



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

**PREVENCIÓN DE LOS EFECTOS TÓXICOS DE LA
AFLATOXINA B1 EN POLLOS DE ENGORDA MEDIANTE EL
USO DE POLÍMEROS ADSORBENTES, CURCUMINA Y
PROBIÓTICOS**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

BRUNO SOLÍS CRUZ

TUTOR PRINCIPAL:

**DRA. RAQUEL LÓPEZ ARELLANO
UNAM, FES-CUAUTITLÁN**

COMITÉ TUTORAL:

**DR. GUILLERMO TÉLLEZ ISAÍAS
UNIVERSITY OF ARKANSAS, DEPT. OF POULTRY SCIENCE**

**DR. ERIC BEYSSAC
UNIVERSITÉ D'AUVERGNE, FACULTÉ DE PHARMACIE**

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO

DICIEMBRE 2019



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, por brindarme la oportunidad y la dicha de la vida, por darme salud y los medios para alcanzar mis metas como persona y como profesionalista.

Con mucho amor a mis padres, por su cariño y apoyo incondicional durante todo este proceso, y por estar conmigo en todo momento siendo mis pilares para seguir adelante. Y a mis dos hermanos, que han estado siempre presentes en los buenos y malos momentos de mi vida.

A mis sobrinos, Renata, Elain e Isaac, que llenan de alegría cada día de mi vida.

A toda mi familia, a mis abuelitos, tíos y primos, que forman parte fundamental de mi vida, que confían en mí, y me permiten ser parte de su orgullo.

“Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber.”

- Albert Einstein.

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a la **Universidad Nacional Autónoma de México**, mi *alma máter*, y a la **Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán**, con la cual tengo una deuda infinita por la formación académica, profesional y personal que he recibido en sus aulas. ¡Por Mi Raza Hablará el Espíritu!

Quisiera expresar mi agradecimiento a la **Dra. Raquel López Arellano**, con quien me he formado a lo largo de todo este tiempo, y de quien he aprendido muchas cosas en el ámbito profesional y personal en un marco de confianza, afecto y amistad.

Especial reconocimiento merece el **Dr. Guillermo Téllez (Memo)**, cuyos aportes y participación se volvieron fundamentales para el desarrollo de este proyecto. Gracias por toda tu disponibilidad y paciencia, pero sobre todo gracias por tu invaluable amistad y confianza.

Mes remerciements vont également au **Prof. Eric Beyssac**, pour avoir aidé à mener à bien ce projet, mais surtout pour ton amitié et ta confiance. Les discussions en français et les soirées gastronomiques me manquent beaucoup.

También agradezco a todo mi jurado, a la **Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte**, al **Dr. Maximino Huerta Bravo**, al **Dr. Rubén Merino Guzmán** y al **Dr. Juan Carlos del Río García**; por su disposición para leer mi trabajo de tesis, por sus observaciones, sugerencias y aportaciones.

Al **CONACYT** y al **PAEP**, por el apoyo económico otorgado para la realización de las estancias en USA y Francia.

A todo el equipo del **LEDEFAR**, **Profe Juanjo**, **Adi**, **Claus**, **Marianita**, **Mimis**, **Gaby**, **Cuate**, **Martitha**, **Profe Rodo** y **Sr. Uriel**, por hacer del laboratorio un lugar con buen ambiente para trabajar, por su colaboración y por los buenos momentos compartidos.

A la **Dra. Paty Ramirez** y al **Dr. Roberto Díaz**, por su apoyo y por los buenos consejos que siempre nos han brindado.

A mi compadre y gran amigo **Daniel Hernández Patlán**, gracias por tu amistad, por el apoyo y por la motivación que siempre me diste, al igual que por todos los buenos y malos momentos que compartimos.

A mis amigos **Anita**, **Chris** y **Jony**, con los que tuve y tengo el privilegio de compartir mucha diversión estrepitosa, momentos muy amenos y excelentes consejos.

A mis amigos **Juanito** y **Laurita**, muchas gracias parceritos por habernos hecho sentir siempre como en casa, por todos los consejos, pláticas y por supuesto por el shopping.

CONTENIDO

ABREVIATURAS	1
ÍNDICE DE FIGURAS.....	2
ÍNDICE DE TABLAS	4
RESUMEN.....	6
ABSTRACT	8
1. INTRODUCCIÓN	10
2. MARCO TEÓRICO	12
2.1. Micotoxinas	12
2.2. Aflatoxina B1	14
2.3. Importancia de la avicultura en México	16
2.4. Relevancia histórica de la AFB1 en avicultura	18
2.5. Efectos tóxicos de la AFB1 en aves de corral	20
2.6. Estrategias de control de los efectos tóxicos de la AFB1	22
2.6.1. Adsorbentes	24
2.6.2. Antioxidantes	26
2.6.3. Métodos microbiológicos	28
3. JUSTIFICACIÓN	30
4. OBJETIVOS	32
4.1. Objetivo General	32
4.2. Objetivos Particulares.....	32
5. HIPÓTESIS	33
6. MATERIALES Y MÉTODOS	34
6.1. Selección de los polímeros adsorbentes	34
6.1.1. Estándares de micotoxinas y polímeros adsorbentes	34
6.1.2. Soluciones de micotoxinas.....	34
6.1.3. Preparación del alimento contaminado con las micotoxinas	35
6.1.4. Modelo de digestibilidad <i>in vitro</i>	35
6.1.5. Cálculo del porcentaje de micotoxina adsorbido	36
6.1.6. Análisis y cuantificación de micotoxinas	36
6.2. Caracterización de los polímeros adsorbentes.....	37

6.3.	Mejora de la solubilidad de la curcumina (CUR).....	38
6.3.1.	Preparación de la dispersión sólida.....	38
6.3.2.	Determinación de la solubilidad	38
6.3.3.	Análisis térmico de la dispersión de CUR	39
6.3.4.	Estudios de toxicidad y permeabilidad aparente.....	39
6.4.	Estudio de biodisponibilidad de la CUR	42
6.5.	Preparación de la formulación con los polímeros y la dispersión sólida de CUR	42
6.5.1.	Caracterización de las formulaciones	43
6.6.	Evaluación <i>in vivo</i> de las formulaciones	45
6.6.1.	Animales, dietas y diseño experimental	45
6.6.2.	Parámetros de productivos.....	46
6.6.3.	Peso relativo de los órganos.....	46
6.6.4.	Evaluación de lesiones histológicas en tejido hepático	46
6.6.5.	Análisis bioquímico en suero.....	47
6.6.6.	Niveles intestinales de IgA	48
6.6.7.	Evaluación de la inmunidad humoral: producción de anticuerpos contra el virus de la enfermedad de Newcastle	49
6.6.8.	Evaluación de la inmunidad celular: respuesta cutánea a fitohemaglutinina (PHA)	49
6.6.9.	Pigmentación de la piel.....	50
6.7.	Evaluación <i>in vivo</i> de un DFM contra los efectos tóxicos de la AFB1	50
6.7.1.	Selección del DFM candidato.....	50
6.7.2.	Animales, dietas y diseño experimental	51
6.7.3.	Evaluación de los parámetros productivos, inmunológicos y bioquímicos séricos	51
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
8.	CONCLUSIONES.....	102
9.	PUBLICACIONES.....	104
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109

ABREVIATURAS

AF	Aflatoxinas
AFB1	Aflatoxina B1
AFB2	Aflatoxina B2
AFG1	Aflatoxina G1
AFG2	Aflatoxina G2
AFM1	Aflatoxina M1
AFBO	Epóxido de AFB1
AFL	Aflatoxicol
CHI	Quitosano
CMC	Carboximetilcelulosa sódica
CUR	Curcumina
CUR/PVP	Dispersión sólida de curcumina usando PVP K30 como acarreador
CYP450	Citocromo P450
DFM	Aditivo microbiano para alimentación directa
DON	Deoxinivalenol (Vomitoxina)
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
EDS	Espectrometría de dispersión de energía de rayos X
FTIR-ATR	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier con reflexión total atenuada
FUB1	Fumonisina B1
GRAS	Generalmente Considerado como Seguro
HSCAS	Aluminosilicatos de calcio y sodio hidratados
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulosa
IARC	Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer
LD50	Dosis letal 50
MCC	Celulosa microcristalina
ND	Enfermedad de Newcastle
NRC	Consejo Nacional de Investigación
OMS	Organización Mundial de la Salud
OTA	Ocratoxina A
PHA	Fitohemaglutinina
PVP	Polivinilpirrolidona
PPARα	Receptor alfa activado por proliferador de peroxisoma hepático
T-2	Toxina T-2
UNA	Unión Nacional de Avicultores
ZEA	Zearalenona

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Factores involucrados en la aparición de micotoxinas en los cultivos durante las etapas de cosecha, manejo y almacenamiento, y su entrada en la cadena alimenticia animal y humana.....	13
Figura 2. Estructuras químicas de las aflatoxinas más abundantes.....	14
Figura 3. Participación porcentual de la avicultura en la producción pecuaria en México durante el año 2018.....	17
Figura 4. Producción y consumo aparente de carne de pollo y huevo en México.....	17
Figura 5. Porcentaje de adsorción de múltiples micotoxinas por los adsorbentes evaluados	56
Figura 6. Espectros comparativos FTIR de la celulosa microcristalina (MCC), la carboximetilcelulosa (CMC) y la mezcla de estos dos polímeros celulósicos en proporción 9:1, respectivamente.....	57
Figura 7. Micrografías de la celulosa microcristalina (MCC), la carboximetilcelulosa (CMC) y la mezcla de estos dos polímeros celulósicos en proporción 9:1, respectivamente, y espectro EDS de los polímeros celulósicos.	58
Figura 8. Análisis por DSC de la celulosa microcristalina (MCC), la carboximetilcelulosa (CMC) y la mezcla de estos dos polímeros.	59
Figura 9. Micrografías de la curcumina, la polivinilpirrolidona y la dispersión sólida en una proporción 1:9.....	61
Figura 10. Análisis por DSC de la polivinilpirrolidona (PVP), la curcumina (CUR) y de la dispersión sólida en proporción 9:1 (CUR/PVP).....	62
Figura 11. Citotoxicidad de la curcumina (CUR) y de las dispersiones sólidas con polivinilpirrolidona (PVP) en diferentes proporciones en monocapas de células Caco-2 después de 2 h de exposición.....	63
Figura 12. Efecto de la curcumina (CUR) y de las dispersiones sólidas (CUR/PVP) en diferentes proporciones sobre la TEER en función del tiempo	64
Figura 13. Perfil plasmático de la curcumina (CUR) sin formular y en dispersión sólida (CUR/PVP) después de la administración oral de una dosis única de 15 mg/kg en pollos de engorda machos de la estirpe Ross 308 de 42 días de edad.....	65
Figura 14. Fotografías y micrografías de la formulación con los polímeros celulósicos, y la formulación con los polímeros y la dispersión sólida de curcuimina.....	66
Figura 15. Influencia de los polímeros celulósicos en los espectros de fluorescencia de la AFB1 en función del pH del medio 1.6, 5.2 y 6.6.....	67
Figura 16. Segunda derivada de los espectros FTIR de la formulación con polímeros celulósicos, la AFB1 y la mezcla de ambos para analizar las posibles interacciones químicas entre ellos.	70

