

00524
77



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

****EVALUACION DE LA CAPACIDAD INHIBITORIA DE LA
MICOTOXICOSIS EN POLLOS DE ENGORDA,
POR LA ADICION DE UN SEQUESTRANTE COMERCIAL
A DIETAS CONTAMINADAS CON AFLATOXINAS,
TOXINA T-2. OCRATOXINA A****

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
PRESENTA**

MARIA CONCEPCION HERNANDEZ CUELLAR



MEXICO, D. F.



2003

**EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA**

A



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PROFESORES

Presidente	RAFAEL RION ARRIOLA
Vocal	MA. ANTONIETA SILVA CHÁVEZ
Secretario	RENÉ NEFTALÍ MÁRQUEZ MÁRQUEZ
1er suplente	LIZ JANNET MEDINA REYES
2do suplente	ALEJANDRO ORTIZ OSORNIO

**Lugar de realización: Lab. de Micotoxinas Cenid- Microbiología
Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y
Pecuarias. Km. 15.5, Carr. México-Toluca, Cuajimalpa, C.P.
05110**


Asesor: DR. RENÉ NEFTALÍ MÁRQUEZ MÁRQUEZ


Sustentante: Ma. Concepción Hernández Cuellar

DEDICATORIAS

A Dios:

Te agradezco Dios por permitirme llegar a este momento tan preciado y por darme la oportunidad de vivir la vida con sus pros y sus contras.

También te agradezco por darme la familia, y amigos tan maravillosos que tengo que son parte fundamental de mi vida.

A mis Padres:

Gracias Mamá por tener fe en mí y por todas las cosas que tuviste que realizar para que yo continuara mi lucha por la vida, y quiero que sepas que eres una mujer excepcional y que estoy muy orgullosa de tener una madre como tú.
Te quiero.

Gracias Papá donde quiera que te encuentres.

A mis Hermanas:

Gracias por brindarme su apoyo en el momento que más lo he necesitado, por contar con ustedes que se han convertido en mis más grandes amigas.

A mis amigos:

En el camino de la vida tenemos amigos y amores que duran unos instantes y otros que perduran toda la vida, a ambos tipos de amigos les agradezco haberlos conocido, porque fueron y son fuente de conocimientos y alegrías en mi vida.

Yolanda, eres una amiga excepcional, gracias por todo el cariño y apoyo que me brindas, por estar siempre conmigo, por escucharme y brindarme tu amistad incondicionalmente.

A Concepción, Alicia, gracias por abrirme las puertas de su hogar y brindarme su amistad.

A mi Asesor:

Gracias por tu disponibilidad, por todo el apoyo que me brindas, y sobretodo por tu linda y valiosa amistad.

A mis Sinodales:

Q.F.B. RAFAEL RION ARRIOLA

Q.F.B. MA. ANTONIETA SILVA CHAVEZ

DR. RENÉ NEFTALÍ MÁRQUEZ MÁRQUEZ

Q.F.B. LIZ JANNET MEDINA REYES

Q.F.B. ALEJANDRO ORTIZ OSORNIO

Quiero agradecerles de todo corazón, esos momentos de paciencia y comprensión que brindaron al apoyarme en la realización del presente trabajo.

Al (CENID- Microbiología) del INIFAP. Por el apoyo recibido al permitirme la realización del presente trabajo.

A todas las personas que colaboraron conmigo en la realización del presente trabajo.

GRACIAS !

F

CONTENIDO

INDICE	PAGINAS
1.- INTRODUCCIÓN	1
2.- MARCO CONTEXTUAL	5
2.1.1 SITUACIÓN ACTUAL DE LA INDUSTRIA AVÍCOLA Y LAS MICOTOXINAS EN MÉXICO..	5
2.2 MARCO TEORICO	6
2.2.1 MICOTOXINAS	6
2.2.2 AFLATOXINAS	8
2.2.2.1 DEFINICIÓN Y ESTRUCTURA	8
2.2.2.2 EPIDEMIOLOGÍA	9
2.2.2.3 CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO <i>Aspergillus spp</i>	10
2.2.2.4 CARACTERÍSTICAS DEFERENCIALES ENTRE <i>A. flavus</i> Y <i>A. parasiticus</i>	11
2.2.2.5 TIPOS DE AFLATOXINAS	12
2.2.2.6 TOXICIDAD	14
2.2.2.7 TOXICOCINETICA	15
2.2.2.7.1 ABSORCIÓN	15
2.2.2.7.2 DISTRIBUCIÓN DE AFB1 EN LOS TEJIDOS	15
2.2.2.7.3 BIOTRANSFORMACIÓN	18
2.2.2.8 EFECTOS DE LAS AFLATOXINAS	17
2.2.2.8.1 EFECTOS DE LAS AFLATOXINAS EN PLANTAS	18

F

2.2.2.8.2 EFECTOS DE LAS AFLATOXINAS EN ANIMALES Y EL HOMBRE	18
2.2.2.8.3 NIVELES MÁXIMOS PERMISIBLES DE AFLATOXINAS	21
2.3 OCRATOXINAS	22
2.3.1 DEFINICIÓN Y ESTRUCTURA.	22
2.3.2 EPIDEMIOLOGÍA	23
2.3.3 CARACTERÍSTICAS DE <i>Aspergillus ocraceus</i>	23
2.3.4 TOXICOCINETICA DE OCRATOXINA A.	24
2.3.5 MECANISMOS DE ACCIÓN	24
2.3.6 SIGNOLOGÍA CLÍNICA	25
2.3.7 LESIONES MACROSCÓPICAS	26
2.3.8 LESIONES MICROSCÓPICAS	27
2.3.9 PATOLOGÍA CLÍNICA	27
2.3.9.1 NIVELES MÁXIMOS PERMISIBLES DE OCRATOXINAS	28
2.4 TRICOTECENOS	29
2.4.1 DEFINICIÓN Y ESTRUCTURA	29
2.4.2 EPIDEMIOLOGÍA	30
2.4.3 CARACTERÍSTICAS DE <i>Fusarium tricinctum</i>	31
2.4.4 BIOSÍNTESIS	31
2.4.5 TOXICOCINETICA	32
2.4.6 MECANISMOS DE ACCIÓN	33
2.4.7 LESION MACROSCÓPICA	34
2.4.8 LESION MICROSCÓPICA	34
2.4.9 PATOLOGÍA CLÍNICA	35
2.4.9.1 NIVELES MÁXIMOS PERMISIBLES	35
2.5 REDUCCIÓN DE LA TOXICIDAD DE LAS MICOTOXINAS	36
2.5.1 VARIACIÓN ENTRE LOS PRODUCTOS DISPONIBLES PARA LA INDUSTRIA PECUARIA	39
2.6 MÉTODOS DE DESTOXIFICACIÓN DE MICOTOXINAS	40
2.6.1 EXTRACCIÓN CON DISOLVERNTES ORGÁNICOS	40

2.6.2 INACTIVACIÓN POR CALOR	41
2.6.3 IRRADIACIÓN	41
2.6.4 ADSORBENTES	42
2.6.4.1 ESTRUCTURA DE LOS ALUMINOSILICATOS.....	42
2.6.4.2 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS ALUMINOSILICATOS.....	43
2.6.5 INACTIVACION QUÍMICA	44
2.6.6 INACTIVACION BIOLÓGICA	45
2.6.6.1 PRODUCTO "ATOX ^{MR} "	46
2.7 ESTRATEGIAS PARA CONTROLAR LA CONTAMINACIÓN	
DE MICOTOXINAS	47
2.8 JUSTIFICACIÓN	50
2.9 OBJETIVOS	52
2.10 MATERIAL Y MÉTODOS	53
2.10.1 EXPERIMENTO <i>IN VITRO</i>	53
2.10.2 PRODUCCIÓN DE AFB1 EN MAÍZ	53
2.10.2.1 PURIFICACIÓN DEL EXTRACTO	54
2.10.2.2 DESARROLLO CROMATOGRAFICO	55
2.10.3 PRODUCCIÓN DE OCRATOXINA A Y TOXINA T-2	56
2.10.4 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL <i>IN VIVO</i>	58
2.11 RESULTADOS	61
2.11.1 GANANCIA DE PESO SEMANAL	61
A) POLLOS	61
B) POLLAS.....	62
2.12 DISCUSIÓN	63
2.12.1 ENSAYO EXPERIMENTAL <i>IN VIVO</i>	63
2.13 CONCLUSIÓN	68
2.14 LITERATURA CITADA	69
2.15 APÉNDICE	82
2.15.1 GRÁFICA #1	82
2.15.2 GRÁFICA #2	83
2.15.3 FOTOGRAFÍAS DE LESIONES MACROSCÓPICAS	84

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD INHIBITORIA DE LA MICOTOXICOSIS EN POLLOS DE ENGORDA POR LA ADICIÓN DE UN SECUESTRANTE (ATOX^{MR})

1 INTRODUCCIÓN

Los hongos pueden desarrollarse prácticamente sobre cualquier medio que contenga materia orgánica y suficiente humedad, por esa razón casi todos los alimentos terminados para animales, y sus ingredientes mayoritarios (granos y pastas de oleaginosas), contienen hongos o sus esporas. Generalmente la carga de hongos es muy baja, pero al incrementarse la humedad y la temperatura, se establecen las condiciones adecuadas para un rápido desarrollo de dichos hongos, enmohecando los alimentos, lo que origina un cambio drástico en las características de gustocidad (olor, sabor, textura, etc.), provocando con esto, que los animales lo rechacen. Por otro lado, también se afectan las propiedades nutrimentales, debido que los hongos crecen a expensas de los carbohidratos, proteínas, vitaminas y minerales del alimento o de sus ingredientes. La mayoría de los productos agrícolas (cacahuete, maíz, sorgo, arroz, soya, trigo, centeno, nueces, avena, semillas de algodón, frutos, etc.) son susceptibles a la contaminación con hongos, durante las diferentes etapas de su producción: en el campo de cultivo, en la precosecha, durante la maduración y secado, así como durante el transporte y el almacenamiento.

Ocasionando pérdidas, que en México se estiman en más del 30% en la producción agrícola en general. Sin embargo, no sólo el desarrollo y proliferación de los hongos sobre los alimentos ocasionan mermas en la productividad agropecuaria, ya que además existen algunas especies de hongos micotoxigénicos, es decir que durante su crecimiento producen una serie de compuestos altamente tóxicos denominados Micotoxinas y constituyen una seria amenaza a la productividad pecuaria y a la salud pública (Efectos: Cancerígenos, Mutagénicos, Inmunosupresores, Estrogénicos, Teratogénicos), por el consumo de productos agropecuarios contaminados con dichas toxinas o sus metabolitos.

HONGOS PRODUCTORES

Los principales hongos productores de micotoxinas son: *Aspergillus parasiticus*, *A. flavus*, *A. ochraceus*, *Fusarium tricinctum*, *F. graminearum*, *F. moniliforme*, *Penicillium citrinum*, *P. viridicatum*, *P. stekii*, *Claviceps purpurea*, *P. stekii* etc. y producen alrededor de 400 micotoxinas con diferentes estructuras químicas y propiedades tóxicas, que también dependen de varios factores, tales como: la dosis, la combinación de micotoxinas, la edad del animal, del estado fisiológico o productivo, del estrés, de la condición corporal o estado nutricional, así como del tiempo de exposición.

PRINCIPALES MICOTOXINAS EN LOS ALIMENTOS

Las toxinas que se encuentran con más frecuencia contaminando los alimentos y que representan los principales problemas de intoxicación son: Aflatoxinas (B1,B2,G1,G2), Ocratoxina A, Toxina T-2, Vomitoxina (Deoxinivanelol), Fumonisinas, Ergotoxinas, Citrinina, Oosporeina, Moniliformina y Zearalenona..

Las micotoxinas son metabolitos tóxicos productos del desarrollo de hongos en el grano y otras materias primas destinadas a la alimentación^{1,2,3}. Existe un amplia gama de éstos metabolitos, la mayoría no identificados¹. Su presencia en las materias primas y alimentos producen efectos tóxicos detrimentales en los animales dependen de los niveles de tiempo de exposición, la edad, el sexo, la susceptibilidad de especie entre otros. Estos efectos como disminución de la ganancia de peso, inmunosupresión, fallas en la coagulación, mal emplume, disminución en la producción de leche y huevo,

abortos, diarreas sanguinolentas, rechazo del alimento, edema pulmonar, trastornos nerviosos, nefropatías, mala absorción de nutrientes y pigmentos, que traen como consecuencia pérdidas económicas para los productores pecuarios por causa de las micotoxicosis^{1,2,3,4}.

Debido a éstos efectos se han diseñado mecanismos para contrarrestar los efectos de las micotoxinas, entre los que se encuentran los tratamientos físicos y químicos^{5,6}, que pueden resultar difíciles de aplicar en gran escala. Por tal razón, la industria de los alimentos para animales ha recurrido al uso de secuestrantes de micotoxinas, entre los que se encuentran los aluminosilicatos de origen mineral y sintéticos, paredes celulares de levaduras, polímeros reticulares, los cuales se adicionan al alimento y fijan las micotoxinas cuando éstas se encuentran en un medio acuoso^{7,8,9}. La efectividad de los secuestrantes ha sido comprobada para las aflatoxinas, toxinas producidas por *Aspergillus flavus*, en experimentos *in vitro* e *in vivo*^{11,12}. Sin embargo en los alimentos es factible encontrar otras micotoxinas, como la ocratoxina A, la toxina T-2, zearalenona, fumonisinas, deoxinivalenol, citrinina, entre otras.

Recientemente, nuevos secuestrantes han surgido en el mercado para contrarrestar los efectos deletéreos de OA y T-2, entre otras micotoxinas. Sin embargo, la evaluación de los secuestrantes de micotoxinas se efectúa en la mayoría de los casos sólo por experimentación *in vivo*, que intentan simular las condiciones naturales de secuestro, sin conseguirlo. La evaluación de un secuestrante, según Dale¹⁶ debería incluir experimentos *in vitro*, e *in vivo* con evaluación de lesiones macroscópicas e histológicas, además de bioquímica sanguínea; dado que los aluminosilicatos son básicamente arcillas obtenidas de minas pueden ser tóxicos per sé¹⁷.

Por otra parte, las micotoxinas difícilmente se encuentran solas en un ingrediente, debido a la presencia de diferentes hongos toxigénicos, los cuales son ubicuos y ampliamente distribuidos, o bien un mismo hongo es capaz de producir diversos metabolitos tóxicos⁴. Aunado a esto, y como resultado del desarrollo micótico, en los ingredientes se encuentran otros metabolitos fungales que no están identificados y que pueden ser tóxicos en menor proporción, pero que por sinergismo o aditividad,

incrementan la toxicidad de las micotoxinas que se encuentran en el alimento en mayor proporción y que puede ser identificada en el laboratorio. En diferentes estudios se han comparado los efectos tóxicos de la adición de grano inoculado con un tipo de hongo toxigénico y la adición de micotoxina pura, encontrándose diferencias en cuanto a mortalidad y lesiones más ampliamente diseminadas ^{18,19}.

La producción de micotoxinas en grano dentro de un laboratorio, y la contaminación del alimento con éste grano se asemeja más a lo que se puede encontrar en el campo, donde los ingredientes se contaminan naturalmente por hongos productores de diferentes micotoxinas además de diversos metabolitos no identificados. Por otro lado, gran parte de la funcionalidad y efectividad de los secuestrantes que se empleen en el campo dependerá del tipo de micotoxina; cuantas de ellas se encuentran en un alimento, y a la presencia de otros componentes derivados del metabolismo fúngico ^{4,16,18,19}. Es importante, por lo tanto la evaluación de un secuestrante tratando de simular una situación en el campo ^{16, 20}.

2 MARCO CONTEXTUAL

2.1 SITUACIÓN ACTUAL DE LA INDUSTRIA AVÍCOLA Y LAS MICOTOXINAS EN MÉXICO.

La industria avícola ocupa un papel estratégico en la alimentación de la población en México. De acuerdo con datos de la Unión Nacional Agraria (UNA), el 60.23% de los mexicanos incluyen en su dieta productos avícolas. En el año 2000 se produjeron 3.8 millones de toneladas de productos avícolas. La parvada nacional incluye más de 100 millones de gallinas ponedoras y 202 millones de pollos al ciclo ²¹. Igualmente, la avicultura es la principal industria transformadora de proteína de origen vegetal y animal: en la actualidad se consumen 11.1 millones de toneladas de alimento balanceado, de las cuales 7 millones de toneladas son granos forrajeros ²².

Los estudios sobre micotoxinas iniciaron después del descubrimiento de las aflatoxinas en 1960¹. Las pérdidas económicas por micotoxinas no han sido establecidas con certeza, pero se han estimado que, en Estados Unidos, el 2% del grano cultivado está contaminado con micotoxinas, y mundialmente en nivel, se calcula que cerca del 25% de los cultivos están contaminados con micotoxinas ¹⁷. En México se han realizado pocos estudios para evaluar la epidemiología de las micotoxinas en los alimentos balanceados para animales y el hombre. En 1991 La Unión Nacional de avicultores ²³, notificó que de 48 muestras de sorgo y alimento terminado analizado, el 12.5 y 25% respectivamente, se encontraron contaminados con más de 1000 ppb de deoxinivalenol (DON) y sólo 0.9 y 10 % respectivamente se encontraron con más de 1000 ppb de zearalenona.

De acuerdo con datos publicados por Medina ²⁴, en las muestras de sorgo por su laboratorio durante 1994, el 14.8% estuvieron contaminadas con Ocratoxina A, entre 5 y 360 ppb. En 1997, se encontraron 436 muestras de sorgo contaminadas con Ocratoxina A con valores de 1 a 15 ppb²⁴.

2.2 MARCO TEÓRICO

2.2.1 MICOTOXINAS

Las micotoxinas son metabolitos secundarios de hongos que no son utilizados por el hongo para desarrollarse ^{1,2,3} .

Se ha comprobado su actividad como insecticidas y como antibióticos por lo que se ha considerado que su función en el ciclo biológico del hongo es como un mecanismo de defensa y de competencia por un medio ¹ .

