



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y
DE LA SALUD ANIMAL**

**EVALUACIÓN DE DOS ABSORBENTES Y DOS
INACTIVADORES DE MICOTOXINAS EN DIETAS DE
POLLO DE ENGORDA CONTAMINADAS CON
OCRATOXINAS**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

ANA LUISA CEVALLOS GORDON

**TUTOR:
ERNESTO ÁVILA GONZÁLEZ**

**COMITÉ TUTORAL
RENÉ ROSILES MARTINEZ
CÉSAR FLORES ORTIZ**

MÉXICO DF

2007



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.

DEDICATORIAS

A Dios y la Virgen María, que gracias a ellos he tenido tantas oportunidades en la vida, siendo esta una de las más importantes.

A mis padres, que con su cariño y dedicación han formado en mí, la persona que soy.

A mis hermanos: Margarita, Juan Carlos, Judith, Amparo y Luis Fernando.

A mis sobrinos.

AGRADECIMIENTOS

A la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria (FMVZ) y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por permitirme realizar mis estudios de maestría.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado (DEGEP), por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría.

Al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola (FMVZ-UNAM), donde realice las pruebas *in vivo*.

Al Departamento de Nutrición – Toxicología FMVZ-UNAM por su apoyo incondicional.

Al Departamento de Micología FMVZ-UNAM que donaron la cepa de *A. ochraceus*.

Al Departamento de Aves FMVZ-UNAM quienes me prestaron sus instalaciones.

Al Dr. Ernesto Ávila González, por sus enseñanzas y consejos; por su confianza, amistad y apoyo durante todas las fases del proyecto.

Al Dr. René Rosiles Martínez por amistad, paciencia, preocupación y por sus sabios consejos.

Al Dr. César Flores Ortiz por sus comentarios y sugerencias.

Al Dr. Carlos López Coello y Dra. Irma Tejada, miembros del jurado, por sus sabios consejos y colaboración.

A todos mis maestros, por sus enseñanzas.

Al Ing. José Luis Pablos, por su colaboración en la parte estadística.

Al Dr. Janitzio Bautista, por su colaboración en la realización de los cromatogramas.

Al Dr. Néstor Lesdesma, por su ayuda con la parte de histopatología, por su confianza y hospitalidad.

Al Dr. Roberto Cervantes y Dra. Carolina Segundo, por su valiosa ayuda.

Al Dr. Juan Carlos del Río y Dr. René Márquez, por los análisis de micotoxinas.

Al Dr. Arturo García, Dra. Ma. Pilar Castañeda, Dr. Alfredo Canela y Dra. Paola Mérida, por su ayuda con la medición de pigmentación.

Al Dr. René Morales, Dr. Benjamín Fuentes y Dra. Gabriela Gómez, por su amistad, apoyo y consejos.

A la Dra. Teresa Casaubon por sus recomendaciones.

A Jessica, Lourdes, Aarón, Alfredo, César, Isaías y Miguel del CEIEPAv; al Dr. Juan Horta, Sra. Aurelia Cruz, Sr. Jaime, Erika, Julián, Mayela Civil y Víctor del departamento de Toxicología; Andira, Cecilia y Jesús del departamento de Micología.

A todos mis amigos, compañeros y conocidos, quienes siempre estuvieron pendientes de mí, e hicieron que mi estancia en México sea agradable.

MUCHAS GRACIAS.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y
DE LA SALUD ANIMAL**

**EVALUACIÓN DE DOS ABSORBENTES Y DOS
INACTIVADORES DE MICOTOXINAS EN DIETAS DE
POLLO DE ENGORDA CONTAMINADAS CON
OCRATOXINAS**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

ANA LUISA CEVALLOS GORDON

**TUTOR:
ERNESTO ÁVILA GONZÁLEZ**

**COMITÉ TUTORAL
RENÉ ROSILES MARTINEZ
CÉSAR FLORES ORTIZ**

MÉXICO DF

2007

DEDICATORIAS

A Dios y la Virgen María, que gracias a ellos he tenido tantas oportunidades en la vida, siendo esta una de las más importantes.

A mis padres, que con su cariño y dedicación han formado en mí, la persona que soy.

A mis hermanos: Margarita, Juan Carlos, Judith, Amparo y Luis Fernando.

A mis sobrinos.

AGRADECIMIENTOS

A la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria (FMVZ) y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por permitirme realizar mis estudios de maestría.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado (DEGEP), por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría.

Al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola (FMVZ-UNAM), donde realice las pruebas *in vivo*.

Al Departamento de Nutrición – Toxicología FMVZ-UNAM por su apoyo incondicional.

Al Departamento de Micología FMVZ-UNAM que donaron la cepa de *A. ochraceus*.

Al Departamento de Aves FMVZ-UNAM quienes me prestaron sus instalaciones.

Al Dr. Ernesto Ávila González, por sus enseñanzas y consejos; por su confianza, amistad y apoyo durante todas las fases del proyecto.

Al Dr. René Rosiles Martínez por amistad, paciencia, preocupación y por sus sabios consejos.

Al Dr. César Flores Ortiz por sus comentarios y sugerencias.

Al Dr. Carlos López Coello y Dra. Irma Tejada, miembros del jurado, por sus sabios consejos y colaboración.

A todos mis maestros, por sus enseñanzas.

Al Ing. José Luis Pablos, por su colaboración en la parte estadística.

Al Dr. Janitzio Bautista, por su colaboración en la realización de los cromatogramas.

Al Dr. Néstor Lesdesma, por su ayuda con la parte de histopatología, por su confianza y hospitalidad.

Al Dr. Roberto Cervantes y Dra. Carolina Segundo, por su valiosa ayuda.

Al Dr. Juan Carlos del Río y Dr. René Márquez, por los análisis de micotoxinas.

Al Dr. Arturo García, Dra. Ma. Pilar Castañeda, Dr. Alfredo Canela y Dra. Paola Mérida, por su ayuda con la medición de pigmentación.

Al Dr. René Morales, Dr. Benjamín Fuentes y Dra. Gabriela Gómez, por su amistad, apoyo y consejos.

A la Dra. Teresa Casaubon por sus recomendaciones.

A Jessica, Lourdes, Aarón, Alfredo, César, Isaías y Miguel del CEIEPAv; al Dr. Juan Horta, Sra. Aurelia Cruz, Sr. Jaime, Erika, Julián, Mayela Civil y Víctor del departamento de Toxicología; Andira, Cecilia y Jesús del departamento de Micología.

A todos mis amigos, compañeros y conocidos, quienes siempre estuvieron pendientes de mí, e hicieron que mi estancia en México sea agradable.

MUCHAS GRACIAS.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCION.....	1
1.1 PRODUCCION DE MICOTOXINAS.....	1
1.2 OCRATOXINAS.....	2
1.2.1 Estructura química y clasificación.....	3
1.2.2 Cepas de hongos productoras de ocratoxinas <i>in vitro</i>	5
1.2.3 Factores que influyen en la producción de OTA.....	6
1.2.4 Toxicidad de OTA	7
1.2.5 Mecanismo de acción.....	9
1.2.6 Ocurrencia natural de OTA.....	9
1.2.7 Ocratoxicosis natural.....	11
1.2.9 Interacciones encontradas entre OTA y otras micotoxinas.....	13
1.3 Principales adsorbentes o inactivadores de ocratoxinas.....	16
1.3.1 Silicatos.....	16
1.3.2 Polímeros orgánicos.....	16
1.3.3 Evaluación de secuestrantes.....	17
1.3.3.1 Pruebas <i>in vitro</i>	17
1.3.3.2 Pruebas <i>in vivo</i>	17
1.3.4 Características deseables de un secuestrante.....	18
2. JUSTIFICACIÓN	19
3. OBJETIVO GENERAL.....	20
4. OBJETIVOS PARTICULARES	20
5. HIPÓTESIS.....	21
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
6.1 PRODUCCIÓN DE OCRATOXINAS	22
6.2 EVALUACIÓN <i>IN VIVO</i>	23
6.2.1 EXPERIMENTO 1.....	23
6.2.1.1 Parámetros productivos.....	24
6.2.1.2 Consumo de agua.....	24
6.2.1.3 Lesiones macroscópicas.....	25
6.2.1.4 Pigmentación amarilla de la piel.....	25
6.2.2 EXPERIMENTO 2.....	25
6.2.2.1 Parámetros productivos.....	26
6.2.2.2 Consumo de agua.....	26
6.2.2.6 Pigmentación amarilla de la piel y tarsos.....	26
6.2.2.7 Química sanguínea.....	27
6.2.2.3 Necropsias e índices de pesos relativos de órganos.....	29

6.2.2.4 Histopatología.....	30
6.2.2.5 Cuantificación de OTA en órganos.....	30
6.2.2.8 Serología.....	31
6.3 EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i>	32
6.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	34
7. RESULTADOS.....	35
7.1 EVALUACIÓN <i>IN VIVO</i>	35
7.1.1 EXPERIMENTO 1.....	35
7.1.1.2 Parámetros productivos.....	35
7.1.1.2 Consumo de agua.....	36
7.1.1.3 Pigmentación amarilla de la piel.....	36
7.1.1.4 Lesiones macroscópicas.....	37
7.1.2 EXPERIMENTO 2.....	37
7.1.2.2 Parámetros productivos.....	37
7.1.2.2 Consumo de agua.....	39
7.1.2.7 Pigmentación amarilla de la piel y tarsos.....	39
7.1.2.8 Química sanguínea.....	40
7.1.2.3 Necropsias e índice de pesos relativos de órganos.....	40
7.1.2.4 Histopatología.....	41
7.1.2.5 Cuantificación de OTA en órganos.....	42
7.1.2.9 Serología.....	43
7.2 EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i>	43
8. DISCUSIÓN.....	44
8.1 EVALUACIÓN <i>IN VIVO</i>	44
8.1.1 Parámetros productivos.....	45
8.1.2 Efecto de los secuestrantes y/o inactivadores.....	46
8.1.3 Consumo de agua.....	47
8.1.4 Pigmentación amarilla de la piel y tarsos.....	48
8.1.5 Química sanguínea.....	49
8.1.6 Necropsias e índice de pesos relativos de órganos.....	51
8.1.7 Histopatología.....	52
8.1.8 Cuantificación de OTA en órganos.....	53
8.1.9 Serología.....	54
8.2 EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i>	55
9. CONCLUSIONES.....	57
10. BIBLIOGRAFÍA.....	59

11. CUADROS

Cuadro 1. Clasificación de las ocratoxinas por el aminoácido y por el tipo de sustituyente.....	72
Cuadro 2. Experimento 1. Distribución de los tratamientos para los pollitos alimentados con 500 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ocratoxinas	73
Cuadro 3. Composición y Análisis Calculado de nutrientes de la dieta basal.....	74
Cuadro 4. Experimento 2. Distribución de los tratamientos para los pollitos alimentados con 507 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ OTA	75
Cuadro 5. Experimento 1. Concentración de Ocratoxinas en alimento.....	75
Cuadro 6. Experimento 1. Peso corporal (gramos) de pollitos alimentados con 500 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ocratoxinas.....	76
Cuadro 7. Experimento 1. Consumo semanal (gramos) de alimento de pollitos alimentados con 500 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ocratoxinas.....	76
Cuadro 8. Experimento 1. Conversión alimenticia de pollitos alimentados con 500 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ocratoxinas.....	77
Cuadro 9. Experimento 1. Consumo diario de agua (ml) de pollitos alimentados con 500 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ocratoxinas.....	77
Cuadro 10. Experimento 1. Pigmentación amarilla de piel de pollitos alimentados con 500 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ocratoxinas.....	78
Cuadro 11. Experimento 2. Concentración de OTA en alimento.....	78
Cuadro 12. Experimento 2. Peso corporal (gramos) de pollitos alimentados con 507 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ OTA de 7 a 21 días de edad.....	79
Cuadro 13. Experimento 2. Ganancia de peso semanal (gramos) de pollitos alimentados con 507 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ OTA de 7 a 21 días.....	80
Cuadro 14. Experimento 2. Consumo de alimento semanal (gramos) de pollitos alimentados con 507 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ OTA de 7 a 14 días de edad.....	80
Cuadro 15. Experimento 2. Conversión alimenticia de pollitos alimentados con 507 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ OTA de 7 a 14 días de edad.....	81

Cuadro 16. Experimento 2. Consumo de agua diario (ml) y relación agua-alimento de pollitos alimentados con 507 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ OTA de 7 a 14 días de edad.....	81
Cuadro 17. Experimento 2. Pigmentación amarilla (b) de la piel y tarsos de pollitos alimentados con 507 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ OTA de 7 a 14 días de edad.....	82
Cuadro 18. Experimento 2. Bioquímica sanguínea de pollitos alimentados con 507 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ OTA de 7 a 14 días de edad.....	83
Cuadro 19. Experimento 2. Índice de Pesos relativos de órganos de pollitos alimentados con 507 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ OTA de 7 a 14 días de edad.....	84
Cuadro 20. Experimento 2. Degeneración hidrópica de hepatocitos en pollitos alimentados con 507 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ OTA de 7 a 14 días de edad.....	85
Cuadro 21. Experimento 2. Proliferación de conductos biliares en pollitos alimentados con 507 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ OTA de 7 a 14 días de edad.....	85
Cuadro 22. Experimento 2. Nefrosis en pollitos alimentados con 507 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ OTA de 7 a 14 días de edad.....	85
Cuadro 23. Experimento 2. Residuos de OTA ng g^{-1} en órganos de pollitos alimentados con 507 $\mu\text{g kg}^{-1}$ OTA de 7 a 14 días de edad.....	86
Cuadro 24. Experimento 2. Desafío in vitro de cuatro secuestrantes de micotoxinas frente a OTA.....	86

12. FIGURAS

Figura 1. Estructura química de OTA.....	87
Figura 2. Experimento 1. Cromatogramas (HPLC) de trigo contaminado y alimentos balanceados.....	87
Figura 3. Experimento 2. HI para Newcastle de pollitos alimentados con $507 \mu\text{g Kg}^{-1}$ OTA de 7 a 14 días de edad (\log_{-2}).....	88
Figura 4. Experimento 2. HI para Influenza Aviar de pollitos alimentados con $507 \mu\text{g Kg}^{-1}$ OTA de 7 a 14 días de edad (\log_{-2}).....	88

RESUMEN

Con la finalidad de evaluar cuatro aditivos antimicotoxinas (Klin Sil, Mycofix Plus, Mycoad o Toxisorb) en dietas sorgo+soya de pollitos de engorda en crecimiento contaminadas con ocratoxinas, se realizaron dos experimentos *in vivo* y una prueba *in vitro*.

En el Experimento 1, con 240 pollitos Ross 308, de 1 a 28 días de edad, divididos en 6 tratamientos: 1.-Testigo negativo, 2.-Testigo positivo (500 ug ocratoxinas totales kg^{-1}), y 3, 4, 5 y 6 testigo positivo con cada aditivo antimicotoxina. Cada tratamiento tuvo 4 réplicas de 10 aves cada una. El Experimento 2 con 168 pollos Ross 308 de 7 a 21 días de edad, se utilizaron los mismos tratamientos que en el experimento anterior, pero con 7 pollitos por réplica, y que las dietas se contaminaron con 507g ocratoxina A (OTA) kg^{-1} . Se evaluó el peso corporal, consumo de alimento, conversión alimenticia, pigmentación amarilla en piel, consumo de agua y lesiones macroscópicas en los Experimentos 1 y 2. Otras variables fueron: inhibición de la hemoaglutinación (HI) para Newcastle e Influenza aviar, proteínas totales (PT), ácido úrico (AU), creatinina, aspartato aminotransferasa (AST), glutamato deshidrogenasa (GLDH) y cuantificación de OTA en riñón, hígado y pechuga en el Experimento 2. En la prueba *in vitro* se simuló la digestión aviar con pepsina de las dietas.

En el Experimento 1, los pollitos alimentados con ocratoxinas, no presentaron diferencias con los que no la consumieron, en ninguna de las variables evaluadas. Los aditivos anti-micotoxinas, no redujeron ni mejoraron las variables estudiadas.

En el experimento 2, las aves que consumieron 507ug OTA kg^{-1} , mostraron menores valores de: peso corporal, consumo de alimento, pigmentación amarilla y PT; la conversión alimenticia fue deficiente comparada con los que no la recibieron. Además se incrementó el consumo de agua en la relación agua-alimento. Los índices de pesos relativos del hígado, riñón, bolsa de Fabricio, bazo fueron mayores, y el 40% de pollitos sacrificados, presentó nefromegalia. Hubo degeneración leve y moderada de hepatocitos, y nefrosis en todos los tratamientos y proliferación de conductos biliares, sólo en las aves que consumieron OTA. No hubo diferencias en HI de Newcastle e Influenza aviar, índice de peso relativo del timo, así tampoco los intestinos no presentaron cambios. En los pollos que consumieron OTA en riñones y pechugas no se detectó OTA, en hígados se encontró un valor promedio de 14.84 ng g^{-1} .

La prueba *in vitro* presentó secuestro de OTA superior al 90%, tanto en el tratamiento testigo positivo como con los aditivos utilizados. De acuerdo a las condiciones experimentales de esta investigación, no se encontró diferencia de actividad *in vivo* e *in vitro* por el uso o no de los aditivos anti-micotoxinas. Los resultados de la prueba *in vitro* no se relacionaron con los datos de los dos experimentos *in vivo*.

SUMMARY

With the purpose of evaluating four detoxificant additives (Klin Sil, Mycofix Extra, Mycoad or Toxisorb) in sorghum+soya diets for starting chicks contaminated with ochratoxins, two experiments *in vivo* and one test *in vitro* were conducted.

In Experiment 1, with 240 broiler chicks Ross 308, of 1 to 28 days of age, were divided in 6 treatments: 1.-Control negative, 2.-TControl, positive (500 ug total ochratoxins kg⁻¹), and 3, 4, 5 and 6 positive diets each one with an detoxificant additive. Each treatment had 4 replicates of 10 birds each one. Experiment 2 with 168 broiler chicks Ross 308 of 7 to 21 days of age, treatments were used such that in the previous experiment, but with 7 repetitions, and the diets were contaminated with 507 ug ochratoxin A kg⁻¹(OTA) kg⁻¹: Data evaluated were weight gain, feed consumption, feed conversion, yellow pigmentation in skin, water consumption and macroscopic injuries in Experiments 1 and 2. Other variables were: inhibition of the hemoagglutination (HI) Newcastle and Influenza, total proteins (TP), uric acid (AU), creatinine, aspartate aminotransferase (AST), glutamate dehydrogenase (GLDH) and quantification of OTA in kidney, liver and breast in Experiment 2. In the test *in vitro* the bird digestion with pepsin of the diets was simulated.

In Experiment 1, the chicks fed with ochratoxins, did not present differences among treatments, in any of the evaluated variables. The additives detoxificant, did not reduce nor improved the studied variables.

In Experiment 2, the birds that consumed 507ug OTA kg⁻¹, showed decrease values of: corporal weight, feed consumption, yellow pigmentation and TP; feed conversion was deficient compared with which negative control. In addition increased the water consumption in the relation water - feed. The rates of relative weights of the liver, kidney, bursa of Fabricius, spleen were greater and 40% of sacrificed chicks, presented nephromegaly. There was slight and moderate degeneration of hepatocytes, and nephrosis in all the treatments and proliferation of biliary conducts, only in the birds that consumed OTA. There were not differences in: HI of Newcastle and Influenza, rate of relative weight of the thymus, thus the internal did not present changes either. In the chickens that consumed OTA in kidneys and breast did not detect OTA, in livers was found 14.84 of ng OTA g⁻¹.

The test *in vitro* presented lost of OTA superior to 90%, as much in the treatment positive witness like with used additives. According to the experimental conditions of this investigation, was not difference of activity *in vivo* and *in vitro* by the use or not of additives detoxificant. The results *in vitro* were not related to the data of experiments *in vivo*.

1. INTRODUCCION

1.1 PRODUCCIÓN DE MICOTOXINAS

Los hongos son los microorganismos más ubicuos del medio ambiente. Pocos son patógenos para la avicultura y el ganado, resultando en micosis. Sin embargo la mayoría tienen la habilidad de crecer saprofiticamente en un amplio rango de sustratos y son considerados la causa más común de daño en las materias alimenticias humanas y animales¹.

Todos los hongos producen metabolitos primarios para la síntesis de biomasa y para generar energía necesaria para el metabolismo primario. En contraste, el metabolismo secundario es usualmente restringido a un pequeño número de especies (pueden ser cepas específicas) y ocurrir principalmente después de una fase de crecimiento balanceado, usualmente asociado con cambios morfo-genéticos como esporulación. Los metabolitos incluyen pigmentos y compuestos activos como protección contra microorganismos como son los antibióticos, contra las plantas como es el caso de las fitotoxinas o para protegerse de los animales y/o humanos como son las micotoxinas². La exposición a micotoxinas puede producir toxicidad tanto aguda como crónica, con resultados que van desde la muerte a efectos nocivos en los sistemas: nervioso central, cardiovascular, respiratorio y en el aparato digestivo. Las micotoxinas pueden también ser agentes cancerígenos, mutágenos, teratógenos e inmunodepresores³. El rol biológico del metabolismo secundario fúngico es aún desconocido².

Las micotoxinas son metabolitos tóxicos secundarios producidos por ciertos hongos en productos agrícolas, que crecen en condiciones medio ambientales específicas. Se estima que la contaminación de micotoxinas puede afectar hasta el 25% de las cosechas de grano al año^{2, 4}.