Figura 17. Perfiles de liberación y disolución de la curcumina a partir de la formulación con los polímeros celulósicos en medios con diferentes valores de pH 1.6, 5.2 y 6.6.....	71
Figura 18. Histopatología del hígado que muestra los diferentes valores de la puntuación de las lesiones utilizada para evaluar la degeneración hepatocelular	76
Figura 19. Capas de células inflamatorias (heterófilos) alrededor de los espacios perivasculares hepáticos en una sección de hígado de un ave del grupo AFB1, después de 21 días de recibir una dieta con 2 ppm de AFB1	76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efectos tóxicos y signos clínicos que presentan las aves de corral tras el consumo de AFB1	22
Tabla 2. Ejemplos de métodos físicos y químicos usados como estrategia de control de la AFB1	23
Tabla 3. Condiciones de operación de la prueba de disolución en el Aparato USP IV	44
Tabla 4. Evaluación de la capacidad adsorbente para micotoxinas en un modelo gastrointestinal <i>in vitro</i>	55
Tabla 5. Solubilidad de la curcumina (CUR) y de las dispersiones sólidas (CUR/PVP) en diferentes proporciones en función del pH a temperatura ambiente	60
Tabla 6. Evaluación de la permeabilidad aparente y relación de mejora de absorción de la curcumina (CUR) y de las dispersiones sólidas (CUR/PVP) en diferentes proporciones a través de monocapas de células Caco-2 después de 2 h de incubación	63
Tabla 7. Parámetros farmacocinéticos después de la administración oral de la curcumina CUR sin formular y en dispersión sólida (CUR/PVP) calculados por un método no compartimental	65
Tabla 8. Efecto del pH sobre la capacidad para adsorber AFB1 de la celulosa microcristalina (MCC), la carboximetilcelulosa (CMC), y de la formulación desarrollada con estos dos polímeros celulósicos.....	68
Tabla 9. Área Bajo la Curva, Eficiencia de Disolución y Tiempo Medio de Disolución de los perfiles de disolución de la formulación con la dispersión sólida de curcumina	72
Tabla 10. Evaluación del peso corporal (BW), ganancia de peso corporal (BWG), consumo de alimento (FI) y conversión alimenticia (FCR) en pollos de engorda que consumieron una dieta a base de maíz y soya contaminada con AFB1 (2 ppm) suplementada con tres tratamientos.....	73
Tabla 11. Peso relativo del hígado, bazo, bolsa de Fabricio e intestino de pollos de engorda que consumieron alimento contaminado con AFB1 (2 ppm) durante 21 días suplementados con los tratamientos	75
Tabla 12. Degeneración hepatocelular e infiltración de células inflamatorias en hígado de pollos de engorda que consumieron alimento contaminado con AFB1 (2 ppm) durante 21 días suplementados con los tratamientos	75
Tabla 13. Efecto de los tres tratamientos sobre los niveles séricos de superóxido dismutasa (SOD), mucina, citrulina y proteína C reactiva (CRP), los títulos de anticuerpos contra la enfermedad de Newcastle (ND) y los niveles de IgA intestinal en pollos de engorda que consumieron una dieta a base de maíz y soya contaminada con AFB1 (2 ppm) durante 21 días.....	78

Tabla 14. Respuesta a la hipersensibilidad cutánea por basófilos (CBH) a las 12 y 24 h después de la inyección de PHA-M en pollos de engorda que consumieron una dieta a base de maíz y soya contaminada con AFB1 (2 ppm) suplementada con los tratamientos	80
Tabla 15. Efecto de los tratamientos sobre los parámetros bioquímicos séricos en pollos de engorda que consumieron una dieta a base de maíz y soya contaminada con AFB1 (2 ppm) durante 21 días.....	82
Tabla 16. Efecto de los tratamientos sobre el color de la piel del muslo y la almohadilla plantar de los pollos de engorda que consumieron una dieta a base de maíz y soya contaminada con AFB1 (2 ppm).....	87
Tabla 17. Evaluación del peso corporal (BW), ganancia de peso corporal (BWG), consumo de alimento (FI) y conversión alimenticia (FCR) en pollos de engorda que consumieron una dieta a base de maíz y soya contaminada con AFB1 (2 ppm) suplementada con o sin DFM.....	90
Tabla 18. Peso relativo del hígado, bazo, bolsa de Fabricio e intestino de pollos de engorda que consumieron alimento contaminado con AFB1 (2 ppm) durante 21 días suplementados c suplementada con o sin DFM.....	91
Tabla 19. Degeneración hepatocelular e infiltración de células inflamatorias en hígado de pollos de engorda que consumieron alimento contaminado con AFB1 (2 ppm) durante 21 días suplementados con o sin DFM.	92
Tabla 20. Efecto del DFM sobre los niveles séricos de superóxido dismutasa (SOD), mucina, citrulina y proteína C reactiva (CRP), los títulos de anticuerpos contra la enfermedad de Newcastle (ND) y los niveles de IgA intestinal en pollos de engorda que consumieron una dieta a base de maíz y soya contaminada con AFB1 (2 ppm) durante 21 días.....	94
Tabla 21. Efecto del DFM en la respuesta a la hipersensibilidad cutánea por basófilos (CBH) inducida por la PHA-M en pollos de engorda que consumieron una dieta a base de maíz y soya contaminada con AFB1 (2 ppm)	96
Tabla 22. Efecto del DFM sobre los parámetros bioquímicos séricos en pollos de engorda que consumieron una dieta a base de maíz y soya contaminada con AFB1 (2 ppm) durante 21 días.....	97

RESUMEN

Las micotoxinas son metabolitos tóxicos secundarios producidos por algunas cepas de hongos, que son extremadamente difíciles de eliminar o erradicar cuando han ingresado en la cadena alimenticia, lo que constituye una grave amenaza para la salud humana y animal. En términos de toxicidad y ocurrencia, la aflatoxina B1 (AFB1) es la micotoxina más importante, y las aves de corral son de las especies más sensibles a sus efectos tóxicos. Las investigaciones han demostrado los efectos negativos de la AFB1 en los parámetros productivos de las aves de corral y que la contaminación de los forrajes con la AFB1 sigue siendo un problema para la industria avícola, lo que genera pérdidas económicas anuales importantes para los productores.

Por este motivo, se han realizado muchas investigaciones para reducir el problema de aflatoxicosis en aves de corral, incluyendo estrategias de prevención y descontaminación. Hasta la fecha, se han utilizado muchos métodos físicos, químicos y biológicos para controlar el problema de la contaminación con AFB1, la adición de adsorbentes no nutricionales al alimento es el método más comúnmente utilizado para prevenir la aflatoxicosis en aves de corral. Estos adsorbentes son compuestos de gran peso molecular que pueden unirse a la micotoxina, forman un complejo estable adsorbente-micotoxina que puede pasar a través del tracto gastrointestinal sin ser absorbido. Hoy en día, nuevos polímeros sintéticos y biopolímeros han surgido de la investigación como una alternativa a los adsorbentes inorgánicos para la desintoxicación de AFB1. Sin embargo, ninguno es capaz de adsorber completamente esta micotoxina, por lo que el uso de estos materiales se ha combinado con otros aditivos alimenticios como los antioxidantes dietéticos, para apoyar al sistema de defensa antioxidante y mejorar la productividad de las aves de corral. Ciertos fitofármacos como la curcumina (CUR) se han evaluado y han mostrado resultados prometedores para reducir los efectos tóxicos de esta micotoxina. No obstante, a pesar de los efectos positivos que ha demostrado la CUR, sus efectos benéficos siguen limitados por su baja solubilidad y su escasa biodisponibilidad, lo que ha alentado a los investigadores a utilizar diversas estrategias para aumentar su solubilidad y biodisponibilidad. Por otra parte, el control

biológico de la aflatoxicosis en aves de corral mediante el uso de probióticos ha ganado importancia como una estrategia para manejar este problema, ya que ha mostrado buenos resultados.

La primera parte de esta investigación doctoral consistió en evaluar y comparar la capacidad de adsorción de algunos polímeros como el quitosano y tres polímeros celulósicos sobre seis de las micotoxinas más importantes para la industria avícola, utilizando un modelo de digestibilidad *in vitro* que simula los tres compartimentos gastrointestinales de las aves de corral. Posteriormente se realizó la caracterización fisicoquímica de estos materiales y se probaron diferentes estrategias para incrementar la solubilidad de la CUR. Se seleccionó la preparación de una dispersión sólida que usa a la polivinilpirrolidona K30 (PVP) como acarreador, la cual demostró mejorar las propiedades biofarmacéuticas de solubilidad y permeabilidad de la CUR. Posteriormente se desarrollaron dos formulaciones con estos polímeros y con la dispersión sólida de CUR utilizando una granulación vía húmeda en un mezclador granulador de alto corte. Estas formulaciones también fueron caracterizadas y posteriormente se evaluó su efectividad *in vivo* para reducir los efectos negativos de la AFB1 sobre los parámetros productivos, bioquímicos séricos, de inmunidad celular y humoral, así como el daño en el hígado de pollos de engorda. La última parte de este proyecto consistió en evaluar el uso de un aditivo microbiano para alimentación directa (DFM) compuesto de tres cepas de *Bacillus spp.* como un candidato potencial para reducir los efectos perjudiciales de la AFB1 en pollos de engorda.

Palabras claves: aflatoxinas, probióticos, polímeros, adsorción, pollos de engorda

ABSTRACT

Mycotoxins are secondary toxic metabolites produced by some mold strains, which are extremely difficult to remove or eradicate when they have entered the food chain, becoming a serious threat to human and animal health. In terms of toxicity and occurrence, aflatoxin B1 (AFB1) is the most important mycotoxin, poultry species are extremely sensitive to its toxic effects. Research has shown the negative effects of AFB1 on poultry performance and that feed contamination with AFB1 is still a problem in the poultry industry, resulting in substantial annual economic losses to producers.

For this reason, a lot of research has been done to reduce the aflatoxicosis problem in poultry, including strategies of prevention and feed decontamination. To date, many physical, chemical and biological methods have been used to detoxify AFB1, the addition of non-nutritional adsorbents to feed is the most commonly used method to prevent aflatoxicosis in poultry. These adsorbents are large molecular weight compounds that bind the mycotoxin, forming a stable adsorbent-mycotoxin complex that can pass through the gastrointestinal tract avoiding its intestinal absorption. Nowadays, new synthetic polymers and biopolymers have emerged from research as alternative to inorganic adsorbents for the detoxification of AFB1. However, no adsorbent is capable of completely adsorb this mycotoxin, so the use of adsorbent materials has been combined with other feed additives such as dietary antioxidants, which could help support the antioxidant defense system and improve performance of poultry. Certain phytopharmaceuticals such as curcumin (CUR) have shown promising results to reduce the toxic effects of this mycotoxin. Nevertheless, despite the positive effects of CUR, its beneficial effects remain limited due to its low solubility and bioavailability, which has encouraged researchers to use various strategies to increase both characteristics. On the other hand, biological control of aflatoxicosis in poultry by using probiotics has gained importance as an attractive strategy to manage this problem because of its good results.

The first part of this doctoral research was the evaluation and comparison of the adsorption capacity from polymers such as chitosan and three cellulosic polymers on six of the most important mycotoxins for the poultry industry, using an *in vitro* digestibility model that simulates the three compartments of the gastrointestinal tract of poultry. Subsequently, the physicochemical characterization of these materials was performed, and different strategies were tested to increase the solubility of CUR. As a strategy to improve the solubility of CUR, the preparation of a solid dispersion was selected using the polyvinylpyrrolidone K30 (PVP) as carrier, which proved to improve the biopharmaceutical properties, solubility and permeability of CUR. Once the polymers with the highest adsorption capacity were selected, and having improved the bioavailability of CUR, two formulations were developed with these polymers and the solid dispersion of CUR using a wet granulation in a high-shear granulator mixer. These formulations were also characterized and evaluated for their effectiveness to reduce the negative effects of AFB1 *in vivo* on the productive, biochemical, cellular and humoral immunity parameters, as well as on the microscopic liver damage in broilers. The last part of this project was the evaluation of the use of a direct fed microbial (DFM) composed of three strains of *Bacillus spp.* as a potential candidate to reduce the harmful effects of AFB1 on broilers.

