.com](http://www.engormix.com)
- Godfray, H.C.J., Beddington, J.R., Crute, I.R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J.F., Priddy, J., Robinson, S., Thomas, S.M., Toulmin, C. (2010). Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Sci.* 327, 812-818; doi:10.1126/science.1185383.

- Gupta, R. C., Srivastava, A., Lall, R. (2018). Veterinary Toxicology. Chapter 72, Ochratoxins and citrinin. 1019-1027; doi:10.1016/b978-0-12-811410-0.00072-6.
- Hernandez, D., Solis, B., Hargis, B. M., Tellez, G. (2018). Chitin-Chitosan-Myriad Functionalities in Science and Technology. Chapter 13, Chitinous materials for control of foodborne pathogens and mycotoxins in poultry. 261-283; doi:10.5772/intechopen.76041.
- Huwig, A., Freimund, S., Käppeli, O., Dutler, H. (2001). Mycotoxin detoxification of animal feed by different adsorbents. Toxicology Letters 122, 179-188; doi: 10.1016/s0378-4274(01)00360-5.
- Iheshiulor, O.O.M., Esonu, B.O., Chuwuka, O.K., Omede, A.A., Okoli, I.C., Ogbuewu, I.P. (2011). Effects of mycotoxins in animal nutrition: a review. Asian Journal of Animal Sci. 5, 19-33; doi:10.3923/ajas.2011.19.33.
- Juárez, L.A., Hernández, H., Chigo, E., Águila, E., Tenorio, M.G. (2017). Chitosan-aflatoxins B<sub>1</sub>, M<sub>1</sub> interaction: A computational approach. Current Organic Chemistry 21, 2877-2883; doi: 10.2174/1385272821666170511165159.
- Kolawole, O., Meneely, J., Greer, B., Chevallier, O., Jones, D., Connolly, L., Elliott, C. (2019). Comparative *in vitro* assessment of a range of commercial feed additives with multiple mycotoxin binding claims. Toxins 11, 659-673; doi:10.3390/toxins11110659.
- Kotz, J., Kosmella, S., Beitz, T. (2001). Self-assembled polyelectrolyte systems. Prog. Polym. Sci. 26, 1199-1232.
- Lee, Y., Kim, P., Kim, H., Seoung, D. (2020). Comparative compressibility of smectite group under anhydrous and hydrous environments. Materials 13, 3784-3793; doi:10.3390/ma13173784.
- Lertsutthiwong, P., Noomun, K., Khunthon, S., Limpanart, S. (2012). Progress in natural science: Materials International 22, 502-508; doi: rg/10.1016/j.pnsc.2012.07.008.
- Li, Y., Tian, G., Dong, G., Bai, S., Han, X., Liang, J., Meng, J., Zhang, H. (2018). Research progress on the raw and modified montmorillonites as adsorbents for mycotoxins: a review. Appl. Clay Sci. 163, 299-311; doi:10.1016/j.clay.2018.07.032.

- Linlin, S. (2016). The effects of structural and environmental factors on the swelling behavior of montmorillonite-beidellite smectites: a molecular dynamics approach. Department of Chemistry, University of Eastern Finland. 1-37.
- Machado, P. (2014). Neutralizador de micotoxinas en pollos expuestos a toxina T-2. <http://www.wattagnet.com/articles/20408-neutralizador-de-micotoxinas-en-pollos-expuestos-a-toxina-t-2>.
- Madsen, I.C., Scarlett, N.V.Y., Cranswick, L.M.D., Lwin, T. (2001) "Outcomes of the international union of crystallography commission on powder diffraction round robin on quantitative phase analysis: Sample 1A to 1H" J. Appl. Cryst. 34, 409-426.
- Magnoli, A.P., Poloni, V.L., Cavaglieri, L. (2019). Impact of mycotoxin contamination in the animal feed industry. Current Opinion in Food Sci. 29, 99-108; doi:10.1016/j.cofs.2019.08.009.
- Mahmoud Amer, E., Saber, S. H., Abo Markeb, A., Elkhawaga, A. A., Mekhemer, I. M. A., Zohri, A.-N. A., Abujamel, T.S., Harakeh, S., Abd-Allah, E. A. (2021). Enhancement of  $\beta$ -glucan biological activity using a modified acid-base extraction method from *Saccharomyces cerevisiae*. Molecules 26, 2113-2130; doi:10.3390/molecules26082113.
- Mallmann, C.A., Dilkin, P. (2011). Micotoxins and Mycotoxicosis in Swine. Special nutrients the mycotoxins specialist for 25 years. Lamic.
- Manual del Pollo de Engorde Ross Especificaciones de Nutrición. (2019). [www.aviagen.com](http://www.aviagen.com).
- Missmer, S. A., Suarez, L., Felkner, M., Wang, E., Merrill Jr, A. H., Rothman, K. J., Hendricks, K. A. (2006). Exposure to fumonisins and the occurrence of neural tube defects along the Texas-Mexico border. Environmental Health Perspectives 114, 237-241; doi: 10.1289/ehp.8221.
- Mitchell, J. K. (1993). Fundamentals of Soil Behavior. Second edition. New York, John Wiley & Sons, Inc. 437-458.
- Owuor Lalah, J., Omwoma, S., A.O. Orony, D. (2020). Aflatoxin B<sub>1</sub> occurrence, detection, and toxicological effects. Aflatoxin B<sub>1</sub>: chemistry, environmental and