Los ingredientes alimenticios y el alimento terminado puede estar contaminado con múltiples micotoxinas por varios caminos: por un solo hongo que produce más de una micotoxina en un ingrediente alimenticio dado por dos ingredientes separados que contienen diferentes micotoxinas que serán utilizados en la manufacturación de alimento, o por la contaminación de un solo ingrediente con dos hongos por separado que producen diferentes micotoxinas ³.

Las micotoxinas más comunes son las Aflatoxinas, Ocratoxinas, Zearalenona, los Tricotricos, las Fumonisinias y Ergotaminas (alcaloides del cornezuelo) ⁵.

Las micotoxinas son compuestos orgánicos que contienen diferentes grupos funcionales. Por ejemplo zearalenona es un compuesto difenólico; Ocratoxina A posee en su estructura un grupo carboxilo y un grupo fenólico; mientras que Aflatoxina B1 contiene un grupo funcional β -keto-lactona ⁶.

1.2 OCRATOXINAS

Las Ocratoxinas constituyen el segundo grupo más importante de micotoxinas caracterizado luego del descubrimiento de las aflatoxinas ⁷.

La ocratoxina más significativa en términos de frecuencia y concentración es la Ocratoxina A (OTA)⁸, ésta fue descubierta en Sudáfrica por Van der Merwe en 1965 ¹⁴.

La OTA junto con otras micotoxinas nefrotóxicas fueron implicadas en una nefropatía endémica que afectó a miles de personas a mediados de los años 20 en Europa del Este, conocida como enfermedad de los Balcanes.⁹

OTA es una micotoxina que ha sido demostrada por ser aproximadamente 3 veces más tóxica que aflatoxina B1 en pollitos de engorda jóvenes¹⁰ y ha sido involucrada, en significativos brotes de campo de micotoxicosis en avicultura¹¹.

Debido a la vida media larga de OTA acumulada en los alimentos de la cadena alimenticia, constituye una amenaza para la salud humana y animal, además es extremadamente tóxica, tiene una ocurrencia generalizada y una variedad de cosechas pueden estar contaminadas¹².

1.2.1 ESTRUCTURA QUÍMICA Y CLASIFICACIÓN

Químicamente la OTA contiene 7-carboxi-5-cloro-8-hidroxi-3,4-dihidro-3R-metilisocumarina (O α) esto está unido a través del grupo 7-carboxi a la L- β -fenilalanina por un enlace amino¹³.

Existen muchas formas de Ocratoxina (Figura 1), con diferentes grados de toxicidad, entre ellas: OTA, Ocratoxina B (OTB)¹⁴; Ocratoxina C (OTC), Ocratoxina A metil éster, Ocratoxina B metil éster, Ocratoxina B etil éster¹⁵; Ocratoxina α , Ocratoxina β , 4R-hidroxiocratoxina A, 4S-Hidroxiocratoxina A, 10-Hidroxiocratoxina A¹⁶; OTA, análogo de tirosina¹⁷, Ocratoxina A, análogo de serina, OTA, análogo de hidroxiprolina y OTA, análogo de lisina¹⁸ (Cuadro 1).

OTA tiene 2 grupos ionizables: el grupo carboxil de la fenilalanina y el grupo 8-hidroxil; cada uno puede existir en la forma ionizada y no ionizada de acuerdo a las condiciones fisiológicas. La constante de disociación (pKa) del grupo 8-hidroxil está influenciado por la estructura de la OTA; el valor de pKa son 7.05 para OTA, 7.10 para OTC; 8.0 para OTB, y 11.0 para ocratoxina α ¹³.

Cuadro 1. Clasificación de las ocratoxinas por el aminoácido y por el tipo de sustituyente.

Nombre	R1	R2	R3	R4	R5	Fuente
Ocratoxina A	Fenilalanina	Cl	H	H	H	Van der Merwe et al. (1965) ¹⁴
Ocratoxina B	Fenilalanina	H	H	H	H	Van der Merwe et al. (1965) ¹⁴
Ocratoxina C	Fenilalanina, etil éster	Cl	H	H	H	Chu (1974) ¹⁵
Ocratoxina A metil éster	Fenilalanina, metil éster	Cl	H	H	H	Chu (1974) ¹⁵
Ocratoxina B metil éster	Fenilalanina, metil éster	H	H	H	H	Chu (1974) ¹⁵
Ocratoxina B etil éster	Fenilalanina, etil éster	H	H	H	H	Chu (1974) ¹⁵
Ocratoxina α	OH	Cl	H	H	H	Størmer et al. (1983) ¹⁶
Ocratoxina β	OH	H	H	H	H	Størmer et al. (1983) ¹⁶
4R-Hidroxiccratoxina A	Fenilalanina	Cl	H	OH	H	Størmer et al. (1983) ¹⁶
4S-Hidroxiccratoxina A	Fenilalanina	Cl	OH	H	H	Størmer et al. (1983) ¹⁶
10-Hidroxiccratoxina A	Fenilalanina	Cl	H	H	OH	Størmer et al. (1983) ¹⁶
Ocratoxina A, análogo de tirosina	Tirosina	Cl	H	H	H	Creppy et al. (1990) ¹⁷
Ocratoxina A, análogo de serina	Serina	Cl	H	H	H	Hadidane et al. (1991) ¹⁸
Ocratoxina A, análogo de hidroxiprolina	Hidroxiprolina	Cl	H	H	H	Hadidane et al. (1991) ¹⁸
Ocratoxina A, análogo de lisina	Lisina	Cl	H	H	H	Hadidane et al. (1991) ¹⁸

1.2.2 CEPAS DE HONGOS PRODUCTORAS DE OCRATOXINAS *IN VITRO*.

Actualmente se conoce que la OTA es producida por hongos de la sección *Aspergillus* y *Penicillium*^{19, 20, 21}.

Muchas cepas de *Aspergillus* agrupados en la sección *Circumdati* han sido calificadas como productoras de Ocratoxinas, entre ellas: *Aspergillus ochraceus*¹⁴, *A. melleus* y *A. sulphureus*²²; *A. alliaceus*, *A. sclerotiorum*, *A. ostianus* y *A. petrakii*^{23, 24, 25}; *A. albertensis* y *A. auricomus*²⁶; *Neopetromyces muricatus*²⁷; y *A. lanosus*²⁸. Pero ahora *A. lanosus*, *A. alliaceus* y *A. albertensis* son presentados en la sección Flavi²⁹.

A. ochraceus fue definido tradicionalmente como polifilético. Este fue recientemente dividido en varias especies, muchas de las cuales incluyen cepas aisladas productoras de OTA como *A. cretensis*, *A. flocculosus*, *A. pseudoelegans*, *A. roseoglobulosus*, *A. westerdijkiae*, así como *A. ochraceus sensu strictu*³⁰.

La producción de OTA también ha sido encontrada en *A. glaucus* de la sección *Aspergillus*²⁶. Después, se encontró en *A. niger* var. *niger*³¹ y subsiguientemente en otras especies de *Aspergillus* de la sección *Nigri* entre ellos: *A. awamori* y *A. carbonarius*³²; y recientemente en dos cepas aisladas de café: *A. lacticoffeatus* y *A. sclerotioniger*³³.

Otros cepas de *Aspergillus* han sido reportadas como productoras de OTA, pero han sido reducidas a sinónimos de las especies antes enlistadas, por ejemplo: *A. alutaceus* fue reportada por producir OTA³⁴ pero es sinónimo con *A. ochraceus*³⁵.

Reportes de producción de OTA por: *A. auricomus*, *A. elegans*, *A. foetidus* y *A. wentii* aparentemente están basadas en aislados erróneos ³⁰. También han sido reportados otras como *A. terreus* (sec. *Terrei*), *A. ustus* (sec. *Usti*); *A. versicolor* y *A. sydowii* (sec. *Versicolores*) ³⁶ pero no han sido confirmadas ²¹.

La producción de OTA en *Penicillium*, fue reportada por primera vez en *P. viridicatum* ²³; sin embargo Pitt ³⁷ no confirmó este hallazgo.

Se ha publicado también la producción de OTA por *P. chrysogenum* ³⁸ y *P. nordicum* ³⁹.

Hasta el momento *P. verrucosum* es la única especie de *Penicillium* conocida y confirmada como productora de OTA ^{19, 37, 40}. Las cepas diferentes de *P. verrucosum* han sido identificadas: *P. verrucosum* quimiotipo I que produce OTA, verrucolon y citrinina; y *P. verrucosum* quimiotipo II que produce sólo OTA y verrucolon ⁴¹.

1.2.3 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA PRODUCCIÓN DE OTA

La cantidad de OTA producida esta influenciada por muchos factores incluyendo la actividad de agua (a_w), temperatura, tipo de sustrato, presencia de microflora competitiva, cepa de hongo contaminante e integridad del grano. El valor mínimo de a_w para la producción de OTA por *A. alutaceus* (*A. ochraceus*) y *P. verrucosum* fue entre .83 y .90. A 24° C; el valor óptimo de a_w fue de .95 a .99 ⁴². A un óptimo a_w , el rango de temperatura para la producción de OTA por *A. alutaceus* (*A. ochraceus*) fue de 12 a 37° C; mientras que para *P. verrucosum* estuvo entre 4 y 31° C; datos que corresponden a lo observado en la contaminación de granos almacenados ⁴³.

El sustrato utilizado por cepas de *Aspergillus* y *Penicillium* para su crecimiento afecta significativamente la cantidad de OTA producida ^{44, 45}. Madhyastha et al. ⁴⁶ demostraron que las semillas de oleaginosas (cacahuete y soya) presentaron mayor producción de OTA y OTB por *A. alutaceus* (*A. ochraceus*) que los granos de cosecha (trigo y maíz); sin embargo estos granos fueron mejores sustratos para la producción de OTA y citrinina por *P. verrucosum* que dichas oleaginosas. Además observaron que OTB sólo fue producida por *A. alutaceus* (*A. ochraceus*) en las oleaginosas pero no en los granos estudiados. Igualmente no encontraron una asociación entre la masa fungal y la cantidad de micotoxina producida.

La presencia de microflora competitiva sobre un sustrato cereal afecta la producción de OTA por *A. alutaceus* (*A. ochraceus*), así lo demostraron Chelack et al. ⁴⁷ al obtener mayores cantidades de OTA al utilizar como sustrato cebada esterilizada comparada con cebada sin esterilizar, asimismo la producción de OTA por este hongo fue altamente suprimida por la reintroducción de flora no productora de OTA aislada de cebada.

La cepa de hongo también afecta la producción de OTA; Roschenthaler et al. ⁴⁸ reportaron una cepa productora conocida como *A. ochraceus* NRRL 3174, cuando fue dividida en sub-cultivos, produjo cantidades variables de OTA.

1.2.4 TOXICIDAD DE OTA

La toxicidad aguda de las ocratoxinas, se evalúa como valores de dosis letal 50 (LD50), y ésta varía considerablemente de especie a especie; y en cada especie está influenciada por la dieta, edad, sexo, ruta de administración, diferencias genéticas y la forma de ocratoxina ⁴⁹.

La LD50 ha sido informada en rangos de aproximadamente 5.9 y 16.5 mg Kg⁻¹ de peso corporal en pavos y codorniz japonesa respectivamente, de 0.5 y de 2 a 4mg Kg⁻¹ de peso corporal en patos y pollos de engorda ^{50, 51}.

Chu ¹⁵ indicó que la toxicidad de las diferentes formas de ocratoxinas varia considerablemente, así la LD50 de OTA para pollos de engorda es de 150µg (3 - 4 mg Kg⁻¹ de peso corporal), para OTC 216µg, para OTB 1900µg; mientras que ocratoxina α no fue tóxica a 1000µg. Esta toxicidad, como indicador temprano, es afectada por la disociación constante del grupo fenol hidroxilo.

Las formas de OTA y OTC que tienen similares valores de toxicidad molar, tienen el mismo valor de pKa. OTB es aproximadamente 10 veces menos tóxica que OTA, así también tiene una disociación constante ácida 10 veces mayor que la de OTA. Ocratoxina α, no es tóxica y no se disocia en condiciones fisiológicas ⁴⁹.

En animales de laboratorio OTA ha demostrado tener un efecto teratogénico y cancerogénico. El IARC (Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer) la clasificó dentro del grupo 2B como posible cancerígeno en humanos ⁶.

La JECFA (Comisión mixta FAO/WHO) estableció que la ingesta diaria admisible (IDA) de OA para humanos sea 14ng Kg⁻¹ de peso corporal (1995) ⁵². Mientras que la Comisión Europea (CE) según el reglamento N° 472/2002 dictaminó una IDA de 5ng OTA Kg⁻¹ de peso corporal. Los cereales en grano sin transformar deberán contener máximo 5µg OTA Kg⁻¹ y los productos derivados de cereales y granos para consumo humano 3µg OTA Kg⁻¹ ⁵³.

1.2.5 MECANISMO DE ACCIÓN

Los efectos tóxicos de OTA están basados en la inhibición y/o activación de enzimas, muchas de ellas usan fenilalanina como un sustrato. Esto prueba que la molécula de fenilalanina en la molécula de OTA interactúa como un sustrato sustituto. La principal enzima blanco es la fenilalanina - tRNA sintetasa la cual es inhibida por OTA en procariontes ⁵⁴, microorganismos eucariontes ⁵⁵, células de mamíferos ^{56, 57}, y animales experimentales *in vivo* ^{58, 59}.

Esta inhibición causa una reducción en la síntesis de proteína como un importante efecto de la toxicidad aguda y subaguda de OTA. En adición para inhibir la síntesis de proteína, síntesis de RNA ⁶⁰ y síntesis de DNA son el blanco de la toxicidad de OTA ⁶¹.

La fosfoenolpiruvato carboxinasa, enzima clave en la ruta de la gluconeogénesis, es afectada agudamente por la OTA. El mecanismo parece ser la vía específica de degradación del mRNA codificado por esta enzima ^{62, 63}. Además las enzimas glicolíticas ⁶⁴ la succinato-citocromo c reductasa y succinato dehidrogenasa ⁶⁵ son inhibidas por OTA.

1.2.6 OCURRENCIA NATURAL DE OTA

A inicios de la década de los 60s OTA fue mencionada en cebada, trigo, centeno, maíz y arroz ⁶⁶. Más recientemente, OTA ha sido localizada en legumbres, uvas, pasas y vinos ^{36, 67}, en cerveza, cacao y en especies ⁶⁸.

OTA se ha encontrado también en productos animales como leche de vaca y cerdo, particularmente riñones de cerdo, hígado y embutidos ^{69, 70}. Esta lista de alimentos contaminados con OTA irá creciendo en el futuro ²¹.

La ocurrencia natural de OTA en los alimentos y materia prima de alimentos de origen animal y vegetal es común¹².

Los *Penicillium*, específicamente *P. verrucosum* es el mayor productor de OTA en cereales de zonas climáticas frías; tal como se ha visto en Escandinava y Canadá. En contraste la producción de OTA en cereales de zonas climáticas calientes, como Yugoslavia y Australia, es principalmente por cepas de *A. ochraceus*⁴³.

La presencia de OTA en las diferentes regiones geográficas, el lugar de contaminación por estas micotoxinas toma más importancia en condiciones de pos-cosecha y raramente en pre-cosecha de cereales como trigo, maíz, centeno, cebada y avena. Esto también ocurre en cacahuate, grano de café, pan, arroz y frutas secas. Además la presencia de OTA en productos alimenticios como café, vino, cerveza, jugo de uva, carne y productos cárnicos es debido a su relativa estabilidad química durante el procesamiento industrial^{71, 72, 73, 74}.

De acuerdo a la revisión realizada por Dänicke⁸, el nivel máximo reportado en ingredientes alimenticios de países europeos fue de 0.2 mg Kg⁻¹; la concentración de OTA en 630 muestras de alimentos balanceados de Alemania (1982 a 1987) presentaron un rango de 0.0002 a 0.012 mg Kg⁻¹. En Egipto, 3 de 35 muestras de alimentos balanceados para aves, contuvieron más de 1.0 mg Kg⁻¹.

Las concentraciones de OTA notificadas en trigo y cebada en Canadá, oscilan entre cantidades ínfimas y concentraciones de hasta 6000 mg Kg⁻¹ (trigo). En el Reino Unido, se han notificado concentraciones comprendidas entre menos de 25 y 5000 mg Kg⁻¹ y entre menos de 25 y 2700 mg Kg⁻¹, en cebada y trigo respectivamente⁵².

Según Böhm⁷⁵ el nivel máximo tolerable en dietas para aves es 0.5 mg kg⁻¹ para pollos de engorda y 1.0 mg kg⁻¹ para gallinas de postura.

1.2.7 OCRATOXICOSIS NATURAL

El primer reporte de Ocratoxicosis en avicultura fue resultado de un incremento elevado de mortalidad en una caseta que alojaba 6000 pavos jóvenes; hasta la edad de sacrificio se contabilizó 58% de mortalidad; mientras que los sobrevivientes presentaron una conversión alimenticia pobre, bajos índices de crecimiento y rechazo a la comida ¹¹.

Se han reportado cinco casos independientes de ocratoxicosis en alrededor de 970 mil pavos; dos en 70 mil gallinas ponedoras y dos en 12 millones de pollos de engorda en Estados Unidos que fueron estudiados por Hamilton et al. ¹¹, donde los niveles tóxicos de las dietas estuvieron entre 0.3 y 16 mg Kg⁻¹; los mismos que produjeron una disminución en la eficiencia de utilización del alimento e incremento de la mortalidad a valores entre el 21 y 58%. En ocho de los casos, fue por utilización de maíz contaminado y uno por incluir en la dieta gluten de maíz contaminado con ocratoxinas.

1.2.8 OCRATOXICOSIS EXPERIMENTAL

1.2.8.1 PARÁMETROS PRODUCTIVOS

OTA causa significativas pérdidas a la industria avícola, debido a sus efectos sobre la salud y producción; caracterizados por una reducción de la tasa de crecimiento y del consumo alimenticio; así como también conversiones alimenticias pobres e incremento de la mortalidad ^{50, 51, 76}.

En una ocratoxicosis aguda, los pollitos presentan síntomas de apatía, languidez, amontonamiento, diarreas ocasionales, ataxia y postración ⁷⁷.

1.2.8.2 INMUNIDAD

Durante una ocratoxicosis la respuesta inmune humoral se encuentra disminuida. La reducción de los títulos fue más drástica a niveles más altos de OTA; y sin importar el nivel de OTA, los títulos de anticuerpos se incrementaron, alcanzando su máximo al séptimo día post inmunización y luego disminuyó al décimo día post inmunización ⁷⁸.

La respuesta inmune mediada por células, también se encuentra disminuida; reflejado por una disminución del número de leucocitos, debido a la regresión de los órganos linfáticos como el bazo, la bolsa de Fabricio y timo ⁷⁸.

1.2.8.3 BIOQUÍMICA SANGUINEA

Durante una ocratoxicosis se ha observado nefrotoxicidad y hepatotoxicidad. Esta última ha sido demostrada por una reducción significativa en los niveles séricos de proteína total, albúmina, globulina, colesterol, triglicéridos y nitrógeno ureico sanguíneo, así también por un aumento en la actividad de la gama-glutamil transferasa y colinesterasa. La nefrotoxicidad ha sido reflejada por un incremento significativo en la cantidad de ácido úrico sérico y los niveles de creatinina ⁷⁹.

1.2.8.4 LESIONES EN ÓRGANOS

Huff et al. ⁵¹ informaron agrandamiento del riñón, hígado, buche, proventrículo y molleja, con una regresión de la bolsa de Fabricio durante una ocratoxicosis; mientras que el corazón, páncreas y el bazo no presentaron alteraciones.

Stoev et al. ^{80, 81} confirmaron dichos hallazgos, reportando que OTA induce cambios degenerativos y aumento en el peso de riñón e hígado; así como una disminución en los pesos de los órganos linfáticos.

1.2.8.5 PIGMENTACIÓN AMARILLA DE PIEL

La pigmentación de las canales es un factor que contribuye a la aceptación para consumir productos avícolas. Huff y Hamilton ⁸² demostraron que la presencia de OTA en el alimento disminuyó la concentración de carotenoides plasmáticos en aves, considerándose un buen indicador de la pigmentación por su correlación con la coloración de la piel; sugiriendo que la OTA produce hipocarotenemia en pollos de engorda. Esta disminución de la pigmentación es responsable de la falta de coloración, económicamente importante, de las carcasas y de las yemas de los huevos; que sugiere una posible mala absorción del tracto gastrointestinal.

Osborne et al. ⁸³ ratificaron dichos resultados; reportando además un mayor porcentaje de depresión de carotenoides plasmáticos por parte de ocratoxina comparada con aflatoxina.

Schaeffer et al. ⁸⁴ encontraron cinco mecanismos de acción de Ocratoxina que afectan el metabolismo de los carotenoides, estos son: dilución de los carotenoides en el contenido intestinal, disminución de la entrada por la mucosa intestinal, disminución del transporte en el suero, alteraciones en la acumulación del hígado y alteraciones en los pasos de fijación en la piel.

1.2.9 INTERACCIONES ENCONTRADAS ENTRE OTA Y OTRAS MICOTOXINAS

1.2.9.2 OTA y Aflatoxina

Las aflatoxinas y OTA son extremadamente tóxicas para la avicultura, sin embargo estas dos micotoxinas interactúan sinérgicamente, cuando se encuentran como contaminantes de manera simultánea en la avicultura ^{85, 86, 87, 88}.