Keywords: aflatoxins, probiotics, polymers, adsorption, broiler chickens

1. INTRODUCCIÓN

Las micotoxinas son compuestos de bajo peso molecular producidos como metabolitos secundarios de hongos filamentosos que contaminan los cultivos en el campo o en los almacenes cuando las condiciones ambientales de temperatura y humedad son adecuadas. Estos metabolitos no tienen relevancia bioquímica para el crecimiento o desarrollo de los hongos, y constituyen un grupo química y toxicológicamente heterogéneo que se agrupan solo porque pueden causar enfermedades, e incluso la muerte, a seres humanos y otros animales, incluso en bajas concentraciones [1].

Actualmente se conocen más de 400 micotoxinas, pero solo seis se consideran de importancia mundial, las aflatoxinas son las micotoxinas más toxigénicas e investigadas en todo el mundo debido a que su aparición natural puede causar graves pérdidas económicas y problemas de salud [2,3]. En términos de toxicidad y ocurrencia, la aflatoxina B1 (AFB1) es la micotoxina más importante debido a sus efectos hepatotóxicos y hepatocarcinogénicos, que pueden resultar en inmunosupresión, anorexia con reducción de la tasa de crecimiento, disminución de la producción de huevos y de la reproductividad, baja alimentación, anemia, hemorragia y aumento de la mortalidad [4,5]. Además, la intoxicación con AFB1 se ha relacionado con otros efectos graves como la teratogénesis, la carcinogénesis y la mutagénesis [6].

Debido a los efectos tan severos y dañinos de la AFB1, se han propuesto muchos métodos para reducir sus efectos tóxicos. Prevenir la contaminación de granos y forrajes con esta micotoxina es el primer y mejor intento; sin embargo, dado que la prevención no siempre es posible, los métodos de descontaminación o desintoxicación han ganado atención como una alternativa para reducir los efectos tóxicos de la contaminación de forrajes y granos con AFB1. Entre estos, el uso de adsorbentes inorgánicos es el método más ampliamente estudiado y utilizado como alternativa para disminuir los efectos tóxicos de AFB1 en animales, debido a su practicidad económica y su idoneidad desde la perspectiva nutricional [7].

Alternativamente, han sido probados tanto polímeros orgánicos a base de carbono como polímeros sintéticos, y algunos de ellos están actualmente en el mercado [8,9]; sin embargo, resulta muy difícil encontrar un adsorbente capaz de mitigar completamente los efectos tóxicos de la AFB1, por lo que el uso de nuevos adsorbentes combinados con otros agentes adicionados a la dieta se usan para contrarrestar más efectivamente los efectos de la aflatoxicosis. La AFB1 es una micotoxina cuya toxicidad está altamente relacionada con su capacidad de causar daño a la membrana celular a través del aumento de la lipoperoxidación, por lo que han sido ampliamente investigados ciertos compuestos fitogénicos que poseen propiedades antioxidantes e inhiben la biotransformación de esta micotoxina [10–12]. El uso combinado de adsorbentes y antioxidantes es la estrategia con enfoque dietético más recientemente utilizada para prevenir la aflatoxicosis en las aves de corral [13].

Los métodos biológicos para prevenir la aflatoxicosis también han sido evaluados y muestran resultados prometedores [14–16]. Muchos microorganismos, incluidas bacterias, levaduras, mohos, actinomicetos y algas, han sido probados para determinar su capacidad para controlar la contaminación por aflatoxinas, principalmente a través de la adsorción y degradación [17,18]. Entre las bacterias analizadas, los probióticos se han identificado como una buena opción para reducir la disponibilidad de aflatoxinas *in vitro*. Además, las bacterias probióticas han mostrado numerosos efectos beneficiosos para la salud, lo cual las vuelve aditivos aún más adecuados para alimentos y forrajes [19–21].

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Micotoxinas

Las micotoxinas son metabolitos secundarios toxigénicos producidos por ciertos hongos filamentosos. Son moléculas estructuralmente diversas, bastante estables, no son inmunogénicas y en su mayoría de bajo peso molecular. Constituyen un grupo química y toxígenamente heterogéneo cuyos miembros tienen efectos adversos sobre humanos, animales (especialmente monogástricos) y cultivos, que resultan en enfermedades y grandes pérdidas económicas [22,23].

Las micotoxinas se encuentran presentes mundialmente y afectan un amplio rango de productos agrícolas, incluidos cereales, frutos secos, nueces, granos de café y semillas oleaginosas. Se estima que el 25% de los cultivos alimentarios mundiales, incluidos muchos alimentos básicos, se ven afectados por hongos productores de micotoxinas. Según las estimaciones de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), las pérdidas mundiales de productos alimenticios debidas a las micotoxinas son del orden de 1000 millones de toneladas al año [24]. Estos metabolitos fúngicos son los contaminantes naturales de alimentos de mayor importancia mundial, ya que la exposición a estos metabolitos fúngicos puede causar toxicidad tanto aguda como crónica, con resultados que van desde daño en el sistema nervioso central, cardiovascular, respiratorio y digestivo, hasta la muerte [25].

Las plantas son susceptibles de contaminarse por micotoxinas debido al crecimiento de hongos patógenos sobre las plantas directo en los cultivos, antes o durante la cosecha, en su transportación, o bien, durante su almacenamiento, cuando las condiciones de humedad y temperatura son apropiadas [26]. El crecimiento y la actividad fisiológica de estos hongos están condicionados por parámetros ecológicos y ambientales que modifican su velocidad de propagación e infección, el desarrollo de la enfermedad y la producción de las micotoxinas.

Cuando un ser humano o un animal ingiere plantas, o algún producto elaborado a partir de ellas (por ejemplo, un forraje), contaminado con micotoxinas, puede desarrollar la enfermedad denominada micotoxicosis primaria. Por otra parte, si los animales consumen forrajes contaminados con estas toxinas, pueden bioacumularse en sus tejidos o ser excretadas a través de la leche, huevos o derivados cárnicos, e ingresar así a la cadena alimenticia del ser humano y ocasionar micotoxicosis secundarias, como se muestra en la Figura 1.

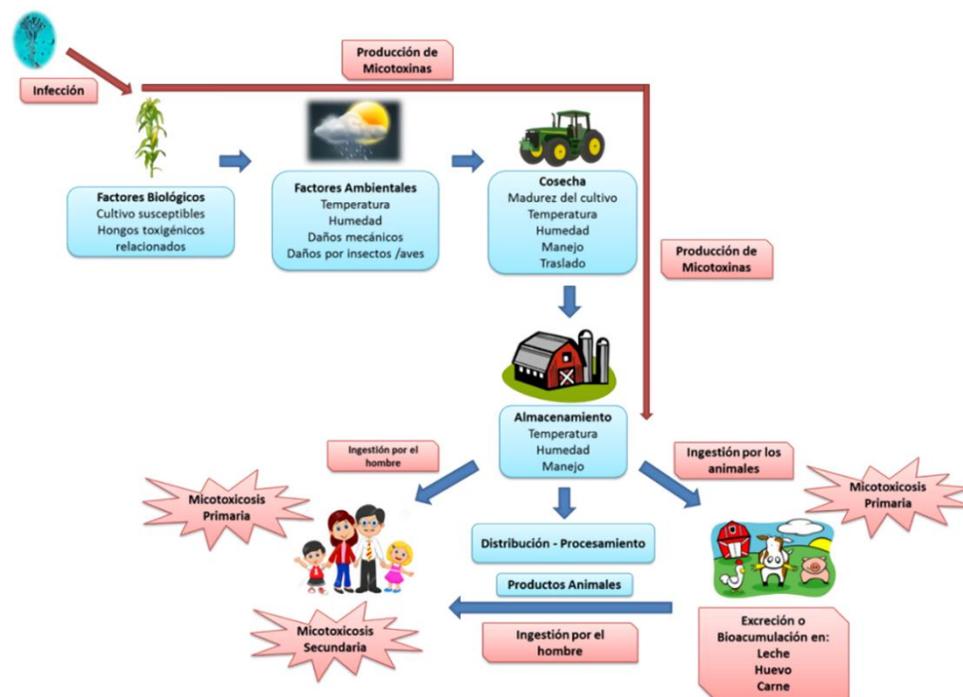


Figura 1. Factores involucrados en la aparición de micotoxinas en los cultivos durante las etapas de cosecha, manejo y almacenamiento, y su entrada en la cadena alimenticia animal y humana (adaptado de [27]).

No todos los hongos son toxigénicos y no todos los metabolitos secundarios de los hongos son tóxicos; sin embargo, se sabe que cada planta o cultivo puede ser afectado por más de un hongo toxígeno y que cada hongo puede producir una o más micotoxinas. Por lo tanto, es altamente probable que en un alimento contaminado se encuentren presentes varias micotoxinas a la vez, lo que incrementa la posibilidad de su interacción y de que ocurra un efecto sinérgico o aditivo [28,29].

2.2. Aflatoxina B1

De las más de 400 micotoxinas las aflatoxinas (AF) son las más toxigénicas e investigadas en todo el mundo porque su ocurrencia natural puede causar serias pérdidas económicas y problemas de salud [2,3].

Las AF son un grupo de micotoxinas producidas principalmente por las especies de hongos *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, que están presentes como contaminantes de alimentos y forrajes. Químicamente, las AF son derivados de la difuranocumarina producidos a partir del metabolismo de policétidos. En la naturaleza, se producen al menos 14 tipos de AF, de éstas la aflatoxina B1 (AFB1), B2 (AFB2), G1 (AFG1) y G2 (AFG2) son las más abundantes, las cuales se nombran de acuerdo con su fluorescencia bajo la luz UV (azul o verde) y movilidad cromatográfica relativa durante la cromatografía en capa fina. Como se muestra en la Figura 2, la AFB1 y la AFB2 se caracterizan por un anillo de ciclopentanona, mientras que la AFG1 y la AFG2 tienen un anillo de lactona de 6 miembros en lugar de la ciclopentanona [30].

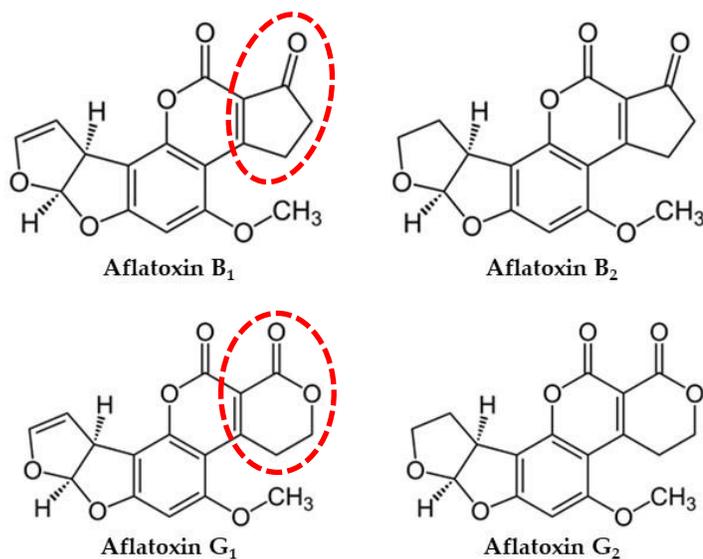


Figura 2. Estructuras químicas de las aflatoxinas más abundantes.

De las cuatro AF más abundantes, la AFB1 suele ser la que se produce mayoritariamente por las cepas toxigénicas, y es la más importante en términos de potencia y toxicidad debido a sus efecto hepatotóxico y hepatocarcinógeno, además de que la intoxicación con esta micotoxina se ha relacionado con otros efectos graves como teratogénesis, carcinogénesis y mutagénesis [6,31]. La AFB1 ha mostrado valores LD50 que van desde 0.3 mg/kg en patitos hasta 18.0 mg/kg en ratas hembra adultas, es uno de los agentes hepatotóxicos y hepatocarcinógenos más potentes identificados. Esta micotoxina ha sido clasificada por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) dentro del grupo 1 de carcinógenos para humanos [31,32].