Existen más de 400 micotoxinas diferentes ^{11,25} . Siendo desconocidos los efectos de la mayoría de ellas. Sin embargo, es ampliamente conocido que muchos de éstos metabolitos ejercen diversos efectos indeseables sobre la producción en diversas especies domésticas, entre las que se encuentran las aves ⁴ . Su presencia en el alimento tiene como consecuencia pérdidas en la producción por disminución del crecimiento o de la producción del huevo ^{2,3} , inmunosupresión y mortalidad ^{2,3,26} , además de tener efectos negativos sobre la fertilidad en gallinas ²⁷ , y alterar la deposición de pigmentos ocasionando pérdidas económicas para los productores en zonas donde la pigmentación tiene un valor comercial ²⁸ .

La mayor parte de lo que se conoce de las micotoxinas se ha estudiado a partir de 1960, con el descubrimiento de la enfermedad X del pavo, donde se estableció que las aflatoxinas habían causado el problema ²⁹ . Enfermedades renales de origen

desconocido fueron subsecuentemente atribuidas a Ocratoxina A en países escandinavos, donde demostraron que Ocratoxina A causaba nefropatía en cerdos. Elling *et al.*³¹ señalaron que Ocratoxina A producía nefropatía en 1975. En Estados Unidos y Canadá se han señalado casos de mortalidad en pollos y pavos, con concentraciones de Ocratoxina A en los alimentos desde 0.3 hasta 16 mg/Kg³².

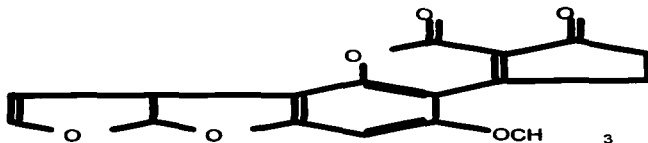
De las micotoxinas de mayor importancia actual, dada su toxicidad se mencionan las siguientes:

2.2.2 AFLATOXINAS

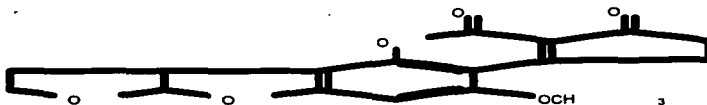
2.2.2.1 DEFINICIÓN Y ESTRUCTURA

Las Aflatoxinas son metabolitos secundarios de los hongos *Aspergillus flavus*,

A. parasiticus, *A. nomius*, y *A. Niger*, químicamente corresponden a las bis-dihidrofuranocumarinas polisustituídos ¹⁰⁵, y son los cancerígenos biológicos más importantes que se conocen.



AFLATOXINA B1



AFLATOXINA B2

La estructura de las aflatoxinas B consisten de un anillo de bifurano fusionado a un núcleo de cumarina con un anillo penténico, unido a una lactona de 6 elementos en el caso de las Aflatoxinas G1 y G2 ¹⁰⁶.

La capacidad tóxica de las aflatoxinas depende de la naturaleza química del sustituyente y de la región estereoquímica en que se encuentre dentro de los anillos de bifuranocumarina, así como de la capacidad de ser activado metabólicamente a la formación del producto altamente electrofilico ¹⁰⁷.

La aflatoxina B1 es la más tóxica y es precursora de todos los tipos de aflatoxinas restantes.

Presenta fluorescencia azul intensa al exponerse a la luz UV convencional de longitud de onda larga (350 nm) con tres picos máximos de adsorción en : 223, 265 y 362 nm. La fluorescencia es emitida a 425 nm. Es ligeramente soluble en agua y soluble en muchos solventes orgánicos de polaridad intermedia como: metanol, etanol, acetonitrilo, acetona y cloroformo.

Dentro de las propiedades químicas más importantes de la aflatoxina B1 tenemos las siguientes:

Fórmula mínima..... $C_{17}H_{12}O_6$
Peso molecular.....312
Rotación óptica.....D-558

2.2.2.2 EPIDEMIOLOGIA

Las Aflatoxinas afectan prácticamente a todos los seres vivos desde los virus hasta al hombre. Entre los síntomas que producen están vómitos, diarreas, cirrosis, hepatomas, proliferación de conductos biliares, inmunosupresión, daño teratogénico y abortos en diferentes animales y el hombre.

Los hongos del género *Aspergillus spp.* contaminan con sus toxinas diferentes alimentos: semillas de algodón, cereales y oleaginosas, productos lácteos, cárnicos, vino ect. Estos contaminantes de los alimentos actúan en concentraciones de partes por billón (ug/Kg). Son fluorescentes al exponerse a la luz ultravioleta (UV) de onda larga y resisten altas temperaturas, entre 20 y 320°C, por lo tanto no se eliminan con la cocción, fritura, ni con la pasteurización de los alimentos contaminados

2.2.2.3 CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO *Aspergillus* spp.

El género *Aspergillus* es importante por sus implicaciones en salud vegetal, animal y humana. Dos de las especies más productoras de Aflatoxinas son: *Aspergillus flavus* y *A. parasiticum*, que crecen como saprofitos en los desechos de las cosechas y en los suelos de cultivo contaminado en el campo, al igual que los esclerocios de *A. flavus* que se forman en los granos dañados y sanos de maíz.

Es importante identificar, por medio de análisis macro y micro morfológicos y químicos, a las dos especies mencionadas, pues comparten muchas características.

La producción de aflatoxinas en maíz, algodón y nueces es casi exclusivamente de *A. flavus*¹⁰⁰ quien produce en el maíz únicamente Aflatoxina del tipo B1 y B2, G1 y G2 en cacahuete¹⁰¹.

A. flavus es un hongo proteolítico, posee enzimas proteasas, capaces de degradar y utilizar fuentes proteicas, y el hongo *A. parasiticus* es lipolítico, posee enzimas llamadas lipasas capaces de degradar y utilizar fuentes lipídicas.

Otras características taxonómicas para diferenciar especies tan cercanas como:

A. flavus y *A. parasiticus*, son el crecimiento en placa de agar en las mismas condiciones, composición del sustrato, temperatura de incubación, edad del cultivo, color de las partes aéreas y diámetro de crecimiento de la colonia¹⁰².

2.2.2.4 CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES ENTRE *A. flavus* y *A. parasiticus*.

Características diferenciales	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus parasiticus</i>
Arreglo del esporangio	Biseriado	Mixto, generalmente uniseriado
Conidio	De liso a ligeramente rugoso	Claramente verrucoso
Superficie de la colonia	Irregular	Compacto
Color de la colonia	Verde amarillento (limón)	Verde hiedra (bandera)
Análisis químico	AFB1 + AFB2 + ác. ciclopiazónico	AB1+ AFB2+ AFG1+ AFG2 +AFM1
Características metabólicas	Proteolítico	Lipolítico

El proceso de nixtamalización del maíz las disfraza, ya que el pH alcalino abre el anillo de lactona de la Aflatoxina, y no permite la fluorescencia bajo luz UV y esto impide su detección¹⁰⁰. Con el pH ácido del jugo gástrico de los animales y del hombre, el anillo de lactona se cierra nuevamente, las Aflatoxinas recuperan su toxicidad y su fluorescencia, y pueden detectarse de nuevo.

2.2.2.5 TIPOS DE AFLATOXINAS

Hay diferentes tipos de Aflatoxinas designados según el color de su fluorescencia o se nombran por sus sustratos, así tenemos:

- B1** con fluorescencia azul (blue) el número 1 indica que es la que viaja más rápido en el corrimiento cromatográfico de capa fina.
- B2** es un derivado de la B1, carece de la doble ligadura en el furano exterior, con fluorescencia azul, el número indica que viaja más lento en la placa cromatográfica de capa fina.
- M1** es un derivado hidroxilado de la Aflatoxina B1 que se metaboliza y pasa a la leche de ahí su nombre (milk).
- M2** es un derivado de la M1 y el número indica que corre más lento en la placa cromatográfica de capa fina.
- G1** es un derivado de la Aflatoxina B1 con un anillo de 5 carbonos (pentosas) en lugar del anillo con 6 carbonos característicos de las de tipo B1 y tiene fluorescencia verde (green).
- G2** es un derivado de la Aflatoxina B1 con fluorescencia verde pero carece de la doble ligadura en el furano extremo, se número 2 porque es más lento en su corrimiento cromatográfico que la anterior, apareciendo hasta abajo.

La producción de los distintos tipos de Aflatoxinas, depende de la especie del hongo, el tipo de cepa, del balance de nutrientes en el medio y de pH y la presencia de trazas de metales como: Mn, Mg y Va, favorecen la formación de las Aflatoxinas hidroxilasas, es decir, AFM1, AFM2 ¹⁰³.

La producción de Aflatoxinas se favorece con humedad mayor del 16% y temperatura de 11 hasta 40°C; el rango óptimo de desarrollo del hongo está entre los 25 y los 30°C ¹⁰⁰.

El género **Aspergillus** produce Aflatoxinas sobre una gran variedad de sustratos, en los cacahuates, las condiciones óptimas para el crecimiento, multiplicación del hongo y producción de Aflatoxinas son: temperatura entre 25 a 30°C , y humedad del 16%.

Aspergillus flavus, requiere de una humedad relativa del aire del 85% que corresponde a un 18.3-18.5% de humedad en cereales, las temperaturas mínima, óptima y máxima de producción de Aflatoxinas son 12, 27-30 y 40-42°C respectivamente ¹⁰⁰.

En ensayos *in vitro* con la activación microsomal de algunas aflatoxinas, se estableció el siguiente orden de toxicidad: B1> G1 > B2a > M1. Es conveniente señalar que existen factores en los animales que determinan su susceptibilidad a los efectos tóxicos, como son: edad, sexo, estado fisiológico, reproductivo y nutricional ¹⁰⁸.

Diferencias en la susceptibilidad a AFB1 de las especies animales ¹⁰⁹.

ESPECIE	DL ₅₀ (mg/kg de peso corporal)
Conejo	0.30 -0.50
Pato	0.34 -0.56
Gato	0.55
Cerdo	0.62
Trucha arcoiris	0.81
Perro	1.00
Cobayo	1.40 - 2.00
Borrego	2.00
Mono	2.20
Pollito	6.50 - 16.50
Ratón	9.00
Hamster	10.20
Rata	5.5 - 17.90

Los métodos de control de Aflatoxinas en granos y otros alimentos son tratamientos con amonio ¹¹⁰, ya que los términos (freído, tostado, pasteurización, etc.) no disminuyen la concentración de Aflatoxinas significativamente. Los aluminosilicatos, son agentes alcalinos que se han usado, así como detergentes reductores con grupos -SH que reaccionan con la Aflatoxina B1 activada o sea el 2,3-epóxido- aflatoxina B1 ¹¹¹.

2.2.2.6 TOXICIDAD.

Los efectos tóxicos de la AFB1 dependen de la dosis y tiempo de exposición.

De acuerdo a estos parámetros es posible diferenciar dos formas de aflatoxicosis, denominadas aguda y crónica. La intoxicación aguda se reconoce como una enfermedad hepatotóxica, y caracterizada clínicamente por depresión, anorexia, ictericia y hemorragias ¹³⁴. Las lesiones histológicas hepáticas incluyen necrosis periportal, proliferación de conductos biliares e hiperplasia de células ovasles.

La aflatoxicosis crónica es el resultado de la ingesta continua de bajas dosis de AFB1 durante un período largo de tiempo. Produce una disminución importante en la ganancia de peso, consumo de alimento y conversión alimenticia en ganado bovino, cerdos y aves, otros efectos importantes son la inmunosupresión, depleción de órganos linfoides y coagulopatías. La AFB1 produce hepatotoxicidad aguda a niveles menores a la mitad de la DL₅₀. La toxicidad de las aflatoxinas G1, B2, y G2 fueron aproximadamente 50,20 y 10 % menor respecto a la de la AFB1, cuando se probaron en varias especies animales y en cultivos celulares de líneas de mamíferos ¹³⁵.

2.2.2.7 TOXICOCINETICA

2.2.2.7.1 Absorción.

La absorción es el conjunto de procesos, por el cual los xenobióticos cruzan las membranas celulares y entran al torrente sanguíneo.

Los principales sitios de absorción son el tracto gastrointestinal, pulmones y piel. La velocidad del transporte de los xenobióticos a través de las membranas depende de varios factores: liposolubilidad, tamaño molecular y grado de ionización ¹³⁶.

Las aflatoxinas son sustancias con un alto coeficiente de partición (hexano/agua), de bajo peso molecular (312.06 daltones) y no ionizables, por lo que fácilmente son absorbidas en el sitio de exposición hacia el flujo sanguíneo.

2.2.2.7.2 Distribución de AFB1 en los tejidos.

Las aflatoxinas se infiltran a la mayoría de los tejidos blandos y depósitos de grasa, sin embargo, la principal acumulación ocurre en los órganos biotransformadores de toxinas, tales como hígado y riñón Sawhney y colaboradores, en 1973 administraron una dosis oral de AFB1 marcada con ¹⁴C a gallinas y la concentración más alta se detectó en hígado, seguido por músculo, páncreas, piel, tejido adiposo pulmones y bazo. En otro estudio, realizado por Harland y Cardeilhac en 1975, obtuvieron resultados mostraron que los principales sitios de acumulación fueron: hígado, riñón y médula ósea y que se detectaron los niveles más bajos en cerebro y tejido adiposo.

Por otro lado Obioha y colaboradores en 1986, sugirieron el curso temporal de la administración única de una dosis oral de 1.0 mg de AFB1- ¹⁴C a pollos de 3 semanas de edad. Después de 12 horas la mayor marca radioactiva se encontró en el contenido de la molleja, seguido por el tejido hepático e intestino y este patrón de distribución persistió durante 24 horas. El tracto intestinal y su contenido presentaron mayor

concentración de AFB1 que cualquier otro tejido, después de que el alimento había pasado a través de la molleja. La mayor cantidad relativa de la radioactividad detectada en hígado demostró la acumulación de la AFB1 en dicho tejido.

2.2.2.7.3 Biotransformación.

Las reacciones de biotransformación enzimática, se dividen en dos fases:

Fase I.- Los xenobióticos a través de las reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis, aumentan su hidrosolubilidad y pueden ser activados o inactivados dependiendo de la naturaleza del xenobiótico.

FASE II.- Los productos de la fase I pueden conjugarse con ácido glucorónico, sulfatos, glutatión, aminoácidos, grupos acetilos o metilos, para incrementar su hidrosolubilidad y facilitar su excreción a través de la bilis, orina, leche o huevo, de acuerdo a la especie animal involucrada.

La AFB1. Es un xenobiótico que requiere de la activación metabólica por las enzimas de la función mixta oxidasa (FMO) contenida en los microsomas hepáticos, por lo que aquellos factores que sean capaces de activar o inhibir dicha función, también influirán en la toxicidad de esta micotoxina.

Durante la Fase I la AFB1 es biotransformada por las enzimas del citocromo p-450 hacia los metabolitos hidrosolubles M1, Q1 y P1 y aflatoxicol¹³⁷. Las enzimas de esta fase están localizadas en la fracción microsomal de los tejidos, donde las células contienen una abundante cantidad de retículo endoplásmico liso (hígado, riñón, intestino y pulmones).

Se han identificado 5 isoenzimas del citocromo CYP-450, responsables de la biotransformación de la AFB1¹³⁸. La formación de la AFM1 se debe a la actividad

específica de la CYP-488 microsomal, mientras que la formación de la AFB1 es catalizada por la CYP-448 y CYP-450 ¹³⁹.

Las familias de enzimas del CYP-450, localizadas en el retículo endoplásmico liso, están involucradas en las reacciones de hidroxilación, O-desmetilación, epoxidación de AFB1, mientras que las reductasas citosólicas son las responsables de la reducción de AFB1, lo que produce el derivado hidroxilado conocido como aflatoxicol o Ro ¹⁴⁰.

2.2.2.8 EFECTOS DE LAS AFLATOXINAS

2.2.2.8.1 EFECTOS DE LAS AFLATOXINAS EN PLANTAS ¹¹².

La Aflatoxina B1 a dosis de 100 µg, produce enanismo por acortamiento del hipocotilo en lechuga. Las Aflatoxinas también inhiben la producción de clorofila y la germinación, estos efectos se reducen con la adición del ácido α -indolilacético.

Las aflatoxinas son derivados cumarínicos con grupo de lactona. Las cumarinas y las lactonas insaturadas tienen un efecto sinérgico sobre el ácido α -indolilacético cuando se encuentran en bajas concentraciones y por tener un efecto antagónico cuando se encuentran en concentraciones altas; lo anterior se cumple también para la aflatoxina B1 si se utilizan secciones de tallo de la planta del chícharo, *Pisum sativum* ¹¹³.

Las Aflatoxinas afectan el metabolismo de las semillas de algodón, *Gossypium hirsutum*. El ácido giberélico que estimula la formación de enzimas como las lipasas y las α -amilasas durante la germinación, ve disminuida su efectividad cuando se aplica sobre semillas que fueron expuestas a las aflatoxinas, al disminuir considerablemente la actividad de esta enzima. Las Aflatoxinas tienen acción inhibitoria sobre la síntesis de proteínas ¹¹⁴.

Un efecto de las Aflatoxinas sobre la actividad metabólica de la raíz de la **papa**, *Ipomoea batatas*, es que la Aflatoxina B1, inhibe la reproducción de las mitocondrias al interferir con la replicación del ADN mitocondrial aunque en este caso no hubo efecto en la síntesis de proteínas en sí ¹¹⁵.

En tomates y maíz, se observó desecación y crecimiento reducido cuando se trataron con soluciones de *Aspergillus flavus* ¹¹⁶. Las raíces de haba *Vicia faba*, tratadas con soluciones de Aflatoxinas, muestran fragmentación cromosómica, inhibición de mitosis y aumento en la frecuencia de anafase anormales ¹¹⁷. La microscopía electrónica ha demostrado un incremento de cuerpos grasos en las células vegetales. La Aflatoxina B1 actúa como un antimetabolito que se une al DNA e interfiere con la biosíntesis de ARN ¹¹⁸. Otros efectos en estructura celular por Aflatoxinas sobre granos son la reducción del número de ribosomas y la inhibición de la formación de la grana en cloroplastos.

2.2.2.8.2 EFECTOS DE LAS AFLATOXINAS EN ANIMALES Y EL HOMBRE.

Los efectos son muy variables, dependiendo de varios factores como: edad, sexo, especie, estado nutricional, la dosis ingerida, frecuencia de ingestión y composición de la dieta ¹¹⁹.