1.2.9.3 OTA y Toxina T-2

La OTA y T-2 presentaron efectos aditivos al reducir el peso corporal, la ganancia de peso, los niveles de proteína total en suero, la actividad de lactato deshidrogenasa; así como también presentó una correlación significativa entre OTA y T-2 elevando los niveles de triglicéridos séricos y disminuyendo la actividad de la gama glutamil transferasa; demostrando que los efectos de dicha combinación pueden ser más tóxicos que las micotoxinas individuales, y puede ser un gran problema para la industria avícola ⁸⁹.

García et al. ⁹⁰ también notaron un efecto aditivo entre OTA y T-2 en los parámetros productivos de pollitos.

1.2.9.4 OTA y Diacetoxiscirpenol (DAS)

Kubena et al. ⁹¹ observaron una toxicidad aditiva entre OTA y DAS, donde la presencia de estas disminuyó la eficiencia alimenticia y el peso corporal, incrementó el peso relativo de los hígados y mollejas, disminuyó la concentración de las proteínas totales en suero y la hemoglobina. Además el 90% de los casos presentaron lesiones orales; demostrando que la combinación OTA-DAS, pueden afectar la producción y salud de los pollos de engorda.

1.2.9.5 OTA y Deoxinivalenol (DON)

La combinación OTA-DON redujo los parámetros productivos en pollitos alimentados con dichas micotoxinas; incremento el peso relativo de riñón, hígado y proventrículo. Histológicamente se encontraron lesiones difusas y ligeras de lipidosis en el hígado y ligera inflamación en el epitelio del túbulo renal tanto en OTA sola, como en la combinación OTA-DON. Por lo tanto OTA y DON parecen

tener un efecto de interacción aditiva. Sin embargo, muchos de los parámetros como peso corporal, ganancia de peso corporal, proteína total, AST y nitrógeno ureico sanguíneo presentaron interacción significativa, la cual puede ser descrita mejor como menos que aditiva o en algunos casos antagonismo ⁹².

1.2.9.6 OTA y Ácido ciclopiazónico (ACP)

Gentles et al. ⁹³ tuvieron una disminución del peso relativo del hígado, riñón, páncreas y proventrículo de pollitos alimentados con OTA – ACP; así como la disminución de la concentración sérica de albúmina, proteína total y colesterol. Concluyeron que OTA, ACP, solas y en combinación pueden limitar la producción y afectar la salud de pollos de engorda; así como la interacción de estas dos micotoxinas es primariamente aditiva o menos que aditiva en los parámetros en los que la interacción ocurre.

1.2.9.7 OTA y Citrinina

La disminución del crecimiento de pollitos de engorda como resultado del efecto de OTA y el incremento del consumo de agua asociado con Citrinina, fue aminorado cuando estas dos micotoxinas fueron administradas en combinación; demostrando así un efecto antagónico, entre dichas micotoxinas ⁹⁴.

El pre-tratamiento con OTA atenúa los efectos de Citrinina, debido posiblemente a la compensación renal de la hemoconcentración inducida por OTA; manifestando que Citrinina y OTA no parecen tener efectos aditivos diuréticos ⁹⁵.

1.3 PRINCIPALES ADSORBENTES O INACTIVADORES DE OCRATOXINAS

1.3.1 SILICATOS

Los silicatos están clasificados de acuerdo a sus características estructurales en subclases, entre ellas tenemos los neosilicatos, con tetraedros simples; los sorosilicatos, con tetraedros dobles; los inosilicatos, con cadenas simples y dobles; los ciclosilicatos, que son anillos; los filosilicatos, que son hojas; y los tectosilicatos, estructurales. Los silicatos investigados como materiales absorbentes son clasificados básicamente como filosilicatos y tectosilicatos; de estos los más estudiados son los denominados “Aluminosilicatos de sodio y calcio hidratados” (HSCAS). Este es sugerido como un silicato mineral específico que puede unirse a la aflatoxina para quelatar la molécula β -dicarbonil en aflatoxina con iones de metal incoordinados en el material de la arcilla ⁹⁶.

Un número de estudios han examinado las modificaciones químicas de los silicatos. Döll et al. ⁹⁷ reconocieron un aluminosilicato químicamente modificado que presento un buen secuestro *in vitro* de zearalenona. Dakovic et al. ⁹⁸ demostraron la absorción de aflatoxina, ocratoxina y zearalenona por una zeolita tratada con octa-decil-dimetil-bencil amonio.

1.3.2 POLÍMEROS ORGÁNICOS

Algunos carbohidratos indigestibles complejos como la celulosa, polisacáridos de las paredes celulares de las levaduras y bacterias, como son los glucomananos y los peptidoglicanos, entre otros: así como polímeros sintéticos como colestiramina y polivinilpirrolidona, pueden absorber micotoxinas ⁹⁹.

Procesos recientes biotecnológicos han encontrado que *Saccharomyces cerevisiae* tiene efectos benéficos durante micotoxicosis avícolas ^{100, 101}. Los

mananos oligosacáridos presentes en las paredes celulares; se cree que son los responsables de este efecto favorable observado con *S. cerevisiae*; esto fue realizado en estudios *in vitro* donde los mananos extraídos de las paredes celulares de *Saccharomyces cerevisiae*¹⁰²⁶ y esterificados con glucanos presentaron una considerable habilidad de secuestro para varias micotoxinas comúnmente presentes ¹⁰².

1.3.3 EVALUACIÓN DE SECUESTRANTES

1.3.3.1 Pruebas *in vitro*

Las pruebas *in vitro* han sido utilizadas como un método potencial de monitoreo de productos secuestrantes, porque dan una idea de la afinidad y capacidad de secuestro. Los métodos *in vitro* no están estandarizados y por lo tanto no son comparables entre los laboratorios ⁹⁹.

Las técnicas *in vitro* no han producido resultados que correlacionen bien con los resultados *in vivo* con todas las micotoxinas. Por consiguiente, las pruebas *in vitro* no podrían ser usadas para tomar decisiones sobre el uso de productos en la práctica ^{90, 97, 103}.

1.3.3.2 Estudios *in vivo*

Los estudios *in vivo* dan resultados en la respuesta de la producción, indican si hay residuos en tejidos o cambios en los parámetros bioquímicos y permiten determinar la eficacia de los secuestrantes ¹⁰⁴.

Estas mediciones sólo pueden estimar el secuestro de manera indirecta; porque muchos factores y condiciones del estudio pueden afectar los resultados; los

secuestrantes necesitan ser evaluados con diferentes rangos de inclusión; con diferentes micotoxinas, especies animales, edades y géneros; así también, sobre las diferentes condiciones medioambientales. Sin embargo, si las comparaciones son consideradas, el criterio experimental podría ser estandarizado. Aún con la estandarización, los productos pueden variar mucho significativamente, reflejando diferentes resultados *in vitro* o *in vivo* y de estudio en estudio ¹⁰⁴.

1.3.4 CARACTERÍSTICAS DESEABLES DE UN SECUESTRANTE

Whitlow ⁹⁹ considera que un aditivo detoxificante, debe ser efectivo secuestrando las micotoxinas de interés. En muchos casos, éste debe ser un secuestrante de valor para una micotoxina y cierta capacidad de secuestro para varias micotoxinas. Un secuestrante debe prevenir significativamente la toxicidad en los animales. Estos no deben tener efectos dañinos serios sobre los animales, o la disminución de dichos efectos no deben pesar más que los beneficios. Los costos de estos deben prestarse para un uso práctico y rentable.

Los residuos en los productos animales no deben incrementarse. Estos no deben tener efectos perjudiciales sobre los productos alimenticios de origen animal. Las micotoxinas en los alimentos no deben ser enmascaradas porque la contaminación en los alimentos no podría ser verificada.

Los secuestrantes deben ser físicamente usables en los procesos de manufacturación comercial de alimentos. El uso y la eficacia de los secuestrantes deben ser verificables.

2. JUSTIFICACIÓN

Las toxinas producidas por hongos o micotoxinas se pueden encontrar de modo natural en un gran número de productos agrícolas, utilizados como materias primas para la preparación de alimentos balanceados para animales, o como contaminantes o residuos tóxicos de los productos de las explotaciones zootécnicas (leche, huevos y carnes). Son numerosos los factores que pueden influir para la contaminación con hongos productores de micotoxinas, entre estos están la resistencia genética del cultivo, las condiciones climatológicas caracterizadas por temperaturas y humedades relativas altas, condiciones de transporte y almacenamiento inadecuado y un secado deficiente ¹⁰⁵.

Por tanto, la contaminación del producto puede ocurrir en cualquier punto de la cadena alimenticia, desde la cosecha, pasando por la recolección, almacenaje, transporte, elaboración y conservación. La incidencia de micotoxinas en la producción de animales, especialmente aves y cerdos, representa uno de los mayores problemas que preocupa a estos importantes sectores agro-productivos ¹⁰⁶.

Para la salud humana estas también representan una amenaza latente pues pueden actuar como un "asesino silencioso", ya que su consumo en dosis muy pequeñas no induce síntomas clínicos evidentes, pero con el tiempo puede traer graves consecuencias sobre la calidad y durabilidad de la vida ¹⁰⁶.

Una variedad de métodos físicos, químicos y biológicos se han usado para la descontaminación de micotoxinas de las cosechas agrícolas, pero han tenido un éxito limitado ¹⁰⁷.

Una de las prácticas más apropiadas, es el uso de adsorbentes no nutritivos, como los secuestrantes de micotoxinas, y éstos inhiben la absorción en el tracto gastrointestinal, minimizando de esta manera los efectos tóxicos ¹⁰⁸.

3. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la capacidad de desactivación y/o adsorción de Ocratoxina A (OTA) de cuatro productos comerciales, utilizados en México en avicultura; tanto *in vivo* como *in vitro* en pollo de engorda.

4. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la capacidad de adsorción y/o inactivación *in vitro* de OTA, por los productos en estudio.
- Evaluar el comportamiento productivo de pollitos en crecimiento alimentados con cuatro dietas contaminadas con OTA ($500\mu\text{g Kg}^{-1}$) por 15 días utilizando cuatro diferentes detoxificantes de micotoxinas.
- Establecer la concentración de OTA en riñón, hígado y músculo, mediante HPLC.
- Obtener el peso relativo de riñón e hígado, como indicador de daño ocasionado por OTA.
- Describir los cambios macroscópicos y microscópicos en hígado, riñón e intestino por la exposición a OTA.
- Medir la inmunidad para Newcastle e Influenza Aviar.
- Cuantificar en sangre: Glucosa, Creatinina, Ácido Úrico, proteínas totales, AST y GLDH como indicadores de daño hepático y renal.
- Evaluar intensidad de la pigmentación amarilla de la piel de las aves en los diferentes tratamientos.
- Establecer si los resultados de las pruebas *in vitro* se relacionan con los resultados de las pruebas *in vivo*.

5. HIPÓTESIS

1. Los pollitos quedan protegidos de los efectos perjudiciales ocasionados por OTA ($500\mu\text{g Kg}^{-1}$) al consumir alimento que contenga cualquiera de los productos en estudio.
2. La pigmentación amarilla de la piel no presenta variación.
3. Las Proteínas Totales, Creatinina, Ácido Úrico, AST y GLDH, no se ven afectados ante la presencia de OTA ($500\mu\text{g Kg}^{-1}$) en el alimento.
4. A dosis de $500\mu\text{g Kg}^{-1}$ de OTA en el alimento; el riñón, el hígado y los intestinos presentan la misma estructura, tanto en los tratamientos que contienen adsorbentes como en el grupo testigo.
5. La concentración de OTA en riñón, hígado y músculo es menor a $5\mu\text{g Kg}^{-1}$
6. La respuesta inmune frente a la vacunación de Newcastle e Influenza Aviar, es igual en todos los tratamientos.
7. El poder de adsorción y/o desactivación de OTA *in vitro*, de los productos valorados es superior al 70%.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 PRODUCCIÓN DE OCRATOXINAS

En el Laboratorio de Micología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, se procedió a cultivar en Agar Dextrosa Sabouraud una cepa de *Aspergillus ochraceus*, por 10 días a 30° C para producir esporas. Pasado ese tiempo, las esporas fueron recolectadas con solución salina fisiológica estéril al 0.5% de Tween 80, se procedió con la cuantificación y posterior inoculación.

Como sustrato se uso trigo, a razón de 200g por botella de vidrio de 1L de capacidad con tapones de algodón, a la cual se le añadió agua (500ml) y a los 30 minutos se retiro, esto con el objetivo de aumentar su humedad relativa; a continuación se esterilizó en autoclave a 121° C con 15Lb de presión y por 20 minutos.

Se procedió a la inoculación utilizando 6×10^3 esporas de *Aspergillus ochraceus* por cada botellas con sustrato. Luego de una agitación rigurosa, se cultivaron a temperatura ambiente protegidos de la luz durante 28 días. Los tres primeros días se dejó en reposo, y a partir del cuarto se agitó diariamente, para evitar apelmazamiento y conseguir un crecimiento uniforme.

Cumplido este tiempo se procedió a la inactivación del hongo, mediante esterilización en autoclave (121° C, 15Lb de presión por 20 min.), luego se mantuvo a 45° C durante 48h para disminuir la humedad, se procedió con la molienda y luego a la cuantificación de Ocratoxina A mediante el método descrito por Stoloff et al. ¹⁰⁹.

6.2 EVALUACIÓN IN VIVO

Las pruebas in vivo se llevaron a cabo en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola (CEIEPAv), perteneciente a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). El centro está ubicado en Santiago Zapotitlán, Delegación Tláhuac, México D. F. A una Altitud Promedio: 2250msnm. Latitud Norte: 19°17' 30", Longitud Oeste: 99°00'30". Con un clima templado sub-húmedo. Una precipitación media: 747 mm; y una temperatura media anual de 16° C. Se realizaron dos experimentos, ambos en jaulas de calefacción automática (Petersime), y consistieron en:

6.2.1 EXPERIMENTO 1

Se utilizaron 240 pollitos mixtos Ross 308 de un día de edad, distribuidos en seis tratamientos (Cuadro 2), con cuatro repeticiones de diez aves cada uno, los tratamientos consistieron en:

Tratamiento 1: Testigo Negativo

Tratamiento 2: Testigo Positivo (con 500µg Kg⁻¹ de ocratoxinas totales)

Tratamiento 3: Como el 2 + Klinsil® (5kg ton⁻¹)

Tratamiento 4: Como el 2 + Mycofix Plus® (1kg ton⁻¹)

Tratamiento 5: Como el 2 + Mycosorb® (2kg ton⁻¹)

Tratamiento 6: Como el 2 + Toxisorb® (4kg ton⁻¹)

Todos los tratamientos fueron alimentados con dietas sorgo soya (Cuadro 3) que cubre los requerimientos de la línea genética (22% de proteína cruda y 3000 kilocalorías de EM Kg⁻¹), y se adicionó 30g ton⁻¹ de xantofilas amarillas de flor de cempasúchil.

Para llegar a las concentraciones de Ocratoxinas antes mencionadas, se añadió el trigo contaminado, en cantidades necesarias hasta alcanzar dicha concentración (500µg Kg⁻¹de Ocratoxinas totales ó 500ppb de ocratoxinas) esto gracias a un análisis previo de cuantificación mediante ELISA, tanto del trigo contaminado así como de los alimentos preparados.

Las dosis de los aditivos detoxificantes fueron las recomendadas por las casas comercializadoras y corresponden al nivel máximo de inclusión en el alimento balanceado.

Al décimo día las aves fueron vacunadas contra la enfermedad de Newcastle por vía ocular (Sepa La Sota) y por vía subcutánea contra Influenza Aviar.

6.2.1.1 Parámetros productivos

La alimentación fue a libre acceso durante los 31 días que duró el tratamiento, ofertando a los pollitos el alimento correspondiente a cada grupo experimental. Semanalmente fueron calculados: peso corporal, consumo de alimento y conversión alimenticia.

6.2.1.2 Consumo de agua

Durante toda la fase experimental, las aves tuvieron acceso libre al agua; sin embargo se midió su consumo diariamente.

6.2.1.3 Lesiones macroscópicas

En busca de lesiones macroscópicas, al día 31 de edad se sacrificaron cuatro aves de cada tratamiento (1 por cada réplica) en el Departamento de Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

6.2.1.4 Pigmentación amarilla de la piel

A los 21 y 28 días de edad se tomaron al azar tres aves por cada réplica (12 por tratamiento) y utilizando el Colorímetro de Reflectancia Minolta R-400, se procedió a evaluar la pigmentación amarilla (b) de la piel en la zona conocida como vena de la grasa del lado derecho.

6.2.2 EXPERIMENTO 2

Este experimento contó con 168 pollitos mixtos de siete días de edad de la línea genética Ross 308, que fueron divididos en seis tratamientos (Cuadro 4) con cuatro repeticiones cada uno con siete pollitos:

Tratamiento 1: Testigo Negativo

Tratamiento 2: Testigo Positivo (con $500\mu\text{g Kg.}^{-1}$ de OTA)

Tratamiento 3: Como el 2 + Klinsil® (5Kg. ton^{-1})

Tratamiento 4: Como el 2 + Mycofix Plus® (1Kg. ton^{-1})

Tratamiento 5: Como el 2 + Mycosorb® (2Kg. ton^{-1})

Tratamiento 6: Como el 2 + Toxisorb® (4Kg. ton^{-1})

Al igual que en el Experimento 1 las dietas fueron contaminadas con trigo pero su cuantificación previa se realizó mediante HPLC, se utilizaron las cantidades necesarias del trigo contaminado para alcanzar la concentración antes indicada ($500\mu\text{g Kg}^{-1}$ de OTA o 500ppb de OTA). La dieta base fue sorgo soya (Cuadro 3).

Las aves fueron vacunadas al décimo día contra la enfermedad de Newcastle por vía ocular (Sepa La Sota) y por vía subcutánea contra Influenza Aviar.

6.2.2.1 Parámetros productivos

Durante los 14 días que duró el experimento, la alimentación fue a libre acceso, brindando a las aves el alimento correspondiente a cada tratamiento. El peso corporal, consumo de alimento y conversión alimenticia fueron calculados semanalmente.

6.2.2.2 Consumo de agua

Las aves tuvieron agua *ad libitum* durante toda la fase experimental, y su consumo fue medido diariamente.

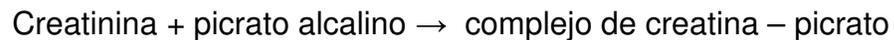
6.2.2.3 Pigmentación amarilla de la piel y tarsos

Al concluir el Experimento (21 días de edad), se tomaron al azar tres aves por cada réplica (12 por tratamiento) y utilizando el Colorímetro de Reflectancia Minolta R-400 se evaluó la pigmentación amarilla (b) en la zona conocida como vena de la grasa y en la cara interna, parte media del tarso, en ambos casos del lado derecho .

6.2.2.4 Química sanguínea

Mediante punción cardiaca, a los 21 días de edad, se tomó 3 mL de sangre de cada pollito, 8 por tratamiento; la sangre fue colocada en tubos de ensayo de 5 mL sin anticoagulante para de esta manera obtener el suero sanguíneo y evaluar el funcionamiento renal y hepático, mediante la medición de: Creatinina, Ácido Úrico, Aspartato Aminotransferasa (AST), Glutamato deshidrogenada (GLDH) y Proteínas Totales, mediante un sistema automatizado.

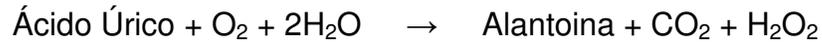
Para la Creatinina se realizó a través de la reacción dada entre la creatinina y el picrato de sodio; en base al siguiente principio:



Con un pH alcalino, la creatinina reacciona con el picrato formando un complejo de Janousky. El índice de aumento en absorbancia a 510nm debido a la formación del complejo de creatinina-picrato, es directamente proporcional a la concentración de creatinina en la muestra.

Mediante la prueba de ureasa se determinó la cantidad de ácido úrico el cual tiene como fundamento que el ácido úrico presente en la muestra es oxidado enzimáticamente por la acción de la uricasa (UOD) y transformado en alantoina y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno formado reacciona con el ácido 3,5-dicloro-2 hidroxibenceno sulfónico y la 4- aminofenazona, en presencia de peroxidasa (POD), para formar un complejo de quinoneimina de color rojo. La intensidad de color medida fotocolorimétricamente a 510nm permite cuantificar el ácido úrico presente en las muestras.

UOD



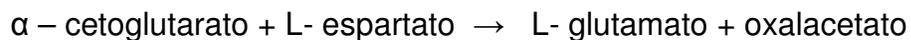
POD



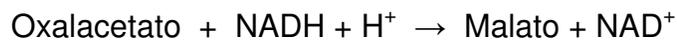
- Reactivo 4AF/Enzimas: Polvo conteniendo 4AF y enzimas para las siguientes concentraciones finales: 4AF 0.7 mmol/l, UOD (90 U/l), POD (1000 U/l).
- Reactivo 3,5 DCBS: Solución de 3,5 DCBS 4 mmol/l en buffer de fosfatos 50 mmol/l, pH = 7.0.

La determinación de AST, antes llamada Glutamato Oxaloacético Transaminas (GOT) se realizó mediante la siguiente reacción: el AST cataliza la reacción del α - cetoglutarato con el L- espartato a L- glutamato y oxalacetato, luego la deshidrogenada málica (MDH) cataliza la oxidación del NADH a NAD. El índice de reducción en absorbancia de la mezcla de la reacción a 340nm, debido a la oxidación de HANDH es proporcional a la actividad AST.