En la producción ganadera, la AFB1 afecta la salud, el bienestar y la productividad de los animales, debido a que su ingesta puede resultar en inmunosupresión, anorexia, anemia, tasa de crecimiento reducida, baja utilización de nutrientes, disminución de la productividad, problemas de reproducción, y aumento de la mortalidad [4,5]; sin embargo, también puede ocasionar la intoxicación indirecta de los humanos al consumir los tejidos y productos animales contaminados, como se ha demostrado para AFB1 y su metabolito, la aflatoxina M1 (AFM1) [33,34].

Aunque el hígado es el principal órgano diana de la AFB1, puede causar muchas otras afecciones patológicas asociadas directa o indirectamente con su toxicidad aguda y crónica. Sin embargo, existen diferencias sustanciales en la susceptibilidad de las diferentes especies, y dentro de cada especie, la magnitud de la respuesta está influenciada por la edad, el sexo, el peso, la dieta, el estado nutricional, la exposición a agentes infecciosos y la presencia de otras micotoxinas y sustancias farmacológicamente activas; así como por la dosis y el tiempo de exposición del organismo a la toxina [35,36].

La toxicidad y carcinogenicidad de la AFB1 se produce después de su bioactivación por el sistema oxidasa de función mixta del citocromo P450 (CYP450), lo que da como resultado un epóxido de AFB1 (AFBO) altamente reactivo, el cual forma aductos covalentes con macromoléculas celulares como el ADN, el ARN, componentes de proteínas y algunas enzimas para alterar el gen p-53 e inhibir las actividades enzimáticas, lo que resulta en daño

y necrosis de los hepatocitos, así como otras células metabólicamente activas de órganos como riñones, pulmones, cerebro, testículos, corazón, huesos y músculos [37,38].

La diferencia en el metabolismo hepático de la AFB1 podría ser responsable de la sensibilidad de las especies de aves de corral a esta micotoxina, ya que su activación metabólica a AFBO por el CYP450 es especialmente eficiente en estas especies [39]. Otra posible razón de la gran susceptibilidad de las especies de aves de corral a la AFB1 es la variación en las enzimas de biotransformación de fase II, como la glutatión S-transferasa (GST) que cataliza una reacción de conjugación del AFBO con glutatión endógeno (GSH). Aunque las especies de aves son altamente eficientes en la transformación metabólica del AFBO, no son capaces de conjugarlo eficazmente con GSH, lo que indica que tienen baja actividad de la GST [40,41]. Por lo tanto, la extrema sensibilidad de las especies de aves de corral a los efectos tóxicos de la AFB1 puede deberse a una combinación de su bioactivación eficiente al AFBO por el CYP450 y su deficiente conjugación con GSH en el hígado.

2.3. Importancia de la avicultura en México

El sector avícola de México tiene un papel estratégico en la nutrición de la población, ya que los productos avícolas como huevo y pollo están presentes en la mayoría de los hogares porque son nutritivos, versátiles y tienen precios relativamente bajos. Tan solo en el año 2018, la participación porcentual de la avicultura mexicana en el Producto Interno Bruto (PIB) total fue del 0.737%. Dentro de las áreas que integran la producción pecuaria, la avicultura se posiciona en el primer lugar con poco más del 63% a nivel nacional, siendo estos productos los que participan con casi dos tercios de la producción pecuaria nacional con el 28 y 35%, respectivamente [42]. Esto demuestra que la industria avícola es la actividad pecuaria más dinámica y uno de los sectores estratégicos para la alimentación en el país, al grado de que la carne de pollo ha desplazado a la carne de cerdo y bovino, como se puede observar en la Figura 3.

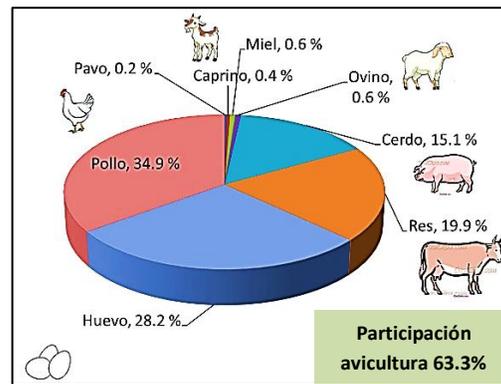


Figura 3. Participación porcentual de la avicultura en la producción pecuaria en México durante el año 2018 [42].

A pesar de que México tiene una economía en constante fluctuación, permanente inflación, altos costos de producción, y falta de política gubernamental a largo plazo para proteger a los avicultores, durante los últimos años la industria avícola ha sido capaz, no sólo de sobrevivir, sino de crecer de manera significativa (Figura 4). Datos de la Unión Nacional de Avicultores (UNA) indican que la producción de pollo en México ha crecido durante el periodo de 2008 a 2018, aumentando con una tasa de crecimiento media anual (TCMA) de casi 2 por ciento [42]. En el 2018 se produjeron casi 3.471 millones de toneladas de carne de pollo, el cárnico con mayor producción en el país, mientras que la producción de huevo fue de 2.8 millones de toneladas y la de pavo 10,741 toneladas, lo que posiciona a la avicultura como la principal industria transformadora de proteína vegetal en proteína animal.



Figura 4. Producción y consumo aparente de carne de pollo y huevo en México [42].

La evolución económica de este sector se debe a los esfuerzos en la aplicación de tecnologías que han brindado a los productores aportaciones en la genética, alimentación, manejo y la sanidad de las explotaciones avícolas. Además, se realizan alianzas comerciales, así como inversiones intensivas de capital que permiten a las compañías diversificar sus productos y desarrollar nuevas estrategias comerciales y de mercadotecnia, para asegurar su permanencia en el mercado nacional. Según los registros de la UNA, la industria avícola nacional mantendrá un crecimiento constante y se consolidará como una actividad estratégica para el país, tanto en el ámbito alimentario como en el económico [42].

El costo más alto en la producción de aves de corral es la alimentación, para la cual se destina hasta un 70% de los recursos, por esto, su composición nutricional y condición sanitaria son prioritarios, y resultan importante atender el tema de la contaminación con micotoxinas. Las micotoxinas producen pérdidas anuales de millones de dólares en el sector avícola mundial, las AF son las de mayor impacto y las que directamente influyen en la pérdida del alimento contaminado, pérdidas por mortalidad de las aves que consumen alimento contaminado, supresión del sistema inmune o disminución de los parámetros productivos, e indirectamente en el costo de los programas diseñados para reducir riesgos a la salud animal y humana [43].

2.4. Relevancia histórica de la AFB1 en avicultura

Las aves y las micotoxinas han estado estrechamente ligadas; de hecho, la primera evidencia sólida de los problemas causados por las micotoxinas en animales se observó en aves. En el invierno de 1959, el buque de carga británico Rosetti transportó un cargamento de harina de maní de Brasil a Inglaterra, la cual se utilizó como suplemento proteico en las dietas de aves de corral y otros animales domésticos. Como consecuencia de su ingesta, miles de pavos murieron durante el verano de 1960. En 1961 el Dr. W.P. Blount publicó el primer informe sobre la "Enfermedad 'X' de los Pavos", en donde escribió: "*Mi primer contacto serio con la enfermedad fue el 7 de julio, cuando visité una granja en Berkshire, donde casi 800 de 1,000 aves, de edades entre dos y ocho semanas, habían muerto en 10 a 14 días. Sucumbieron literalmente como moscas ante nuestros ojos, y su apariencia general*

ciertamente me sugirió que se había producido alguna forma de envenenamiento. ¿Pero qué? Las aves estaban casi todas apagadas y sin vida, muchas de ellas semicomatosas, y en media hora más de otra docena de aves había muerto por la enfermedad 'X'. Al principio, solo atacó a los pavos, pero más tarde, algunos grupos pequeños de patitos y los faisanes murieron de la misma manera misteriosa. La mayoría de los casos ocurrieron después de la primera semana de mayo y antes de finales de agosto. En total, se reportaron unos 500 casos (muchos a través de laboratorios veterinarios) que involucraron la muerte de más de 100,000 pavos. Habíamos comprado un poco más de 5,000 toneladas de harina de maní brasileña en 1960, siendo esta la primera vez que comprábamos este ingrediente en Brasil. Podemos matar repetidamente a los polluelos y patitos utilizando muestras particulares de la harina de maní brasileña, con síntomas y hallazgos post mortem típicos de la enfermedad 'X' de los pavos” [44].

Los veterinarios la llamaron la enfermedad de 'X' de los pavos, porque algunos de los primeros signos fueron síntomas neurológicos, coma y muerte, que en ese momento se parecían a una enfermedad viral de etiología desconocida [44,45]. Las investigaciones de este problema condujeron al descubrimiento de las AFB1 como agente etiológico, y comenzó el desarrollo de la micotoxicología [46,47]. Los siguientes informes en los que la AFB1 se identificó como una molécula altamente cancerígena para las ratas y responsable de causar hepatocarcinoma en la trucha arco iris, hicieron que el descubrimiento fuera aún más significativo [48,49]. Desde entonces, diversas investigaciones han demostrado los efectos negativos de la AFB1 sobre los parámetros productivos de las aves de corral y que la contaminación de los forrajes con AFB1 aún es un problema para la industria avícola, lo que anualmente resulta en pérdidas económicas sustanciales para los productores debido a los efectos a menudo subletales, pero tóxicos, que afectan severamente a patos, pollos de engorda, ponedoras, pavos y codornices [50–52].

Las aves de corral son probablemente los animales de producción más sensibles a los efectos tóxicos de la AFB1, y pequeñas cantidades de esta micotoxina dañan gravemente la salud de estas especies y la rentabilidad del sistema productivo [4]. Esto es particularmente importante ya que, dentro del sector ganadero, las aves de corral representan el subsector más

eficiente en el uso de los recursos naturales y en el suministro de proteína de origen animal para satisfacer la creciente demanda mundial [53].

Entre las especies de aves de corral existen diferencias en la susceptibilidad a la AFB1, los patos y los pavos son las especies más sensibles, seguidos por los gansos y los faisanes con sensibilidad intermedia, y finalmente los pollos, que mostraron tener una resistencia relativamente mayor a los efectos tóxicos de la AFB1 [54]. Aunque todavía no hay una explicación clara para esta diferencia en la susceptibilidad, esta podría deberse a las distintas vías de biotransformación de la AFB1 que se llevan a cabo en estas especies. Además, la toxicidad de la AFB1 en las diversas especies de aves de corral depende de otros factores como la concentración de la micotoxina, la edad y el sexo de los animales, su estado nutricional, así como su interacción con otras micotoxinas, sin olvidar que dentro de cada especie de las aves de corral, ciertas razas parecen ser más sensibles que otras [55].

2.5. Efectos tóxicos de la AFB1 en aves de corral

Las aves de corral están expuestas a las AF al consumir alimentos fabricados con materias primas contaminadas, la AFB1 es la principal micotoxina que afectan la industria avícola. La toxicidad de la AFB1 en aves depende principalmente de la dosis o concentración y del tiempo de exposición a la toxina, son más notorios los efectos inhibitorios sobre el desarrollo, cambios en los valores hemáticos y bioquímicos normales, disminución de la respuesta inmune, así como cambios patológicos [56].

El efecto más notable de la AFB1 en las aves de corral es el detrimento de todos los parámetros productivos importantes, incluidos la ganancia de peso corporal, el consumo de alimento, la eficiencia en la conversión alimenticia, la pigmentación, el rendimiento productivo, la producción de huevo, el rendimiento reproductivo en machos y hembras, así como una mayor mortalidad [51,57,58]. Estas alteraciones en los parámetros productivos son el resultado de los efectos fisiológicos del consumo prolongado de concentraciones subletales de AFB1, de los cuales el daño hepático es el más notorio, caracterizado por el agrandamiento de este órgano, su coloración amarilla pálida, hemorragias petequiales y hematomas en la

superficie, generalmente acompañados de proliferación de conductos biliares y atrofia de los órganos linfoides [59,60].