El tipo y la intensidad de la respuesta varía entre individuos de una misma especie y estos síntomas van desde la irritación de las mucosas intestinales hasta intoxicaciones severas que traen hemorragias internas, vómitos, diarreas, o bien daños crónicos como son la cirrosis, el cáncer en hígado y los daños teratogénicos ó malformaciones en fetos. El Síndrome de Reye, en niños del sureste asiático, también se asocia a las Aflatoxinas y se manifiesta por ictericia (amarillamiento), hígado graso y otros daños hepáticos.

Una intoxicación trae la muerte súbita del animal afectado por coagulopatía diseminada y falla hepática. La forma **aguda** viene acompañada con procesos patológicos que

pueden afectar diversos órganos y sistemas, evolucionando hasta la muerte, la curación total a la cronicidad.

La forma **subclínica**, es asintomática y trae grandes pérdidas económicas al afectar a los animales domésticos causando: bajo índice de conversión, menor ganancia diaria de peso, disminución de la producción de huevo y leche, baja fertilidad, abortos y nacimientos de crías débiles, descenso en la tasa de incubación de huevo de gallina, disminución de la tasa de anticuerpos de resistencia y menor resistencia a enfermedades ¹¹⁹.

En general se llama **aflatoxicosis** a la enfermedad causada por la ingestión de alimentos contaminados con Aflatoxinas. Las aflatoxinas afectan principalmente al hígado, causan degradación de hepatocitos, proliferación de conductos biliares hasta necrosis hemorrágicas ¹²⁰.

En **aflatoxicosis**, bajan los niveles plasmáticos de las enzimas de síntesis de ácidos grasos y lípidos, disminuye la excreción de lipasa pancreática y la velocidad del transporte lipídico; la acumulación de grasa en hígado y la aparición de un Síndrome de mala absorción disminuye el crecimiento de los animales ¹²¹.

Las Aflatoxinas interfieren con los mecanismos de coagulación sanguínea al afectar la protrombina; Aumenta la fragilidad capilar y disminuye la resistencia de los tejidos protectores que circulan a los vasos por el aumento en la actividad de las enzimas lisosómicas, que degradan los componentes intra y extracelulares de este tejido ¹²².

Las consecuencias son coagulopatías generalizadas, más hemorragias espontáneas y aumento en el tiempo de sangrado ¹²³.

Las gallinas con aflatoxicosis disminuyen la absorción de calcio, producen menos huevos, que pierden su potencial de incubación, se altera la digestión de las proteínas y la absorción de los aminoácidos, y aumenta el requerimiento proteínico, se retrasa el crecimiento al disminuir la síntesis de ADN, RNA y proteínas en los ribosomas ¹²⁴.

En ganado vacuno, la producción de leche cae drásticamente y en ella aparece Aflatoxina M1 (AFM1), que procede del metabolismo de la AFB1. La AFM1 en leche es del 1 % de la AFB1, ingerida por el animal ¹²⁵.

Se reduce la concentración de vitamina A en hígado y en sangre, tanto en aves como en ganado vacuno y porcino, y aunque se administren dosis masivas de esta vitamina no se reduce la mortalidad de las aves ¹²⁶. La vitamina K, al igual que las Aflatoxinas tiene anillos cumarícos. Se ha sugerido que las Aflatoxinas interfieren en el metabolismo de la vitamina K, ésta disminuida, no se sabe de alguna relación entre los niveles de vitamina K y protrombina durante la aflatoxicosis ¹²⁷.

La deficiencia de la vitamina B1 (Tiamina) protege a los animales de los efectos de las Aflatoxinas, debido quizá a que la falta de vitamina moviliza la reserva lipídica o bien, a que se interfiere con el metabolismo hepático de las Aflatoxinas ¹²⁸. En cambio, la deficiencia de vitamina B2 (Riboflavina), aumenta la sensibilidad del animal hacia las Aflatoxinas ya que la ausencia de vitamina impide al animal detoxificar sus sistemas ¹²⁹.

La aflatoxicosis interfiere con el sistema inmunológico (mortalidad, fagocitosis, reconocimiento del antígeno, producción de anticuerpos, complemento e interferón) ¹³⁰. Produce infertilidad en cerdos y trae fallas en la inseminación, abortos y alta mortalidad entre lechones lactante ¹³¹. Las lesiones renales tardías, sugieren que la causa son los derivados de las aflatoxinas y no las Aflatoxinas en sí. Los túbulos proximales se necrosan, hay separación de epitelio, exudación granular y congestión de los vasos sanguíneos intersticiales ¹³².

Las aflatoxinas requieren una activación metabólica para provocar efectos mutágenos y cancerígenos. La ruta principal de activación proviene vía ataque de oxigenasas en el hígado ¹³³.

Essigman y Lin en 1977 con trabajos paralelos, establecen que el 15, 16-dihidro-16-[N7-guanidil], 15-hidroxi-AFB1, es el productor principal de la hidrólisis ácida del aducto AFB1-DNA o AFB1-RNA. Estos aductos se forman en el hígado de ratas *in vivo*.

La unión covalente de la AFB1 con la guanina es capaz de inducir mutaciones "frame shift", es decir que al intercalarse la AFB1 juntos hacen que el mecanismo de sustitución de bases se altere produciendo la pérdida de una base en la secuencia de ADN ó RNA iniciando así el proceso canceroso.

Las Aflatoxinas son metabolitos sumamente tóxicos que normalmente se están ingiriendo en alimentos (tortillas, cereales, productos lácteos, cárnicos, vinos, especias, etc.) y que si no se controla su concentración puede causar efectos nocivos a todos los seres vivos, ya que también están presentes en alimentos balanceados para animales.

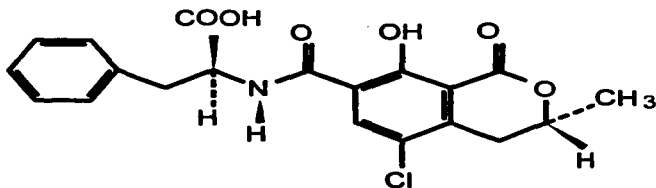
2.2.2.8.3 NIVELES MÁXIMOS PERMISIBLES DE AFLATOXINAS.

ESPECIE ANIMAL	ALIMENTO	LIMITE (μ g / Kg)
Pollos	Maíz, Sorgo, Pasta de Soya	10
Caballos	Alimento terminado	20
Ganado Lechero	Maíz, Alimento terminado	20
Ganado de Carne	Maíz, Alimento terminado	50
Cerdos de 50 Kg	Maíz, Alimento terminado	20

2.3 OCRATOXINAS.

2.3.1 DEFINICIÓN Y ESTRUCTURA.

Son un grupo compuesto por 7 metabolitos tóxicos cuya estructura química está compuesta por isocumarina ligada al aminoácido L- α -fenilalanina^{1,2,3,30}. Fueron primeramente asociadas a *Aspergillus ocraceus*, de donde proviene su nombre, aunque pueden ser producidas por diferentes especies de *Aspergillus* y de *Penicillium*^{1,30,33}. De los 7 metabolitos tóxicos identificados, la Ocratoxina A es la más frecuentemente encontrada como contaminante de los alimentos, además de ser la más tóxica para las aves^{2,3}, sobre todo para pollos en crecimiento^{33,34,35}.



OCRATOXINA A

2.3.2 EPIDEMIOLOGIA

Las cepas toxigenas de *A.ocraceus* han sido aisladas de diferentes ingredientes: cacahuete, sorgo, pimienta roja, frijol, arroz, soya, café, y pan ^{2, 3, 33}.

Penicillium viridicatum han sido aislado de trigo, frijol, cacahuete, alimentos peletizados, maíz y cebada ³³. En zonas geográficas de clima frío, se han aislado hongos del género *Penicillium* productores de Ocratoxina A, mientras que en zonas de clima templado, la producción ocurre por especies del género *Aspergillus* ³⁰.

Se ha demostrado que la Ocratoxina B, Citrinina y Ácido penicílico son producidos por los hongos productores de Ocratoxina A ^{19, 33, 36}. Las concentraciones de Ocratoxina A obtenidas del análisis de diferentes materias primas van desde 5 ppb hasta 70 ppb ³⁷.

2.3.3 CARACTERÍSTICAS DE *Aspergillus ocraceus*.

Es un hongo contaminante común de varios ingredientes alimenticios, y más común en regiones tropicales y subtropicales que *Penicillium*. Los organismos forman colonias de rápido crecimiento, de color amarillento-café. Los conidióforos no son ramificados, aseptados, y tienen una vesícula en la punta del conidióforo de donde se producen las esporas, y con apéndice hinchado. Las colonias en medio extracto de malta agar se forman más rápido que en medio Czapek. Es usualmente cultivado a 25°C ^{38, 39}.

La cantidad de Ocratoxina A producida por alguna especie dada es influenciada por varios factores, entre ellos la actividad de agua (Aw), cuyo valor ha sido encontrado en rangos de 0.8 a 0.9 para una óptima producción de Ocratoxina A, el tipo de sustrato y la temperatura ³⁰.

2.3.4 TOXICOCINETICA DE Ocratoxina A.

Ocratoxina A es altamente soluble en solventes orgánicos y solo ligeramente soluble en agua, por lo que su absorción a nivel de membrana ocurre fácilmente ². Ocratoxina A se deposita en los tejidos suaves, encontrándose las concentraciones más altas en riñón ten menor cantidad en hígado. Se ha mencionado una baja distribución de Ocratoxina A en el músculo ³. La principal reacción de biotransformación es la hidrólisis a O□ y L-fenilalanina.

Un pequeño porcentaje es convertido a 4-hidroxi-ocratoxina A. La eliminación ocurre principalmente por vía urinaria, y en menor proporción por vía fecal.

La vida media de la Ocratoxina es de 4 horas, y sus residuos desaparecen después de retirar el alimento en un tiempo de 4 horas o menor. Se deposita en el huevo y le reduce la incubabilidad ^{2,3,40}. En aves, después de diferentes periodos de administración y a diferentes dosis, se han encontrado residuos en hígado y en músculos ⁴¹. Miccoo *et al* ⁴⁰ alimentaron pollos de engorda y gallinas de postura con 50 ppb de Ocratoxina A durante 64 y 169 días, respectivamente, encontrando residuos de hasta 11 ppb de Ocratoxina A en hígado y 0.8 ppb en músculo de la pierna de las gallinas.

2.3.5 MECANISMOS DE ACCIÓN.

Ocratoxina A tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima fenilalanina-RNA sintetasa, la cual participa en el paso inicial de la síntesis de proteínas ³⁰.

En el riñón, la Ocratoxina A reduce la codificación del la codificación del RNAm para la síntesis de fosfoenolpiruvato carboxinasa (PECK), enzima que cataliza la descarboxilación del oxalacetato a fosfoenolpiruvato. Dicha enzima representa un eslabón entre el ciclo de transformación del ácido cítrico y la gluconeogénesis, la cual es la principal actividad metabólica generadora de carbohidratos que se realizan en la corteza renal ^{3,30}.

Se ha demostrado que Ocratoxina A afecta la movilización del glicógeno hepático, lo cual ha sido atribuido a un mal funcionamiento del sistema de fosforilasas de la glucogenolisis ⁴². En condiciones normales, el glucógeno es degradado por la enzima glucógeno fosforilasa después de la activación de la fosforilcinasa, que a su vez es activada por AMPc dependiente de la proteína cinasa ^{42,43}.

2.3.6 SIGNOLOGIA CLÍNICA.

Los pollos intoxicados sufren de emaciación, diarrea, pobre crecimiento e incremento de la mortalidad. Ocratoxina A causa un incremento en la ingesta energética y producción de calor ^{2,3}.

Los valores de la DL₅₀ para pollitos de un día varían desde 2.14 hasta 3.9 mg/Kg ^{3,30}. Se ha señalado también efectos adversos en el sistema inmune. Chang *et al* ⁴⁴, utilizando Ocratoxina A cristalina y purificada en concentraciones desde 0.5 ppm, observándose una reducción significativa en las cuentas de leucocitos y linfocitos circulantes cuando se utilizaron concentraciones de 0.5 ppm. El número de monocitos se encontró reducido cuando se utilizaron 2 ppm de Ocratoxina A ⁴⁴.

En otro estudio, los mismos investigadores observaron alteraciones en la actividad fagocítica y locomotora de los heterófilos cuando se utilizaron concentraciones de 4 y 8 ppm ⁴⁵. Singh *et al* ⁴⁶, encontraron una reducción de la inmunidad mediada por células mediada por pruebas de sensibilidad cutánea y cuentas de linfocitos T, cuando se utilizaron concentraciones desde 0.5 a 2 ppm en la dieta. En el mismo estudio, el número de células encontradas en timo, bolsa de Fabricio, y bazo, se encontró reducido ⁴⁶.

En estudios realizados en cerdos se encontraron que en la forma aguda se observan deprimidos, presentan anorexia, paresia, edemaperineal, ascitis, hidrotorax, y edema

subcutáneo y moscatérico. En forma crónica, disminuye el apetito y el crecimiento, hay polidipsia, poliuria, diarrea y deshidratación. Los riñones aumentan de tamaño, el color es pálido y aparecen quistes y focos miliares fibrosos ⁷⁵.

Existe la presentación subclínica:

- ♣ Índice de conversión deficiente
- ♣ Menor ganancia diaria de peso
- ♣ Descenso en la tasa de fertilidad
- ♣ Aumento en el número de abortos
- ♣ Muerte fetal
- ♣ Disminución del tamaño de camada
- ♣ Mayor número de lechones débiles al nacimiento
- ♣ Inmunodepresión
- ♣ Efectos teratogénicos
- ♣ Efectos carcinogénicos
- ♣ Dermonecrosis.

2.3.7 LESIONES MACROSCÓPICAS.

Se han observado deshidratación, emaciación y erosiones en la molleja, hemorragias proventriculares y enteritis catarral ². Los riñones se observan pálidos y aumentados de tamaño. El hígado puede estar aumentado de tamaño, pálido, friable y hemorrágico ^{2, 3}. Puede ocurrir la acumulación de uratos en el parénquima renal y en membranas serosas, y se ha mencionado también una reducción en la fuerza requerida para la ruptura de los huevos tibiotarsales, así como adelgazamiento de la pared intestinal ³.

Con diferentes dosis de Ocratoxina A se ha observado aumento de tamaño de riñón, proventrículo, molleja e hígado mientras que la bolsa de Fabricio se encuentra reducida de tamaño ^{2, 3, 34, 47}.

2.3.8 LESIONES MICROSCÓPICAS.

Se han observado principalmente en riñón e hígado. En aves que consumieron entre 2 y 4 ppm de Ocratoxina A por veinte días, se observó dilatación severa de los túbulos contorneados proximales, así como engrosamiento de la membrana basal del glomérulo.

Una concentración superior a 4 ppm en la dieta produjo incremento en los depósitos de glucógeno en los hepatocitos. En hueso se han observado lesiones como osteopenia generalizada y alteración de la oscilación tanto endocondral como intramembranosa ^{2, 3, 34, 47}.

2.3.9 PATOLOGÍA CLÍNICA.

En aves tratadas con 2 ppm de Ocratoxina durante 21 días, se ha informado de la reducción en las concentraciones de hemoglobina, sin reducción en el número de eritrocitos circulantes, aunque sí el número de las células blancas circulantes.

También se presenta un incremento de la glucosa circulante y reducción de la actividad de las enzimas hexocinasa y aldolasa. Otras enzimas séricas como la fosfatasa alcalina, gama transferasa, aspartato amino transferasa (AST) y otros parámetros como ácido úrico y creatinina se encuentran elevados, tanto que las concentraciones de proteínas séricas, albúmina, fósforo, potasio y colesterol se ven reducidos ^{2, 3, 34, 47}.

2.3.9.1 NIVELES MÁXIMOS PERMISIBLES DE OCRATOXINAS.

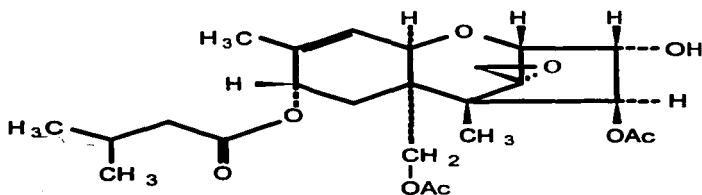
ESPECIE ANIMAL	ALIMENTO	LIMITE (μ g/Kg)
Pollos	Maíz, Sorgo, Pasta de Soya	10
Caballos	Alimento terminado	10
Ganado Lechero	Alimento terminado	20
Ganado de Carne	Alimento terminado	50
Cerdos de 50 Kg	Alimento terminado	10

2.4 TRICOTECENOS.

2.4.1 DEFINICIÓN Y ESTRUCTURA.

Los tricotecenos comprenden un vasto grupo de más de 100 metabolitos fungales ^{2,3}. Producidos por diferentes especies de hongos del género *Fusarium spp*, además de los géneros *Myrothecium*, *Stachybotrys*, *Cephalosporium*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Cylindrocarpon*, y *Phomopsis* ^{2,3}.

La estructura química descrita en general para éste grupo de micotoxinas es un núcleo tetracíclico sesquiterpénico con un anillo epóxido característico ^{2,3,50}, el cual les confiere una alta estabilidad y resistencia a los tiempos prolongados de almacenaje y temperaturas de cocción ^{2,50}.



TOXINA T-2

Todos los Tricotecenos que se presentan en la naturaleza contienen un enlace olefínico en el carbono 9 y 10, un grupo epóxido en C-12 y C-13, y usualmente un hidroxilo o grupo éster en C-3, C-7, C-8, y C-15 ⁵⁰. Ueno ⁵¹ designó a los tricotecenos en cuatro grupos: A, B, C, D. Los del grupo A presentan una Fluorescencia después de ser separados por cromatografía de capa fina y tratados por aspersion con ácido sulfúrico. Este grupo incluye T-2, neosolanol, HT-2, y diacetoxiscirpenol (DAS). Los del grupo B exhibieron una mancha café mediante el mismo proceso, e incluyeron a nivalenol, fusarenona-X, deoxinivalenol (DON) y diacetil nivalenol.