AST

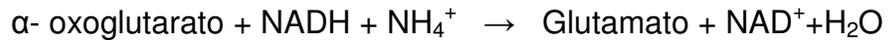


MDH

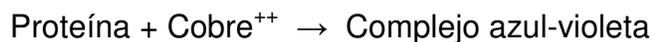


Para la valoración de la GLDH en suero se utilizó un método estándar optimizado de acuerdo a las recomendaciones del Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie. Este procedimiento mide la reacción de arrastre no específica en base al siguiente principio:

GLDH



Las proteínas totales fueron determinadas mediante la reacción de Biuret en la cual la proteína reacciona con el reactivo a un pH alcalino, formando un complejo azul-violeta:



En un pH alcalino, la proteína reacciona con el cobre del reactivo de Biuret causando un aumento en la absorbancia. El índice de incremento en absorbancia a 540nm debido a la formación del complejo azul-violeta es directamente proporcional a la concentración de proteína en la reacción.

6.2.2.5 Necropsias y obtención del índice de pesos relativos de órganos

A los 21 días de edad, se tomó al azar un ave de cada réplica, es decir 4 por tratamiento y en el Departamento de Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, fueron identificadas, pesadas individualmente y sacrificadas mediante dislocación cervical. Se procedió con la necropsia y a través de una evaluación visual se procedió a identificar los principales cambios patológicos macroscópicos en los órganos internos.

El lóbulo intermedio del timo, el hígado con vesícula biliar, bazo, riñón y bolsa de Fabricio de cada ave fueron pesadas, para posteriormente obtener su índice de peso relativo. Este se obtuvo considerando el peso corporal del ave como el valor total (1).

6.2.2.6 Histopatología

Con la finalidad de buscar posibles cambios celulares, se hicieron cortes histológicos de hígado, riñón e intestino de cada ave sacrificada; para lo cual se tomó un pedazo del lóbulo izquierdo del hígado; del riñón se tomó una muestra del mesonefro y del intestino una muestra del yeyuno; estas muestras fueron colocadas en una solución de formol al 10% por 24 horas para fijar las muestras.

Pasado este tiempo se lavó con agua corriente por 20 minutos, se deshidrató con alcoholes de concentración ascendente (30, 50, 70, 80, 96 y absoluto) para suprimir el agua tisular y se aclaró con xilol.

Se dejó en aceite de cedro por 24 horas, se lavó con xilol y se incluyó en parafina fundida. Una vez solidificada la parafina, se procedió a hacer los cortes de 3 micras utilizando un microtomo.

Antes de la tinción, se procedió a desparafinar e hidratar los cortes ya que los colorantes actúan en medio acuoso. Se utilizó el método de Hematoxilina-Eosina (hematoxilina de Harris-eosina alcohólica)¹¹⁰.

Finalmente se observaron los cortes en microscopio a 40x, 100x, 300x y 400x.

6.2.2.7 Cuantificación de OTA en órganos

A los 21 días de edad, los riñones, el hígado y la pechuga del Experimento 2, fueron conservados para determinar la presencia de micotoxinas. La determinación se realizó mediante la técnica descrita por Nesheim et al.¹¹¹, que consiste en una extracción ácido-base (ácido fosfórico 0.1 M y bicarbonato de

sodio al 3%), utilizando una columna de extracción en fase sólida C18 (SEP-PACK de Waters).

La fase móvil consistió en Agua : Acetonitrilo : Ácido acético (99 : 99 : 2), el flujo de inyección fue de 1mL por minuto. Se utilizó una columna C18 de 250x46mm y 5µm. El detector de fluorescencia fue calibrado a una longitud de onda de excitación de 333nm y una longitud de onda de emisión de 460nm.

Se inyectaron 25µL de muestra, que corrieron en cinco minutos cada una. Se utilizaron 3 soluciones de estándares que contenía: 0.1, 0.05 y 0.025 ng de OTA por cada 25 µL, y luego se inyectaron cada una de las muestras.

Mediante la ecuación: $y = a + bx$

Siendo:

a = valor del eje de intersección

b = valor de la pendiente

x = variable independiente, que corresponde al área bajo la curva.

y = variable dependiente, que corresponde al valor estimado.

Se procedió a la cuantificación; utilizando las áreas de los estándares para establecer los valores de **a** y **b**, mediante el método de mínimos cuadrados; considerando a **x** como el valor del área de cada muestra. Luego se hicieron los cálculos respectivos para establecer la concentración final ($\mu\text{g Kg}^{-1}$) de OTA.

6.2.2.8 Serología

Mediante punción cardiaca, a los 21 días de edad, se tomó muestras de sangre de 8 pollitos por tratamiento, para realizar la prueba de Inhibición de la

Hemoaglutinación (HI) para las enfermedades de Newcastle e Influenza Aviar, como parámetros para la evaluación de la inmunidad en las aves.

Para HI de Newcastle se utilizó una mezcla de 29.883mL de solución buffer fosfato (PBS) con 117µl de antígeno con 1:256 de concentración. Esta solución se distribuyó 50µl en cada pocillo, de las 8 placas utilizadas.

Se colocó 50 µl de cada suero en el primer pocillo de cada fila; se homogenizó con la ayuda de una micropipeta; y se retiró 50µl de esta solución, la misma que fue depositada en el segundo pocillo, se homogenizó y se retiraron 50µl de solución; se procedió de la misma manera con el resto de pocillos; esto con la finalidad de reducir la concentración a la mitad.

Se incubó por 30 minutos a 25° C; luego se colocó 50µl de una solución de glóbulos rojos de pollo al 0.7%. Luego de 30 minutos se procedió a la lectura.

La técnica para HI para Influenza Aviar, fue similar a la anterior, pero en este caso se utilizó una mezcla de 29,766mL de PBS con 234µl de antígeno con 1:128 de concentración.

6.3 EVALUACIÓN IN VITRO

Se evaluó la capacidad de secuestro y/o inactivación *in vitro* de los cuatro productos comerciales (Klins Sil®, Mycofix Plus®, Mycosorb® y Toxisorb®); mediante la medición de la OTA no absorbida (libre) por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) luego de simular lo que sucede durante la digestión en aves.

Se consideró la misma concentración de OTA del alimento balanceado utilizado para la prueba *in vivo*; así como las dosis máximas de inclusión de dichos aditivos detoxificantes, recomendados por las casas comercializadoras; se procedió con la prueba *in vitro*. Primero se cuantificó la cantidad de OTA de cada alimento para corroborar que fueran semejantes.

Luego se colocó 10g de cada alimento balanceado en matraces de 250mL; esto incluyó los cuatro productos experimentales y un testigo que contenía la misma cantidad de OTA, pero no secuestrantes y/o inactivadores de micotoxinas; luego se añadió 60mL de una solución de pepsina al 0.2% (actividad 1:10000) en ácido clorhídrico 0.075 N (solución para determinación de digestibilidad de la proteína en pepsina, Método AOAC ¹¹²; con lo que se llegó a un pH de 1.61 y 1200 unidades de pepsina; esto en base al concepto que el pH del jugo gástrico de las aves esta entre 0.5 a 2.5 y que la actividad de pepsina en unidades de pepsina por cada kilogramo (Kg) de peso corporal por hora para las aves, es de aproximadamente 2430 ¹¹³; esto fue calculado para aves con un peso de 0.5kg.

Los matraces fueron cubiertos con papel aluminio, para así mantenerlos en oscuridad; se llevo a baño maría a 41° C durante una hora con agitación constante. Cumplido este tiempo, se paso la solución por un filtro y utilizando el filtrado se procedió a cuantificar la cantidad de OTA remanente (no adsorbida y/o inactivada), utilizando el procedimiento descrito por Nesheim et al. ¹¹¹, anteriormente detallada en cuantificación de OTA en órganos.

Para el cálculo se consideraron las cantidades iniciales de OTA en el alimento como el 100%, y por diferencia entre esta cantidad de OTA y la obtenida del remanente se determino el porcentaje de secuestro y/o inactivación de cada secuestrante. El testigo fue utilizado para verificar el efecto de la pepsina sobre OTA.

6.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Al final del experimento se procedió a calcular las medidas de tendencia central y dispersión para cada una de las variables del estudio.

Se aplicó la prueba de Anderson-Darling para verificar la normalidad de las observaciones de las variables cuantitativas, como son: peso corporal, consumo de alimento, índice de conversión alimenticia, consumo de agua, pigmentación amarilla de la piel y tarso, índices de pesos relativos de órganos, y los resultados de bioquímica sanguínea y serología¹¹⁴.

En donde la prueba de Anderson-Darling mostró que las variables presentan una distribución normal, se realizó un análisis de varianza conforme a un diseño completamente aleatorizado; para inferir sobre la igualdad de los efectos de los tratamientos, en los casos donde la hipótesis nula se rechazó, se realizó una comparación de medias empleando la prueba de Tukey ¹¹⁴, del paquete estadístico SAS¹¹⁵.

Las variables peso corporal, consumo de alimento, ganancia de peso, pigmentación amarilla de la piel y tarso, peso relativo del timo, ácido úrico sanguíneo, GLDH, AST, creatinina y los resultados serología del Experimento 2, no presentaron una distribución normal de acuerdo a la prueba de Anderson - Darling, por lo que se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis ¹¹⁶, del paquete estadístico JMP 5.0.1 ¹¹⁷.

Los resultados de serología (HI de Newcastle e Influenza Aviar) fueron previamente transformados a \log_2 .

7. RESULTADOS

7.1 EVALUACION IN VIVO

7.1.1 EXPERIMENTO 1

A continuación se describen los resultados del análisis de ocratoxinas por el método de inmuno ensayo ligado a enzimas (ELISA) y el de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC),

Los alimentos balanceados utilizados para los tratamientos 2, 3, 4, 5 y 6 fueron previamente analizados a través de ELISA que reporto $455 \mu\text{g Kg}^{-1}$ de OTA en promedio; cantidad aproximada a las $500 \mu\text{g Kg}^{-1}$ de OTA calculadas; debido tal vez a la imposibilidad de conseguir una distribución homogénea del grano contaminado con ocratoxinas. En el tratamiento 1 no se detectaron cantidades de OTA (Cuadro 5).

Los mismos alimentos fueron analizados por HPLC, donde no se encontraron cantidades detectables de OTA (figura 2).

7.1.1.1 Parámetros Productivos

Los parámetros productivos de pollitos alimentados con $500 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ocratoxinas no presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$) durante las cuatro semanas de evaluación. Estos resultados se pueden observar en el Cuadro 6, que corresponde a los pesos corporales; en el Cuadro 7 los consumos de alimentos; y en el Cuadro 8 los índices de conversión alimenticia calculados en cada semana de estudio.

Por lo que se podría sugerir que 500 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ocratoxinas en el alimento no fueron suficientes para afectar los parámetros productivos, ya que el testigo negativo, que se esperaba que tuviera mejores resultados, presentó similares respuestas con el resto de tratamientos.

De la misma manera se puede indicar que la adición de los aditivos detoxificantes al alimento, no mejoraron ni perjudicaron los parámetros productivos de los pollitos en estudio.

7.1.1.2 Consumo de agua

El consumo de agua de los pollitos de todos los tratamientos (Cuadro 9), no se vio afectado, encontrándose dentro de los rangos establecidos como de referencia para la línea genética; así como tampoco se encontraron diferencias estadísticas ($P > 0.05$) entre ellos.

7.1.1.3 Pigmentación amarilla de la piel

Los resultados de la valoración de la pigmentación amarilla de la piel, se presentan en el Cuadro 10. Los tratamientos no presentaron diferencias estadísticas ($P > 0.05$) entre ellos, ni con el grupo testigo negativo, tanto en las evaluaciones realizadas en la semana 3 como en la semana 4.

Por lo que se señala que con 500 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ocratoxinas en el alimento no fueron suficientes para afectar la pigmentación amarilla de los pollos. Así también la

presencia de los secuestrantes y/o inactivadores de micotoxinas no mejoró ni perjudicó dicha variable.

7.1.1.4 Lesiones macroscópicas

En todas las aves sacrificadas, no se observaron cambios macroscópicos significativos, salvo dos pollos; uno correspondiente al testigo positivo (tratamiento 2) y el otro perteneciente al tratamiento 6, que en ambos casos presentó ligera nefromegalia.

Estos resultados confirman que con $500 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ocratoxinas en el alimento, no fueron suficientes para alterar el comportamiento productivo, ni la salud de los animales.

7.1.2 EXPERIMENTO 2

En el Experimento 2 se calcularon $500 \mu\text{g OTA Kg}^{-1}$, y para confirmar la concentración de OTA en las dietas, se analizó mediante HPLC, el mismo que mostró cantidades no detectables en el alimento del tratamiento 1 (testigo negativo), mientras que los alimentos de los tratamientos 2, 3, 4, 5 y 6 presentaron $507 \mu\text{g OTA Kg}^{-1}$ en promedio (Cuadro 11).

7.1.2.1 Parámetros productivos

Los resultados de los parámetros productivos de los pollitos alimentados con $507 \mu\text{g Kg}^{-1}$ de OTA se pueden observar en los cuadros 12, 13, 14 y 15.

En cuanto al peso corporal (cuadro 12), se indica que los tratamientos presentaron diferencias estadísticas, así se puede ver que el peso del grupo testigo positivo (tratamiento 2) en la segunda semana corresponde al 65.87% del peso corporal del grupo testigo negativo, mientras que en la tercera semana tan sólo alcanzó un 47.65% del mismo. El resto de tratamientos presentaron similares respuestas (69.31%, 65.08%, 66.67% y 66.14% para los tratamientos 3, 4, 5 y 6 respectivamente en la semana dos y 48.93%, 47.94%, 46.66% y 47.08% en la semana tres).

La ganancia de peso de los pollitos que se alimentaron con $507 \mu\text{g Kg}^{-1}$ de OTA, fue significativamente menor que la ganancia calculada para el grupo testigo negativo. No se observó diferencia entre el testigo positivo contra el resto de tratamientos que contenían aditivos detoxificantes (cuadro 13). También se notó que la disminución fue más drástica en la semana 3, donde la ganancia de peso fue menor en los tratamientos que contenían $507 \mu\text{g Kg}^{-1}$ de OTA; mientras que el testigo negativo mantuvo su ritmo de crecimiento.

El consumo de alimento de las aves se vio afectado, siendo mayor el de las aves que fueron alimentadas sin OTA, al compararse al resto de tratamientos, donde se observó una notable disminución del consumo (Cuadro 14). El resto de tratamientos (2, 3, 4, 5 y 6) no presentaron diferencias entre sí.

Al igual que los parámetros anteriores, la conversión alimenticia (cuadro 15), durante las dos semanas de estudio, presentó diferencias entre el grupo testigo negativo contra el resto de tratamientos, demostrando superioridad. La conversión alimenticia del testigo positivo fue deficiente, y no presentó diferencias con los tratamientos 3, 4, 5 y 6. Por lo que se considera que a esta dosis de OTA ($507 \mu\text{g Kg}^{-1}$) los productos comerciales en estudio, no ayudaron a contrarrestar los efectos perjudiciales de estas micotoxinas en parámetros productivos de pollitos de engorda.

7.1.2.2 Consumo de agua

En la segunda semana el consumo de agua en los tratamientos presentó diferencia estadística altamente significativa ($P < 0.01$). El tratamiento testigo negativo fue diferente a los tratamientos 2, 3, 4, 5 y 6. El testigo positivo no presentó diferencias (Cuadro 16).

En la semana tres, esta diferencia fue más drástica, siendo el testigo negativo el que mayor consumo de agua presentó y fue diferente al resto de tratamientos ($P < 0.01$). Durante esta semana el consumo de agua del testigo positivo fue similar a los tratamientos 3, 4, 5 y 6.

La relación consumo de agua (ml) – alimento (g), en el grupo testigo negativo fue de 2.62 y 3.22 para la segunda y tercera semana; mientras que para el resto de tratamientos presentó valores similares en estas semanas, variando desde 3.26 a 3.55 en la segunda semana, y de 4.59 a 5.02 en la tercera semana.

7.1.2.3 Pigmentación amarilla de la piel y tarsos

Los resultados de la pigmentación amarilla de piel y tarsos se puede observar en el Cuadro 17.

La pigmentación amarilla de la piel en la tercera semana, indicó diferencias estadísticas ($P = 0.01$); se encontró que el grupo testigo negativo tuvo la mejor pigmentación, mientras que en el resto (tratamientos 2, 3, 4, 5 y 6) la coloración amarilla en piel fue menor.

En cuanto a la coloración de los tarsos, el grupo testigo negativo, al igual que en la coloración amarilla de la piel, presentó valores más altos en la coloración amarilla de los tarsos que el resto de tratamientos. El resto de tratamientos demostraron ser estadísticamente iguales ($P > 0.05$).

7.1.2.4 Química sanguínea

Los resultados de estas variables están en el Cuadro 18. Los valores de la creatinina sanguínea, demostraron ser diferentes estadísticamente ($P < 0.001$); así los valores encontrados en el grupo testigo negativo fueron inferiores al resto de tratamientos que presentaron valores más altos.

En cuanto a los valores de ácido úrico sérico, se encontró que el testigo negativo fue inferior, y diferente al resto de tratamientos ($P < 0.001$).

Los valores de AST, fueron estadísticamente iguales ($P = 0.09$) al igual que los valores de GLDH, que no presentaron diferencias entre los tratamientos ($P = 0.43$).

Los resultados de proteína total sérica presentaron diferencias estadísticas ($P < 0.001$); el testigo negativo fue diferente al resto de los tratamientos, al exhibir mayores valores de proteína en suero.

7.1.2.5 Necropsias e índice de pesos relativos de órganos

Los hígados e intestinos de los pollitos de los 6 tratamientos, a la inspección no presentaron lesiones macroscópicas; en los riñones sí se observaron éstas. En los tratamiento 3 y 4, se encontró que 2 de los 4 pollitos de cada tratamiento,

presentaron nefromegalia. En el tratamiento 5 se observó nefromegalia en 1 de los 4 riñones; mientras que en el tratamiento 6 fueron 3 los pollitos que presentaron nefromegalia; además un riñón de éstos se encontraba pálido.

Salvo que en los tratamientos 4 y 6 se encontró aerosaculitis, en un pollo de cada grupo, en el resto de órganos no se identificaron cambios macroscópicos.

Los resultados obtenidos de los índices de pesos relativos de hígado, riñón, bazo, bolsa de Fabricio y timo se encuentran en el Cuadro 19. El índice del hígado del tratamiento 1 fue diferente al tratamiento 5 ($P < 0.05$); el mismo que demostró ser el más grande; los tratamientos 2, 3, 4 y 6 estadísticamente no presentaron diferencia con ningún tratamiento ($P = 0.07$).

El índice de peso relativo de riñón presentó diferencias estadísticas significativas ($P = 0.009$); el peso relativo de riñón del tratamiento 1 fue menor, mientras que los tratamientos 3 y 6 obtuvieron los mayores pesos relativos de riñón. Los tratamientos 2, 4 y 5, demostraron ser iguales a todos los tratamientos.

El índice del peso relativo del bazo mostró diferencias estadísticas ($P = 0.03$) y resultó que los tratamientos 1 y 4 tuvieron los valores más bajos, y el tratamiento 3 el más alto. Los tratamientos 2, 5 y 6 mostraron ser iguales al resto.

En cuanto a los índices de los pesos relativos de bolsa de Fabricio ($P = 0.35$) y timo ($P = 0.0479$) no presentaron diferencias estadísticas.

7.1.2.6 Histopatología

El resumen de las lesiones microscópicas encontradas en hígados, se puede ver en los Cuadros 20 y 21.

En los hígados del grupo testigo no se observó proliferación de conductos biliares; pero 2 hígados presentaron degeneración hidrópica leve, y 1 degeneración moderada, de los 4 hígados evaluados.

En el tratamiento 2 y 3 se encontró en cada grupo, que 2 de los 4 hígados presentaban proliferación de conductos biliares, con degeneración hidrópica moderada de los hepatocitos.

Los hígados del tratamiento 4 presentaron degeneración leve, y en 3 de ellos se observó una proliferación leve de los conductos biliares.

En el tratamiento 5 no se observaron lesiones; mientras que en el tratamiento 6; 3 de los 4 hígados evaluados presentaron degeneración hidrópica con proliferación leve de los conductos biliares.

Las lesiones encontradas en los riñones se encuentran resumidas en el Cuadro 22.

En el tratamiento 1, se observó 1 de los 4 riñones con nefrosis moderada. Dos riñones del tratamiento 2, presentaron nefrosis moderada; mientras que en los tratamientos 3, 4 y 5 se observaron 2 de los 4 riñones con nefrosis leve, en cada grupo. El tratamiento 6 mostró 1 riñón con nefrosis leve.

7.1.2.7 Cuantificación de OTA en órganos

La cuantificación de residuos de OTA en pechuga, hígado y riñón se encuentra en el Cuadro 23. En el hígado del tratamiento testigo negativo, no se encontraron residuos de OTA, mientras que el resto de tratamientos presentaron cantidades

superiores a 5ng g^{-1} . En las pechugas y riñones de todos los tratamientos no se detectó OTA.

7.1.2.8 Serología

Los análisis de HI (Inhibición de la hemoaglutinación) para Newcastle (Figura 3) no presentaron diferencias estadísticas en ningún tratamiento ($P = 0.29$); al igual que los de HI para Influenza aviar ($P = 0.30$) (Figura 4).