- diet sources, and potential exposure in human in Kenya. 1-33. doi:10.5772/intechopen.88773.
- Organización Mundial de la Salud. (2018). Mycotoxins. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mycotoxins>.
- Pereyra, C. M., Cavaglieri, L. R., Chiacchiera, S. M., Dalcerro, A. (2013). The corn influence on the adsorption levels of aflatoxin B<sub>1</sub> and zearalenone by yeast cell wall. *Journal of Applied Microbiology* 114, 655-662; doi:10.1111/jam.12082.
- Raju, M. V., Devegowda, G. (2000). Influence of esterified-glucomannan on performance and organ morphology, serum biochemistry and haematology in broilers exposed to individual and combined mycotoxicosis (aflatoxin, ochratoxin and T-2 toxin). *British Poultry Sci.* 41, 640-650; doi:10.1080/713654986.
- Richard, J. L. (2007). Some major mycotoxins and their mycotoxicose - an overview. *International Journal of Food Microbiology* 119, 3-10; doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.019.
- Solís, B., Hernández, D., Beyssac, E., Latorre, J.D., Hernández, X., Merino, R., Tellez, G., López, R. (2017). Evaluation of chitosan and cellulosic polymers as binding adsorbent materials to prevent aflatoxin B<sub>1</sub>, fumonisin B<sub>1</sub>, ochratoxin, trichothecene, deoxynivalenol, and zearalenone mycotoxicoses through an in vitro gastrointestinal model for poultry. *Polymers* 9, 529-539; doi.org/10.3390/polym9100529.
- Spring, P., Taylor-Pickard, J., Jacques, K. A., Hower, J. M. (2019). Poultry and Pig Nutrition, Chapter 10, Biotechnology in the feed industry and animal nutrition: harnessing microbes to provide natural solutions. 229-244; doi:10.3920/978-90-8686-884-1\_10.
- Sultana, N., Hanif N.Q. (2009). Mycotoxin contamination in cattle feed and feed ingredients. *Pakistan Vet. J.* 29, 211-213.
- Takara, E.A., Marchese, J., Ochoa, N.A. (2015). NaOH treatment of chitosan films: Impact on macromolecular structure and film properties. *Carbohydrate Polymers* 132, 25-30; doi:10.1016/j.carbpol.2015.05.077.
- Urrego, J., Días, G. (2006). Aflatoxinas: mecanismos de toxicidad en la etiología de cáncer hepático celular. *Rev. Fac. Med. Univ. Nac. Colomb.* 54, 108-116.

- Van Alfen, N.K. (2014). Encyclopedia of agriculture and food systems. Elsevier Inc., London, UK.
- Vartiainen, S., Yiannikouris, A., Apajalahti, J., Moran, C.A. (2020). Comprehensive evaluation of the efficiency of yeast cell wall extract to adsorb ochratoxin and mitigate accumulation of the toxin in broiler chickens. *Toxins* 12, 37-56; doi:10.3390/toxins12010037.
- Villar, M., Medina, J., García Gómez, J. (2014). La aflatoxicosis: Un problema a resolver dentro de la Medicina Veterinaria. *REDVET*. 15, 1-34.
- Wang, G., Lian, C., Xi, Y., Sun, Z., Zheng, S. (2018). Evaluation of nonionic surfactant modified montmorillonite as mycotoxins adsorbent for aflatoxin B<sub>1</sub> and zearalenone. *Journal of Colloid and Interface Sci.* 518, 48-56; doi: 10.1016/j.jcis.2018.02.020.
- Wielogórska, E., MacDonald, S., Elliott, C.T. (2016). A review of the efficacy of mycotoxin detoxifying agents used in feed in light of changing global environment and legislation. *World Mycotoxin Journal* 9, 419-433; doi.org/10.3920/WMJ2015.1919.
- Worthen, A., Irving, K., Lapitsky, Y. (2019). Supramolecular strategy effects on chitosan bead stability in acidic media: a comparative study. *Gels* 5, 11-23; doi:10.3390/gels5010011.
- Wu, F., Groopman, J. D., Pestka, J. J. (2014). Public health impacts of foodborne mycotoxins. *Annual Review of Food Science and Technology* 5, 351-372; doi: 10.1146/annurev-food-030713-092431.
- Yong, S. K., Bolan, N., Lombi, E., Skinner, W., Guibal, E. (2013). Sulfur-containing chitin and chitosan derivatives as trace metal adsorbents: a review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 43, 1741-1794; doi.org/10.1080/10643389.2012.671734.
- Zachetti, V., Cendoya, E., Nichea, M., Chulze, S., Ramirez, M. (2019). Preliminary study on the use of chitosan as an eco-friendly alternative to control fusarium growth and mycotoxin production on maize and wheat. *Pathogens* 8, 29-44; doi:10.3390/pathogens8010029.

- Zahoor, M., Ali Khan, F. (2018). Adsorption of aflatoxin B<sub>1</sub> on magnetic carbon nanocomposites prepared from bagasse. *Arabian Journal of Chemistry* 11, 729-738; doi:10.1016/j.arabjc.2014.08.025.
- Zhao, Z., Liu, N., Yang, L., Wang, J., Song, S., Nie, D., Yang, X., Hou, J., Wu, A. (2015). Cross-linked chitosan polymers as generic adsorbents for simultaneous adsorption of multiple mycotoxins. *Food Control* 57, 362-369; doi; 10.1016/j.foodcont.2015.05.014.