Químicamente, la diferencia entre ambos se encuentra en el C-8, en donde los del tipo B tienen un grupo cetona, y los del grupo A carecen de éste grupo, teniendo en su lugar un grupo H y un éster u OH ⁵⁰. Los tricotecenos del grupo C contienen un anillo epóxido en las posiciones C-7, C-8, e incluyen el componente denominado crotocina, producido por el hongo *Cephalosporium crotocinigenum*.

Los del tipo D incluyen los derivados macrocíclicos de verrucarinas y verrucarol. Estos tienen un anillo macrocíclico en la posición C-4, y C-15 ⁵⁰. Otros autores los dividieron de inicio en macrocíclicos, cuya toxicidad no ha sido estudiada en aves, que incluye verrucarina y verrucarol, y los no macrocíclicos, comúnmente encontrados como contaminantes de los alimentos, y que incluyen a todos aquellos tricotecenos de importancia para las aves, y a su vez se subdividen a los tricotecenos del grupo a, que incluyen a la toxina T-2, HT-2, diacetoxiscirpenol (DAS), la fusarenona X, deoxinivalenol (DON), y nivalenol perteneciente al grupo B ^{2,3}.

2.4.2 EPIDEMIOLOGÍA.

T-2 es la micotoxina más conocida de los tricotecenos, y es de amplia distribución en regiones de clima templado ⁵⁰. Su presentación en climas tropicales y subtropicales no ha sido problema, dado que en éstas regiones se han aislado otras especies del género *Fusarium* (*F. equiseti*, *F. solani* y *F. moliniforme*). De todas las especies productoras de T-2, *Fusarium tricinctum* ha sido la más frecuentemente aislada ⁵⁰.

La contaminación ocurre en diferentes granos tales como maíz, trigo, cebada, avena, arroz, sorgo, y en alimentos terminados, y se ha informado que a nivel mundial, son más frecuente en aquellas regiones geográficas con climas húmedos ¹.

El desarrollo fungal se ha encontrado favorecido por alta humedad y temperatura desde 6 hasta 24 °C ^{1,2, 3, 50}. La intoxicación natural en el humano y animales domésticos con gallinas, pavos, bovinos, equinos y cerdos causada por el consumo de alimentos contaminados con *Fusarium spp* se ha descrito en diferentes países como Japón, Corea, Estados Unidos y Rusia. Una de las intoxicaciones conocidas es la aleukia tóxica ocurrida en Rusia en 1994, la cual causó la muerte a miles de personas ^{50, 52}.

2.4.3 CARACTERÍSTICAS DE *Fusarium tricinctum*.

Cuando se cultiva en medio Czapek, *F. tricinctum* llega a producir colonias de color blanco, rojo o carmín. Su micelio aéreo es abundante, algodonoso y flooso. Las microconidias son más abundantes que las macroconidias, formadas en filídes cilíndricas de conidióforos ramificados. El hongo se ha cultivado en rangos de temperatura de 6 a 25 °C. Ueno ⁵³, obtuvo 331 mg/l de T-2 al cultivar al hongo a 27 °C por dos semanas, Lillehaj ⁵⁴, produjo la mayor concentración de T-2 (9.9 g/ 1.2 Kg), después de tres semanas cuando cultivó el hongo a 15°C, en comparación con 20 y 25°C ⁵⁴.

2.4.4 BIOSÍNTESIS.

Poco se sabe con certeza acerca de la formación de los tricotecenos, Joffe ⁵⁰, mención que se forman por la ciclización del farnesil pirofosfato, seguido por dos transferencias consecutivas del grupo 1-2 metil. Mediante estudios con isótopos radioactivos, se ha demostrado que el acetato de sodio y el ácido mevalónico son requeridos durante la biosíntesis de los tricotecenos. La biosíntesis de una u otra micotoxina por una misma

especie de hongo se menciona también ser dependiente del sustrato y la temperatura de incubación del hongo⁵⁰.

2.4.5 TOXICOCINÉTICA.

La cinética de la absorción, distribución, metabolismo y eliminación ha sido estudiada por varios autores.

Después de la administración oral se han encontrado concentraciones máximas en sangre después de 1 hora post administración (4,5).

Las respuestas biológicas sugieren una rápida absorción desde las zonas expuestas, las cuales son principalmente piel y tracto gastrointestinal³. La piel y el tejido subcutáneo actúan aparentemente como reservorios. Estudios con toxina T-2, marcada radiactivamente muestran que dicha toxina se distribuye a hígado, riñón, estómago y bilis³. Las concentraciones más altas de toxina T-2 se han encontrado en los tejidos de órganos involucrados en su excreción, especialmente bilis, vesícula, hígado, riñón e intestino. La detoxificación ocurre en dos fases como la mayoría de los xenobióticos.

En la fase I ocurren reacciones de desalilación (hidrólisis), hidroxilación (oxidación) y deepoxidación (reducción). La hidrólisis inicial produce metabolitos casi tan tóxicos como los originales (HT-2, MAS) por lo que no se consideran realmente una detoxificación. La hidrólisis posterior de T-2 produce los alcoholes tetraol y scirpentriol, menos tóxicos³. Las reacciones de oxidación han sido reportadas sólo para T-2. Se ha indicado también la reducción del anillo 12,13-epóxido por parte de la microflora intestinal, lo cual es una vía importante para la detoxificación de la toxina⁵⁵.

De las reacciones de fase II sólo la conjugación glucorónica ocurre para la toxina T-2, DAS y DON. Estos compuestos conjugados son excretados mediante la bilis y pueden

ser liberados nuevamente por la microflora a su paso por el tracto gastrointestinal y entonces ser reabsorbidos ³.

En cuanto a los residuos, varios estudios han sido realizados para determinar la presencia de tricotecenos o sus metabolitos en diversos tejidos. En pollos alimentados con 4 ppm de DON durante 28 días, y gallinas que recibieron 5 ppm de DON durante 190 días, no tuvieron niveles detectables en huevos, músculo, hígado y molleja ²².

En gallinas que recibieron 1 mg de T-2/ Kg de peso, durante 8 días consecutivos, la cantidad de toxina en huevo fue de 0.9 μ g ⁵⁶.

2.4.6 MECANISMOS DE ACCIÓN.

Los tricotecenos son potentes inhibidores de la síntesis de proteínas, incluso inhiben el desarrollo de otros organismos. La síntesis de proteínas puede ser inhibida en alguna de sus etapas. La enzima ribosomal paptidil transferasa, esencial en los pasos de elongación y terminación, es presumiblemente bloqueada por los tricotecenos ^{3, 50}. Las células más afectadas son aquellas en constante división celular, tales como las criptas intestinales y las células de la piel ³.

La toxina T-2 puede ser incorporada a los componentes lipídicos y proteicos de la membrana celular, dadas sus propiedades antipáticas y así interferir en las funciones normales de la célula. Otro de los mecanismos de acción es un incremento en la peroxidación de lípidos, que se considera ser producida por la depleción hepática de la enzima glutatión reducida (GSH) ⁵⁷, dado que varios tricotecenos tienen la capacidad de inactivar los grupos SH contenidos en los centros activos de la enzima ^{3, 50}.

Los tricotecenos son considerados como componentes altamente tóxicos.

La DL₅₀ para pollitos de 1 día de edad para el caso de toxina T-2 se encuentran entre 4.97 y 5.25 mg/Kg^{3, 60}. El deoxinivalenol (DON o vomitoxina) es el compuesto menos tóxico, cuya DL₅₀ es de 140 mg/Kg^{3, 60}.

La actividad inmunosupresora ha sido también estudiada⁵⁸. Necrosis y depleción linfocítica se han encontrado en timo, bazo y bolsa de Fabricio. Los tricitecenos tienen un efecto negativo sobre los niveles de proteínas en el plasma, la producción de anticuerpos y la inmunidad mediada por células^{2,3,14,59}. Hoerr *et al*⁶⁰ administraron toxina T-2 (1.5-3 mg/Kg) por sonda directamente en el buche durante 2 semanas. En la necropsia se observó depleción de tejido linfocítico y hematopoyético.

2.4.7 LESIÓN MACROSCÓPICA.

Según la dosis y el tipo de edad del ave, los tricitecenos producen lesiones erosivas y ulcerativas en la mucosa oral, caracterizadas por desarrollo de placas amarillo grisáceas, acumulación de exudado en el paladar, lengua y piso de la cavidad oral y necrosis de la mucosa oral^{2, 3, 60}. En órganos linfocíticos y hematopoyéticos se observó necrosis y atrofia. Se observan también focos de necrosis y la ulceración también ocurren en la mucosa de proventrículo, molleja, mucosa intestinal y el epitelio plumoso^{2, 3, 52, 60}. Se observan alteraciones en las plumas de las aves afectadas; aves alimentadas con cultivos de *Fusarium spp* en maíz han demostrado diferentes lesiones de aquellas aves alimentadas con toxina T-2 pura. Hoerr *et al*¹⁸ observaron muy alta mortalidad (50%) a los 17 días de iniciado el tratamiento y atrofia de los órganos linfocíticos, necrosis de la mucosa gastrointestinal, epidermis y tubúlos renales. Se observó también vacuolización de los hepatocitos, hiperplasia de conductos biliares, necrosis de la mucosa del buche y reducción de los folículos tiroideos.

El grano contaminado contenía 5 ppm de toxina T-2, 0.5 ppm de neosolaniol y otros metabolitos no identificados¹⁸.

2.4.8 LESIONES MICROSCÓPICAS.

En la histopatología por la intoxicación aguda se encontró necrosis de los tejidos hematopoyético y linfoide, focos de necrosis de hepatocitos, necrosis e inflamación de la vesícula biliar, proliferación de los ductos biliares, necrosis del epitelio intestinal, reducción de las vellosidades, necrosis de la mucosa del proventrículo y molleja, además del epitelio plumoso ^{2, 3, 18, 60}.

2.4.9 PATOLOGÍA CLÍNICA.

Durante intoxicación por T-2 a diferentes dosis se han notado incremento en las concentraciones de las enzimas de la transformación del sistema glutatión (GSH) (GSH peroxidasa, GSH reductasa y glucosa 6 fosfato deshidrogenasa). Cambios bioquímicos incluyen incremento en las enzimas aspartato amino transferasa (AST), alanina amino tranferasa (ALT) y lactato deshidrogenasa (LDH), así como reducción del ácido úrico y fosfoatasas alcalinas ^{13, 14, 48}.

2.4.9.1 NIVELES MÁXIMOS PERMISIBLES DE TOXINA T-2.

ESPECIE ANIMAL	ALIMENTO	LIMITE (Dg/ Kg)
Pollos	Maíz, Sorgo, Pasta de Soya	50
Caballos	Alimento terminado	50
Ganado Lechero	Alimento terminado	100
Ganado de Carne	Alimento terminado	50
Cerdos de 50 Kg	Alimento terminado	100

2.5 REDUCCIÓN DE LA TOXICIDAD DE LAS MICOTOXINAS.

Debido a los efectos nocivos que éstos agentes tóxicos tienen sobre los animales en producción, se han ideado diversos mecanismos para contrarrestar el desarrollo fungal en los granos y la consecuente formación de micotoxinas, tal como la adición de fungicidas a las dietas ⁴. Otros métodos, los más comunes, están encaminados a reducir la toxicidad de las micotoxinas una vez que éstas han sido formadas, entre los que se encuentran: inactivación térmica, separación física, amoniación, inactivación con ozono, degradación microbiana ^{5, 6}. Y el uso de secuestrantes ^{7, 11, 12, 13, 61, 62, 63, 64, 65}.

Desafortunadamente muchas de estas medidas son difíciles de aplicar, requieren tiempo para llevarse a cabo y son parcialmente efectivas.

Respecto a los sistemas de inactivación de las micotoxinas, debemos tomar y tener en cuenta una serie de factores que a continuación se citan:

- Deben ser procedimientos que estén preparados para el tratamiento de grandes cantidades de alimento, del orden de cientos de toneladas diariamente.
- Se debe tener en cuenta que la micotoxina no está repartida uniformemente en la masa del alimento.
Esto se debe normalmente al problema de la existencia de zonas de microflora.
- La micotoxina puede estar protegida por alguno de los constituyentes del alimento.
- Un tratamiento de inactivación y detoxificación, debe ser, eficaz, barato y evidentemente no debe modificar significativamente los valores nutritivos del alimento.
- El tratamiento en cuestión no debe producir productos secundarios que después tengan influencia en el animal en cuanto a toxicidad y/o en cuanto a interferencia en el buen aprovechamiento de los elementos nutritivos.

Muchos son los estudios realizados hasta a hora, utilizando métodos físicos, químicos y microbiológicos, para la detoxificación de las micotoxinas ⁶⁶, y una amplia recopilación de los mismos puede ser encontrada ⁶⁸. La mayor parte de estos estudios se han

centrado en las aflatoxinas G1 y G2, seguido de una oxidación, tocante probablemente al doble enlace vecino del grupo carbonilo. Después de la acción del calor y presión se forman compuestos derivados que en principio resultan ser atóxicos

Otro sistema que da buenos resultados, es la utilización de un solvente de extracción de micotoxinas (prueba realizada con las aflatoxinas), que es el metoximetano. Sistema aplicado con éxito a la harina de cacahuete.

Otros métodos de detoxificación basados en las propiedades de los adsorbentes de ciertos silicatos con respecto a las moléculas de micotoxinas tales como las aflatoxinas, han sido ampliamente estudiados ⁶⁸. Este tipo de detoxificación ocurre generalmente dentro del organismo animal por la incorporación de estos silicatos en el alimento compuesto y la adsorción del animal que estos ejercen sobre las moléculas químicas de las aflatoxinas y de otras micotoxinas.

Actualmente, está muy difundido el uso de los aluminosilicatos de calcio y sodio hidratados (HSCAS) ¹¹. Estos compuestos se incorporan al pienso en concentraciones adecuadas y una vez dentro del organismo animal tienen en general un mecanismo de acción que lleva a que se formen complejos estables e irreversibles (de la misma naturaleza química que los quelatos) con ciertas micotoxinas. Estos complejos bloquean pues a la molécula de la micotoxina impidiendo que ésta actúe, posteriormente éstos son excretados por el animal.

Sin embargo hay que tener cuidado porque no todos los HSCAS son iguales, existen diferencias en cuanto a su composición química y esto puede influenciar el poder de bloqueo de ciertas micotoxinas. Da buenos resultados el uso de una combinación adecuada de dos arcillas sílicas dipolares: HSCAS (arcillas illitic / clorita) que forman parte del grupo de las micas no hidratadas.

Estos compuestos tienen diferentes eficacias de química-adsorción según la micotoxina y todo ello está en función de su capacidad de intercambio catiónico denominado CEC

que tiene como unidad de medida el MEQ que es el equivalente a mil por 100 g de arcilla.

Dentro del extenso campo de las arcillas como adsorbentes debemos diferenciar a estas por su perfil químico y debemos tener en cuenta los siguientes parámetros: capacidad de intercambio catiónico, expansible, no expansible, polar, dipolar, tamaño del poro y área superficial, tamaño de partícula, pH, y temperatura a la que se someten después del proceso de extracción, ya que las arcillas expansibles tienen un elevado intercambio catiónico (más de 60 MEQ), adsorben agua y adsorben nutrientes (ciertos minerales, vitaminas y antibióticos). No son pues los compuestos aconsejables para actuar detoxificantes de micotoxinas¹².

Las arcillas no expansibles tienen un bajo intercambio catiónico (menos de 60 MEQ), prácticamente no adsorben agua, no adsorben nutrientes, son los compuestos aconsejables para actuar como detoxificantes de micotoxinas⁶².

Una arcilla o mezcla adecuada de arcillas que se quiera utilizar como detoxificante de ciertas micotoxinas, tiene que tener una capacidad de intercambio catiónico entre 20 y 60 MEQ, ser no expansible, ser dipolar, el tamaño del poro mayor debe estar alrededor de 2,5 Å, el tamaño de partícula ideal debe estar comprendido entre 300 y 400 mesh, el pH debe ser moderadamente alcalino, la temperatura a la que se somete la arcilla o arcillas después de su extracción debe estar comprendida entre 94 y 149°C⁶².

La incorporación sistemática de detoxificante eficaz y de amplio espectro, es una excelente ayuda para evitar o minimizar los graves problemas que pueden surgir por una contaminación con micotoxinas.

2.5.1 VARIACIÓN ENTRE LOS PRODUCTOS DISPONIBLES PARA LA INDUSTRIA PECUARIA.

Los efectos tóxicos de las micotoxinas son una preocupación constante para la industria pecuaria, sobre todo avícola y porcícola por las pérdidas económicas que provocan cuando se encuentran presentes en las dietas de animales sometidos a explotación. La toxicidad de las micotoxinas oscila desde la muerte hasta intoxicación crónica, inmunosupresión e interferencia con la eficiencia reproductiva. Consecuentemente la investigación de procesos de detoxificación de micotoxinas con aplicación comercial ocupa un lugar muy importante en diferentes universidades y centros de investigación de todo el mundo.

Un proceso comercial viable no sólo debe ser efectivo contra una amplia gama de micotoxinas, sino también debe ser económico e idealmente utilizar tecnología accesible. Estos procesos deben de generar productos atóxicos y no deben afectar la palatabilidad ni las propiedades nutricionales de los granos o productos derivados de éstos.

Hasta la fecha no existe un método que cumpla con todas estas expectativas, pero se han realizado diferentes pruebas dando como resultado que algunos procesos tengan el suficiente potencial para que se apliquen comercialmente.

2.6 MÉTODOS DE DESTOXIFICACIÓN DE MICOTOXINAS.

La enorme cantidad de brotes de contaminación de los productos agrícolas con micotoxinas, ha motivado que investigadores hayan desarrollado métodos para la prevención y destoxificación de los mismos. Los procedimientos de descontaminación han sido dirigidos a la degradación, destrucción, inactivación o remoción de las micotoxinas a través de los métodos:

- Físicos
- Químicos
- Biológicos
- Físico-químicos

2.6.1 Extracción con disolventes orgánicos.

Algunos disolventes o sus mezclas pueden extraer con eficiencia a las aflatoxinas contenidas en alimentos contaminados, con un mínimo efecto sobre el contenido proteico o la calidad nutricional. Por ejemplo etanol 95%, acetona 90%, isopropanol 80%, hexano-etanol, hexano-metanol y hexano-acetona-agua. Su extracción industrial aún es impráctica y con un costo prohibitivo. Park y Liang en 1993 propusieron el uso de cloruro de metilo para la extracción de aceite, aflatoxinas y gosisol simultáneamente, de las hojuelas de algodón.