Para la industria avícola es más importante la contaminación y la ingesta de bajas concentraciones de AFB1 por periodos prolongados debido a su capacidad para disminuir la resistencia a enfermedades infecciosas comunes, incluidas las infecciones parasitarias, bacterianas y virales debido a la depresión de la respuesta inmune humoral y celular [61–63]. Diversos estudios han demostrado que la exposición de las aves de corral a concentraciones bajas de AFB1 ha resultado en inmunosupresión, incluso en aves inmunizadas en situaciones de campo contra las principales enfermedades infecciosas, como Newcastle, bronquitis infecciosa e infección de la bolsa de Fabricio (enfermedad de Gumboro) [63–65]. Los problemas de inmunosupresión podrían estar causados por una regresión, relacionada con la dosis de AFB1, en el tamaño del timo y la bolsa de Fabricio, que son los órganos principales de la inmunocompetencia, reduciendo las células funcionales y disminuyendo la producción de anticuerpos [5,64,66]. El control de las enfermedades inmunosupresoras es de primordial importancia para la industria avícola en los países en desarrollo, por lo que el alimento contaminado con AFB1 todavía se consideran un problema económicamente importante para la avicultura [67]. Además, existe preocupación pública tanto por los efectos que los alimentos contaminados con AFB1 pueden tener sobre el crecimiento y la salud de las aves de corral, como por la posible contaminación con residuos tóxicos de esta micotoxina o de sus metabolitos en productos avícolas como la carne y el huevo, lo que puede suponer un peligro potencial para salud humana [68].

Los efectos tóxicos de la AFB1 (tabla 1) se han observado en aves que consumieron AFB1 en condiciones experimentales, pero pueden presentarse en condiciones de campo en granjas avícolas que utilicen alimento contaminado con esta micotoxina en niveles mayores a los permitidos (entre 20 a 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$), que eventualmente provocan efectos subclínicos en algunos casos, y causan signos o lesiones crónicas en aquellas granjas donde las concentraciones sobrepasan los límites oficiales permitidos ($> 50 \mu\text{g}/\text{kg}$) [69]. Todos estos efectos tienen implicaciones económicas al repercutir de manera adversa en la producción avícola, afectar

la disponibilidad de ciertos productos y la comercialización de estos a escala nacional e internacional [70].

Tabla 1. Efectos tóxicos y signos clínicos que presentan las aves de corral tras el consumo de AFB1.

Efectos	Signos
Hepatotoxicidad	Ictericia
Teratogenicidad	Defectos de nacimiento de las crías
Carcinogenicidad	Mayor incidencia de cáncer en los animales expuestos
Cambios patológicos	Variación de peso de los órganos internos <ul style="list-style-type: none"> - Aumento del hígado, bazo y riñones - Disminución de la bolsa de Fabricio y del timo Cambios en la textura y coloración de los órganos (hígado, molleja)
Disminución de parámetros productivos	Ingesta de alimento Ganancia diaria de peso Peso al final del ciclo Producción de huevo Uniformidad en la parvada Capacidad de eclosión de los huevos (incubabilidad)
Efectos hematopoyéticos	Hemorragias Anemia
Inmunosupresión	Disminución de la resistencia a factores de estrés ambientales y microbianos Incremento de la susceptibilidad a enfermedades
Neurotoxicidad	Síndrome nervioso (comportamiento anormal)
Efectos dérmicos	Plumaje deteriorado Palidez de las membranas mucosas y la piel (síndrome del ave pálida)
Residuos	Presentes en hígado, carne y huevos

2.6. Estrategias de control de los efectos tóxicos de la AFB1

Muchos métodos han sido utilizados para tratar de prevenir los efectos tóxicos de la AFB1; sin embargo, ninguno de ellos cumple con todos los criterios de eficacia y seguridad necesarios (Tabla 2), por lo que no existe un método único para contrarrestar por completo los efectos tóxicos de esta micotoxina [71,72]. Sin duda, el primer y mejor intento para prevenir los efectos tóxicos de la AFB1 es minimizar su producción a través de buenas prácticas agrícolas (BPA), incluidas las prácticas de cultivo en los campos, así como las condiciones de cosecha, transporte y almacenamiento [73,74]. Como la prevención no siempre es posible, diferentes métodos de descontaminación o desintoxicación ganan atención como alternativa para reducir la contaminación de los forrajes y granos con esta

micotoxina [75–77]. Solo algunos de estos métodos son de uso práctico, probablemente debido a dificultades para cumplir con los requisitos de la FAO: reducción de AFB1 sin toxicidad residual, garantía de valores nutricionales y ninguna modificación de las propiedades de los alimentos y forrajes [78]. Se necesitan con urgencia métodos rentables para detoxificar granos y forrajes contaminados con AFB1, con mínimas pérdidas económicas para el agricultor y riesgos toxicológicos para el consumidor. Encontrar métodos nuevos y adecuados para la descontaminación de AFB1 se ha convertido en una necesidad primaria [79].

Tabla 2. Ejemplos de métodos físicos y químicos usados como estrategia de control de la AFB1 [36].

Método	Condición	Degradación de la AFB1 (%)	Comentarios
Físico			
Luz solar	Es efectiva en productos líquidos	99	No son muy efectivos y en la mayoría de los casos deterioran las propiedades organolépticas. Ningún proceso individual puede eliminar todas la toxinas en productos líquidos y sólidos contaminados.
Luz UV	Solución de cloroformo de aceite de cacahuete	45	
Microondas	6 KW, 4 min	95	
Autoclave	121°C, 4 h	95	
Cocción	Vapor / explosión	50	
Tostado	180°C, 30 min	80	
Pasteurización	80°C, 45 s	64	
Calor seco	250°C	Parcial	
Solventes	Específico para cada solvente	80-95	
Químico			
H ₂ O ₂	H ₂ O ₂ 6%, 30 min, 80°C, pH alcalino	97	Pueden dejar residuos químicos nocivos después de la desintoxicación y también pueden generar compuestos más tóxicos durante la reacción química.
Ozono	2 h, 100°C, 22% de humedad	100	
Amoníaco	40 psi, 100°C, 4% NH ₄ OH, 30 min	99	
Urea + Ureasa	20% Urea, 2% harina de soya, luz solar, 14 h	85	
Hipoclorito de sodio	15 mg Cl ₂ gas por 100 mg AFB1	100	
Bisulfito de sodio	0.4%, 5 min	45	

Los métodos de descontaminación estudiados son tratamientos físicos, químicos o biológicos de los forrajes o granos contaminados, y pueden ser tan simples como la separación física mediante la selección, clasificación y selección de granos dañados o tan

complejos como la irradiación gamma o métodos químicos que usan amoníaco, ozono, peróxido de hidrógeno, o algunos ácidos y álcalis [72,77,80]. Sin embargo, muchos de estos métodos para el tratamiento de alimentos contaminados con AFB1 no están disponibles actualmente porque no se pueden aplicar a gran escala y de manera rentable o porque muchos de ellos son poco prácticos o potencialmente inseguros.

2.6.1. Adsorbentes

El enfoque más utilizado para prevenir la aflatoxicosis en animales es la adición de materiales adsorbentes en la dieta, los cuales se unen a la AFB1 en el tracto gastrointestinal e impiden su absorción en el intestino así como distribución a la sangre y los órganos diana [81]. Generalmente estos adsorbentes son compuestos de gran peso molecular que pueden unirse a la micotoxina, forman un complejo adsorbente-micotoxina estable que puede atravesar el tracto gastrointestinal de los animales sin disociar la AFB1, para ser eliminada por las heces [82]. Los adsorbentes se han utilizado de forma recurrente debido a su viabilidad económica y su idoneidad desde la perspectiva nutricional [83].

La eficacia de la adsorción parece depender de la estructura química tanto del adsorbente como de la micotoxina, y de los componentes del alimento. Las propiedades fisicoquímicas de los adsorbentes, como la carga total, la distribución de carga, el tamaño de los poros en la superficie, el área superficial, los índices de yodo y azul de metileno, y el pH, también desempeñan una función importante en la unión efectiva. Por otro lado, las propiedades de las micotoxinas adsorbidas, como polaridad, solubilidad, tamaño, forma, distribución de carga y constantes de disociación también juegan un papel importante. El alto contenido de fibra de la base alimenticia aumenta la afinidad de las micotoxinas al adsorbente [7,8].

Muchos estudios han demostrado que los minerales de arcilla y aluminosilicatos, principalmente zeolitas, aluminosilicatos de calcio y sodio hidratados (HSCAS), y las arcillas que contienen aluminosilicatos, pueden reducir efectivamente la toxicidad de la AFB1 en animales; estos materiales inorgánicos son los adsorbentes más estudiados [8,84,85]. A pesar de que estos adsorbentes inorgánicos han sido probados y reconocidos por su capacidad para

unirse efectivamente a la AFB1 [86,87], el principal riesgo de usarlos en la alimentación animal es que pueden adsorber también algunos nutrientes como vitaminas y minerales, y disminuir yendo su metabolismo y utilización por los animales [88,89]. Otro riesgo es que las arcillas pueden liberar componentes tóxicos o elementos unidos a ellas, como metales pesados o dioxinas, que pueden liberarse en el intestino de los animales y bioacumularse en los órganos animales [90,91].

Para tratar de mitigar los problemas que implica el uso de adsorbentes inorgánicos, se han investigado otros materiales adsorbentes de origen orgánico, como biopolímeros y polímeros sintéticos [8,92]. Solo unos pocos polímeros sintéticos han sido evaluados y han demostrado que son capaces de adsorber las micotoxinas *in vitro* e *in vivo*, como la colestiramina, divinilbenceno-estireno, polivinilpirrolidona (PVP) y su modificación polivinilpolipirrolidona (PVPP) [7,8,74]. De estos polímeros, solo la PVP y la PVPP han sido probados contra AFB1 en aves de corral. Los estudios *in vitro* indican que PVPP puede adsorber hasta 50 mg/kg de AFB1 del alimento. Los estudios *in vivo* realizados en pollos de engorda demostraron que la adición de PVPP en la dieta mejoró algunos parámetros bioquímicos y hematológicos del suero, y disminuyó los efectos perjudiciales de la AFB1 sobre el sistema inmune, además de inhibir notablemente los cambios patológicos [93–95]. A pesar de que el costo de estos polímeros podría ser el factor limitante para su aplicación práctica, su uso podría ayudar a resolver los problemas relacionados con el uso de adsorbentes de origen inorgánico [74,96].

Los biopolímeros utilizados como adsorbentes generalmente son carbohidratos complejos no digeribles, no tóxicos, biocompatibles y biodegradables, como celulosa, lignina, hemicelulosa, glucomananos, peptidoglucanos y quitosano. Se han utilizado ampliamente como biosorbentes prometedores para la remoción de diversos iones de metales pesados y colorantes [97,98], por lo que podrían mostrar buenos resultados en su capacidad para adsorber micotoxinas importantes para la industria avícola. Además, estos materiales son susceptibles de sufrir modificaciones físicas, químicas, térmicas o combinadas que podrían mejorar su capacidad de adsorción [99,100]. La presencia de grupos hidroxilo en los polímeros celulósicos los hace adecuados para ser modificados químicamente y producir

materiales con propiedades adsorbentes mejoradas, como características hidrofílicas o hidrofóbicas, elasticidad, capacidad de adsorción o intercambio iónico, propiedades térmicas del material o su resistencia al ataque microbiológico [101]. Además, estos biopolímeros también presentan una estructura porosa multicapa llena de aberturas y canales que proporcionan un gran volumen por unidad de superficie del biosorbente, lo cual resulta favorable en el proceso de adsorción [102]. Los diferentes pesos moleculares del quitosano, su grado de desacetilación y de reticulación deben ser considerados cuando se determinan sus propiedades de adsorción de AFB1 [103].