7.2 EVALUACIÓN *IN VITRO*

La evaluación de la actividad secuestrante *in vitro* se describe en el Cuadro 24. Se observa la desaparición de OTA, tanto en el grupo que no contenía secuestrante y/o inactivadores de micotoxinas, como en las que sí los tenían. Cuando se comparó la actividad secuestrante entre el tratamiento positivo sin secuestrante con los que sí contenían, la diferencia fue sólo del 2.52%.

8. DISCUSIÓN

8.1 EVALUACIONES IN VIVO

En el Experimento 1, no se encontró efecto negativo en el comportamiento productivo de los pollitos a la adición de OTA. Se realizó análisis de ocratoxinas por el sistema de inmuno ensayo ligado a enzimas (ELISA) y cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), en las mismas muestras de alimento de los distintos tratamientos. Ante la posibilidad de que ELISA puede presentar reacciones cruzadas de OTA con otras ocratoxinas, es probable que se haya cuantificado el total de ocratoxinas en el alimento y por ende los resultados positivos por esta prueba.

Este mismo alimento al analizarse por HPLC, los resultados fueron negativos, contradiciendo las $455 \mu\text{g Kg}^{-1}$ de OTA reportadas con ELISA. Por lo que el método implementado de HPLC fue específico para la cuantificación de OTA. En este método se compara el tiempo de retención del estándar de OTA con el tiempo de retención del compuesto identificado en el extracto del alimento; esta respuesta es lo que confiere especificidad al método de HPLC.

Al comparar los resultados del análisis de ocratoxinas entre los métodos de ELISA con el uso de la columna de inmunoafinidad para la limpieza de la muestra y el método de HPLC, los resultados fueron similares. La misma muestra analizada por el método de ELISA con la columna de inmunoafinidad fue de $490 \mu\text{g OTA Kg}^{-1}$ y el resultado por el método de HPLC fue de $507 \mu\text{g OTA Kg}^{-1}$. Esto sin duda indica que estos dos métodos son coincidentes, pues describen la concentración exclusiva de OTA.

8.1.1 Parámetros Productivos

La disminución de los parámetros productivos observada en los pollitos alimentados con 507 $\mu\text{g OTA Kg}^{-1}$ (Experimento 2), coincide con lo señalado por Elaroussi et al. ⁷⁸ quienes al adicionar 400 y 800 $\mu\text{g OTA Kg}^{-1}$, encontraron una disminución significativa del peso corporal de los pollitos; así como, la conversión alimenticia que también se vio afectada. García et al. ⁹⁰ también encontraron disminución de los parámetros productivos en pollitos al alimentarlos con 567 $\mu\text{g OTA Kg}^{-1}$.

Verma et al. ⁷⁶ probaron dosis de 1, 2 y 4 mg OTA Kg^{-1} (1000, 2000 y 4000 $\mu\text{g Kg}^{-1}$) y observaron una reducción significativa del crecimiento y del consumo de alimento, así como una pobre conversión alimenticia en pollitos que recibieron 2 y 4 mg OTA Kg^{-1} (4000 $\mu\text{g Kg}^{-1}$). Sin embargo con 1 mg OTA Kg^{-1} (1000 $\mu\text{g Kg}^{-1}$) no identificaron reducción de los parámetros productivos. Morehouse ¹¹⁸, y Osborne et al. ⁸³ indicaron que la concentración mínima de OTA para afectar el crecimiento de pollitos es de 2 $\mu\text{g OTA g}^{-1}$ (2000 $\mu\text{g Kg}^{-1}$).

En los presentes experimentos, se utilizó trigo contaminado con *A. ochraceus* de forma natural, por lo que es posible que se encuentren otros tipos de ocratoxinas, así como metabolitos menores no identificados; que a pesar de ser menos tóxicos tengan un efecto negativo. Esto se puede confirmar con lo observado en el Experimento 1, donde las dietas analizadas con ELISA, se encontraron resultados altos de OTA, mientras que a través de HPLC fueron cantidades no detectables; esto posiblemente se deba a la reacción cruzada que pueden presentar los kits de ELISA ante ocratoxina B, ocratoxina C y ocratoxina α .

8.1.2 Efecto de los secuestrantes y/o inactivadores

Los secuestrantes y/o inactivadores de micotoxinas utilizados en los tratamientos 3, 4, 6 contienen aluminosilicatos modificados; glucomananos modificados obtenidos de la pared celular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en el 5; *Trichosporon mycotoxinivorans*, *Eubacterium* BBSH 797 y extractos vegetales y de algas en el 6, carbón activado y enzimas hidrolíticas en el 3.

En el Experimento 1 la adición de los secuestrantes y/o inactivadores de micotoxinas a las dietas no disminuyeron ni mejoraron: los parámetros productivos, el consumo de agua y la pigmentación amarilla de la piel de los pollitos alimentados con bajo contenido de OTA (menor de 5 $\mu\text{g OTA Kg}^{-1}$). Con lo que se demuestra que la adición de éstos en las dietas, no alteró el metabolismo de las aves. Estos resultados confirman lo encontrado por García¹¹⁹ y Huff et al.¹²⁰.

Al probar los mismos secuestrantes y/o inactivadores en dietas con mayor contenido de ocratoxinas (Experimento 2, con 507 $\mu\text{g OTA Kg}^{-1}$), no mostraron diferencias con el tratamiento que contenía ocratoxinas y no secuestrantes y/o inactivadores; tanto en parámetros productivos, consumo de agua, pigmentación amarilla de la piel y tarsos, proteínas totales, creatinina así como ácido úrico sérico.

Estos resultados coinciden con: Politis et al.¹²¹ quienes no encontraron diferencias en parámetros productivos de pollitos alimentados con *Trichosporon mycotoxinivorans* (10^4 , 10^5 y 10^6 CFU g^{-1} de alimento) para contrarrestar los efectos dañinos de 500 $\mu\text{g OTA Kg}^{-1}$ (500 $\mu\text{g OTA Kg}^{-1}$). Estos resultados se mantuvieron hasta los 42 días. Sin embargo varias publicaciones señalan que la levadura, denominada *Trichosporon mycotoxinivorans* tiene la capacidad de degradar micotoxinas como OTA y zearalenona^{122, 123, 124}.

Sin embargo, Raju y Devegowda ¹²⁵ encontraron sólo una mejora marginal (2.63%) en peso corporal al agregar 1g Kg⁻¹ de glucomamanos esterificados a dietas con 2mg OTA Kg⁻¹ (2000 µg OTA Kg⁻¹), luego de 5 semanas de exposición. Aranvind et al. ¹²⁶ al adicionar glucomanos esterificados a dietas de pollitos contaminadas con micotoxinas en forma natural (168 µg aflatoxinas Kg⁻¹, 8.4 µg OTA Kg⁻¹, 5.4 µg zearalenona Kg⁻¹ y 32 µg T-2 Kg⁻¹) mejoró el crecimiento de los pollitos.

Santin et al. ¹²⁷ al utilizar aluminosilicatos no observaron una mejoría durante una ocratoxicosis; al contrario de lo que ocurre con las aflatoxinas. Esto probablemente se deba a una diferencia de la estructura molecular entre los dos tipos de micotoxinas. Sin embargo Huff et al. ¹²⁰ encontraron una pequeña reducción de la toxicidad de 2µg g⁻¹ (2000 µg Kg⁻¹) de OTA utilizar 0.5% de un aluminosilicato de sodio y calcio hidratado (HSCAS) en el alimento de pollitos.

Al igual que los resultados de la presente investigación, García ⁹⁰ no encontró mejoría en pollos, al utilizar secuestrantes de micotoxinas con 567 µg OTA Kg⁻¹.

8.1.3 Consumo de agua

En el Experimento 1, las cantidades de OTA no fueron suficientes para afectar el consumo de agua.

En el Experimento 2, a pesar que los consumos de agua de los pollitos alimentados con OTA, cuantitativamente, fueron menores comparados con el tratamiento que no contenía OTA; la relación consumo de agua – alimento fue mayor, a favor del agua. Esto demuestra que dichas aves tomaron más agua;

tanto a los siete y más aún a los catorce días de experimentación, donde la relación consumo de agua – alimento aumentó.

Este incremento del consumo de agua, es posible que esté asociado con la fase inicial de la insuficiencia renal.

Los resultados coinciden con experimentos anteriores^{94, 127}, donde también se observó un incremento en el consumo de agua.

Glahn et al.¹²⁸ encontraron que OTA incrementó: la micción, la excreción de iones (Na, K, Ca, P) y la humedad en heces (este síndrome en medicina veterinaria, es conocido como “camas húmedas”); así como la disminución de la osmolaridad de la orina. Explicaron que los efectos de OTA pueden causar una diuresis osmótica por inhibición de la reabsorción tubular de electrolitos; además que el efecto de OTA puede ser reversible al discontinuar la administración de la toxina, siempre y cuando no se halla llegado a una nefrosis.

8.1.4 Pigmentación amarilla de la piel y tarso

La menor pigmentación amarilla encontrada en la piel y los tarsos de los pollitos alimentados con 507 $\mu\text{g OTA Kg}^{-1}$, coincide con lo observado por: Santin et al.¹²⁷ quienes utilizaron 2000 $\mu\text{g OTA Kg}^{-1}$; con Osborne et al.⁸³ quienes encontraron una hipocarotenemia al alimentar pollitos con 1, 2, 4 y 8 $\mu\text{g g}^{-1}$ (1000, 2000, 4000 y 8000 $\mu\text{g OTA Kg}^{-1}$) de OTA, y con Huff y Hamilton⁸².

Los resultados del presente también coinciden parcialmente con Gibson et al.¹²⁹ quienes describieron el “Síndrome de ave pálida”, así llamado por la falta de pigmentación de: piel, músculo, pico y patas durante una ocratoxicosis (4000 $\mu\text{g OTA Kg}^{-1}$).

La menor pigmentación puede ser atribuida a una disminución en la absorción de carotenoides, y en particular, debido a una baja disponibilidad de enzimas digestivas ¹³⁰.

8.1.5 Química sanguínea

Los valores de proteínas séricas totales encontrados en la presente investigación coinciden con publicaciones anteriores, donde los pollos que fueron alimentados con OTA presentaron valores menores de proteínas totales, comparados con los que no consumieron ^{131, 132, 133, 134}.

Los niveles bajos de proteína total sérica, pueden ser atribuidos a la inhibición de la síntesis de proteína por OTA, a la inhibición competitiva de la fenilalanina-t-RNA sintetasa con la fenilalanina ⁵⁵ y a la salida de albúmina ocasionado por la nefrotoxicidad inducida por OTA ⁷⁹.

El incremento en los valores de ácido úrico sérico en los tratamientos alimentados con OTA demuestra que la función renal fue significativamente afectada; resultados que coinciden con varias investigaciones de toxicidad de OTA ^{130, 131, 133, 134}.

Las aves alimentadas con OTA, presentaron un aumento significativo en los valores séricos de creatinina. El incremento de la concentración de creatinina en suero en aves alimentadas con micotoxinas, puede ser debida a la acción nefrotóxica de OTA, que causa falla renal por destrucción de las células epiteliales de los túbulos contorneados proximales y distales, y por daño tubular ¹³³. Estos resultados coinciden con los de Stoev et al. ¹³⁵ que utilizaron 5000 $\mu\text{g OTA Kg}^{-1}$; Gupta et al. ¹³² y Kumar et al. ¹³⁴ que trabajaron con 2000 $\mu\text{g OTA Kg}^{-1}$; y con Agawane y Lonkar ¹³³ que observaron incremento en los valores de creatinina con 500 $\mu\text{g OTA Kg}^{-1}$.

Según Stoev et al. ¹³⁵, el aumento significativo en los niveles de ácido úrico y creatinina demuestran que la función renal está severamente deteriorada como resultado del consumo de OTA; adicionalmente puede atribuirse la disminución de las proteínas totales séricas por el incremento de la excreción urinaria.

Los valores de Aspartato amino transferasa (AST) no presentaron diferencias entre los tratamientos. Koynarski et al. ¹³¹ coinciden con estos resultados, al no encontrar diferencias en la actividad de AST en pollitos alimentados con y sin OTA (4000 µg OTA Kg⁻¹) durante 2 semanas, sin embargo estos autores observaron un incremento cuando combinaron OTA con *Eimeria acervulina*, y en menor valor cuando sólo añadieron *E. acervulina*. Al contrario, Kubena et al. ⁹² observaron que la actividad enzimática de AST disminuyó en pollitos alimentados por tres semanas con OTA (2000 µg OTA Kg⁻¹). Es posible que las alteraciones de AST estén ligadas al tiempo de exposición de OTA y a su concentración en las dietas.

Los valores de la enzima Glutamato deshidrogenasa (GLDH), no presentaron diferencia entre los tratamientos. No se encontraron trabajos donde evalúen la actividad de esta enzima durante una ocratoxicosis en pollos. Sin embargo Goyarts et al. ¹³⁶ encontraron una disminución en la actividad de GLDH en fetos de cerdas, cuando éstas consumieron Zearalenona y deoxinivalenol (DON) durante la gestación; así también Döll et al. ¹³⁷ también observaron una disminución de GLDH en lechones alimentados con las mismas fusario-toxinas.

Los resultados de química sanguínea realizados en el Experimento 2 sugieren que la función renal fue más afectada. Datos que confirman estudios anteriores de Dwivedi y Burns ¹³⁸, que señalan que OTA, en pollitos jóvenes, es más nefrotóxica que hepatotóxica.

8.1.6 Necropsias y pesos relativos de órganos.

En la evaluación macroscópica de las aves del Experimento 2, se observó que el 40% de los pollitos alimentados con $507 \mu\text{g OTA Kg}^{-1}$, presentaron nefromegalia; resultados que coinciden con varias publicaciones^{90, 127, 131}, pero a diferencia de éstos, no presentaron palidez. El resto de órganos de las aves, no presentaron cambios macroscópicos.

Varias publicaciones indican la presencia de hígados con hepatomegalia, amarillentos y friables a la palpación, así como alteraciones en los órganos linfáticos^{51, 127, 139}. Koynarski et al.¹³¹ encontraron que las paredes intestinales del duodeno a menudo estaban delgadas y el contenido fue mayormente agua, durante una ocratoxicosis. En el Experimento 2, no se observaron ninguno de estos cambios.

El índice de peso relativo de hígado y riñón de pollitos, fueron ligeramente incrementados al consumir dietas con $507 \mu\text{g OTA Kg}^{-1}$. Estos resultados coinciden con estudios anteriores.^{77, 125, 135, 138, 140}

Stoev et al.¹⁴⁰, sugieren que estos incrementos en el peso relativo del hígado y riñón se deben al agrandamiento del epitelio y por la hiperemia en estos órganos, los cuales están involucrados en la detoxificación y eliminación de OTA.

Los índices de peso relativo de bazo se encontraron ligeramente incrementados, estos resultados coinciden con los encontrados con Stoev et al.^{81, 135, 140}. Sin embargo, Verma et al.⁷⁶ no encontraron variación en el peso relativo del bazo.

Se ha descrito una disminución en el peso relativo de la bolsa de Fabricio^{51, 76, 135, 138}. En el Experimento 2 no se encontraron diferencias.

Según Stoev et al.^{80,135} el incremento del peso relativo de la bolsa de Fabricio, timo y bazo son posibles consecuencias de los cambios degenerativos y aumento del tejido linfoide en los órganos linfáticos de pollitos alimentados con OTA.

El índice del peso relativo del timo tampoco presentó diferencias entre los pollitos alimentados con y sin OTA. A diferencia de Stoev et al.¹⁴⁰; y Dwivedi y Burns¹³⁸ que encontraron una disminución en el peso relativo de este órgano.

Los efectos de OTA sobre los diferentes órganos son dependientes del tiempo de exposición y de la dosis⁹⁰, y dado que la concentración de OTA en éste estudio no fue tan alta como la empleada por los autores antes mencionados, puede ser la razón por la cual las aves no mostraron lesiones macroscópicas, ni mayores cambios en los índices de los pesos relativos de los órganos estudiados.

8.1.7 Histopatología

En el Experimento 2, los cambios histopatológicos encontrados en hígado y riñones se relacionan con el ligero incremento en el índice de los pesos relativos de estos órganos y con las alteraciones encontradas en los parámetros evaluados en química sanguínea.

Los cambios degenerativos de hepatocitos; la proliferación de conductos biliares, así como la nefrosis encontrada en pollitos alimentados con OTA, concuerda con publicaciones anteriores^{119, 127, 135, 138}.

Fuchs¹⁴¹ sugiere que los cambios degenerativos en las células epiteliales del riñón e hígado, se deben probablemente a la ruta de eliminación de OTA vía renal y en parte por el hígado (debido a la excreción de OTA a través de la recirculación

entero-hepática y por la ruta hepato-biliar) y por la acción tóxica directa de OTA en estos tejidos ^{81, 135}.

Debido a los signos clínicos y lesiones no específicas, el diagnóstico de una micotoxicosis es siempre una tarea difícil. Además, para la demostración cualitativa y cuantitativa de la presencia de toxinas, debe ser considerada la presencia de enfermedades infecciosas, desórdenes y deficiencias alimenticias ¹⁴³. Es posible que por alguna de estas razones se hayan encontrado cambios histopatológicos en los órganos del grupo testigo que no consumió OTA.

8.1.8 Cuantificación de OTA en órganos

Los pollitos del Experimento 2, alimentados con $507 \mu\text{g OTA Kg}^{-1}$, durante 15 días, no presentaron residuos de OTA en músculo (pechuga) y riñón al análisis a través de HPLC. El hígado presentó un promedio de $14.84 \mu\text{g OTA Kg}^{-1}$.

Estos resultados coinciden con Biró et al. ¹⁴² quienes tampoco encontraron OTA en músculo de pechuga durante las tres primeras semanas de la administración de $0.354 \text{ mg OTA Kg}^{-1}$ de peso vivo. En el músculo de pierna, la toxina apareció en la tercera semana con bajas cantidades ($0.06 \mu\text{g OTA Kg}^{-1}$) cuantificadas por HPLC; en la cuarta semana no encontraron OTA en ninguno de los dos tipos de músculo. En la segunda semana no detectaron OTA en el riñón, mientras que en el hígado encontraron $0.335 \mu\text{g OTA Kg}^{-1}$; en la tercera y cuarta semana no detectaron OTA ni en hígado ni en riñón.

Kozaczyński ¹⁴³ no encontró OTA en riñón, músculo ni en hígado al administrar $200 \mu\text{g OTA Kg}^{-1}$ en el alimento por 20 semanas. Sin embargo Micco et al. ¹⁴⁴ encontraron $11 \mu\text{g OTA Kg}^{-1}$ en hígado, $0.8 \mu\text{g OTA Kg}^{-1}$ en riñón, mientras que en

el músculo de pechuga no detectaron OTA, en pollitos alimentados con 50 ppb (50 μg OTA Kg^{-1}) durante 64 días al analizar mediante HPLC.

Estos resultados pueden deberse a que los pollitos pueden eliminar o metabolizar rápidamente la toxina, debido a los valores altos de depuración de OTA en plasma ¹⁴⁵; o a la rápida disminución de la concentración de OTA en tejidos durante un período de ausencia de alimento antes del sacrificio ¹⁴⁰. Por tanto para disminuir la potencial exposición OTA en humanos; el período de privación de alimento antes del sacrificio de las aves podría ser prolongado, o se podría cambiar el alimento varios días antes del sacrificio de las aves ¹⁴⁶, o descartar éstos órganos ¹⁴⁰.

8.1.9 Serología

En el Experimento 2, los resultados de Inhibición de la hemoaglutinación (HI) para Newcastle e Influenza aviar, no presentaron diferencias entre los pollitos alimentados con y sin 507 μg OTA Kg^{-1} , lo que coincide con los índices de pesos relativos de la bolsa de Fabricio, timo y bazo, que no presentaron diferencias entre los tratamientos.

Estudios previos señalan que la inmunidad de las aves es afectada durante una ocratoxicosis, reduciendo la respuesta inmune humoral o celular, o ambas, e inhibiendo la fagocitosis ¹⁴⁷. Santin et al. ¹²⁷ encontraron disminución de los títulos de HI para Newcastle al alimentar a las aves con 2000 μg OTA Kg^{-1} .

Elaroussi et al. ⁷⁸ también encontraron una disminución en la respuesta inmune celular y humoral, en pollitos alimentados con 400 y 800 μg OTA Kg^{-1} ; lo mismo fue observado con 5000 μg OTA Kg^{-1} ^{80,134} y con 2000 μg OTA Kg^{-1} ^{127, 147}.

Es posible que el tiempo de exposición a OTA de tan solo 15 días en el Experimento 2, haya sido insuficiente para reproducir un cuadro de inmunotoxicidad por ocratoxicosis.

8.2 EVALUACIÓN *IN VITRO*

La evaluación *in vitro* de los aditivos detoxificantes, presentó resultados muy interesantes, al mostrar que el alimento testigo (con OTA, y sin secuestrantes y/o inactivadores) mostró resultados similares que el resto de tratamientos. Lo que sugiere que en un pH ácido, la pepsina utilizada en la prueba *in vitro*, puede reconocer a OTA como un péptido y la hidroliza. Estos resultados podrían ser la base para desarrollar nuevas alternativas en el control de micotoxinas.