Sin embargo, la extracción de Aflatoxina B1 a partir de los alimentos contaminados con otro tipo de disolventes orgánicos, no se lleva a cabo de manera selectiva, lo que ocasiona que también se extraigan y se eliminen otros factores nutritivos como vitaminas no hidrosolubles ¹⁴⁰.

2.6.2 Inactivación por calor.

La estructura química de la Aftoxina B1 le confiere una termoestabilidad superior a 260°C, por lo que los procedimientos basados en la destoxificación por calor, tales como: agua en ebullición, vapor a presión, tostado y horneado producen pocos cambios en los niveles de las Aftatoxinas (Park y Liang 1993). Sin embargo, Conway y colaboradores (1979) indicaron que el tostado del cacahuate, redujo los niveles de Aftatoxinas hasta 50-70%, dependiendo de las concentraciones iniciales de las micotoxinas y del tipo y temperatura del procedimiento. Es necesario considerar que la exposición directa de los productos agrícolas a altas temperaturas por períodos prolongados, disminuyen el valor nutritivo y modifican las características organolépticas de dichos productos, lo que podría influir en su aceptación por los consumidores.

2.6.3 Irradiación.

Park y liang en 1993 demostraron que la irradiación durante 14 horas con luz ultravioleta de cacahuates contaminados con aflatoxina B1 redujo los niveles cerca del 50%. Scott en 1989, propone que la destrucción de aflatoxinas en cocos y aceite de coco por irradiación de luz solar constituye una aplicación potencial en pequeña escala de las áreas rurales de países poco desarrollados. La irradiación gama también destruye la aflatoxina contenida en alimentos contaminados, sin embargo para obtener una inactivación eficiente de Aftatoxina B1 hasta los niveles permisibles en los alimentos contaminados, es necesario utilizar condiciones de alta concentración de humedad en los sustratos y niveles superiores a 2 Mrads, lo cual esta fuera de las normas internacionales para la irradiación de productos comestibles ¹⁴¹.

2.6.4 Adsorbentes.

Existen compuestos que no son adsorbidos en el tracto gastrointestinal y que tiene la capacidad de unirse físicamente con sustancias químicas, evitando así su absorción intestinal.

Como son los aluminosilicatos de sodio y calcio, las zeolitas y las bentonitas, entre otras. El uso de adsorbentes ha sido uno de los métodos más importantes para la prevención de la adsorción de sustancias tóxicas en el tracto gastrointestinal, sin embargo estos productos también pueden unirse a algunos nutrientes, limitados su aprovechamiento y a los productos también pueden unirse a algunos nutrientes, limitando su aprovechamiento y a los fármacos que llegaran a administrarse conjuntamente, inhibiendo así su acción terapéutica.

Al bloquearse la adsorción intestinal de Aflatoxina B1, disminuye considerablemente la concentración de dicha toxina en los tejidos de animales alimentados con dietas contaminadas, lo que se refleja en una menor eliminación de Aflatoxina M1 en la leche de vacas y de los niveles de dicha micotoxina en huevos de aves expuestas al tóxico ^{12,52,143,144,145}.

Algunas limitaciones importantes que presentan el uso de los aluminosilicatos son la reducida capacidad de adsorción de otras micotoxinas diferentes a las Aflatoxinas, tales como: Ocratoxinas, Tricotecenos (T-2), diacilcisterpenol, citrinina, zearalenona y cuando los niveles de contaminación con aflatoxinas son superiores a 1000µg/Kg ^{12,78}.

2.6.4.1 ESTRUCTURA DE LOS ALUMINOSILICATOS.

Los aluminosilicatos son minerales de origen natural o sintético, con una estructura basada fundamentalmente en silicio y aluminio ^{7,9}. En la industria pecuaria se encuentran 2 tipos de aluminosilicatos: los filosilicatos y los tectosilicatos. Los primeros

poseen una estructura plana bidimensional compuesta por capas u hojas de tetraedros unidos a capas de octaedros. El caolín y monterrinolita, principal componente de la bentonita, pertenecen a éste grupo. El espacio entre las diferentes capas es donde se realiza la adsorción, y generalmente se encuentra ocupado por agua y cationes.

Los Aluminosilicatos son minerales de estructura tridimensional, compuestos por tetraedros de silicio o aluminio unidos unos con otros mediante sus cuatro oxígenos.

Las zeolitas son los minerales de éste grupo que se utilizan como adsorbentes. Al igual que en el caso de los filosilicatos, los espacios entre las diferentes láminas así como los poros formados por los diferentes átomos de aluminio y silicio, son el sitio de adsorción.

El tamaño del poro determinará el tamaño de partículas que pueda ser adsorbida ^{7,9}.

2.6.4.2 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS ALUMINOSILICATOS.

En la superficie de los aluminosilicatos existen interacciones diversas entre los iones.

La capacidad de intercambio catiónico (CIC) en los aluminosilicatos mide el área y la carga eléctrica superficial ^{7, 9, 10, 68}. La CIC es el número de cationes que pueden ser extraídos de la superficie del aluminosilicato y reemplazados por otros. De ésta manera, los cationes pueden salir del espacio interlaminar y dejar su lugar a los cationes presentes en el medio. Este es el principio de la adsorción de las micotoxinas por parte del aluminosilicato, ya que si la molécula orgánica es polar o sus grupos funcionales se pueden intercambiar con los presentes en el aluminosilicato y podrá ocurrir la adsorción. Este fenómeno dependerá de la micotoxina, ya que las aflatoxinas son más polares que la zearalenona, lo cual explica el porqué *in vivo* ocurre la adsorción de la primera y no de la segunda ^{7, 9}. En el caso de ocratoxina A y toxina T-2

hasta el momento no se conoce el mecanismo por el cual los aluminosilicatos pueden adsorber dichas micotoxinas ^{13,14,15}.

Numerosos trabajos han sido realizados para evaluar el efecto adsorbente de los aluminosilicatos sobre la aflatoxina B1, en los cuales se ha logrado la reducción de los efectos tóxicos por la adición de éste producto ^{11,12,61,62,63,64,69,70}. Sin embargo su eficacia no ha sido tal para el caso de la Ocratoxina A y la Toxina T-2 ^{13, 14, 15, 59, 66}.

2.6.5 Inactivación química.

Se ha utilizado el H₂O₂ como un agente altamente oxidante que destruye más del 97% de Aflatoxina B1. Clavero y colaboradores en 1993 sumergieron harina de cacahuete contaminada con 250 µg/Kg de Aflatoxina B1 en una solución 0.25% de peróxido de hidrógeno durante 1 minuto y el contenido de la micotoxina disminuyó cerca del 90%. También se han empleado metilamina, bisulfito de sodio, hipoclorito de sodio, entre otros con los que se han logrado buenos porcentajes de reducción ¹⁴⁸.

Park en 1993 describió la utilización de amonio o sus derivados para la descontaminación de diversos productos agrícolas, como semillas de algodón y harina de cacahuete contaminadas con aflatoxinas ^{11, 25,141}. Utilizaron hidróxido de amonio a una concentración final de 1.5 % en maíz contaminado con 150 µg/Kg de AFB1 y se obtuvieron niveles de inactivación superiores al 85%. Sin embargo, la inactivación química tiene desventajas que pueden quedar residuos de los productos químicos utilizados durante el proceso, en el producto agrícola que se descontaminó, lo cual le puede conferir cambios de sabor, coloración y aspecto, que pudiera ser motivo de una importante disminución en la aceptación de los consumidores, además algunos productos químicos son altamente corrosivos, por lo que su uso continuo puede deteriorar los implementos agrícolas ¹⁴¹.

2.6.6 Inactivación biológica.

Flavobacterium aurantiacum, Saccharomyces cerevisiae.

La inactivación microbiológica con *F. aurantiacum* sólo se ha podido realizar bajo condiciones *in vitro*, ya que no ha sido posible aplicarlo como aditivo en la alimentación de animales, debido a que sus características de crecimiento y desarrollo difieren de las condiciones que prevalecen en el tracto gastrointestinal de los animales, lo que constituye una gran limitación en su utilización en la práctica pecuaria ¹⁵¹.

La adición de levaduras (*S. cerevisiae*) para evitar los efectos de la aflatoxicosis en pollo y patos se ha analizado por algunos investigadores con resultados prometedores ^{152, 153}, que en el caso de los filosilicatos, los espacios entre las diferentes láminas así como los poros formados por los diferentes átomos de aluminio y silicio, son el sitio de adsorción.

2.6.6.1 Producto “ATOX^{MR}”

El producto inhibidor de micotoxinas “ATOX^{MR}”, cuyo principio activo es la PVPP (polivinilpolipirrolidona, polímero reticulado de poliamida o polivinil ciclobutamida, que es sintético, inerte, y que interactúa físicoquímicamente con las micotoxinas sin afectar vitaminas y minerales como lo indican diversas pruebas *in vivo*, inhibiendo la acción tóxica de las micotoxinas por un impedimento estérico evitando su absorción intestinal ocasionado por la gran afinidad de los polímeros por los anillos de los grupos polifenólicos, que presentan dobles ligaduras y radicales de oxígeno abundantes en algunas de las micotoxinas conocidas, estableciendo interacciones físico-químicas estabilizadas por enlaces covalentes y enlaces parciales (puentes de hidrógeno y/o azufre) que atrapan a las micotoxinas, formando una macromolécula que por su dimensión no puede ser absorbida en el tracto gastrointestinal y por lo tanto se elimina en las heces.

El vehículo del ATOX es una bentonita natural activada químicamente y organofílicamente para incrementar los sitios activos y controlar el tamaño de los poros, mediante la activación térmica, estando libre de dioxinas y de metales pesados.

La PVPP, principio activo del inhibidor de micotoxinas “ATOX”, es una molécula inerte y estable en niveles de 2 a 8 de pH; es de origen sintético y tiene un control de calidad constante, actúa sobre las micotoxinas: Aflatoxinas, Tricotecenos, Fumonisinias, Citrininas, Zearalenonas y Ocratoxinas presentes en los alimentos, a la dosificación baja de 500g por tonelada de alimento, no impactando por volumen en el contenido nutricional de la dieta.

Su granulometría tan fina le permite una dispersión homogénea con una gran superficie de contacto y se puede aplicar en la premezcla o directamente en el alimento.

El inhibidor de micotoxinas "ATOX " es un producto inerte que conservado en sacos, no expuesto a la intemperie y almacenado en condiciones adecuadas permanece activo por cuando menos dos años, pudiendo utilizarse como aditivo de los alimentos de los animales con la confianza de su positiva acción inhibitoria y factor importante en el control de micotoxinas^{11,25} .

2.7 ESTRATEGIAS PARA CONTROLAR LA CONTAMINACIÓN DE MICOTOXINAS.

La presencia de concentraciones elevadas de micotoxinas en los alimentos destinados tanto para consumo humano como animal, ha generado la necesidad de que más de 80 países hayan elaborado estrategias tendientes a normar y por lo tanto minimizar el riesgo de exposición a micotoxinas.

Los intentos para su control incluyen:

- 1).- Seguimiento y control fitosanitario de los productos agrícolas durante las etapas tempranas de su cosecha.**
- 2).- Control sanitario y químico durante el proceso de elaboración y hasta el terminado del alimento.**
- 3).- Establecimiento de niveles**
- 4).- Utilización de métodos de descontaminación y la implementación de estrategias que prevengan la contaminación de alimento destinados a la alimentación y a otros usos industriales.**

5).- Prevención a través de buenas prácticas de campo tales como:

- a).- Desarrollo biotecnológico para la producción de especies vegetales resistentes a infección micotóxicas.**
- b).- Innovaciones tecnológicas que hagan posible la reducción de temperatura y humedad en los silos de almacenamiento o durante las etapas de transportación.**
- c).- Control biológico para la eliminación de plagas que lesionan a las plantas en cultivo y que facilitan la infección fúngica ¹⁵⁰.**

Sin embargo la experiencia demuestra, que los resultados no han sido óptimos ya que se han descubierto altos contenidos de micotoxinas en los productos agrícolas en las etapas de cultivo, precosecha, post cosecha y de alimentos elaborados ^{151, 152, 153}.

Actualmente se consumen alimentos elaborados con productos agrícolas contaminados con diversas micotoxinas (tortillas, cereales, harina nixtamalizada, palanquetas y mazapanes) y derivados animales como: carne fresca de pollo y cerdo, embutidos, leche, huevo y queso); ya que se han determinado altos contenidos de aflatoxinas, Ocratoxinas, Fuminosinas y Zearalenona ^{154, 155, 156}.

Es conveniente destacar la importancia toxicológica que representan los bajos niveles de micotoxinas y particularmente de las aflatoxinas cuando se consumen alimentos contaminados durante periodos largos de tiempo. No se deben subestimar los efectos inmunosupresores, mutagénicos y hepatocarcinogénicos de la aflatoxina B1 en intoxicaciones crónicas. Una parte de esta toxina activada permanece en los tejidos del organismo, dañado al ADN, ARN y a las proteínas funcionales por la formación de aductos que les pueden producir mutaciones e iniciar el proceso carcinogénico y la misma Aflatoxina B1 puede actuar como promotor.

Por esta razón se han realizado estudios en México sobre los efectos que producen las aflatoxinas en humanos. Se ha visto que existe una relación entre los aductos AFB1-N7_Gua en pacientes con hepatitis viral B en presencia del Citocromo p450 y el gene 53 (supresor de tumores), sin embargo en varios procesos carcinogénicos tales como el colon rectal, cervicouterino de tumores, pero no ha sido posible establecer la presencia de Aflatoxinas como un indicador ¹⁵⁵.

2.8 JUSTIFICACIÓN.

En la actualidad se ha incrementado el uso de secuestrantes de micotoxinas en las dietas para la alimentación animal, sin embargo muchos de estos productos sólo se han evaluado a través de ensayos de adsorción *in vitro*, y una gran diversidad de autores han descrito que no existe una correlación entre los resultados *in vitro* con los que se obtienen en modelos animales, por lo que es necesario evaluar la capacidad de inhibición de los efectos tóxicos de micotoxinas por medio de ensayos *in vivo*.

Y de esta forma se puede obtener la información del potencial real de éstos productos y que el avicultor tenga dicha información que le permita tomar la decisión adecuada sobre el uso de estos productos ¹³⁷. Por otro lado, al evitar la absorción de micotoxinas por los animales, se evita el depósito de los metabolitos de dichas toxinas en los tejidos de los animales y se disminuirá el riesgo de toxicidad en los consumidores finales.

De ésta manera los fabricantes de secuestrantes pueden acceder a metodologías específicas de control de calidad mediante una evaluación *in vivo* e *in vitro*, especialmente de aquellos productos de reciente lanzamiento al mercado, que señalan ser capaces de adsorber varias micotoxinas, y realmente no se conoce su comportamiento frente a metabolitos producidos por los hongos productores de ocratoxina A y toxina T-2, en condiciones naturales, ni frente a la combinación de éstas micotoxinas.

La eficacia de los nuevos productos debe ser probada tanto en estudios *in vitro*, evaluando su capacidad de adsorción, como *in vivo*, mediante la evaluación de parámetros productivos, lesiones macroscópicas y microscópicas, además de parámetros de bioquímica clínica y hematología.

Por esta razón, se realizó una investigación *in vivo* encaminada a evaluar el efecto protector contra los efectos de aflatoxinas, ocratoxina A y toxina T-2 en el secuestrante comercial de micotoxinas ofrecido en el mercado para la producción avícola.

Por lo tanto el propósito de éste trabajo es obtener más información sobre la metodología de evaluación de el secuestrante (ATOX^{MR}) de micotoxinas, para detoxificación de los alimentos de animales .

2.9 OBJETIVOS:

- 1).- Determinar el efecto tóxico y sobre la ganancia de peso en pollos, por el consumo de dietas contraminadas con una mezcla de micotoxinas (Aflatoxina B1, Toxina T2, Ocratoxina A).**
- 2).- Determinar el grado de inhibición de la toxicidad producida por la acción sinérgica de Aflatoxina B1, Toxina T-2, y Ocratoxina A, en un modelo *in vivo* en pollos de engorda, por la adición de un detoxificador de Micotoxinas (Polímero Reticular) a las dietas contaminadas.**

2.10 MATERIAL Y MÉTODOS.

2.10.1 Experimento *in vitro*.

2.10.1.1 Producción de AFB1 en maíz.

El maíz utilizado se adquirió de una cosecha única en cuya producción no se utilizaron pesticidas. Se lavó con agua corriente para eliminar el polvo y otros contaminantes agrícolas, así como los granos defectuosos o fragmentados. Se hizo un lavado final con agua destilada.

Los granos se escurrieron durante 10 minutos para eliminar el exceso de agua y se distribuyeron en lotes de 5 Kg en frascos pirex. La boca de cada recipiente se cubrió con tapón de gasa y algodón y fueron esterilizados en autoclave a una presión de 1.3 Kg/cm² durante 1 hora.

Posteriormente se sembró la cepa ATCC-26691 de *Aspergillus parasiticus* por el método de puntos separados en cajas Petri con medio de cultivo Czapek-Dox, los cuales se incubaron durante 10 días a 28°C hasta obtener una gran concentración de esporas, (la superficie de las colonias se torna verde).

Las esporas de cada caja se cosecharon con 10 ml de solución salina isotónica estéril adicionada de 1% de Tween 80. Se cuantificó la concentración de esporas con la ayuda de una cámara cuenta glóbulos por el método de Neubauer y el resultado de la concentración contenida fue de 2.6×10^8 esporas/ ml. Posteriormente se inoculó el maíz en cuatro frascos con 10.4×10^8 esporas/ Kg, agregando a cada frasco 100 ml de solución salina al 0.85% estéril, para que el hongo estuviera en condiciones optimas de humedad. Se incubaron a temperatura ambiente durante 6 semanas, rotando los

frascos para favorecer las condiciones aeróbicas de cultivo y un crecimiento homogéneo del hongo. posteriormente se esterilizó el maíz contaminado bajo condiciones anteriormente descritas para destruir las esporas de *A. parasiticu*⁷⁸.