Hoy en día hay algunas investigaciones muy prometedoras sobre la efectividad de los polímeros sintéticos y orgánicos en la adsorción de AFB1, aunque este campo aún está en desarrollo y necesita más investigación *in vitro* e *in vivo* para confirmar la efectividad de estos materiales sobre los efectos tóxicos de la AFB1.

2.6.2. Antioxidantes

Otras estrategias efectivas contra los efectos tóxicos de la AFB1 son la quimiopreención, quimioprotección y quimioprofilaxis a través del uso de fármacos, fitofármacos, suplementos dietéticos y alimentos funcionales, los cuales modulan la actividad de las enzimas que metabolizan xenobióticos y conducen a la eliminación facilitada de los metabolitos de esta micotoxina o a la disminución en su tasa de biotransformación, que resulta en el bloqueo, retraso o reversión de la aflatoxicosis [104]. Otras ventajas del uso de estos compuestos es que pueden alterar el desarrollo celular, evitar que las células adquieran daño genético, y prevenir la proliferación de células preneoplásicas o acelerar su muerte por apoptosis [105].

El estrés oxidativo juega un papel muy importante en la aflatoxicosis, por lo que se ha puesto atención a los productos naturales que pueden contrarrestar los efectos tóxicos de la AFB1, ya que estos pueden ser o contener antioxidantes capaces de prevenir y proteger contra el daño oxidativo derivado del efecto directo de esta micotoxina o de sus metabolitos. De estos productos naturales también han sido aislados compuestos activos estructuralmente

diferentes con efecto hepatoprotector por lo que podrían reducir el efecto hepatocarcinógeno de la AFB1 [106].

De los compuestos antioxidantes y hepatoprotectores, la curcumina (CUR), un curcuminoide polifenólico, es uno de los productos naturales activos más estudiados. La CUR posee propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimutagénicas, antimicrobianas y anticancerígenas [107,108], y se ha demostrado que la CUR puede disminuir la toxicidad de la AFB1 a través del incremento en la actividad de las enzimas antioxidantes, neutralización de los radicales libres, inhibición de la biotransformación de la AFB1 a su 8,9-epóxido y por su efecto inmunomodulador [11,109], por lo que la CUR se considera un fitofármaco prometedor para disminuir los efectos tóxicos de la aflatoxicosis. Sin embargo, a pesar de los efectos positivos demostrados de la CUR, sus efectos benéficos están limitados por su baja solubilidad que resulta en una baja absorción a lo largo del tracto gastrointestinal y, por lo tanto, baja biodisponibilidad incluso cuando se administra a dosis de 12 g/día en humanos [110].

Estudios *in vivo* han demostrado que después de la administración oral de CUR, la mayor parte es excretada a través de las heces y se observaron varios de sus derivados como glucurónico de CUR y sulfatos, lo que indica que este fitofármaco sufre metabolismo rápido en el hígado y se elimina rápidamente de la circulación sistémica [111]. También se ha reportado que la CUR es inestable a valores de pH neutro-básicos, se degrada a vainillina, ácido ferúlico, feruloil metano y trans-6-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2,4-dioxo-5-hexenal, pero cuando los medios son suplementados con suero, la CUR es más estable [112].

Esto ha orillado a los investigadores a utilizar varias estrategias para mejorar la solubilidad de la CUR e incrementar su biodisponibilidad y, por lo tanto, su efectividad terapéutica, así como su estabilidad. Algunas de estas técnicas incluyen los complejos de inclusión, micronización, dispersiones sólidas, nanosuspensiones, nanopartículas, liposomas, sistemas autoemulsionantes y sistemas basados en geles [110,113–115].

2.6.3. Métodos microbiológicos

El enfoque de control microbiológico se ha fortalecido en el campo de la investigación para controlar el problema de contaminación con AFB1, cuyas investigaciones se han centrado principalmente en dos mecanismos: adsorción y degradación, que pueden lograrse mediante sistemas biológicos como bacterias, levaduras, mohos, actinomicetos y algas [116].

La adsorción biológica puede ocurrir por la unión directa de la AFB1 a los componentes de la pared celular de los microorganismos viables y no viables, por lo que el uso de probióticos puede ser una buena opción para adsorber la AFB1 en el intestino y facilitar su posterior eliminación [117], aunque también puede darse un fenómeno de internalización activa y acumulación de la AFB1 dentro de los microorganismos. Uno de los inconvenientes de la adsorción biológica es que se trata de un proceso naturalmente reversible por lo que la AFB1 puede liberarse fácilmente, lo que hace necesaria la búsqueda de nuevos enfoques o la combinación de estrategias de detoxificación para superar estos inconvenientes [118].

El otro mecanismo es la biodegradación microbiológica, que se realiza por la acción de enzimas extracelulares o intracelulares de los microorganismos, generalmente este es un mecanismo permanente e irreversible que puede disminuir o eliminar por completo la toxicidad de la AFB1 [17]. No obstante, la modificación química en la estructura de la AFB1 puede resultar en otras moléculas que también tienen efectos tóxicos, como el aflatoxicol (AFL), por lo que también es necesario más conocimiento sobre la identidad, cantidad y toxicidad de los metabolitos de degradación antes de las posibles aplicaciones de tratamientos microbiológicos [78,119].

En los últimos años, el control microbiológico parece ser uno de los enfoques más prometedores para el control de la aflatoxicosis, ya que estos métodos de bioadsorción y biodegradación han demostrado ser eficientes, específicos y ecológicos [120–123]. Sin embargo, dado que se espera que el uso de microorganismos sea seguro tanto para la salud animal como para la obtención de productos pecuarios inocuos, todavía hay muchos microorganismos que no pueden emplearse directamente en el alimento o los forrajes. Las

últimas investigaciones para encontrar microorganismos capaces de controlar el problema de contaminación con AFB1 se han centrado en la selección, aislamiento y la evaluación de las cepas que han demostrado su eficacia para reducir o incluso suprimir la toxicidad de la AFB1, pero que también sean generalmente reconocidos como seguros (GRAS, por sus siglas en inglés) [124,125].

Existen varios microorganismos que han demostrado ser efectivos para prevenir y controlar los efectos tóxicos de la AFB1, entre ellos, las cepas bacterianas probióticas son algunas de las más estudiadas, debido en gran medida a su carácter GRAS y porque han demostrado tener varias aplicaciones potenciales contra esta micotoxina tanto *in vitro* como *in vivo* [126–128]. Los probióticos son microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio para la salud del huésped directa o indirectamente a través del mantenimiento del equilibrio microbiano en su tracto digestivo [120,129]. En los animales de producción, se han usado varios géneros bacterianos como probióticos, incluidas muchas especies de *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *E. coli*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*; aunque también se han usado algunas especies de mohos y levaduras, como *Aspergillus*, *Candida* y *Saccharomyces* [130,131].

3. JUSTIFICACIÓN

La importancia de la industria avícola en México reside en el papel estratégico en la producción de proteína animal debido a su alta eficiencia productiva, consolidándose como la actividad agropecuaria más importante en México y el mundo, a tal grado que hoy en día la producción de carne de pollo es mayor que la de carne de cerdo y bovino. Asimismo, la avicultura mexicana tiene importancia internacional, al ocupar el séptimo lugar como país productor de carne de pollo a nivel mundial.

El problema de contaminación con micotoxinas, especialmente con AFB1, aún es un tema de gran importancia para la industria avícola, tanto por las importantes pérdidas económicas, como por sus efectos en salud pública. Por lo tanto, actualmente hay muchas investigaciones que pretenden incrementar la eficiencia productiva del pollo, mejorar la calidad e inocuidad del alimento destinado al sector avícola y la de los productos alimenticios de origen avícola, así como la prevención de los efectos tóxicos ocasionados en las especies avícolas por el consumo de alimento contaminado con aflatoxinas. Por obvias razones, la prevención de la contaminación con AFB1 antes o después de la cosecha de los granos y cereales con los que se elaboran los alimentos y forrajes para la alimentación animal es la estrategia más efectiva para reducir al mínimo el riesgo de aflatoxicosis; sin embargo, la contaminación con AFB1 en granos y forrajes es casi universal, y hasta cierto punto prácticamente inevitable, por lo que se han desarrollado y evaluado otros métodos para tratar de descontaminar el alimento contaminado o para aminorar los efectos tóxicos que ocasiona en los animales de producción la ingestión de esta micotoxina.

Una de las estrategias que mejores resultados ha mostrado y que, por razones económicas y prácticas es la más empleada, es la adición de aditivos a los alimentos y forrajes que permitan reducir la toxicidad ocasionada por la contaminación con AFB1. A pesar de que muchos aditivos para la alimentación animal ya han sido evaluados, todavía existen muchos materiales que no han sido considerados o evaluados. Los polímeros de origen celulósico generalmente han sido utilizados con fines textiles, alimenticios o farmacéuticos, sin

considerar que sus propiedades de adsorción les permitiría formar parte del gran arsenal de técnicas y productos que existen para contrarrestar los problemas relacionados con la contaminación con AFB1 en el sector avícola. Además, hoy en día, una de las estrategias más utilizadas para prevenir la aflatoxicosis en aves de corral es el uso de antioxidantes de origen natural. En este sentido, diversas investigaciones han demostrado que la curcumina (CUR) puede disminuir la toxicidad de la AFB1; sin embargo, sus efectos benéficos siguen limitados por su baja solubilidad, lo que incrementa nuestro interés en mejorar la solubilidad y con ello la biodisponibilidad de este fitofármaco. El uso de métodos biológicos como la adición de ciertos microorganismos al alimento también ha mostrado resultados prometedores para la reducción de los efectos tóxicos de la AFB1. Algunas cepas bacterianas, cuyo uso es generalmente reconocido como seguro y que han demostrado poseer propiedades probióticas en humanos y animales, también han sido reportadas como microorganismos con actividad contra AFB1. Parte de nuestro equipo de trabajo seleccionó, aisló e identificó previamente algunas cepas bacterianas del género *Bacillus spp*, con las que fue formulado un aditivo microbiano para alimentación directa (DFM, por sus siglas en inglés), el cual ha sido evaluado y ha demostrado su eficacia para mejorar los parámetros productivos y la salud intestinal de las aves de corral. No obstante, aún no se han estudiado sus efectos para contrarrestar los efectos tóxicos ocasionados por la ingesta de AFB1 en pollos de engorda.

Por estas razones, este proyecto desarrolló novedosas formulaciones para prevenir o contrarrestar los efectos tóxicos de la AFB1 mediante la combinación de los diferentes mecanismos de prevención y protección que exhiben sus componentes, mediante la evaluación tanto *in vitro* como *in vivo* de su efectividad para que puedan formar parte del arsenal de técnicas y productos que existen para contrarrestar los efectos tóxicos de una de las micotoxinas más importantes para el sector avícola, y que, además sea más eficiente que cualquiera de las opciones que se ofrecen actualmente para tratar de resolver esta problemática.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Prevenir los efectos tóxicos de la Aflatoxina B1 en pollos de engorda mediante el diseño, elaboración y evaluación *in vitro* e *in vivo* de nuevas formulaciones a base de polímeros celulósicos, curcumina y/o probióticos.

4.2. Objetivos Particulares

- Determinar la capacidad de diferentes polímeros para adsorber *in vitro* seis diferentes micotoxinas (AFB1, FUB1, OTA, T-2, ZEA y DON) en un modelo del tracto gastrointestinal que simule las condiciones fisiológicas del pollo de engorda para seleccionar la combinación y proporción que tenga la mayor capacidad de adsorción para estas micotoxinas.
- Evaluar diferentes técnicas para incrementar la solubilidad, velocidad de disolución, estabilidad y biodisponibilidad de la curcumina, mediante la fabricación de distintos sistemas farmacéuticos para seleccionar el más eficiente en cuanto a costos, practicidad y escalabilidad.
- Evaluar la citotoxicidad y el incremento de la permeabilidad aparente de la curcumina de solubilidad mejorada, en un modelo *in vitro* con células Caco-2, y determinar el incremento de su biodisponibilidad en pollos de engorda.
- Desarrollar y optimizar una formulación con polímeros adsorbentes y curcumina que sea capaz de adsorber AFB1 y de liberar la curcumina de forma biodisponible, para ser administrada en el alimento de las aves.