Avantaggiato et al.¹⁴⁸ utilizaron un producto (carbón y aluminosilicatos) para disminuir la absorción de varias micotoxinas; para lo cual simulaban la digestión *in vivo* del cerdo, encontrando un 29% de disminución en la absorción de OTA. Schatzmayr et al.¹²² indican beneficios al utilizar *Trichosporon mycotoxinivorans*, *Eubacterium* BBSH 797, tanto *in vivo* como *in vitro*, por su capacidad de inactivar y degradar micotoxinas como OTA y zearalenona. Galvano et al.¹⁴⁸ encontraron que OTA fue adsorbida por carbón activado, pero no por HSCAS.

Dado que las técnicas *in vitro* no están estandarizadas para todas las micotoxinas; y que en el presente experimento no se encontró una relación entre los resultados *in vitro* con los *in vivo*, se sugiere que la metodología utilizada en este estudio, sobreestima la capacidad de secuestro y/o inactivación por los aditivos detoxificantes, por lo que es necesario considerar las condiciones experimentales utilizadas y proponer nuevas alternativas, como el uso de una solución de pepsina 0.0002% que actualmente utilizan para la determinación de proteína digestible en pepsina de harinas de origen animal¹⁵⁰.

Los resultados de la prueba *in vitro* coinciden con estudios anteriores donde se ha observado que las pruebas *in vitro* en laboratorio, no siempre coinciden con lo que se ha observado en campo ^{90, 97, 103}. Con base en lo anterior se hace evidente la necesidad de estandarizar una prueba de laboratorio que refleje de manera adecuada las condiciones de digestión y de absorción de micotoxinas en los organismos, de manera que sus resultados sean de utilidad para la selección de materias primas y materiales empleados en el manejo de la contaminación con micotoxinas.

9. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos, y bajo las condiciones experimentales empleadas se puede inferir que:

Los parámetros productivos de 1 a 28 días de edad, consumo de agua y pigmentación de la piel de pollitos, no se afectaron al consumir 500 μg ocratoxinas totales Kg^{-1} durante 28 días.

En dietas contaminadas con 507 μg OTA Kg^{-1} , la adición de aditivos detoxificantes no presentaron beneficios, en ningún parámetro evaluado, comparados con el testigo positivo (con OTA y sin aditivos).

Los aditivos detoxificantes utilizados en dietas sorgo-soya, con bajo contenido de OTA (menor de 0.5 μg OTA Kg^{-1}), no redujeron ni mejoraron los parámetros productivos de los pollitos, así tampoco se vio afectada la pigmentación amarilla de la piel, ni el consumo de agua.

Los pollitos alimentados con 507 μg OTA Kg^{-1} de 7 a 21 días, presentaron menor crecimiento, pobre conversión, mayor consumo de agua, menor coloración amarilla (b) en piel y tarsos, incremento en la cantidad de ácido úrico y en la actividad de creatinina; así como una disminución en la cantidad de proteínas totales plasmáticas. Las actividades de AST y GLDH no se vieron afectadas.

La concentración de OTA en riñón y músculo de pechuga fue no detectable por HPLC; con sensibilidad de 5 μg OTA Kg^{-1} . En hígado las cantidades de OTA encontradas fueron desde 5.13 (tratamiento 3) a 36.58 μg Kg^{-1} (tratamiento 4).

El 40% de los pollitos alimentados con $507\mu\text{g OTA Kg}^{-1}$ en el alimento presentaron nefromegalia, en hígados e intestinos no se observaron cambios macroscópicos. Los hígados y riñones presentaron cambios histopatológicos leves y moderados; mientras que en los intestinos no se detectaron.

La respuesta inmune de pollitos frente a la vacunación de Newcastle e Influenza Aviar fue igual en todos los tratamientos

El poder de adsorción y/o desactivación de OTA *in vitro*, por los productos valorados fue superior al 90%. El tratamiento control (con OTA y sin secuestrantes y/o inactivadores) presentó similar respuesta que el resto de tratamientos.

No se encontró relación entre los resultados de las pruebas *in vitro* con los de la prueba *in vivo*.

LITERATURA CITADA

1. Dwivedi P. & B. Burns. 1986 The natural occurrence of ochratoxin A and its effects in poultry. A review. Part I. Epidemiology and toxicity. *World's Poultry Sci. Journal.* 42:32-47.
2. Lesson S & JD Summers. 2001. *Scott's nutrition of the chicken.* 4th edition. University Books. Guelth Ontario Canada. Pp. 579.
3. Huff WE, LF Kubena, RB Harvey, JA Doerr. 1988. Mycotoxin interactions in poultry and swine. *J. Anim. Sci.* 66: 2351-2355.
4. Lopez-Garcia R, DL Park, TD Phillips. 1999. Integrated mycotoxin management systems. *Food, Nutrition and Agriculture FAO Vol. 23* pp.38-47
5. Tomasevic M, A Dakovi, G Rottinghaus, S Matijasevic, M Duricic. 2003. Surfactant modified zeolites - new efficient adsorbents for Mycotoxins. *Microporous and Mesoporous Materials* 61: 173–180.
6. IARC. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, Some Naturally Occurring Substances; Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins, vol. 56, Lyon, France, 9-16 June 1992, World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, 1993. Disponible en: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol56/volume56.pdf>
7. Chang, C. F., Huff, W.E. and Hamilton, P.B. (1979). A leucocytopenia induced in chickens by dietary ochratoxin A. *Poultry Sci.* 58: 555-558.
8. Dänicke S. 2002. Prevention and control of mycotoxins in the poultry production chain: a European view. *World's Poultry Sci.* 58: 451-474.
9. Sharma RP. 2004. Mycotoxins in the food chain: a look at their impact on immunological responses. *Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries Proceedings of Alltech's. 20th Annual symposium.* Edited by TP Lyons and KA Jaques. 2004.
10. Huff WE, CF Chang, MF Warren, PB Hamilton. 1979. Ochratoxin A-induced iron deficiency anemia. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 601-604.
11. Hamilton PB, WE Huff, JR Harris, RD Wyatt, 1982. Natural occurrences of ochratoxicosis in poultry. *Poultry Sci.* 61: 1832-1841.
12. Scott PM. 1978. Mycotoxins in feed and ingredients and their origin. *Journal of Food Additives and Contaminants*, 12, 592-598.

13. Ronald R & A Frohlich. 1992. A Review of recent advances in understanding ochratoxicosis. *J. Anim. Sci.* 70: 3968-3988.
14. Van der Merwe KJ, PS Steyn, L Fourie. 1965. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus*. *Wilh. Nature* 205:1112-1113.
15. Chu FS. 1974. Studies on ochratoxins. *C.R.C. Crit Rev Toxicol* 2 (4) 499-524.
16. Størmer FC, O Storen, CE Hansen, JI Pedersen, AJ Aasen. 1983. Formation of (4R) - and (4S)-4-hydroxyochratoxin A and 10-hydroxyochratoxin A from ochratoxin A by rabbit liver microsomes. *Appl. Environ. Microbiol.* 45:1183.
17. Creppy EE, K Chakor, MJ Fisher, G Dirheimer. 1990. The mycotoxin ochratoxin A is a substrate for phenylalanine hydroxylase in isolated rat hepatocytes and in vivo. *Arch. Toxicol.* 64:279.
18. Hadidane R, H Bacha, M Hammami, F Ellouze, EE Creppy, G Dirheimer. 1991. Identification of three natural analogues of ochratoxin A: Serine-OTA, hydroxyproline OTA and lysine OTA, produced by *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174. *Mycotoxins, nephropathy and urinary tract tumors*. P. 18. International agency for research on cancer, Lyon, France.
19. Frisvad JC, RA Samson. 1991. Mycotoxins produced in species of *Penicillium* and *Aspergillus* occurring in cereals. In: J. Chelkowski (ED) *Cereal grain mycotoxins, fungi and quality in drying and storage*. Pp 441-476. Elsevier, Amsterdam.
20. Størmer FC. 1992. Ochratoxin A - a mycotoxins of cancer. In: Bhatnagar D, Lillehoj EB, Arora DK, eds. *Handbook of Applied Mycology, Vol 5: Mycotoxins in Ecological Systems*, Marcel Dekker, Inc, New York, 1992: 403-432.
21. Bayman P & JL Baker 2006. Ochratoxins: A global perspective. *Mycopathologia* 162: 215-223.
22. Lai M, G Semeniuk, CW Hesseltine. 1970. Conditions for production of ochratoxin A by *Aspergillus* species in synthetic medium. *Appl. Microbiol.* 19:542-544.
23. Ciegler A, DI Fennell, GA Sanding, RW Detroy, GA Bennett. 1973. Mycotoxin-producing strains of *Penicillium viridicatum*: Classification into subgroups. *Appl. Microbiol* 26: 271-278.
24. Hesseltine CW, Vandegrift EE, Fennell DI, Smith ML, Shotwell OL. 1972. *Aspergilli* as ochratoxin producers. *Mycologia* 64: 539-550

25. Tsubouchi H, K Yamamoto, K Hisada, Y Sakabe, S Udagawa. 1987. Effect of roasting on ochratoxin A level in green coffee beans inoculated with *Aspergillus ochraceus*. *Mycopathologia* 97: 111-115.
26. Varga J, E Kevei, E Rinyu, J Téren, Z Kozakiewicz. 1996. Ochratoxin production by *Aspergillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4462-4464.
27. Frisvad JC, RA Samson. 2000. *Neopetromyces* gen. nov. and an overview of teleomorphs of *Aspergillus* subg. *Circumdati*. *Stud Mycol* 45: 201-207.
28. Baker JL, Bayman P, Mahoney NE, Klich MA, Palumbo JD, Campbell BC. 2003. Ochratoxigenic *Aspergillus lanosus* and *A. alliaceus* isolates from California tree nut orchards. Proceedings of the 3rd Fungal Genomics, 4th Fumonisin and 16th Aflatoxin Elimination Workshops, Savannah, Georgia (Poster).
29. Peterson SW. 2000. Phylogenetic relationships in *Aspergillus* based on rDNA sequence analysis. In: Samson R.A., Pitt J.I., eds. *Classification of Penicillium, Aspergillus: Integration of Modern Taxonomic Methods*, Harwood Publishers Reading UK, 2000: 323-356.
30. Frisvad JC, JM Frank, J Houbraken, AFA Kuijpers. 2004. New ochratoxin producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Stud. Mycol.* 50:23-43.
31. Abarca ML, MR Bragulat, G Sastellá, FJ Cabañes. 1994. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus Niger* var. *niger*. *Appl. Environ. Microbiol* 60: 2650-2652.
32. Téren J, J Varga, Z Hamari, E Rinyu, F Kevei. 1996. Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. *Mycopathologia* 134: 171-176.
33. Samson RA, JAMP Houbraken, AFA Kruijpers, JM Frank, JC Frisvad. 2004. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Stu. Mycol.* 50: 45-46
34. Blank G, U Nwoko, A Frohlich, R Marquardt. 1998. Ochratoxin A production in relation to the growth morphology of *Aspergillus alutaceus*. *Lebensm Wiss. Technol.* 31: 210-214.
35. Klich M.A. 2002. *Identification of Common Aspergillus species*. The American Society for Microbiology (ASM) Press, Washington, DC, 2002, 116 pp.
36. Abarca ML, F Accensi, MR Bragulat., FJ Cabañes, 2001. Current important of ochratoxin A-producing *Aspergillus* spp. *J. Food Protect* 64: 903-906.

37. Pitt JI. 1987. *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum* and production of ochratoxin A. Appl. Environ. Microbiol. 52:266.
38. Land CJ & Hult K 1987. Mycotoxin production by some wood-associated *Penicillium* spp. Lett. Appl. Microbiol 4:41-44.
39. Mills JT & D Abramson. 1982. Ochratoxigenic potential of *Penicillium* spp. Isolated from stored rapeseed and cereals in western Canada. Can. J. Plant. Pathol. 4:37-41.
40. Pitt JI. 1988. A laboratory guide to common *Penicillium* species. 2nd Ed. Pp 132-133. CSIRO Division of Food Processing, North Ryede, N.S.W., Australia.
41. Frisvad JC and O Filtenborg. 1989. Terverticillate penicillia; Chemotaxonomy and mycotoxin production. Mycologia. 81:837.
42. Northolt MD, HP Van Egmond, WE Paulsch. 1979. Ochratoxin A production by some fungal species in relation to water activity and temperature. J. Food Prot. 42:485.
43. Krogh P. 1987. Ochratoxin in foods. In: P. Krogh (Ed.) Mycotoxins in food. Pp 97. Academic Press, Harcourt Brace Jovanovich. London.
44. Filtenborg O, JC Frisvad, U Thrane. 1990. The significance of yeast extracts on the metabolite production of *Penicillium*. In: RA Samson & JI Pitt (Ed.) Modern Concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* systemics. pp 443-440. Plenum Press, New York.
45. Pitt JI & RA Samson. 1990. Approaches to *Penicillium* and *Aspergillus* systematics. Stud. Mycol. 32:77.
46. Madhyastha, MS, RR Marquardt, AA Frohlich, D Abramson. 1990. Effects of different cereal and oilseed substrates on the growth and production of toxins by *Aspergillus alutaceus* and *Penicillium verrucosum*. J. Agric. Food Chem. 38:1506.
47. Chelack WS, K Borsa, RR Marquardt, AA Frohlich. 1991. Role of competitive microbial flora in the radiation - induced enhancement of ochratoxin production by *Aspergillus alutaceus* var *alutaceus* NRRL-3174. Appl. Environ. Microbiol. 57:2492.
48. Rosenthaler R, EE Creppy, G Dirheimer. 1984. Ochratoxin A: On the mode of action of a ubiquitous mycotoxin. J. Toxicol,-Toxin. Rev. 3:53.
49. Marquardt RR & AA Frohlich. 1992. A review of recent advances in understanding ocratoxicosis. J. Anim. Sci 70: 3968-3988.

50. Peckham JC, D Doupnik Jr., OH Jones. 1971. Acute toxicity of ochratoxin A and B in chicks. *Applied Microbiology*, 21, 492-494.
51. Huff WE, RD Wyatt, TL Tucker, PB Hamilton. 1974. Ochratoxicosis in broiler chickens. *Poultry Sci.* 53, 1585-1591.
52. FAO. 2003. Manual Sobre la Aplicación del Sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC) en la Prevención y Control de las Micotoxinas. Estudio FAO alimentación nutrición 73. Disponible en: <http://www.fao.org/DOCREP/005/Y1390S/y1390s00.htm#Contents>
53. Diario Oficial de las Comunidades Europeas. REGLAMENTO (CE) No 472/2002 DE LA COMISIÓN de 12 de marzo de 2002. Disponible en: http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/es/oj/2002/l_075/l_07520020316es00180020.pdf
54. Honrad I & R Rösenthaller. 1977. Inhibition of phenylalanine tRNA synthetase from *Bacillus subtilis* by ochratoxin A. *FEBS Letter*, 83, 341-347.
55. Creppy EE, AAJ Lungnier, F Fasiolo, K Heller, R Rösenthaller, G Dirheimer. 1979. In vitro inhibition of yeast phenylalanyl-tRNA synthetase by ochratoxin A. *Chem Biol Interac* 24, 257-261.
56. Creppy EE, G Lorkowski, G Beck, R Rösenthaller, G Dirheimer. 1980a. Combined action of citrinin and ochratoxin A on hepatoma tissue cultura cells. *Toxicology Letter* 5, 375-380.
57. Creppy EE, FC Støemer, R Rösenthaller, G Dirheimer. 1983. Effect of ochratoxin A metabolites on yeast phenylalanyl-tRNA synthetase and on the growth and in vivo protein synthesis of hepatoma cells. *Chemo-Biological Interactions* 47. 239-247.
58. Creppy EE, M Schlegel, R Rösenthaller, G Dirheimer. 1980b. Phenylalanine prevents acute poisoning by ochratoxin A in mice. *Toxicology Letter* 6, 77-80.
59. Creppy EE, R Rösenthaller, G Dirheimer. 1984. Inhibition of protein synthesis in mice by ochratoxin A and its prevention by phenylalanine. *Food and Chemical Toxicology* 22, 883-886.
60. Dirheimer G & EE Creppy. 1991. Mechanism of action of ochratoxin A. *IARC Science Publication*, 115, 171-186.
61. Størmer FC & T Lea. 1995. Effects of ochratoxin A upon early and late events in human T-cell proliferation. *Toxicology* 95: 45-50.

62. Meisner H, MA Cimbala, RW Hanson. 1983. Decrease of renal phosphoenolpyruvate carboxykinase RNA and poly (A) RNA level by ochratoxin a. Archives of Biochemistry, 223, 264-270.
63. Meisner H & P Krogh. 1986. Phosphoenolpyruvate carboxykinase as a selective indicator of ochratoxin A induced nephropathy. Developments in toxicology and Environmental Sci. 14, 199-206.
64. Subramanian S, A Kanthasamy, N Balasubramania, N Sekar, S Govindasamy. 1989. Ochratoxin A toxicity on carbohydrate metabolism in rats. Bulletin of Environmental contamination and Toxicology. 43, 180-184.
65. Wei YH, CY Lu, TN Lin, RD Qei. 1985. Effect of ochratoxin A on rat liver mitochondrial respiration and oxidative phosphorylation. Toxicology 36, 119-130.
66. Shotwell LL, CW Hesseltine, ML Goulden. 1969. Ochratoxin A occurrence as natural contaminant of a corn sample. Appl. Microbiol. 17: 765-766.
67. Zimmerli B & R Dick. 1996. Ochratoxin A in table wine and grape-juice: occurrence and risk assessment. Food. Addit. Contam. 13: 655-668.
68. Aziz NH, YA Youssef, MZ El-Fouly, LA Moussa. 1998. Combination of some common medical plant samples and spices by fungi and their mycotoxins. Bot Bull Acad sinica (Taiwan) 39, 279-285.
69. Jorgensen K. 1998. Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin. Food Addit contam. 15, 550-554.
70. Kuiper-Goodman T & PM Scott. 1989. Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. Biomedical and Environmental Sci. 2, 179-248.
71. Tsubouchi H, H Terada, K Yamamoto, K Hisada, Y Sakabe. 1995. Caffeine degradation and increased ochratoxin production by toxigen strains of *Aspergillus ochraceus* isolated from green coffee beans. Mycopathologia 90: 181-186.
72. Lopez de Cerain A, E González-Peñas, AM Jiménez & J Bello. 2002. Contribution to the study of ochratoxin A in Spanish wines. Food Additives and Contaminants. 19: 1058-1064.
73. Scudamore KA, Banks J, SJ Macdonald. 2003. Fate of ochratoxin A in processing of whole wheat grains during milling and bread production. Food Additives and Contaminants. 20, 1153-1163.

74. Scudamore KA, Banks J, RC Guy. 2004 Fate of ochratoxin A in the processing of whole wheat grain during of extrusion. *Food Additives and Contaminants*. 21, 488-497.
75. Böhm, J. 1992. Über die Bedeutung der Mykotoxine Desoxynivalenol, Zearalenon und Ochratoxin A für landwirtschaftliche Nutztiere. *Archives of Animal Nutrition* 42: 95-111.
76. Verma J, TS Johri, BK Swain, S Ameena. 2004. Effect of graded levels of aflatoxin, ochratoxin and their combinations on the performance and immune response of broilers. *British Poultry Sci*. 45: 512-8.
77. Prior MG, CS Sisodia, JB O'Neil. 1976. Acute oral ochratoxicosis in day-old White Leghorns, turkeys and Japanese quail. *Poultry Sci*. 55:736-790.
78. Elaroussi, MA, FR Mohamed, EM Barkouky, AM Atta, AM Abdou, MH Hatab, 2006. Experimental ochratoxicosis in broiler chickens. *Avian Pathology* 35: 263-269.
79. Huff WE, Kubena LF, Harvey RB. 1988. Progression of ochratoxicosis in broiler chickens. *Poultry Sci* 67: 1139-1146.
80. Stoev SD, G Anguelov, I Ivanov, D Pavlov. 2000. Influence of ochratoxin A and an extract of artichoke on the vaccinal immunity and health in broiler chicks. *Experimental and Toxicologic Pathology* 52: 43-55.
81. Stoev SD, V Koynarsky, PG Mantle. 2002. Clinic morphological studies in chicks fed ochratoxin A while simultaneously developing coccidiosis. *Vet Res Commun*. 26(3):189-204.
82. Huff WE & PB Hamilton. 1975. Decreased plasma carotenoids during ochratoxicosis. *Poultry Sci*. 54: 1308-1310.
83. Osborne DJ, WE Huff, PB Hamilton, HR Burmeister. 1982. Comparison of ochratoxin, aflatoxin, and T-2 Toxin for their effects on selected parameters related to digestion and evidence for specific metabolism of carotenoids in chickens. *Poultry Sci*. 61: 1646-1652.
84. Schaeffer JL, JK Tyczkowski, PB Hamilton. 1987. Alterations in carotenoid metabolism during ochratoxicosis in young broiler chickens. *Poultry Sci*. 66(2):318-24.
85. Huff WE, & JA Doerr. 1981. Synergism between aflatoxin and ochratoxin A in broiler chickens. *Poultry Sci*. 60:550-555.