También se esterilizó en autoclave el maíz contenido en otros cuatro frascos pero sin la adición de las esporas del hongo.

Cuantificación de la AFB1 en el maíz.

Se mezcló el contenido de los cuatro frascos contaminados así como el de los frascos sin contaminar y se tomaron tres muestras de 500 g cada una de las respectivas mezclas, se molieron en un molino Willey con criba 1mm y se cuantificó la cantidad de AFB1 producida, por cromatografía de líquidos de alta resolución, como se describe a continuación¹³⁵.

2.10.1.2 Purificación del extracto.

1.- En una licuadora de laboratorio se colocaron 25g de la muestra de maíz molido y 100 ml de una solución de acetonitrilo-agua (9+1) y se agitó a alta velocidad durante 2 minutos.

2.- Se colocaron 5ml del extracto en una columna de limpieza de alta afinidad Mycosep 224, para la eliminación de interferencias analíticas.

3.- El extracto purificado fue transferido a un vial con tapa sellada con teflón y se evaporó a sequedad a una temperatura de 60 °C, utilizando una corriente de nitrógeno para evitar proyecciones.

2.10.1.3 Desarrollo cromatográfico.

1.- El contenido de cada vial se resuspendió y se disolvió en 200µg de acetonitrilo (9+1), posteriormente se adicionaron 700µl de la solución derivatizadora (ácido trifluoracético 4ml ácido acético glacial 2ml + agua destilada 14ml).

2.- Los viales se incubaron en baño maría a 65 °C durante 9 minutos y se enfriaron con agua durante 15 segundos.

3.- Se inyectaron 50µl del extracto derivatizado al sistema HPLC.

Condiciones cromatográficas.

1.- Detector fluorométrico: Waters 420 con monocromadores de excitación a 360 nm y emisión a 440 nm.

2.- Fase móvil: acetonitrilo-agua (9+1).

3.- Columna: C-8 de 5µ por 10mm.

5.- Condiciones isocráticas de flujo: 2 ml por minuto.

6.- Tiempo de corrida: 8 minutos.

Resultados del análisis cromatográfico indicaron una producción promedio en los frascos contaminados de 800 µg / Kg de AFB1 y no se detectó AFB1 en el maíz sin contaminar.

2.10.3 Producción de Ocratoxina A y Toxina T-2.

Producción de Ocratoxina A: Se utilizó una cepa de *Aspergillus ochraceus*, la cual fue cultivada en el laboratorio. El procedimiento utilizado para la producción de ésta toxina se basó en metodologías previamente publicadas^{36, 71}, y fue el siguiente:

Para cultivar el hongo se utilizó el medio agar Sabouraud de 72 a 96 horas a temperatura ambiente. Como sustrato para que el hongo produjera la micotoxina se utilizaron 400 g de trigo en botellas de vidrio. El grano se cubrió con agua para aumentar el contenido de humedad. El agua fue retirada 30 minutos después de su aplicación con la finalidad de que el grano alcanzara un grado de humedad superior al 30% determinada mediante una estufa a 100°C durante 24 hr. Las botellas fueron tapadas con algodón y sometidas a esterilización en autoclave a 121°C, 15 lb de presión por 20 minutos.

Para la inoculación de las botellas se utilizó solución salina fisiológica estéril con 0.5% de Tween 80 para la colección de las esporas del hongo. Cada botella recibió, en condiciones de esterilidad, 5 ml de un inóculo contenido entre 5 y 8 X 10³ esporas / mm³.

Las botellas con el grano inoculado fueron incubadas en oscuridad y a temperatura ambiente (25-28°C), recibieron una agitación ligera diariamente después de 96 horas para favorecer el desarrollo uniforme del hongo sobre la superficie del grano.

Después de 3 semanas de incubación se tomó una muestra de grano contaminado en condiciones estériles. La muestra fue sometida a autoclave para matar al hongo, y posteriormente fue analizada por cromatografía de capa fina, siguiendo la metodología desarrollada por Stolof *et al*⁷², con el fin de determinar si había producción de Ocratoxina A.

La cuantificación final de Ocratoxina A tanto en el cultivo como en el alimento se realizó mediante HPLC, de acuerdo con el método publicado por Nesheim *et al*⁷³.

Para la producción de Toxina T-2 se utilizó una cepa de *Fusarium tricinctum* ATCC 1422, que fue cultivada en maíz, con base en estudios previos^{53, 74, 75}.

Los procedimientos de inoculación y determinación de la presencia de la micotoxina fueron similares a los utilizados para Ocratoxina A. La inoculación en éste caso se realizó entre 15 y 20 °C. Un inóculo de 5 ml para cada botella contenía $1,4 \times 10^4$ esporas / mm³.

Posteriormente, y una vez comprobada la presencia de Ocratoxina A y Toxina T-2 en los sustratos, el grano fue esterilizado por autoclave, molido y secado en una estufa a 55 °C por 48 horas para su posterior inclusión en el alimento.

La semicuantificación y cuantificación de toxina T-2 tanto en los cultivos en grano como en el alimento terminado, se realizó por el método de ELISA, utilizando el kit comercial BIOPHARM®.

2.10.3 Procedimiento Experimental *in vivo*.

Preparación de las dietas experimentales:

a).- Se elaboraron dietas equiproteicas, equienergéticas y equipigménticas a base de sorgo-soya y se adicionó maíz y trigo contaminado con micotoxinas para el tratamiento positivo sin secuestrante y el contaminado + secuestrante (T-3) y el Testigo Positivo (T-2) y con maíz sin contaminar para el Control Negativo (T-1).

Se cuantificó el contenido de micotoxinas en cada dieta por medio de métodos cromatográficos

(HPLC y GASES ACOPLADO A UN DETECTOR DE MASAS).

FORMULACIÓN DE DIETAS	
INGREDIENTE / TON	Kg
SORGO	650
PASTA DE SOYA	185
ACEITE ACIDULADO	46.0
ORTOFOSFATO	13.0
CARBONATO DE CALCIO	12.0
HARINA DE POLLO	20.0
HARINA DE PLUMA	10.0
CLORURO DE COLINA	1.3
GROMAX	0.60
AVELUT	8.0
GLUTEN DE MAIZ	40.0
PREMEZCLA*	25.0

COMPOSICIÓN DE LA PREMEZCLA.

INGREDIENTE DE LA PREMEZCLA / 25 Kg	G
DL-METIONINA	4.1
L-LISINA	3.2
L-TREONINA	0.65
PRMX MINERAL	1.0
PRMX VITAMINAS	1.0
BACITRACINA	0.30
NaCl	3.5
ETQ.20%	0.50
SULFATO DE COBRE	0.50
SORGO	10.25

Se almaceno el alimento en sacos etiquetados según el tratamiento

Organización de los grupos experimentales.

b).- Se realizó un diseño factorial $3 \times 12 \times 3$, donde los factores fueron:

3 tratamientos, 12 aves por tratamiento (6 machos y 6 hembras) y 3 repeticiones.

Se utilizaron pollos Ross de un día de edad, distribuidos aleatoriamente y se alojaron en dos baterías Petersime con control eléctrico de temperatura y se alimentaron durante 5 semanas con las dietas experimentales y agua potable *add libitum*.

Los tratamientos se analizaron estadísticamente por medio de una ANDEVA con un $p < 0.05$ una comparación de medias por el método de Tukey.

DATOS:

Tratamiento	Secuestrante comercial	Aflatoxinas $\mu\text{g}/\text{kg}$	Ocratoxina A $\mu\text{g}/\text{Kg}$	Toxina T-2 $\mu\text{g}/\text{Kg}$
1 Control Negativo	0.0	< 1.0	< 0.5	< 15.0
2 Testigo Positivo	0.0	120	250	2,210
3 Micotoxinas + Secuestrante Comercial	0.5g/ Kg	120	250	2,210

c).- Al final del periodo experimental se sacrificó la mitad de la población de cada tratamiento, para la descripción de las lesiones.

PATOLOGÍA MACROSCÓPICA: Se evaluaron hallazgos macroscópicos en boca, lengua, esófago, riñón, bolsa de Fabricio (BF), proventrículo (PV) y molleja (MLL) en las aves aleatoriamente por tratamiento. Cada ave fue pesada e identificada.

HISTOPATOLOGÍA: Se obtuvieron muestras de riñón, hígado, proventrículo, bolsa de Fabricio, de cada ave sacrificada, y fueron fijadas con formol amortiguador al 10%.

En la evaluación microscópica se realizaron laminillas por la técnica de inclusiones Parafina y se tificaron por la técnica de hematoxilina-eosina.

Se observaron las laminillas para describir las lesiones en cada Tejido.

2.11 RESULTADOS

2.11.1 Ganancia de peso semanal.

A).- Ganancia de peso semanal en pollos (g)

EDAD DE LAS AVES

Tratamiento	Semana	Primera	Segunda	Tercera	Cuarta
	Cero X D.E	Semana X D.E	Semana X D.E.	Semana X D.E.	Semana X D.E.
1 Control (-)	83.5 ^a 5.5	225.1 ^a 21.1	452.6 ^a 38.9	717.9 ^a 69.7	1281.0 ^a 100.8
2 Testigo (+)	84.7 ^a 4.9	210.2 ^a 15.1	404.8 ^b 31.6	637.6 ^b 75.1	919.7 ^b 78.2
3 Dietas con micotoxinas + secuestrantes	85.0 ^a 5.7	205.7 ^a 18.2	430.7 ^{ab} 36.0	693.7 ^a 64.7	1182.5 ^a 97.3

Tratamiento	Ganancia de Peso Total (g)	(%) de Ganancia de Peso en relación al control (-)
1 Control (-)	1,197.5	100.00 ^a
2 Testigo (+)	835.0	69.72 ^b
3 Dieta con micotoxinas + secuestrante	1,097.6	91.65 ^a

B).- Ganancia de peso semanal pollas (g)

EDAD DE LAS AVES

Tratamiento	Semana Cero	Primera Seman	Segunda Semana	Tercera Seman	Cuarta Seman
	X D.E.	X D.E.	X D.E.	X D.E.	X D.E.:
1 Control (-)	82.4 ^a 6.2	231.0 ^a 19.1	447.2 ^a 38.9	785.4 ^a 71.0	1270.3 ^a 120.7
2 Testigo	83.8 ^a 8.7	214.1 ^a 21.6	370.2 ^b 31.3	668.3 ^b 67.3	897.6 ^b 58.9
3 Dieta con micotoxinas + secuestrante	86.9 ^a 5.1	214.3 ^a 21.2	418.3 ^a 33.8	708.4 ^a 33.8	1192.5 ^a 54.5

Tratamiento	Ganancia de Peso Total (g)	(%) de Ganancia de Peso en relación al control (-)
1 Control (-)	1,187.9	100.00 ^a
2 Testigo (+)	813.8	68.50 ^b
3 Dieta con micotoxinas + secuestrante	1,105.6	93.07 ^a

□ Literales diferentes con significancia estadística (p<0.05)

2.12 Discusión.

2.12.1 Ensayo experimental in vivo.

GANANCIA DE PESO SEMANAL POLLOS.

- **Semana cero no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los animales alimentados con los diferentes tratamientos.**
- **En la primera semana aún no existieron evidencias significativas de toxicidad ni diferencias estadísticas en las ganancias de peso mientras que en la segunda semana ya existieron efectos tóxicos donde los procesos biocelulares y/o fisiológicos son afectados, por lo que se presentó una disminución de la ganancia de peso. Comparando los tratamientos 1 y 2 se presentó una pérdida en la ganancia de peso del 17.2% para el tratamiento 2, mientras que para el tratamiento 3, que fue adicionado del secuestrante de micotoxinas, la diferencia fue tan sólo del 6.5%, es decir que el efecto tóxico acumulativo de la mezcla de micotoxinas se evidenció hasta 14 días después de la alimentación con la dieta experimental y con la adición del polímero reticular los animales reflejaron un efecto de protección parcial a la micotoxicosis.**
- **En la tercera semana se observó un efecto similar y, finalmente en la cuarta semana de alimentación experimental se obtuvo la mayor diferencia en la ganancia de peso entre los tratamientos de tal forma que al comparar las ganancias de peso respecto al grupo control, se obtuvo una diferencia del 28.2% para el tratamiento 2., y del 7.7% en el tratamiento 3, siendo estadísticamente significativo en el tratamiento 2. Cuadro # 1, Grafica # 1.**

GANANCIA DE PESO SEMANAL EN POLLAS.

- El comportamiento en la ganancia de peso en las hembras fue similar al obtenido en los machos, ya que durante la primera semana no se presentaron diferencias significativas ni manifestaciones clínicas importantes y a partir de la segunda semana se incrementaron las diferencias en la ganancia de peso para los animales que no se les adicionó el secuestrante con una diferencia máxima del 29.34% al final del período y del 6% en las aves del tratamiento 3.
- Los resultados obtenidos en el presente trabajo están de acuerdo a lo descrito en la literatura donde se menciona que los efectos tóxicos de las micotoxinas se potencian al estar presentes más de un tipo de micotoxina y que tienen un efecto acumulativo, lo cual representa un grave problema en la producción pecuaria y en los riesgos de salud pública ^{11,25,93}. Cuadro # 2, Grafica # 2.
- El efecto de protección parcial (93.7% para las hembras y 91.65% para machos) obtenidos en el presente estudio, coinciden con los resultados descritos por (1,23,4) donde el uso de secuestrantes puede disminuir los efectos tóxicos de alguna micotoxina o mezcla de micotoxinas, pero hasta el momento ningún secuestrante ha demostrado conferir una protección del 100% en los parámetros productivos, reproductivos, o estatus inmunológico. Evidentemente existe una gran diversidad de tipos de micotoxinas, con estructuras químicas y modos de acción muy diversos, por lo que resulta sumamente difícil que un secuestrante con un solo principio activo y mecanismo de acción pueda inhibir todo tipo de micotoxinas.
- Las diferencias en las ganancias de pesos entre los tratamientos se puede deber a que la acción tóxica de las Aflatoxinas, Ocratoxina A y Toxina T-2 interfieren con los procesos de obtención de energía, síntesis de proteínas, son inmunosupresores e interfieren con los procesos de absorción intestinal de algunos nutrientes, además de

las lesiones de ulcerativas que el tricoticeno T-2 produce en el tracto gastrointestinal de los animales expuestos. **Apéndice fotografías (#2, #3)**

- Es importante señalar que las manifestaciones clínicas en los animales tanto hembras como machos del tratamiento 2 se presentaron (Testigo+) heces acuosas a partir de la tercera semana de la dieta experimental y a la cuarta semana se observó una mala pigmentación de patas y crestas. Mientras que estos animales del tratamiento 3 no se presentó diarrea durante el período experimental y se obtuvo una buena pigmentación.
- Al realizar las necropsias de las aves tanto machos como hembras de los grupos controles, no se observaron lesiones macroscópicas en los órganos y tejidos. Sin embargo, en los animales alimentados con las dietas contaminadas, los hígados presentaron una ligera hiperemia, bordes redondeados y un color amarillento.
- Así como lesiones ulcerosas de diferentes magnitudes en la cavidad oral, lengua y proventrículo, siendo de mayor severidad en los animales donde no se adicionó el polímero reticular a la dieta. Los intestinos delgados presentaron un endurecimiento al tacto. **Apéndice (fotografías #1, #4, #5, #6).**
- En el estudio histopatológico se encontró una depleción celular algunos órganos linfoides como la bolsa de fabricio y el timo, en el tejido hepático se observó una pérdida de la estructura, los hepatocitos mostraron una alta vacuolización sugestivos de cambio graso y en el tejido renal se observó una tubulonefrosis y glomerulonefritis moderada.
- Las lesiones renales encontradas en el presente trabajo no fueron tan severas como las señaladas en otros trabajos, donde utilizaron una dosis de 567 ppb, y encontraron lesiones y características de Ocratoxicosis, con una severa afectación en la ganancia de peso y consumo de alimento ³.

- García en el 2001 utilizó un ensayo *in vivo* con aves de un día de edad con niveles de Toxina T-2 de 927 ppb y observó una reducción significativa de la ganancia de peso y del consumo del alimento, con la presentación de escasas lesiones ulcerativas, y al agregar individualmente a las dietas contaminadas dos productos comerciales secuestrantes de micotoxinas (Celtic y Mycofix) observó un efecto de protección parcial.

2.13 CONCLUSIÓN.

1).- Se observó un efecto acumulativo de la toxicidad de las micotoxinas en las aves alimentadas con la dieta contaminada con la mezcla de Aflatoxina B1, Toxina T-2 y Ocratoxina A.

2).- Las aves alimentadas (hembras y machos) con una dieta conteniendo 120 ppb de Aflatoxina B1, 2,210 ppb de Toxina T-2 y 250 ppb de Ocratoxina A presentaron una disminución en la ganancia de peso promedio de 28.77%.

3).- La adición de una dosis de 0.05% Polímero Reticular (Atox) a dietas contaminadas con 120 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de Aflatoxinas, 250 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de Ocratoxina A y 2,210 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de Toxina T-2, le confirió una protección del 92.36% a pollos de engorda contra los efectos tóxicos de la mezcla de Micotoxinas.