- Caracterizar la formulación desarrollada en cuanto a tamaño de partícula, morfología y liberación de curcumina, así como su comportamiento en espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier con reflexión total atenuada para tratar de elucidar su mecanismo de adsorción.
- Evaluar la efectividad *in vivo* de la formulación desarrollada sobre los parámetros productivos, marcadores bioquímicos e inmunológicos en pollos de engorda alimentados con dietas contaminadas con AFB1 durante 21 días.
- Demostrar la capacidad de tres especies bacterianas del género *Bacillus spp.* administradas como DFM, y su combinación con la formulación de polímeros y curcumina desarrollada, para biodegradar o adsorber AFB1, evaluando parámetros productivos, marcadores bioquímicos e inmunológicos en pollos de engorda alimentados con dietas contaminadas con AFB1 durante 21 días.

5. HIPÓTESIS

Si se administran nuevas formulaciones a base de combinaciones de polímeros adsorbentes, curcumina o probióticos en el alimento, entonces los efectos tóxicos de la AFB1 que alteran los parámetros productivos, bioquímicos e inmunológicos en pollos de engorda serán menos severos debido a la combinación de sus diferentes mecanismos de acción y efectos benéficos.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Selección de los polímeros adsorbentes

6.1.1. Estándares de micotoxinas y polímeros adsorbentes

Los estándares de las micotoxinas utilizadas (AFB1, FUB1, OTA, T-2, DON, y ZEA) fueron obtenidos de Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA).

Los polímeros a los que se les evaluó la capacidad adsorbente fueron los siguientes:

- Quitosano de alto peso molecular (350 kDa), con un grado de desacetilación del 95% (CHI, Paragon Specialty Products, LLC). Se preparó una solución de 1 g de quitosano disuelto en 100 mL de solución acuosa de ácido acético al 1% (v/v). Posteriormente, esta solución se goteó sobre 100 mL de una solución de NaOH 0.5 M y se agitó durante 40 minutos a 600 rpm. Las partículas de quitosano formadas se enjuagaron tres veces con agua destilada y se secaron a 40°C durante 12 h. Las partículas resultantes fueron molidas y tamizadas para estandarizar el tamaño de partícula.
- Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC, Methocel[®], Chempoint)
- Carboximetilcelulosa sódica (CMC, Aqualon[®], Ashland)
- Celulosa microcristalina (MCC, Avicel[®], FMC)

6.1.2. Soluciones de micotoxinas

Las soluciones de cada micotoxina se prepararon por separado. Las soluciones estándar primarias de AFB1, FUB1, OTA, T-2, DON (100 µg/mL) y ZEA (500 µg/mL) se prepararon en dimetil sulfóxido (DMSO). Estas soluciones se diluyeron posteriormente con agua destilada hasta luego a 4, 30, 8, 8, 30 y 30 µg/mL, respectivamente, usando agua destilada. A continuación, las soluciones de AFB1, OTA y T-2 (4, 8 y 8 µg/mL) se diluyeron con agua destilada hasta alcanzar las concentraciones de 0.32, 0.64 y 1.92 µg/mL. Las concentraciones

finales fueron AFB1 (0.32 $\mu\text{g/mL}$), FUB1 (30 $\mu\text{g/mL}$), OTA (0.64 $\mu\text{g/mL}$), T-2 (1.92 $\mu\text{g/mL}$), DON (30 $\mu\text{g/mL}$) y ZEA (30 $\mu\text{g/mL}$).

6.1.3. Preparación del alimento contaminado con las micotoxinas

La dieta experimental fue formulada según los requerimientos nutricionales del pollo de engorda según lo recomendado por el Consejo Nacional de Investigación (NRC, por sus siglas en inglés), sin la adición de antibióticos. El alimento contaminado para el modelo de digestibilidad *in vitro* se preparó adicionando cada una de las soluciones de micotoxinas por separado. Para ello, a 3.0 g de alimento libre de micotoxinas se le adicionaron 0.5 mL de solución de micotoxina para alcanzar las siguientes concentraciones de micotoxina en el alimento: AFB1 (50 $\mu\text{g/kg}$), FUB1 (5000 $\mu\text{g/kg}$), OTA (100 $\mu\text{g/kg}$), T-2 (300 $\mu\text{g/kg}$), DON (5000 $\mu\text{g/kg}$) y ZEA (5000 $\mu\text{g/kg}$). Después, el alimento contaminado se secó durante una noche en oscuridad a 40°C.

6.1.4. Modelo de digestibilidad *in vitro*

El estudio *in vitro* para evaluar los polímeros respecto a su capacidad de adsorción de micotoxinas se realizó en un modelo de digestibilidad que simula las condiciones fisiológicas del tracto gastrointestinal de las aves de corral. Todos los pasos del modelo se realizaron a 40°C para simular la temperatura corporal de las aves de corral, utilizando una incubadora con control de temperatura para demanda bioquímica de oxígeno (modelo 2020, VWR), que fue adaptada con un agitador orbital (modelo 3500, VWR) para mezclar a 19 rpm el contenido del alimento en los tubos. Todos los tubos de muestras se mantuvieron en una posición inclinada a 30 grados para facilitar el mezclado adecuado de las partículas del alimento y las soluciones enzimáticas incorporadas durante el ensayo. El primer compartimento gastrointestinal simulado fue el buche, para lo cual se mezclaron cinco gramos de alimento contaminado con cada micotoxina y 50 mg de cada uno de los polímeros, con 10 ml de ácido clorhídrico 0.03 M (catálogo no. HX0607-2, EMD Millipore Corporation)

en tubos de polipropileno para centrifuga de 50 mL. Cada tubo se mezcló vigorosamente, alcanzando un valor de pH de alrededor de 5.2. Luego, todos los tubos se incubaron durante 30 minutos. El segundo compartimento gastrointestinal simulado fue el proventrículo, donde se agregaron 3000 U de pepsina (catálogo no. P700, Sigma-Aldrich) por gramo de alimento y 2.5 mL de HCl 1.5 M a cada tubo, alcanzando un pH entre 1.4 y 2.0, y se incubaron durante 45 minutos. El tercer y último compartimento gastrointestinal simulado fue la sección intestinal. En este caso, se adicionaron 6.84 mg de pancreatina 8x (catálogo no. P7545, Sigma-Aldrich) por gramo de alimento y 6.5 ml de bicarbonato de sodio 1.0 M (catálogo no. S6014, Sigma-Aldrich), alcanzando un pH que osciló entre 6.4 y 6.8, incubando las muestras durante 2 h. El modelo de digestibilidad completo tuvo una duración total de 3 h y 15 min. Después de este tiempo, todos los tubos se centrifugaron a $2000 \times g$ durante 30 minutos, para separar los sólidos y el sobrenadante, el cual se filtró, se recolectó y se almacenó a -20°C hasta el análisis residual de las micotoxinas que no fueron adsorbidas. Al mismo tiempo, se corrieron muestras control sin la adición de los polímeros adsorbentes, cuyos valores de concentración de las micotoxinas fueron usados como referencia.

6.1.5. Cálculo del porcentaje de micotoxina adsorbido

El porcentaje de adsorción de cada micotoxina para cada polímero se calculó de la siguiente manera:

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

Donde C_i es la concentración de micotoxina en el control (ng/mL), y C_s la cantidad de micotoxina en el sobrenadante de las muestras con adsorbente (ng/mL).

6.1.6. Análisis y cuantificación de micotoxinas

El análisis de las micotoxinas en el sobrenadante se llevó a cabo utilizando un sistema de ensayos en biochip (Biochip Array), con el kit Myco 7[®] (modelo EV4065A; Randox Food

Diagnostics). El kit contiene el biochip, que es un elemento sólido que contiene una matriz de sitios de reacción discretos en la superficie y cada sitio de reacción contiene ligandos de unión específicos para las diferentes micotoxinas que se cuantificaron. El ensayo se realizó siguiendo las instrucciones descritas por el fabricante, y los datos fueron generados y procesados con el inmunoanalizador de biochips Evidence Investigator (modelo EV3602; Randox Food Diagnostics), el cual analiza las señales de quimioluminiscencia individuales generadas en los sitios de reacción mediante una cámara especial, y un software de lectura e interpretación de imágenes traduce las señales de luz generadas por las reacciones quimioluminiscentes en una concentración de analito.

6.2. Caracterización de los polímeros adsorbentes

Los polímeros que fueron probados como adsorbentes se evaluaron con espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflexión total atenuada (FTIR-ATR), utilizando un espectrofotómetro Frontier (modelo SP8000; Perkin Elmer). Todos los espectros fueron tomados en el rango de 4000–400 cm^{-1} . La morfología y superficie de los polímeros utilizados se evaluó utilizando un microscopio electrónico de barrido (modelo JSM-6010LA, JEOL), con un voltaje de aceleración de 15 kV. Las muestras se colocaron en cinta adhesiva de doble cara sobre soportes de aluminio para obtener una capa uniforme de partículas, las cuales se revistieron con oro usando un metalizador por pulverización (modelo Desk V, Denton Vacuum) con una corriente de 7 miliamperios y una presión de 50 millitorr durante 300 segundos. Este mismo equipo permite realizar el análisis de espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS), para el análisis cuali y cuantitativo de elementos en los polímeros, para obtener sus espectros y su composición elemental porcentual. Se realizó también el análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC) utilizando un calorímetro (modelo Q2000 TA Instruments) equipado con un conjunto de enfriamiento de nitrógeno líquido. Se pesaron muestras de 5 mg en bandejas de aluminio herméticas, con ambiente de nitrógeno a una velocidad de flujo de 50 mL/min. Las muestras se equilibraron a 25°C, con una isoterma de 3 min y una rampa de calentamiento de 10°C/min hasta 250°C.

6.3. Mejora de la solubilidad de la curcumina (CUR)

6.3.1. Preparación de la dispersión sólida

La estrategia elegida para la mejora de las propiedades biofarmacéuticas y estabilidad de la CUR fue la preparación de una dispersión sólida, evaluando acarreadores como la polivinilpirrolidona (PVP) K30, el polietilenglicol 6000 y el Gelucire® 48/16. No obstante, por cuestiones de efectividad y costo, fue la PVP el acarreador seleccionado para la fabricación de la dispersión sólida de CUR en dos proporciones diferentes 1:6 y 1:9 (CUR/PVP). La primera parte del método de fabricación consistió en adicionar la PVP K30 en un volumen de agua desionizada e ir mezclando con un homogeneizador de alta velocidad Ultraturrax® (modelo T25 Basic S1, IKA) hasta la desaparición de los grumos. Posteriormente se adicionó poco a poco la CUR (Cúrcuma “E”, Laboratorios Mixim) y se fue mezclando con el Ultraturrax® hasta tener una dispersión homogénea. Esta mezcla se vertió en un molde y se dejó secando en una estufa a 40°C durante 48 h. Cuando la dispersión estuvo seca, se redujo y homogeneizó el tamaño de partícula.

6.3.2. Determinación de la solubilidad

La solubilidad de la CUR (materia prima) y de la dispersión sólida de CUR se evaluó agregando una cantidad en exceso de CUR (200 mg) a 20 mL de soluciones buffer acuosas de pH 1.2, 5.2 y 6.4. Las suspensiones formadas se mantuvieron en agitación continua durante 24 h a temperatura ambiente hasta alcanzar el equilibrio. Posteriormente se centrifugaron las muestras (Microfuge 20R, Beckman Coulter) a $2300 \times g$ durante 10 minutos a 4°C y los sobrenadantes se pasaron a través de un filtro de jeringa con tamaño de poro de 0.45 μm . Las soluciones resultantes se analizaron en un espectrofotómetro UV/VIS (Cary 100, Varian) a 421 nm, utilizando una curva de calibración con un rango de concentración de 1.36 - 13.6 $\mu\text{g/mL}$.