86. Huff WE, JA Doerr, CJ Wabeck, GW Chaloupka, JD May, JW Merkley. 1983. Individual and combined effects of aflatoxin and ochratoxin A on bruising in broiler chickens. *Poultry Sci.* 62: 1764-1771.
87. Huff WE, JA Doerr, CJ Wabeck, GW Chaloupka, JD May, JW Merkley. 1984. The individual and combined effects of aflatoxin and ochratoxin A on various processing parameters of broiler chickens. *Poultry Sci.* 63: 2153-2161.
88. Campbell ML, JD May, WE Huff, JA Doerr, 1983. Evaluation of immunity of young broiler chickens during simultaneous aflatoxicosis and ochratoxicosis. *Poultry Sci.* 62: 2138-2144.
89. Kubena LF, RB Harvey, WE Huff, DE Corrier, TD Philips, GE Rottinghaus 1989. Influence of ochratoxin A and T-2 toxin singly and in combination on broiler chickens. *Poultry Sci.* 68:867-72
90. García, AR, E Ávila, R Rosiles, VM Petrone. 2003. Evaluation of two mycotoxin binders to reduce toxicity of broiler diets containing ochratoxin A and T-2 toxin contaminated grain. *Avian Diseases* 47:691-699.
91. Kubena LF, RB Harvey, TS Edrington, GE Rottinghaus 1994. Influence of ochratoxin A and diacetoxyscirpenol singly and in combination on broiler chickens. *Poultry Sci.* 73:408-15.
92. Kubena LF, WE Huff, RB Harvey, DE Corrier, TD Phillips, CR Creger 1988. Influence of ochratoxin A and deoxynivalenol on growing broiler chicks. *Poultry Sci.* 67:253-60.
93. Gentles A, EE Smith, LF Kubena, E Duffus, P Johnson, J Thompson, RB Harvey, TS Edrington. 1999. Toxicological evaluations of cyclopiazonic acid and ochratoxin A in broilers *Poultry Sci.* 78 (10):1380-4.
94. Manning RO, TP Brown, RD Wyatt, OJ Fletcher. 1985. The individual and combined effects of citrinin and ochratoxin A in broiler chicks. *Avian Dis.* 29(4):986-97.
95. Glahn RP, RF Wideman Jr, JW Evangelisti, WE Huff. 1988. Effects of ochratoxin A alone and in combination with citrinin on kidney function of single comb White Leghorn pullets. *Poultry Sci.* 67:1034-42
96. Phillips TD, BA Sarr, BA Clement, LF Kubena, RB Harvey. 1991. Prevention of aflatoxicosis in farm animals via selective chemisorption of aflatoxin. Pages 223-237. In: *Mycotoxins, Cancer and Health* (Bray, G.A., and D. H. Ryan, eds.), Louisiana State University Press, Baton Rouge.

97. Döll, S, S Dänicke, H Valenta, G Flachowsky. 2004. In vitro studies on the evaluation of mycotoxin detoxifying agents for their efficacy on deoxynivalenol and zearalenone. Arch. Anim. Nutr. 58: 419-441.
98. Dakovic, A, M Tomasevic-Canovic, V Dondur, GE Rottinghaus, V Medakovic, S Zaric. 2005. Adsorption of mycotoxins by organozeolites. Colloids Surf B Biointerfaces. 46:20-25.
99. Whitlow LW. 2006. Evaluation of mycotoxins binders. Proceedings of the 4th Mid-Atlantic Nutrition Conference. Zimmermann, N.G., ed., University of Maryland, College Park. pp 132-143.
100. Stanley VG, R Ojo, S Woldensenbet, DH Hutchinson. 1993. The use of *Saccharomyces cerevisiae*, to suppress the effects of aflatoxicosis in broiler chicks. Poultry Sci. 72: 1867-1872.
101. Devegowda, G, BIR Aravind, MG Morton. 1996. *Saccharomyces cerevisiae* and mannanoligosaccharides to counteract aflatoxicosis in broilers. Proceedings of the Australian Poultry Science Symposium, Sydney, pp. 103-106.
102. Devegowda, G, MVLN Raju, N Afzali, HVLN Swamy. 1998. Mycotoxin picture world wide: Novel solutions for their counteraction, in: Lyons, T.P. and Jacques, K.A. (Eds.) Biotechnology on the Feed Industry, pp. 241-255 (Kentucky, Alltech Inc.).
103. Diaz DE, WM Hagler Jr., JT Blackwelder, JA Eve, BA Hopkins, KL Anderson, FT Jones, LW Whitlow. 2004. Aflatoxin binder II: Reduction of aflatoxin M1 in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed. Mycopathologia 157:233-241.
104. Bailey RH, LF Kubena, RB Harvey, SA Buckley & GE Rottinghaus. 1998. Efficacy of various inorganic sorbents to reduce the toxicity of aflatoxin and T-2 toxin in broiler chickens. Poultry Sci. 77:1623-1630.
105. Wood GE. 1992. Mycotoxins in Food and Feeds in the United States. J Anim. Sci. 70: 3941-3949
106. Requena F, E Saume, A León, 2005. Micotoxinas: Riesgos y prevención. Zootecnia Tropical 23 (4): 393 – 410. Disponible en: http://www.ceniap.gov.ve/bdigital/ztzoo/zt2304/arti/requena_f.htm
107. Doyle MP, RS Applebaum, RE Brackett, EH Marth. 1982. Physical, chemical and biological degradation of mycotoxins in foods and agricultural commodities. J. Food Prot. 45:946-971

108. Ramos AJ, J Fink-Gremmels, E Hernández. 1996. Prevention of toxic effects of mycotoxins by means of nonnutritive adsorbent compounds. *J. Food Prot.* 59:631-641.
109. Stoloff L, S Nesheim, L Yin, JV Rodicks, M Stack, AD Cambell. 1971. A multimycotoxin detection method for aflatoxins, ochratoxins, zearalenone, sterigmatocystin and patulin. *Journal of the AOAC*; 54 (1) 91-97.
110. Estrada FE, ZL Peralta, PM Rivas. 1982. *Manual de técnicas histológicas.* México AGT Editor S.A. pp. 46-48 y 63.
111. Nesheim S, M Stack, M Trucksess, R Eppley. 1992. Rapid solvent-efficient method for liquid chromatographic determination of ochratoxin A in corn, barley, and kidney: Collaborative study. *Journal of AOAC International.* 75 (3) 481-487.
112. AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1990. *Official methods of the Association of Official Analytical Chemists.* Edited by Kenneth Helrich. 15th. Ed. Washington DC: AOAC, USA.
113. Denbow M. Chapter 12. *Gastrointestinal Anatomy and Physiology.* Sturkie's Avian Physiology. 5th Edition Academic Press USA 2000. pp 316. (299-321).
114. Kuehl R. *Diseño de experimentos. Principios estadísticos de diseño y análisis de investigación.* Segunda edición. México 2001.
115. SAS Institute, 2002. *SAS® User's guide, Statistics.* Version 9.00 Edition. SAS Institute Inc., Cary. NC USA.
116. Maruscuilo L, M McSweeney. 1977. *Non parametric and distribution-free methods for the social science.* Brooks/Cole Publishing Company. Pp. 299 – 324. Monterey-California 1977.
117. JMP 2002. SAS Institute Inc 2002. A business unit of SAS. Version 5.0.1. 1989 – 2002.
118. Morehouse LG. 1985. Mycotoxins of veterinary importance in the United States. In: LACEY, J. (Ed.) *Trichothecene and other Mycotoxins.* John Wiley and Sons Ltd, New York, pp. 383-410.
119. García, A.R. *Evaluación de secuestrantes de micotoxinas para reducir la toxicidad en dietas para pollo de engorda contaminadas con cultivos de *Aspergillus ochraceus* y *Fusarium tricinctum* productores de ocratoxina y toxina t – 2 (tesis de maestría).* México (DF): FMVZ, UNAM, 2002.

120. Huff WE, LF Kubena, RB Harvey, TD Phillips. 1992. Efficacy of hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the individual and combined toxicity of aflatoxin and ochratoxin A. *Poultry Sci.* 71: 64-9.
121. Politis I, K Fegeros, S Nitsch, G Schatzmayr, D Kantas. 2005. Use of *Trichosporon mycotoxinivorans* to suppress the effects of ochratoxicosis on the immune system of broiler chicks. *British Poultry Sci.* 46 (1) 58-65.
122. Schatzmayr G, F Zehner, M Täubel, D Schatzmayr, A Klimitsch, AP Loibner, EM Binder. 2006. Microbiologicals for deactivating mycotoxins. *Mol Nutr Food Res.* 50(6):543-51.
123. Schatzmayr G, D Heidler, E Fuchs, M Mohnl. 2003. Investigation of different yeast strains for the detoxification of ochratoxin A. *Mycotoxin Res.*, 19, 124-128.
124. Molnar O, G Schatzmayr, E Fuchs, H Prillinger. 2004. *Trichosporon mycotoxinivorans* sp. nov., a new yeast species useful in biological detoxification of various mycotoxins. *Syst Appl Microbiol.* 27(6):661-71.
125. Raju MVLN & G Devegowda. 2000. Influence of esterified-glucomannan on performance and organ morphology, serum biochemistry and haematology in broilers exposed to individual and combined mycotoxicosis (aflatoxin, ochratoxin and T-2 toxin). *British Poultry Sci.* 41: 640-650.
126. Aravind KL, VS Patil, G Devegowda, B Umakantha, SP Ganpule. 2003. Efficacy of esterified glucomannan to counteract mycotoxicosis in naturally contaminated feed on performance and serum biochemical and hematological parameters in broilers. *Poultry Sci.* 82(4):571-6.
127. Santin E, AC Paulillo, PC Maiorka, AC Alessi, EL Krabbe, A Maiorka. 2002. The effects of ochratoxin/aluminosilicate interaction on the tissues and humoral immune response of broilers. *Avian Pathology*, 31, 73-79.
128. Glahn RP, RS Shapiro, VE Vena, RF Wideman, WE Huff. 1989. Effects of chronic ochratoxin A and citrinin toxicosis on kidney function of single comb White Leghorn pullets. *Poultry Sci.*, 68(9):1205-12.
129. Gibson RM, CA Bailey, LF Kubena, WE Huff, RB Harvey R. 1990. Impact of L-phenylalanine supplementation on the performance of three-week-old broilers fed diets containing ochratoxin A. 1. Effects on body weight, feed conversion, relative organ weight, and mortality. *Poultry Sci.* 69(3):414-9.

130. Ueno Y. 1991. Biochemical mode of action of mycotoxins. In J.E., Smith, R.S. Henderson (Eds.) *Mycotoxins and Animal Foods* 1st ed. (pp. 437-454). Boca Raton, FL: CRC Press.
131. Koynarski V, S Stoev, N Grozeva, T Mirtcheva, H Daskalov, J Mitev, P Mantle. 2007. Experimental coccidiosis provoked by *Eimeria acervulina* in chicks simultaneously fed on ochratoxin A contaminated diet. *Research in Veterinary Sc.* 82; 225–231.
132. Gupta S, N Jindal, RS Khokhar , AK Gupta, DR Ledoux, GE Rottinghaus. 2005. Effect of ochratoxin A on broiler chicks challenged with *Salmonella gallinarum*. *British Poultry Sci.* 46(4):443-50.
133. Agawane SB, PS Lonkar. 2004. Effect of probiotic containing *Saccharomyces boulardii* on experimental ochratoxicosis in broilers: hematobiochemical studies. *J. Vet. Sci.* 5(4), 359–367.
134. Kumar A, N Jindal, CL Shukla, Y Pal, DR Ledoux, GE Rottinghaus. 2003. Effect of ochratoxin A on Escherichia coli-challenged broiler chicks. *Avian Dis.* 47(2):415-24.
135. Stoev SD, D Djuvinov, T Mirtcheva, D Pavlov, P Mantle. 2002 Studies on some feed additives giving partial protection against ochratoxin A toxicity in chicks. *Toxicology Letters* 135: 33-50.
136. Goyarts T, S Dänicke, KP Brüssow, H Valenta, KH Ueberschär , U Tiemann. 2007. On the transfer of the Fusarium toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) from sows to their fetuses during days 35-70 of gestation. *Toxicol Lett.* 2007 Apr 22.
137. Döll S, S Gericke, S Dänicke, J Raila, KH Ueberschär, H Valenta, U Schnurrbusch, FJ Schweigert, G Flachowsky. 2005. The efficacy of a modified aluminosilicate as a detoxifying agent in Fusarium toxin contaminated maize containing diets for piglets. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl).* 89(9-10):342-58.
138. Dwivedi P & B Burns. 1984. Pathology of ochratoxicosis A in young broiler chicks. *Research in Veterinary Sci.* 36, 92-103.
139. Burns B & P Dwivedi. 1986. The natural occurrence of ochratoxin A and its effects in poultry. A review. Part II. Epidemiology and toxicity. *World's Poultry Sci. Journal.* 42:48-55
140. Stoev SD, M Stefanov, S Denev, B Radic, AM Domijan, M Peraica. 2004. Experimental mycotoxicosis in chickens induced by ochratoxin A and

- penicillic acid and intervention with natural plant extracts. *Vet Res Commun.* 28: 727-746.
141. Fuchs R. 1988. Distribution and fate of ochratoxin A in experimental animals. Doctoral thesis, Swedish University of Agricultural Science, Uppsala), 13-14.
 142. Biró K, L Solti, I Barna-Vetro, G Bagó, R Glávits, E Szabó & J Fink-Gremmels. 2002. Tissue distribution of ochratoxin A as determined by HPLC and ELISA and histopathological effects in chickens. *Avian Pathology* 31, 141-148.
 143. Kozaczyński W. 1994. Experimental ochratoxicosis A in chickens. Histopathological and histochemical study. *Arch Vet Pol.* 34(3-4):205-19.
 144. Micco C, M Miraglia, R Onori, A Ioppolo, A Mantovani. 1987. Long-term administration of low doses of mycotoxins in poultry. 1. Residues of ochratoxin A in broilers and laying hens. *Poultry Sci.* 66(1):47-50.
 145. Galtier P, M Alvinerie, JL Charpentreau. 1981. The pharmacokinetic profiles of ochratoxin A in pigs, rabbits and chickens. *Food and Cosmetic Toxicology*, 19, 735-738.
 146. Stoev SD, H Daskalov, B Radic, A Domijan, M Peraica. 2002. Spontaneous mycotoxic nephropaty in Bulgarian chickens with unclarified mycotoxin etiology. *Veterinary Research*, 33, 83-94.
 147. Singh GSP, HVS Chauhan, GH Jha, KK Singh. 1990. Immunosuppression due to chronic ochratoxicosis in broiler chicks. *Journal of Comparative Pathology* 103: 399-410.
 148. Avantaggiato G, R Havenaar, A Visconti. 2007. Assessment of the Multi-mycotoxin-Binding. Efficacy of a Carbon/Aluminosilicate-Based Product in an *in vitro* Gastrointestinal Model. *J Agric Food Chem.* 13; 55(12):4810-4819.
 149. Galvano F, A Pietri, T Bertuzzi, A Piva, L Chies, M Galvano. 1998. Activated carbons: in vitro affinity for ochratoxin A and deoxynivalenol and relation of adsorption ability to physicochemical parameters. *J Food Prot.* 61(4):469-75.
 150. Tejada I. 1992. Control de calidad y análisis de alimentos para animales. Sistema de educación continua en producción animal. A.C.

11. CUADROS

Cuadro 1. Clasificación de las ocratoxinas por el aminoácido y por el tipo de sustituyente.

Nombre	R1	R2	R3	R4	R5	Fuente
Ocratoxina A	Fenilalanina	Cl	H	H	H	Van der Merwe et al. (1965) ¹⁴
Ocratoxina B	Fenilalanina	H	H	H	H	Van der Merwe et al. (1965) ¹⁴
Ocratoxina C	Fenilalanina, etil éster	Cl	H	H	H	Chu (1974) ¹⁵
Ocratoxina A metil éster	Fenilalanina, metil éster	Cl	H	H	H	Chu (1974) ¹⁵
Ocratoxina B metil éster	Fenilalanina, metil éster	H	H	H	H	Chu (1974) ¹⁵
Ocratoxina B etil éster	Fenilalanina, etil éster	H	H	H	H	Chu (1974) ¹⁵
Ocratoxina α	OH	Cl	H	H	H	Størmer et al. (1983) ¹⁶
Ocratoxina β	OH	H	H	H	H	Størmer et al. (1983) ¹⁶
4R-Hidroxiccratoxina A	Fenilalanina	Cl	H	OH	H	Størmer et al. (1983) ¹⁶
4S-Hidroxiccratoxina A	Fenilalanina	Cl	OH	H	H	Størmer et al. (1983) ¹⁶
10-Hidroxiccratoxina A	Fenilalanina	Cl	H	H	OH	Størmer et al. (1983) ¹⁶
Ocratoxina A, análogo de tirosina	Tirosina	Cl	H	H	H	Creppy et al. (1990) ¹⁷
Ocratoxina A, análogo de serina	Serina	Cl	H	H	H	Hadidane et al. (1991) ¹⁸
Ocratoxina A, análogo de hidroxiprolina	Hidroxiprolina	Cl	H	H	H	Hadidane et al. (1991) ¹⁸
Ocratoxina A, análogo de lisina	Lisina	Cl	H	H	H	Hadidane et al. (1991) ¹⁸

Cuadro 2. Experimento 1. Distribución de los tratamientos para los pollitos alimentados con 500 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ocratoxinas.

Tratamientos	Ocratoxinas ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	Producto Comercial	Dosis utilizada (Kg. ton^{-1})	Identificación
1	0	Ninguno	-	Testigo Negativo
2	500	Ninguno	-	Testigo Positivo
3	500	Klin sil®	5	Producto A
4	500	Toxisorb®	1	Producto B
5	500	Micofyx Plus®	2	Producto C
6	500	Mycosorb®	4	Producto D

Cuadro 3. Composición y Análisis Calculado de nutrientes de la dieta basal

INGREDIENTE	Cantidad Kg Ton ⁻¹
Sorgo	543.848
Pasta de soya	359.203
Aceite de soya	49.474
Ortofosfato	18.673
Carbonato de calcio	15.350
Cloruro de sodio	4.399
DL-Metionina 99%	2.124
Avelut Líquido	2.000
L-Lisina HCL	1.078
Premezcla de minerales	1.000
Premezcla de vitaminas	1.000
Cloruro Colina 60%	1.000
Nicarbacina	0.500
Bacitracina 100%	0.300
Antioxidante	0.050
ANÁLISIS CALCULADO DE NUTRIENTES	
Energía Metabolizable (Kcal ton ⁻¹)	3000
Proteína Cruda (%)	22
Lisina (%)	1.30
Metionina+Cistina (%)	0.90
Metionina (%)	0.50
Treonina (%)	0.80
Calcio (%)	0.95
Fósforo disponible (%)	0.48

Cuadro 4. Experimento 2. Distribución de los tratamientos para los pollitos alimentados con 507 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ OTA.

Tratamientos	OTA ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	Producto Comercial	Dosis utilizada (Kg. ton^{-1})	Identificación
1	0	Ninguno	-	Testigo Negativo
2	500	Ninguno	-	Testigo Positivo
3	500	Klin sil®	5	Producto A
4	500	Toxisorb®	1	Producto B
5	500	Micofyx Plus®	2	Producto C
6	500	Mycosorb®	4	Producto D

Cuadro 5. Experimento 1. Concentración de Ocratoxinas en alimento.

Tratamiento	Elisa ($\mu\text{g/kg}$)*	Elisa ($\mu\text{g kg}^{-1}$)**	HPLC ($\mu\text{g kg}^{-1}$) OTA**
1	0	NSD	NSD
2	500	478	NSD
3	500	463	NSD
4	500	427	NSD
5	500	466	NSD
6	500	438	NSD

* Calculada a partir del trigo contaminado

** Determinados en las dietas.

NSD = No se detecto.

Cuadro 6. Experimento 1. Peso corporal (gramos) de pollitos alimentados con 500 µg Kg⁻¹ ocratoxinas.

Tratamiento	1° Semana (media+EE)	2° Semana (media +EE)	3° Semana (media +EE)	4° Semana (media +EE)
1	155 ± 3.34 ^a	369 ± 6.65 ^a	724 ± 12.89 ^a	1214 ± 27.16 ^a
2	153 ± 4.67 ^a	367 ± 2.80 ^a	718 ± 12.76 ^a	1226 ± 16.92 ^a
3	155 ± 3.49 ^a	373 ± 12.28 ^a	739 ± 19.21 ^a	1298 ± 34.50 ^a
4	147 ± 8.07 ^a	364 ± 15.18 ^a	651 ± 37.88 ^a	1113 ± 15.18 ^a
5	150 ± 5.81 ^a	367 ± 13.14 ^a	710 ± 26.71 ^a	1174 ± 16.88 ^a
6	151 ± 4.38 ^a	365 ± 8.72 ^a	697 ± 15.35 ^a	1296 ± 47.82 ^a
Probabilidad de F	0.87	0.99	0.16	0.87

Literales diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes (P > 0.05)

EE = Error estándar de la media.

Cuadro 7. Experimento 1. Consumo semanal (gramos) de alimento de pollitos alimentados con 500 µg Kg⁻¹ ocratoxinas.