2.13 LITERATURA CITADA

- (1) Richard, J, editor. Mycotoxins- an overview. Romer™ Labs, Inc. USA 2000.
- (2) Hoerr F. J, Mícotoxicosis. Inc: Calnek BW JH, Barnes JH, Beard CH, McDougald LR, Saif YM, editors. Diseases of poultry. 10thed. Ames, Iowa:Iowa State University Press, 1997.
- (3) Leeson S, Díaz G, summers JD. Poultry metabolic disorders and mycotoxins. Guelph: University books, 1995.
- (4) Jones F. Mycotoxins in feeds. In: Coelho BM, editor. Molds, mycotoxins and Feed preservatives in the feed industry. 2nd. Ed, New Jersey: BASF Corporation, 1996, 15-26.
- (5) Robb J. Mycotoxins: contamination and decantamination. Feed mix 1993; 1:18-23
- (6) Doyle MP, Applebaum RS, Brackett RE, and Marth EH. Physical, chemical and biological degradation of mycotoxins in foods and agricultural commodities Journal of Food protection 1982; 45:964-971.
- (7) Camarena G, Domínguez MJ, Díaz LJ, Flores CM. Adsorción diferencial de Aflatoxinas B1 y G1 por 10 materiales adsorbentes. Memorias de la XXII Convención Anual ANECA; 1997 mayo 7-11; Ixtapa, Zihuatanejo (Guerrero) México. México (D.F): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias avícolas, Ac, 1997: 302-310.
- (8) Reyes Q. M, Rocha HA, Corona GS, Zentella P. M, Rosiles M.R. Efecto de los Aluminosilicatos utilizados en dietas contaminadas con aflatoxina B1 y de la restricción alimenticia sobre el glutatión sanguíneo de pollos de engorda. Memorias de la IV Jornada Médico Avícola; 1993 agosto 4-6; México (D.F): Departamento de Producción Animal: Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. 1993: 200-205.
- (9) Domínguez JM, Flores CM, Díaz Lj, Camarena G. Desarrollo de adsorbentes de Micotoxinas a base de tectosilicatos y fitosilicatos microporosos. Memorias de la XII Anual ANECA; 1997 mayo 7-11; Ixtapa, Zihuatanejo (Guerrero) México. México (D.F): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC, 1997: 311-315.
- (10) Muñoz J, Pérez R, Lara J. Capacidad de intercambio catiónico y adsorción de aflatoxina B1 en aluminosilicatos. Memorias de la Convención Anual ANECA; 1997 mayo 7-11; Ixtapa, Zihuatanejo (Guerrero) México. México (D.F): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC, 1997: 297-301.

- (11) Márquez MR, Vera GE, Hernández JK y Madrigal BE. Inhibición de la genotoxicidad de la aflatoxina B1 por la adición del aluminosilicato BionitTM en un modelo in vivo. Memorias de la XXV Convención Anual ANECA; 2000 mayo 3-6; Cancún (Quintana Roo) México. México (D.F): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC, 2000: 169-171.
- (12) Kubena L.F, Harvey R. B, Phillips TD, Corrier DE, UHF WE, Rottinghaus GE. Efficacy of hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the toxicity of aflatoxin and T-2 toxin. Poultry Science 1990: 78; 204-210.
- (13) Edrington TS, Kubena LF, Harvey RB and Rottinghaus GE. Influence of a superactivated charcoal on the toxic effects of aflatoxin or T-2 toxin in growing broilers. Poultry Science 1997: 76; 1205-1211.
- (14) Bailey RH, Kubena LF, Harvey RB, Buckley SA and Rottinghaus GE. Efficacy of varios sorbents to reduce the toxicity of aflatoxin and T-" toxin in broiler chickens. Poultry Science 1998: 77; 1623-1630.
- (15) Huff WE, Kubena LF, Harvey RB, Phillips TD. Efficacy of hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the individual and combined toxicity of aflatoxin and achatoxin A .Poultry Science 1992; 71; 64-69
- (16) Dale N. Mycotoxin binders: It' time for real science. Poultry Digest 1998;57:38-39.
- (17) Devegowda G, Raju MVN, Afzali N and Swamy HVLN. Mycotoxin picture worldwide. Novel solutions for counteraction. In : Proceedings of Alltech's 14th Annual Symposium. (Proceedings on CD-ROM) 1998.
- (18) Hoerr FJ, Carlton Ww, Tuite J, Vesonder RF, Rohwedder WK and Szigeti G. Experimental thricothecene mycotoxicosis prodeded in broiler chickens by Fusarium sporotrichiella var. Sporitrichioides . Avian Pathology 1982: 11; 385-405.
- (19) Rotter Rg, Frohlich AA, Marquardt RR and Abramson D. Comparison of the effects of toxin-free and toxin containing mold contaminated barley on chick performance. Canadian Journal of Animal Science. 69;247-259.
- (20) Ledoux Dr and Rottinghaus Ge. In vitro and in vivo testing of adsorbents for detoxifying mycotoxins in contaminated feedstuffs. In Lyons TP and Jacques KA, editors. Proceedings of Alltech's 15th Annual Symposium. Nottingham. University Press, 1999:369-380.
- (21) Unión Nacional de avicultores. Avicultura Mexicana. UNA. Disponible en : <http://www.UNAM.com.mx>.

- (22) Unión Nacional de Avicultores. Indicadores económicos. Producción industria avícola 2000. UNA. Disponible en: <http://www.unam.com.mx>
- (23) Unión Nacional de Avicultores. Indicadores económicos. Producción industria avícola 2000. UNA. Disponible en: <http://www.unam.com.mx>.
- (24) Medina JC. Actualidades sobre micotoxinas. Los Avicultores y su entorno 2000: 3.30-35.
- (25) Márquez MR, Madrigal SO, Madrigal BE, Villaruel VN, Vera GE y Tejada CL. Efecto antigenotóxico de los mananoligosacáridos (MycosordTM) de *Saccharomyces cervisiae* en dietas para ratón contaminadas con aflatoxina B1 (AFB1). Memorias de la XXV Convención Anual ANECA; 2000 mayo 3-6; Cancún (Quintana Roo) México. México (D.F): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC, 2000: 166-168
- (26) Valladares JC. Efectos de las aflatoxinas en la morfofisiología del sistema inmunológico. Memorias de la IV jornada Médico Avícola; 1993 agosto 4-6 México (D.F): Departamento de Producción Animal:Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 1993: 250-257.
- (27) Díaz GJ, Squires EJ, Julian RJ and Boermans HJ. Individual and combined effects of T-2 toxin and DAS in laying hens. *British Poultry Science* 1994;35:393-405.
- (28) Schaeffer JL, Tyczkowski JK and Halmilton PB. Alterations in carotenoid metabolismo during achratoxicosis in young broiler chickens. *Poultry Science* 1987;66:318-324. Coelho BM. Mycotoxin tolerance of animals. In Coelho BM, editor. *Molds, mycotoxins and feed preservatives in the feed industry*. 2nd. Ed, New Jersey: BASF corporation, 1996,27-30.
- (29) Coelho BM. Mycotoxin tolerance of animals. In Coelho BM, editor. *Molds, mycotoxins and feed preservatives in the feed industry*. 2nd. Ed, New Jersey: BASF corporation, 1996,27-30.
- (30) Marquardt RR and Frolich AA. A review of recent advances in understanding achratoxicosis. *Journal of Animal Science* 1992. 70; 3968-3988.
- (31) Elling F, Hald B, Jacobsen C and Krogh P Spontaneous nephropathy in poultry associated with achratoxin A. *Acta of Pathology and Microbiology Scandianavian* 1975;83:739-742.
- (32) Hamilton PB, Huff WE, Harris JR and Wyatt RD. Natural occurrences of achratoxicosis in poultry. *Poultry Science* 1982;61:1832-1841.

- (33) Burns RB, Dwivedi P. The natural occurrence of ochratoxin A and its effects on poultry. A review Part I . Epidemiology and toxicity . World Poultry Science Journal 1986: 42;32-47.
- (34) Burns RB, Dwivedi P. The natural occurrence of ochratoxin A and its effects on poultry. A review Part II. Pathology and immunology. World Poultry Science journal 1986: 42;48-55.
- (35) Glahn RP. Mycotoxins and the avian kidney: assessment of physiological function. World's Poultry Science Journal 1993: 49;242-245.
- (36) Trenk LH, Butz ME and Chu FS. Production of ochratoxins in different cereal products by *Aspergillus ochraceus*. Applied Microbiology 1971;21;1032-1035.
- (37) Connole MD, Blaney BJ and McEwan T . Mycotoxins in animal feeds and toxic fungi in Queensland 1971-1980. Australian Veterinary Journal 1981;57;314-318.
- (38) Samson RA, Hoekstra ES and Van Oorschot CAN. Introduction to food borne fungi, 2nd. Ed., Netherlands: Centraalbureau voor schimmelcultures, 1984.
- (39) Raper KB and Fennell DI. The genus *Aspergillus*. Baltimore, USA: William & Wilkins, 1965.
- (40) Micco C, Miraglia M, Onorii R, Loppolo A and Mantovani A. Long-term administration of low doses of mycotoxins in poultry. 1. Residues of ochratoxin A in broilers and laying hens. Poultry Science 1987;66;47-50.
- (41) Fuchs R, Applegren LE, Hagelberg S and Hult K. Carbon-14-ochratoxin A distribution in the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) monitored by whole body autoradiography. Poultry Science 1988;67;707-714.
- (42) Warren MF, Halmiton PB. Inhibition of the glycogen phosphorylase system during ochratoxicosis in chickens. Applied and Environmental Microbiology 1980;40;522-525.
- (43) Sturkie PD. Kidneys, extrarenal salt excretion and urine. In: Sturkie PD. Avian physiology. 4thed, New York, USA: Springer-Verlag, 1986.
- (44) Chang CF, Huff WE and Hamilton PB. A leucocytopenia induced in chickens by dietary ochratoxin A. Poultry Science 1979;58;555-558.
- (45) Chang CF and Hamilton PB. Impairment of phagocytosis by heterophils from chickens during ochratoxicosis. Applied and Environmental Microbiology 1980;39;572-575.

- (46) Singh GSP, Chauhan HVS, Jha GJ and Singh KK. Immunosuppression due to chronic ochratoxicosis in broiler chicks. *Journal of Comparative Pathology* 1990;103:399-410.
- (47) Dwivedi P and Burns RB. Pathology of ochratoxicosis in young broiler chicks. *Research in Veterinary Science* 1984;36:92-103.
- (48) Doerr JA, Huff WE, Tung HT, Wyatt RD and Halmiton PB. A survey of T-2 toxin, ochratoxin and aflatoxin for their effects on the coagulation of blood in young broiler chickens. *Poultry Science* 1974;53:1728-1734.
- (49) Bailey CA, Gibson RM, Kubena LF WE and Harvey RB. Impact of L-phenylalanine supplementation on the performance of three-week-old broilers fed diets containing ochratoxin A. 2. Effects on hematology and clinical chemistry. *Poultry Science* 1990;69:420-425.
- (50) Joffe AZ. *Fusarium species. Their biology and toxicology.* New York, USA: John Wiley and sons, 1986.
- (51) Ueno, Y. Toxicology of microbial toxins. *Pure Applied Chemistry* 1986;58:339-350.
- (52) Márquez MR, Tejada HI, González SD, Monroy BJI, Valero EG. Intoxicación por toxina 2 en aves de engorda. *Técnica Pecuaria México* 1995;33:112-115.
- (53) Ueno Y, Sawano M and Ishii K. Production of trichothecene mycotoxins by *Fusarium* species in shake culture. *Applied Microbiology* 1975;30:4-9.
- (54) Lillehoj EB. Feed sources and conditions conducive to production of aflatoxin, ochratoxin, *Fusarium* toxins and zearalenone. *J. Am. Vet. Med. Association* 1973;163:1281-1284.
- (55) Ueno Y. Toxicology of microbial toxins. *Pure applied chemistry* 1986;58:339-350.
- (56) Chi Ms, Robison Ts, Mirocha Cj and Behrens JC. Transmission of radioactivity into eggs from laying hens (*Gallus domesticus*) administered tritium labeled T-2 Toxin *Poultry Science* 1978;57:1234-1238.
- (57) Karppanen E, Rizzo A, Saari L, Berg S and Bostrom H. Investigation on trichothecene-stimulated lipid peroxidation and toxic effects of trichothecenes in animal. *Acta Veterinaria Scandinavica* 1989;30:391-399.
- (58) Coulombe RA. Biological activity of mycotoxins. *Journal of Dairy Science* 1993;76:880-891.
- (59) Kubena LF, Harvey RB, Phillips TD, Corrier DE, Huff WE. Disminution of aflatoxicosis in growing chickens by the dietary addition of hydrated sodium calcium aluminosilicate. *Poultry Science* 1990;69:727-735.

- (60) Hoerr FJ, Carlton WW, Yagen B and Joffe AZ. Mycotoxicosis produced in broiler chickens by multiple doses of either T-2 toxin or diacetoxyscirpenol. *Avian Pathology* 1982;11:369-383.
- (61) Arce MJ, Avila GE, Vázquez PC, López CC, tirado FJ. Efecto de dos aluminosilicatos en dietas con 45ppb de aflatoxina B1 sobre los parámetros productivos en pollos de engorda. *Veterinaria México* 1994;25:33-36.
- (62) Kubena LF, Harvey RB, Bailey RH, Buckley SA and Rottinghaus GE, Effects of a hydrated sodium calcium aluminosilicate (T-Bind) on mycotoxicosis in young broiler chickens. *Poultry Science* 1998;77:1502-1509.
- (63) Ledoux DR, Rottinhaus GE, Bermudez AJ, Alonso-Debolt M. Efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broiler chicks. *Poultry Science* 1999; 78:204-210.
- (64) Phillips TD, Kubena LF, Harvey RB, Taylor DR, Heidebaugh ND, Hidratal sodium calcium aluminosilicate: A. High affinity sorbent for aflatoxin. *Poultry Science* 1988;67:243-247.
- (65) Ramos AJ and Hernández E. Prevention of aflatoxicosis in farm animals by means of hydrated sodium calcium aluminosilicate addition to feedstuffs: a review. *Animal Feed Science and Technology* 1997;65:197-206.
- (66) Devegowda G. And Raju MVLN. 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 Science* 2000.
- (67) Tamames F. Química de las arcillas. *Industria Avícola* 2000;47:20-22.
- (68) Flores CM, Domínguez JM, Díaz de León J. Modelig and experimental comparison on the differential adsorption of B1 and aflatoxins on mineral aluminosilicates surfaces. *Journal of Environmental pathology, Toxicology and Oncology* 1999;18:213-220.
- (69) Lechuga GD, Rosiles MR, Horta RJM. Identificación fisicoquímica de algunos aluminosilicatos y de su actividad adsorbente sobre aflatoxina B1 *in vitro* ; *Veterinaria México* 1995;26:129-132.
- (70) Madhyastha SM, Marquardt RR, Frohlich AA, Platford G and Abramson D. Effects of different cereal and oilseed substrates on the growth and production of toxins by *Aspergillus alutaceus* and *Penicillium verucosum*. *Journal of agricultural food and chemistry* 1990; 38;1506-1510.

- (71) Stoloff L, Nesheim S, Yin L, Rodricks YV, Stack M and Campbell AD. A multimycotoxin detection method for aflatoxins, ocratoxin, zearalenone, sterigmatocystin and patulin. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 1971; Scheideler Se. Effects of various types of aluminosilicates and aflatoxin B1 on aflatoxin toxicity. Chick performance and mineral status. *Poultry science* 1993;72;282-288.
- (72) Stoloff L, Nesheim S, Yin L, Rodricks YV, Stack M and Campbell AD. A multimycotoxin detection method for aflatoxin, zearalenone, sterigmatocystin and patulin. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 1971;54;91-97.
- (73) Nesheim S, Stack ME, Trucksess MW and Eppley M. Rapid solvent-efficient method for liquid chromatographic determination of ocratoxin A in corn, barley, and kidney: collaborative study. *Journal of AOAC International* 1992;75;481-487.
- (74) Burmesteir HR. T-2 toxin production by *Fusarium tricinctum* on solid substrate. *Applied Microbiology* 1971;21;739-742.
- (75) Vesonder RF, Ciegler A and Jensen AH. Production of refusal factors by *Fusarium* strains on grains. *Applied and environmental Microbiology* 1977;34:105-106.
- (76) Perkin-Elmer. Analytical methods for atomic absorption spectrophotometry. Connecticut: Perkin-Elmer, 1994.
- (77) Association of Official Analytical Chemistry. Official methods of the Association of Official Analytical Chemistry. Edited by Kenneth Helrich. 15th. Ed. Washington DC: AOAC, 1990.
- (78) Tejada ZI. Control de calidad y análisis de alimentos para animales México: Sistema de Educación continua en producción Animal, Secretaría de educación Pública, 1992
- (79) Zaugg WS and Knox RJ. Indirect determination of inorganic phosphate by atomic absorption spectrophotometric determination of molybdenum. *Analytical Chemistry*. 1966;38;1759-1760.
- (80) Hair JF, Anderson RE, Tatham RL and Black WC. Multivariate data analysis. 4th ed, New Jersey: Prentice Hall, 1995.
- (81) Osuna O. Soluciones prácticas para disminuir el impacto de las micotoxinas en la avicultura. Memorias del XVI Congreso Centroamericano y del Caribe de Avicultura; 2000 NOVIEMBRE 15-17; Panamá (Panamá): Asociación Centroamericana de Avicultura, 2000:355-361.

- (82) Medina JC, Muñoz J, Lara J, Rivera L y Fierro JA. Criterios de control de calidad de aluminosilicatos comercializadores como adsorbentes de micotoxinas. Memorias del XVI Congreso Latinoamericano de Avicultura; 1999 Septiembre 21-24. Lima (Perú) Perú: Asociación Peruana de Avicultura, 1999:391-393.
- (83) Dorner JW. Mycotoxins in food. Methods of analysis In . Nollet LM, editor Handbook of food Analysis Volumen 2. New York:Marcel Decker, 1996:1089-1146.
- (84) Andrade OF. Efecto de los aluminosilicatos como secuestrantes de aflatoxinas B1, evaluado por conversión alimenticia y concentración de calcio, fósforo, magnesio, hierro, cobre y zinc en pollo de engorda (tesis de licenciatura). México (DF):FMVZ, UNAM, 1993.
- (85) Roland DA, Barnes DG and Laurent SM. Influence of sodium aluminosilicate, hydroxy-sodalite, carnegieite, aluminum sulfate and aluminum phosphate on performance of commercial Leghorns. Poultry Science 1991;70:805-811.
- (86) Huff WE, Wyatt RD, Tucker TL and Hamilton PB. Ochratoxicosis in the broiler chicken. Poultry science.
- (87) Kubena LF, Harvey RB, Huff WE and Corrier DE. Influence of ochratoxin A and t-2 toxin singly and in combination on broiler chickens. Poultry science 1989;68:867-872.
- (88) Huff We, Doerr JA, Wabeck CJ, Chaloupka GW, May JD and Merkle JW. The individual and combined effects of aflatoxin and ochratoxin A on varios processing parameters of broiler chickens. Poultry Science 1984,63:2153-2161.
- (89) Kramer JW and Hoffmann WE. Clinical enzymology. In: Kaneko JJ, Harvey JW and Bruss ML, editors. Clinical biochemistry of domestic animals. 5th ed, San Diego California: Academic Press, 1997.
- (90) Ritchie BW, Harrison GJ and Harrison LR. Avian medicine: principles and application. Florida, USA: Wings publishing, 1994.
- (91) Lumeij JT, Avian clinical biochemistry. In Kaneko JJ, Harvey JW and Bruss ML. Editors. Clinical biochemistry of domestic animals 5th ed, San Diego, California: Academic Press, 1997.