Tratamiento	1° Semana (media+EE)	2° Semana (media +EE)	3° Semana (media +EE)	4° Semana (media +EE)
1	126 ± 4.97 ^a	316 ± 7.56 ^a	567 ± 24.36 ^a	805 ± 17.71 ^a
2	128 ± 4.55 ^a	312 ± 8.82 ^a	574 ± 27.30 ^a	819 ± 10.29 ^a
3	128 ± 4.41 ^a	318 ± 15.75 ^a	574 ± 39.76 ^a	826 ± 21.42 ^a
4	119 ± 7.56 ^a	316 ± 9.03 ^a	511 ± 34.79 ^a	728 ± 17.78 ^a
5	121 ± 6.72 ^a	316 ± 11.55 ^a	546 ± 40.11 ^a	798 ± 44.87 ^a
6	124 ± 6.65 ^a	317 ± 7.77 ^a	567 ± 16.87 ^a	784 ± 6.06 ^a
Probabilidad de F	0.83	0.99	0.60	0.83

Literales diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes (P > 0.05)

EE = Error estándar de la media.

Cuadro 8. Experimento 1. Conversión alimenticia de pollitos alimentados con 500 µg Kg⁻¹ ocratoxinas.

Tratamiento	1° Semana (media+EE)	2° Semana (media+EE)	3° Semana (media+EE)	4° Semana (media+EE)
1	1.14 ± 0.01 ^a	1.35 ± 0.02 ^a	1.48 ± 0.01 ^a	1.54 ± 0.02 ^a
2	1.17 ± 0.02 ^a	1.36 ± 0.03 ^a	1.50 ± 0.01 ^a	1.55 ± 0.02 ^a
3	1.15 ± 0.02 ^a	1.36 ± 0.02 ^a	1.47 ± 0.02 ^a	1.47 ± 0.06 ^a
4	1.17 ± 0.08 ^a	1.37 ± 0.03 ^a	1.57 ± 0.05 ^a	1.66 ± 0.02 ^a
5	1.14 ± 0.03 ^a	1.35 ± 0.04 ^a	1.52 ± 0.03 ^a	1.65 ± 0.01 ^a
6	1.15 ± 0.02 ^a	1.35 ± 0.02 ^a	1.53 ± 0.05 ^a	1.43 ± 0.05 ^a
Probabilidad de F	0.96	0.99	0.27	0.96

Literales diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes (P > 0.05)

EE = Error estándar de la media.

Cuadro 9. Experimento 1. Consumo diario de agua (ml) de pollitos alimentados con 500 µg Kg⁻¹ ocratoxinas.

Tratamiento	1° Semana (media+EE)	2° Semana (media +EE)	3° Semana (media +EE)	4° Semana (media +EE)
1	64 ± 1.03 ^a	116 ± 2.40 ^a	193 ± 3.24 ^a	212 ± 4.37 ^a
2	67 ± 2.14 ^a	120 ± 2.90 ^a	197 ± 6.59 ^a	226 ± 7.47 ^a
3	67 ± 2.35 ^a	126 ± 1.89 ^a	201 ± 4.61 ^a	226 ± 8.51 ^a
4	67 ± 4.34 ^a	117 ± 4.38 ^a	174 ± 17.47 ^a	201 ± 4.55 ^a
5	66 ± 2.48 ^a	117 ± 3.01 ^a	188 ± 6.86 ^a	207 ± 7.22 ^a
6	64 ± 1.78 ^a	117 ± 2.40 ^a	201 ± 11.12 ^a	221 ± 6.28 ^a
Probabilidad de F	0.85	0.24	0.37	0.85

Literales diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes (P > 0.05)

EE = Error estándar de la media.

Cuadro 10. Experimento 1. Pigmentación amarilla (b) de piel de pollitos alimentados con 500 µg Kg⁻¹ ocratoxinas.

Tratamiento	3° Semana (media +EE)	4° Semana (media +EE)
1	6.98 ± 0.54 ^a	13.27 ± 1.17 ^a
2	6.85 ± 0.57 ^a	14.66 ± 0.79 ^a
3	6.66 ± 0.79 ^a	13.86 ± 0.99 ^a
4	6.36 ± 0.54 ^a	13.42 ± 1.03 ^a
5	6.53 ± 0.84 ^a	13.89 ± 0.87 ^a
6	6.79 ± 0.30 ^a	14.12 ± 0.99 ^a
Probabilidad de F	0.98	0.93

Literales diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes (P > 0.05)

EE = Error estándar de la media.

Cuadro 11. Experimento 2. Concentración de OTA en alimento

Tratamiento	OTA calculada ng g ⁻¹	OTA* ng g ⁻¹
1	0	NSD
2	500	447.98
3	500	434.81
4	500	408.43
5	500	739.49
6	500	503.56

* Determinados en las dietas a través de HPLC

NSD = No se detecto.

Cuadro 12. Experimento 2. Peso corporal (gramos) de pollitos alimentados con 507 µg Kg⁻¹ OTA de 7 a 21 días de edad.

Tratamiento	Semana 2 (media+EE)	Porcentaje respecto al testigo negativo	Semana 2* (mediana)	Semana 3 (media +EE)	Porcentaje respecto al testigo negativo	Semana 3* (mediana)
1	378 ± 3.47	100%	376.5a	703 ± 14.97	100%	690a
2	249 ± 10.26	65.87%	247.5b	335 ± 14.25	47.65%	335b
3	262 ± 6.22	69.31%	262b	344 ± 16.52	48.93%	346b
4	246 ± 8.96	65.08%	243.5b	337 ± 12.02	47.94%	336b
5	252 ± 7.93	66.67%	250.5b	328 ± 12.16	46.66%	334b
6	250 ± 7.27	66.14%	251.5b	331 ± 13.16	47.08%	330b
Probabilidad de F			0.0398			< 0.001

Literales diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes (P < 0.05)

EE = Error estándar de la media.

* = Kruskal Wallis

Cuadro 13. Experimento 2. Ganancia de peso semanal (gramos) de pollitos alimentados con 507 $\mu\text{g kg}^{-1}$ OTA de 7 a 21 días.

Tratamiento	Semana 2 (media +EE)	Semana 2* (mediana)	Semana 3 (media +EE)	Semana 3* (mediana)
1	230 \pm 3.28	230.5a	329 \pm 6.72	331.42 ^a
2	100 \pm 8.98	93b	76 \pm 11.37	66.43b
3	113 \pm 6.34	115b	92 \pm 20.98	88.71b
4	99 \pm 5.24	99.5b	91 \pm 7.96	86.86b
5	106 \pm 3.32	105.5b	79 \pm 8.56	73.36b
6	102 \pm 4.02	103.5b	86 \pm 10.25	85.96b
Probabilidad de F		0.03	< 0.001	

Literales diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes (P < 0.05)

EE = Error estándar de la media.

* = Kruskal Wallis

Cuadro 14. Experimento 2. Consumo de alimento semanal (gramos) de pollitos alimentados con 507 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ OTA de 7 a 21 días de edad.

Tratamiento	Semana 2 (media +EE)	Semana 2* (mediana)	Semana 3 (media +EE)	Semana 3* (mediana)
1	315 \pm 1.03	314.5a	522 \pm 1.54	341.42 ^a
2	203 \pm 5.15	201.5b	274 \pm 2.20	266.43b
3	218 \pm 6.98	217b	285 \pm 2.45	288.71b
4	211 \pm 6.02	208.5b	266 \pm 1.19	286.86b
5	205 \pm 6.14	204.5b	262 \pm 0.76	273.36b
6	208 \pm 7.32	209b	273 \pm 0.69	285.96b
Probabilidad de F		0.0373	0.0564	

Literales diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes (P < 0.05)

EE = Error estándar de la media.

* = Kruskal Wallis

Cuadro 15. Experimento 2. Conversión alimenticia de pollitos alimentados con 507 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ OTA de 7 a 21 días de edad.

Tratamiento	Semana 2 (media +EE)	Semana 3 (media +EE)
1	1.37 \pm 0.01	1.59 \pm 0.05
2	2.06 \pm 0.11	3.76 \pm 0.31
3	1.93 \pm 0.06	3.57 \pm 0.72
4	2.15 \pm 0.07	3.00 \pm 0.26
5	1.95 \pm 0.02	3.40 \pm 0.32
6	2.04 \pm 0.07	3.33 \pm 0.45
Probabilidad de F	0.0179	0.0171

Literales diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$)

EE = Error estándar de la media.

Cuadro 16. Experimento 2. Consumo de agua diario (ml) y relación agua-alimento de pollitos alimentados con 507 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ OTA de 7 a 21 días de edad.

Tratamiento	Semana 2 (media +EE) ml	Relación agua-alimento	Semana 3 (media +EE) ml	Relación agua-alimento
1	118 \pm 2.75a	2.62	240 \pm 7.20a	3.22
2	103 \pm 3.58b	3.55	194 \pm 9.35b	4.97
3	101 \pm 2.29b	3.26	187 \pm 8.00b	4.59
4	100 \pm 6.06b	3.34	178 \pm 6.87b	4.67
5	96 \pm 1.47b	3.26	180 \pm 7.27b	4.81
6	101 \pm 3.50b	3.41	196 \pm 8.28b	5.02
Probabilidad de F	0.0099		0.0003	

Literales diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$)

EE = Error estándar de la media.

* = Kruskal Wallis

Cuadro 17. Experimento 2. Pigmentación amarilla (b) de la piel y tarsos de pollitos alimentados con 507 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ OTA de 7 a 21 días de edad.

Tratamiento	Piel (media +EE)	Piel (mediana)	Tarso (media +EE)	Tarso (mediana)
1	6.62 \pm 0.76a	7.11a	28.86 \pm 0.81a	29.35a
2	2.34 \pm 0.59b	1.92b	16.58 \pm 1.46b	17.80b
3	3.89 \pm 0.98b	3.01b	20.49 \pm 2.17b	19.08b
4	2.18 \pm 0.46b	2.16b	16.34 \pm 1.40b	16.25b
5	2.48 \pm 0.55b	2.02b	14.20 \pm 1.19b	14.10b
6	3.27 \pm 0.89b	1.96b	14.70 \pm 0.93b	15.20b
Probabilidad de F		0.0146		0.0003

Literales diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$)

EE = Error estándar de la media.

* = Kruskal Wallis

Cuadro 18. Experimento 2. Bioquímica sanguínea de pollitos alimentados con 507 µg Kg⁻¹ OTA de 7 a 21 días de edad.

Tratamiento	Creatinina µmol l ⁻¹ (media +EE)	Creatinina* µmol l ⁻¹ (mediana)	Proteínas totales g l ⁻¹ (media +EE)	Ácido úrico µmol l ⁻¹ (media +EE)	Ácido úrico* µmol l ⁻¹ (mediana)	GLDH U l ⁻¹ (media +EE)	GLDH* U l ⁻¹ (mediana)	AST U l ⁻¹ (media +EE)	AST* U l ⁻¹ (mediana)
1	6.83 ± 0.01	6.83b	32.25 ± 1.06a	298.38 ± 46.87	269b	3.88±0.69	3.5a	205.25± 7.38	204a
2	12.50 ± 2.13	10.84a	21.00 ± 1.02b	1101.13± 80.51	1095.5a	3.88±0.74	3a	255.00±57.29	200.5a
3	19.68 ± 4.41	18.27a	23.38 ± 0.08b	1241.00±285.07	968a	6.31±1.20	6a	224.75±15.74	213.5a
4	17.92 ± 2.59	16.47a	23.75 ± 1.67b	1419.00±182.75	1455a	6.00±3.16	3a	236.88±16.48	241.4a
5	22.29 ± 2.23	23.50a	24.63 ± 1.12b	2109.63±300.20	2065a	3.41±0.91	3a	238.38± 9.26	234a
6	16.47 ± 1.82	17.67a	24.00 ± 1.07b	1734.25±425.32	1386a	5.25±1.25	4.5a	246.38±11.80	247.5a
Probabilidad De F		0.0002	< 0.0001		< 0.0001		0.4301		0.0880

Literales diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes (P < 0.05)

EE = Error estándar de la media.

* = Kruskal Wallis

Cuadro 19. Experimento 2. Índice de Pesos relativos de órganos de pollitos alimentados con 507 µg Kg⁻¹ OTA de 7 a 21 días de edad.

Tratamiento	Hígado (media +EE)	Riñón (media +EE)	Bolsa de Fabricio (media +EE)	Bazo (media +EE)	Timo (media +EE)	Timo* (mediana)
1	0.0286 ± 0.0007 ^b	0.0103 ± 0.0003 ^b	0.0028 ± 0.0002 ^a	0.0007 ± 0.0001 ^b	0.0008 ± 0.0001	0.0008 ^a
2	0.0320 ± 0.0014 ^{a,b}	0.0183 ± 0.0008 ^{a,b}	0.0024 ± 0.0005 ^a	0.0008 ± 0.0001 ^{a,b}	0.0007 ± 0.0002	0.0008 ^a
3	0.0327 ± 0.0018 ^{a,b}	0.0200 ± 0.0031 ^a	0.0023 ± 0.0003 ^a	0.0011 ± 0.0001 ^a	0.0003 ± 0.0001	0.0004 ^a
4	0.0312 ± 0.0007 ^{a,b}	0.0146 ± 0.0006 ^{a,b}	0.0020 ± 0.0004 ^a	0.0007 ± 0.00004 ^b	0.0011 ± 0.0005	0.0007 ^a
5	0.0343 ± 0.0009 ^a	0.0181 ± 0.0021 ^{a,b}	0.0020 ± 0.0002 ^a	0.0009 ± 0.0001 ^{a,b}	0.0002 ± 0.0001	0.0002 ^a
6	0.0317 ± 0.0010 ^{a,b}	0.0196 ± 0.0018 ^a	0.0020 ± 0.0002 ^a	0.0008 ± 0.0001 ^{a,b}	0.0004 ± 0.0001	0.0004 ^a
Probabilidad de F	0.07	0.009	0.35	0.0257		0.048

Literales diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes (P < 0.05)

EE = Error estándar de la media.

* = Kruskal Wallis

Cuadro 20. Experimento 2. Degeneración hidrónica de hepatocitos en pollitos alimentados con 507 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ OTA de 7 a 21 días de edad.

Tratamiento	Sin lesiones	Leve	Moderada	Total
1	1	2	1	4
2	2	-	2	4
3	2	-	2	4
4	-	4	-	4
5	4	-	-	4
6	1	3	-	4

Cuadro 21. Experimento 2. Proliferación de conductos biliares en pollitos alimentados con 507 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ OTA de 7 a 21 días de edad.

Tratamiento	Sin lesiones	Leve	Moderada	Total
1	4	-	-	4
2	2	-	2	4
3	2	-	2	4
4	1	3	-	4
5	4	-	-	4
6	1	3	-	4

Cuadro 22. Experimento 2. Nefrosis en pollitos alimentados con 507 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ OTA de 7 a 21 días de edad.

Tratamiento	Sin lesiones	Leve	Moderada	Total
1	3	-	1	4
2	2	-	2	4
3	2	2	-	4
4	2	2	-	4
5	2	2	-	4
6	3	1	-	4

Cuadro 23. Experimento 2. Residuos de OTA ng g⁻¹ en órganos de pollitos alimentados con 507 µg Kg⁻¹ OTA de 7 a 21 días de edad.

Tratamiento	Pechuga	Hígado	Riñón
1	NSD	NSD	NSD
2	NSD	6.95	NSD
3	NSD	5.13	NSD
4	NSD	36.58	NSD
5	NSD	15.00	NSD
6	NSD	10.55	NSD

NSD = No se detecto.

Cuadro 24. Experimento 2. Desafío *in vitro* de cuatro secuestrantes de micotoxinas frente a OTA.

Tratamiento	OTA inicial ng g ⁻¹	OTA final ng g ⁻¹	% de desaparición
2	447.98	11.36	97.48
3	434.81	NSD	100
4	408.43	NSD	100
5	739.49	0.86	99.88
6	503.56	0.56	99.89

12. FIGURAS

Figura 1. Estructura general de ocratoxina ⁴⁹.

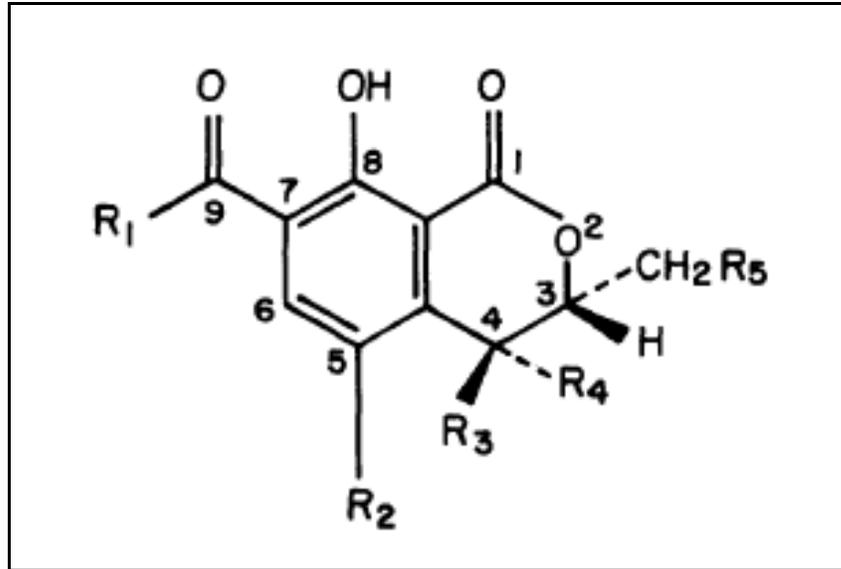


Figura 2. Experimento 1. Cromatogramas (HPLC) de trigo contaminado y alimentos balanceados.

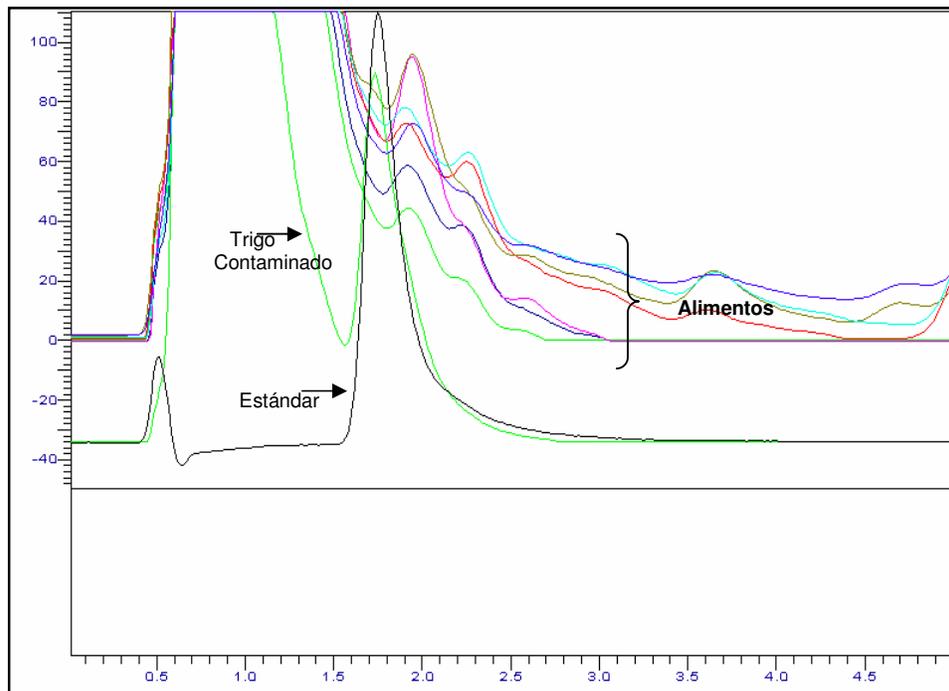


Figura 3. Experimento 2. HI para Newcastle de pollitos alimentados con 507 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ OTA de 7 a 21 días de edad (log $-_2$).

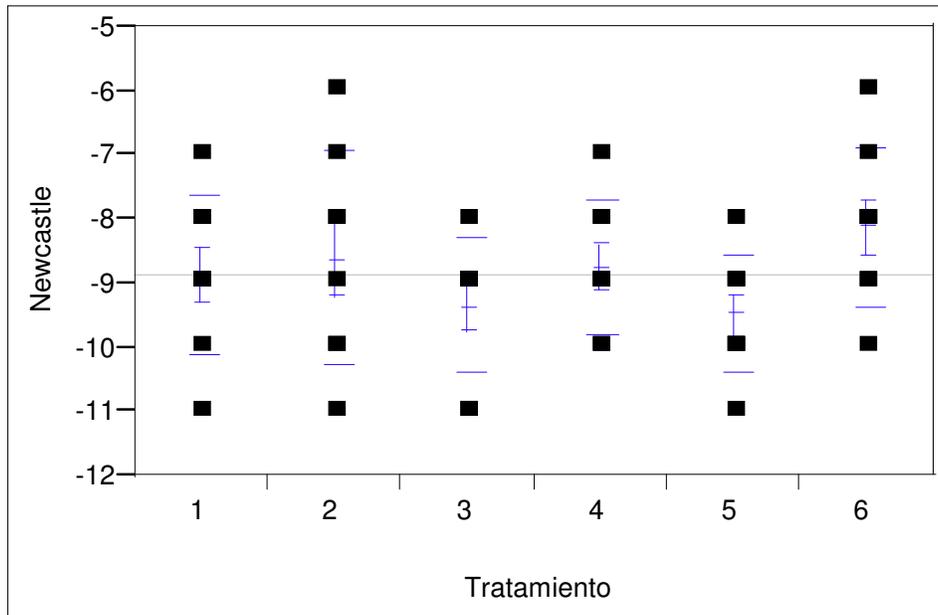


Figura 4. Experimento 2. HI para Influenza Aviar de pollitos alimentados con 507 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ OTA de 7 a 21 días de edad (log $-_2$).