- (92) Kaneko JJ, Serum proteins and the dysproteinemias. In: Kaneko JJ, Harvey JW and Bruss ML, editors. *Clinical biochemistry of domestic animals* 5th ed, San Diego, California: Academic Press, 1997.
- (93) Smith TK, Recent advances in the understanding of *Fusarium trichothecene* mycotoxins. *J. of Anim. Sci.* 1992;70:3989-3993.
- (94) Scott ML, Nesheim MC and Young RJ. *Nutrition of the chicken*. 3rd ed Ithaca, New York: Scott and associates, 1982.
- (95) Petrone VM, Juárez RM, Tejada R y García A. Hallazgos macroscópicos e histológicos gastrointestinales en pollos con mala pigmentación intoxicados con acrotóxina A. *Memorias del X aniversario de la Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios: 2001 junio 14-17; Puerto Vallarta (Jalisco) México. México (D.F): Sociedad Mexicana de patólogos veterinarios, AC, 2001.*
- (96) Hoerr FJ. Liver. In: Riddell C, editor. *Avian histopathology*. 2nd. Ed., Canada: American Association of Avian pathologists, 1996.
- (97) Brown TP. Urinary system. In: Riddell C, editor. *Avian histopathology*. 2nd. Ed., Canada: American Association of avian pathologists, 1996.
- (98) Goodwin MA. Alimentary system. In Riddell C, editor. *Avian histopathology*. 2nd. ed., Canada: American Association of Avian pathologists, 1996. Pope CR. Lymphoid system. In: Riddell C, editor. *Avian histopathology* 2nd ed., Canada: American association of avian pathologists, 1996.
- (99) Pope CR. Lymphoid system. In: Riddell C, editor. *Avian Histopathology*. 2nd. ed., Canada: American Association of Avian pathologists, 1996.
- (100) Diener, U.L & Davis, N.D. 1987. "Biology of *Aspergillus Flavus* & *A. parasiticus*". In. Zube, Lillehoj & Renfro. 1987. *Aflatoxinin Maize. A Proceedings of the Workshop*". 33-40. CIMMYT. México, D.F.
- (101) Krogh, P. 1987. "Mycotoxins in food". Academic Press. U.S.A. 65-95.
- (102) Raper, K.B. 6 fennell, D.L. 1965. "The genus *Aspergillus*". The Williams & Wilkins co. U.S.A. 360-379.
- (103) Steyn, P.s. 1980. "Influence of mycotoxins on protein and amino-acid utilization". *Fed. Proc.* 41 (11):2828-2832.
- (104) Giral Pont, J., Pifol Campanera, j. y arroyo, R. 1989. "El problema de la contaminación fúngica en la industria de piensos". 2^a. Ed. Lucta, S.a. Barcelona, España. 33-65.

- (105) Buchi G y Rae I.D. 1969. The structure and Chemistry of the aflatoxins, en Goldblatt, L.A. (Ed) Aflatoxins. Academic Press, New York:55.
- (106) Sakai M., Abek., Okumura H., Sugiura Y., Horie H., and Ueno Y. 1992. Genotoxicity of fungi evaluated by sos microplate asaga y. *Nat. Toxins*. 1(19):27-32.
- (107) Rodricks J.V., Messaltine L.W. and Mehlam H.a.. 1977. Mycotoxins in human and animal health. Ed Pathotox Publishers Inc. USA: 37-47.
- (108) Pier A.c. 1987. aflatoxicosis and immunosuppression in mammalian animals. En Aflatoxin in Maize, Ed. M.S. Zuber. E. Lillehøj y B.L Renfro (México, CIMMYT):5865.
- (109) Patterson D.S.P. 1973. Metabolism as a factor in determining the toxic action of the aflatoxins in different animal species. *Fd. Cosm. Toxicol.* 11: 287-294.
- (110) Bagley, E.B. 1979. " Decontamination of com containing aflatoxin by treatment with ammonia". *J. Amer. Oil, Chem.* 56 (9):808-811.
- (111) Mirocha, C.J. Pather, S.V. & Christensen, C.M. 1980. " Micotoxins". In: Steyn, P.S. 1980. " The biosynthesis of mycotoxins". Academic Press. U.S.A. 105-150.
- (112) Wyllie, T.d. & Morehouse, L.G. 1978. " Micotoxic fungi, mycotoxins and mycotoxicoses". Vol. 3. Marcel Dekker Inc. U.S.A. 119-143.
- (113) Reiss, J. 1971. " Increase of activity of beta-indolyacetic acid by aflatoxin B1 Z. pflanzenphysiol. 64,(3):260.
- (114) Black, H.S. & Altschul, R. 1965. " Gibberellic acid-induced lipase and α -amilase formation and their inhibition by aflatoxin". Biochem. Biophys. Res. Commun. 19:661.
- (115) Ashai, T., Mopri Z., Majima, R., 6 Uritani, I. 1969. J. stored Prod. Res. 5. In: Wyllie, T.D. & Morehouse, L.G. " Micotoxic fungi, mycotoxins and mycotoxicoses". Vol 3. 1978. Marcel Dekker Inc. E.U.A. 119-143.
- (116) Joffe. A.Z. 1969. " Relationships between A. Flavus, A. niger and some fungi in mycoflora of groundnut kernels". Plant soil. 31:57.
- (117) Lilly, L.J. 1965. " Induction of chromosome aberrations by aflatoxin". Nature 207:433.
- (118) Crisan, E.V. 1973. " effects of aflatoxin on germination and growth of Lettuce". Appl. Microbiol. 25 (3):206.

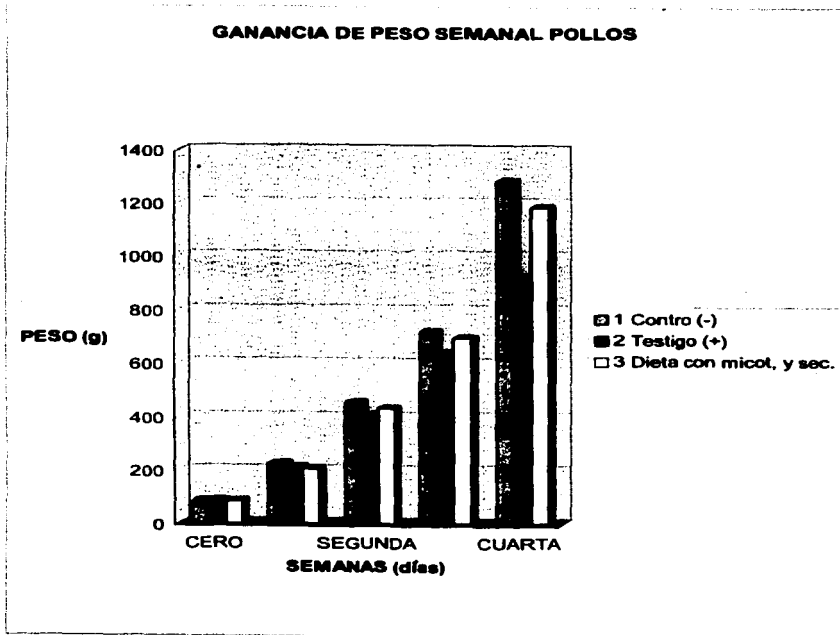
- (119) Giralt Pont, J., Piñol Campanera, J. Y arroyo, r. 1989. " El problema de la contaminación fúngica en la industria de piensos". 2ª. Ed. Lucta, S.a. Barcelona , España. 34-38.
- (120) Puchase, I.f.H. 1968. " Carcinogenicity of sterigmatocystin". Fodd Cosmet. Toxicol. 6: 555.
- (121) Wei, R.D. 1968. Chinese J. physiol. 20. En : Giralt Pont, J., Piñol Campanera, J., arroyo, R. 1989. " El problema de la contaminación fúngica en la industria de piensos". 2ª. Ed. Lecta., S.A. Barcelona, España. 33-65.
- (122) Tung, H.T. et al . 1970. " Effects of aflatoxin on some make enzymes of lysosomes". Biochem. Biophys. Acta 222 (3): 665. In: steyn, P.S. 1980. " The biosynthesis of mycotoxins". Academic Press. U.S.a. 105-150.
- (123) Tung, H.t. et al. 1971. " Aflatoxicosis and bruising in chicken". Poultry Science. 50 (3):795.
- (124) Smith, T. K. 1982. " Influence of mycotoxins on protein and amino-acid utilization". Fed. Proc. 41(11):2828-2832.
- (125) Masri, M.s. 1969. " Aflatoxin M content of milk from cows fed known amounts of aflatoxin". Vet. Rec. 84.146.
- (126) Yen, C.c. & hamilton, P.B. 1979. " Interaction of vitamin-A-deficiency and aflatoxicosis". Poultry Science 58(4):1124.
- (127) Hagler, W.M. 6 Hamilton P.B. 1982. "interactions between vitamin nutrition and aflatoxin in agricultural animals". Dev. Ind. Microbiol. 23: 247-256.
- (128) Hamilton, P.B. 1974. " Interaction of dietary aflatoxin with some vitamin deficiencies ". Poultry Science 53 (3): 871-877.
- (129) Patel, J.M. & Pawar, S.s. 1974. " riboflavin and drug-metabolism in adult male and female rats". Biochem. Pharmacol. 23 (10): 1467-1477.
- (130) Giambrone, J.J. 1978. " aflatoxin on human and cell-mediated immunosystem of chicken". Am. J. Vet. Res. 39 (2) : 305-308.
- (131) Hamilton, P.B. 1982. Refuah Vet. 39. En: giralt Pont, J., Piñol. Campanera, J. Y arroyo, R. 1989. # El problema de la contaminación fúngica en la industria de piensos". 2ª. Ed. Lucta, S.A. Barcelona, España. 33-65.
- (132) Madhavan, T.V. 1967. " Tubular epithelial reflux in kidney in aflatoxin poisonig". J. Path. Bact. 93: 329.

- (133) Roebuck, B.D. 6 Wigan, G.N. 1977. " Species comparison of *in vitro* metabolism of aflatoxin B1 ". Cancer Res. 37 (6): 1649-1656.
- (134) Valle Vega, P. 1991. " Toxicología de Alimentos ". ECO/OMS/OPS. México. 10-13.
- (135) Osweiler G.D., Carson T.L., Buck W.b., and Van Gelder G.A. 1985. Clinical and Diagnostic, Vet. Toxic. 3rd edn. Kendall / Hunt. Iowa: 409-450.
- (136) Smith J.E. and Ross K. 1991. The toxigenic Aspergilli, en : Smith
- (137) Klaassen C.D. and y Rozman K. 1991. Absortion, distribution and excretion of toxicants. Amdurt, M.O., Doull, J.& Klaassen, C. D. (Eds) **Casertt and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons**, 4th edn, 50-87.
- (138) Wogan G.A. 1977 Mode of actino of aflatoxins, en **Mycotoxin in human and animal health**. Pathotox Publishers Inc. USA: 29-50.
- (139) Ueno Y., Tashiro F., Harikawa K. and Emi Y. 1984. Metabolism and their toxicity, en: Tazima Y. *et al* (eds). **Problems of Thershold in Chemical Mutagenesis**. The Environmental Mutagen Society of Japan: 61-71.
- (140) Yoshikawa H. Uchimaruru R. Kamataki., Kato R. and ueno Y. 1982. Metabolism and activation of aflatoxin B1 by reconstituted cytochrome P-450 system of rat liver. **Cancer Res.** 42: 1120-1124.
- (141) Leeson s., Diaz g. And summers J. 1995. **Poultry Metabolic disorders and Mycotoxins**. Edt University Books, Guelph, Canada. 249-298.
- (142) Márquez M. R. ., Martínez A.A., Tejada de H.I. y weismerheimer r.j.. 1995°. Irradiación con Co⁶⁰ de maíz contaminado con Aflatoxina B1. en memorias de la **Reunión Nal de Invest. Pec.** En México: 288.
- (143) Kubena L.F., Harvey R.B., Huff N.E. and Corrier D.E 1989. ameliorating properties of a hydrated sodium calcium aluminosilicate on the toxicity of aflatoxin and T-2 Toxin. Adstracts of the 78th annual meeting of the Poultry science association. Poultry science association. **Poult. Sci.** 68 (19): 69-72.
- (144) Lindermljan m.d. Blodgett e.T., Kornegay E.T., y Schuring G.G. 1993. Potential ameliorators of aflatoxicicis in weanling/growing swine. **J.Anim. Sci** 71:171-178.
- (145) Harvey R.B., kubena L.f., Phillps t.d., corrier D.E., Elissalde m.H., anfd Huff W.E. 1991. disimnution of aflatoxin toxicity to growing lams by dietary supplementation with hydrated sodium calcium aluminosilicate. **Am. J. Vet. Res.** 52 (3): 152-156.

- (146) Park , D.L. 1993 Controlling aflatoxin in food and feed. **Food Technol. Oct.** 1993:92-96.
- (147) Márquez M.R. and Tejada de H.I., 1995 . Aflatoxin adsorbent capacity of two Mexican aluminosilicates in experimentally contaminated chick diets. **Food Addit. And Contam.** 12 (3): 431-433.
- (148) Kubena L.F., Harvey N.E ., Phillips T.D and Clement a.B. 1993. Effect of hydrated of a hydrated sodium calcium aluminosilicate on aflatoxicosis in broiler chicks. **Poult Sci.** 72(4): 651-653.
- (149) Tejada de H.I 1983. **Manual de análisis de ingredientes para la alimentación animal.** Eds. PAIEPEME, México, D.F. 36-40.
- (150) Goñi E.A., y Tejada de H.I 1987. Inactivación de AFB1 con metabisulfito de sodio. En **Memorias de la Reunión Nat de Invest. Pec. En México.** 48.
- (151) Ellis W.O., Smith J.P., Simpson B.K. and Oldham J.H. 1991. Aflatoxin in food: occurrence, biosynthesis, effects on organism, detection, and methods of control. **Critical rev. Food Sci. and Nutr.** 30: 403-439.
- (152) Hao D.Y., and Brackett R.E. 1989. growth and survival of *Flavobacterium aurantiacum* in peanut milk. **J. of food Protec.** 52 (3): 165-168.
- (153) Stanley V.G., Ojo R., Woldesenbet S. and Hutchinson D.H. 1993. The use of *Saccharomyces cerevisiae* to suppress the effects of aflatoxicosis in broiler chicks. **Poult.Sci.** 72: 1867-1872.
- (154) INIFAP. 1997. reducción del riesgo de contaminación por aflatoxinas en maíz. En **Tecnologías Llave en Mano.** INIFAP-SAGAR: 61-62.
- (155) Lillehøj e.B., 1987. The aflatoxin in maize problem: The historical perspective. En **Aflatoxin in Maize.** Ed. CIMMYT., México, D.F. 13-27.
- (156) Torreblanca r.a. Bourges H.R. y Morales J.a. 1987. aflatoxin in maize and tortillas in México. En **Aflatoxin in Maize** Ed CIMMYT, México D.F. 310-316.
- (157) Macoco P.C. 1994. Contenido de micotoxinas en cereales para alimento de animales. Tesis de Lic. **Biología.** Facultad de Ciencias, UNAM, México:12-38.

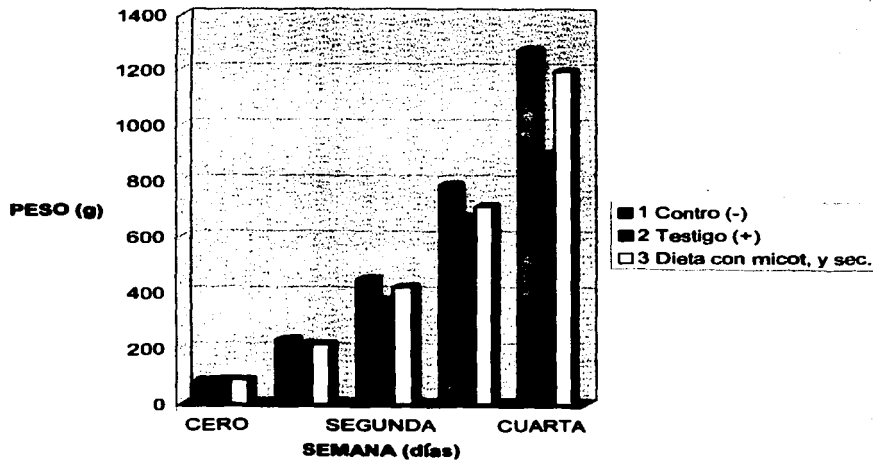
2.14 APÉNDICE.

2.14.1 GRÁFICA # 1



2.14.2 GRÁFICA # 2

GANANCIA DE PESO SEMANAL POLLAS



2.15.3 LESIONES MACROSCÓPICAS



Fig. 1 Presencia de lesiones en el pico de los pollos que son afectados por la mezcla de micotoxinas en la dieta.

Fig. 2 Muestra la diferencia en la ganancia de peso de los grupos experimentales, así como su pigmentación.



Fig. 3 Lesiones características de la mezcla de micotoxinas.

**TESIS CON
MAYOR DE ORIGEN**



Fig. 4

Fig. 5

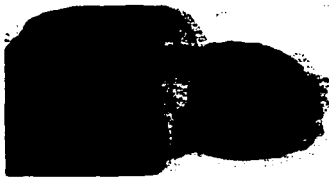


Fig. 6



TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

Fig. 7



Figs. 4, 5, 6, 7 Necropsias que muestran las lesiones ocasionadas por la presencia de micotoxinas a las dietas de los animales de experimentación.