6.3.3. Análisis térmico de la dispersión de CUR

Las propiedades térmicas de la CUR, la PVP K30 y la dispersión sólida de CUR fueron evaluadas por calorimetría diferencial de barrido (DSC) utilizando un sistema automático de análisis térmico (modelo Q2000 TA Instruments) equipado con un conjunto de enfriamiento de nitrógeno líquido. Se pesaron muestras de 5 a 10 mg en bandejas de aluminio herméticas para las mediciones de todas las muestras. Las determinaciones se realizaron en ambiente de nitrógeno, con una velocidad de flujo de 50 mL/min. Las muestras se equilibraron a 25°C, con una isoterma de 3 min y una rampa de calentamiento de 10°C/min hasta 220°C. Los datos fueron analizados por el software TA Universal Analysis (TA Instruments).

6.3.4. Estudios de toxicidad y permeabilidad aparente

Los estudios de toxicidad y permeabilidad aparente se realizaron utilizando la línea celular de cáncer de colon humano Caco-2 de la American Type Culture Collection (ATCC). Estas células se cultivaron en frascos para cultivo celular de 75 cm² con medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco-Invitrogen[®], Thermo Fisher Scientific), suplementado con glucosa (4.5 g/L), suero bovino fetal (15%; v/v), vitaminas (2%; v/v), una solución de aminoácidos no esenciales (2%; v/v), L-glutamina (2%; v / v) y solución antibiótica (2%; v/v), a 37°C en una atmósfera humidificada de 5% CO₂/95% aire. Cuando el cultivo celular alcanzó el 80 - 90% de confluencia las células se dispersaron con tripsina-EDTA 0.025 M, una vez dispersas, se adicionó DMEM nuevo y resuspendieron las células. Posteriormente, se tomó una alícuota y se realizó el conteo de células para tomar el volumen suficiente de la suspensión que permitiera obtener una concentración adecuada para los estudios de toxicidad y permeabilidad. Para los estudios de toxicidad las células fueron sembradas en placas de poliestireno de 12 pocillos de 3.8 cm² (Well Plates Corning[®]) a razón de 5 × 10⁴ células/L de DMEM, mientras que para los estudios de permeabilidad las células se sembraron a razón de 2 × 10⁴ células/L de DMEM sobre el compartimiento apical en placas de 12 inserciones (Transwell Corning[®]) con membrana de poliestireno de 0.4 μm, superficie de 1.12 cm² y un volumen de 0.5 mL en el compartimiento apical y de 1.5 mL en el basolateral. El medio de

cultivo se reemplazó con medio nuevo cada tercer día durante 21 días, tiempo suficiente para que se lleve a cabo la diferenciación celular, el desarrollo de borde en cepillo y la expresión de las enzimas producidas en él.

Para los estudios de toxicidad se prepararon soluciones de CUR materia prima y de la dispersión sólida utilizando DMEM como disolvente. Después de los 21 días de diferenciación, el medio de cultivo de los pocillos de las placas para los estudios de toxicidad fue retirado y reemplazado con 1 mL de las soluciones de CUR. Como control negativo se utilizó DMEM, y como control positivo de toxicidad se utilizó un tratamiento con etanol. Las células se incubaron durante 2 h a 37°C, después de las cuales se retiraron las soluciones con CUR de los pocillos y se realizaron tres lavados con 1 mL de PBS. Posteriormente, se agregaron 900 µL de DMEM fresco. La determinación de la viabilidad celular se realizó utilizando el PrestoBlue[®], un compuesto a base de resazurina que tiene un color azul, que las células viables son capaces de metabolizar y cambiar a color violeta (resorufina). Este cambio se puede detectar y cuantificar usando un enfoque fluorométrico o espectrofotométrico. Para realizar la medida de viabilidad se añadieron 100 µL de PrestoBlue[®] en cada pocillo y se dejó incubar durante 2 h a 37°C, posteriormente el sobrenadante se leyó espectrofotométricamente a 600 nm.

Los estudios de permeabilidad también se realizaron después de los 21 días de diferenciación de las células, utilizando solo los pocillos que mostraron resistencia eléctrica transepitelial (TEER) mayor a 600 Ω cm², la cual fue medida con un sistema de resistencia eléctrica (modelo Millicell ERS-2, electrodo MERSSTX01, Millipore). También se prepararon soluciones de CUR materia prima y de la dispersión sólida utilizando DMEM como disolvente, a una concentración de 250 µg de CUR/mL de DMEM (equivalente a 125 µg de CUR por pocillo). Antes de comenzar la prueba, se retiró el medio de cultivo de los pocillos y las monocapas celulares se lavaron dos veces con 1 mL de PBS. Luego, se adicionaron 0.5 mL de las soluciones de CUR en el lado apical de las monocapas celulares, mientras que en el lado basolateral se adicionó 1.5 mL de DMEM fresco. Las células se incubaron a 37°C durante 2 h. Durante la prueba de permeabilidad se realizó también el seguimiento de la TEER, como indicador de la viabilidad celular e integridad de la

monocapa. Las mediciones se realizaron al inicio de la prueba, una hora después del inicio y al finalizar las dos horas de la prueba. Al finalizar la prueba, se retiró el medio del compartimiento apical y basolateral de los pocillos y se almacenó para su posterior análisis, se realizaron dos lavados con PBS a las células, se colocó DMEM fresco en los pocillos y se mantuvieron en incubación para medir nuevamente la TEER a las 24 h del estudio.

La cuantificación de la CUR que permeó hacia el lado basolateral se realizó utilizando un sistema de cromatografía líquida (ACQUITY UPLC, Waters Corp.) acoplado a una fuente de ionización por electrospray (ESI) y un espectrómetro de masas con un analizador de triple cuadrupolo (Xevo MS-TQ Waters Corp.). El análisis cromatográfico se realizó usando una columna Waters ACQUITY BEH Shield RP 18 (1,7 μm , 2.1 X 100 mm), con una fase móvil compuesta por 60% de A (acetonitrilo y 0.1% de ácido fórmico) y 40% de B (solución de ácido fórmico 0.1%). La velocidad de flujo de la fase móvil fue de 0.25 mL/min, y el volumen de inyección fue de 7.5 μl . La temperatura de la columna se acondicionó a 30°C, y el automuestreador se mantuvo a 4°C.

Los resultados del estudio se expresan como coeficiente de permeabilidad aparente (P_{app}) y relación de mejora de absorción (R), y se calculan con las siguientes ecuaciones:

$$P_{app} \left(\frac{\text{cm}}{\text{s}} \right) = \left(\frac{dQ}{dt} \right) \times \left(\frac{1}{A \times C_0} \right)$$

Donde dQ/dt es el flujo de moléculas de CUR a través de la monocapa celular del lado apical al basolateral; A es el área superficial de la membrana; y C_0 es la concentración inicial de CUR colocada en el lado apical.

$$R = \frac{P_{app} \text{ (muestra)}}{P_{app} \text{ (control)}}$$

Donde P_{app} (control) es el promedio del coeficiente de permeabilidad aparente de CUR materia prima suspendida en DMEM y P_{app} (muestra) es el promedio del coeficiente de permeabilidad aparente de las soluciones de CUR/PVP en proporciones 1:6 y 1:9.

6.4. Estudio de biodisponibilidad de la CUR

Se realizó la evaluación de la biodisponibilidad de la CUR materia prima y se comparó con la dispersión CUR/PVP (1:9) utilizando 24 pollos de engorda de la estirpe Ross 308 sanos de 42 días de edad con un peso entre 1.5 y 2 kg. Las aves fueron alojadas en corrales, con alimento finalizador libre de antibióticos y agua *ad libitum* durante todo el experimento. Después de su llegada, las aves se aclimataron a las instalaciones donde se llevaría a cabo el experimento. Las aves se dividieron en dos grupos de doce cada uno, el primer grupo fue administrado con CUR materia prima y el segundo con la dispersión sólida de CUR. A su vez, cada uno de los grupos experimentales fue dividido en dos subgrupos de 6 aves cada uno, para ir alternando los tiempos de muestreo y evitar la muerte de las aves por un shock hipovolémico.

Se prepararon soluciones de CUR utilizando tanto la materia prima como la dispersión sólida, a una concentración adecuada para administrar una dosis de 15 mg de CUR/kg de peso de cada ave. Las aves de ambos grupos fueron administradas con la respectiva solución de CUR como dosis única por vía oral. Se tomaron muestras de sangre (0.75 - 1.0 mL) de la vena yugular, de la vena braquial la vena o de la vena metatarsal media, y se colectaron en tubos de microcentrífuga heparinizados inmediatamente. El primer tiempo de muestreo fue antes de la administración de la CUR y a las 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 12 y 24 h después de su administración. Todas las muestras de sangre se centrifugaron a $1118 \times g$ a 4°C durante 10 min para separar el plasma, el cual se almacenó a -80°C hasta su análisis. La cuantificación de la CUR en plasma también se realizó con el método analítico de cromatografía líquida acoplado a espectrometría de masas descrito anteriormente.

6.5. Preparación de la formulación con los polímeros y la dispersión sólida de CUR

Los polímeros seleccionados para la formulación fueron la MCC y la CMC, que se combinaron en una proporción de 9:1, respectivamente. El primer tratamiento consistió en un granulado de estos dos polímeros celulósicos obtenido mediante un proceso de

granulación vía húmeda. El segundo tratamiento contenía la misma mezcla de polímeros y la dispersión sólida de CUR/PVP, en una relación de 6:4, respectivamente. Para su fabricación, se utilizó un prototipo de granulador que simula las condiciones de un mezclador granulador de alto corte y agua como líquido aglutinante. Los parámetros del proceso de granulación evaluados fueron la velocidad y el tiempo de mezclado, volumen de líquido aglutinante, velocidad de aspersion y tamaño de lote, seleccionando: 500 rpm durante 10 min, asperjando 40 mL de agua en el granulador a una velocidad de 4 mL/min, con un tamaño de lote de 100 g. Los granulados húmedos se secaron en un horno de convección de aire caliente a 40°C hasta tener un contenido de humedad del 3.5%. Una vez secos, los granulados se pasaron a través de un tamiz de malla No. 25, para homogeneizar las partículas a un tamaño promedio de 700 μm .

6.5.1. Caracterización de las formulaciones

La morfología y superficie de los granulados se evaluó utilizando un microscopio electrónico de barrido (modelo JSM-6010LA, JEOL), con un voltaje de aceleración de 15 kV. El equipo y el pretratamiento de las muestras para la microscopía fue el mismo que se utilizó para la caracterización de los polímeros. Se determinó también la influencia del pH en la capacidad de adsorción de los polímeros celulósicos individuales, y la combinación de ellos. Para ello, se prepararon suspensiones al 1% (p/p) de los materiales poliméricos en soluciones buffer de pH 1.6, 5.2 y 6.6. Se tomaron 9.5 mL de las suspensiones y se les adicionaron 0.5 mL de una solución de AFB1 de 1 $\mu\text{g/mL}$, para obtener una concentración final de AFB1 de 50 ng/mL. Las soluciones a pH 1.6 permanecieron en agitación constante a 100 rpm durante 30 min a 40°C para simular las condiciones durante el paso por el buche, mientras que las de pH 5.2 durante 45 min y las de pH 6.6 durante 2 h bajo las mismas condiciones para simular el paso por proventrículo e intestino, respectivamente. Al término de estos tiempos, las soluciones fueron centrifugadas y se recolectaron los sobrenadantes para obtener su espectro de fluorescencia y calcular el porcentaje de adsorción de cada polímero celulósico y la mezcla de ambos en los diferentes valores de pH. La detección de la AFB1 se llevó a cabo con un espectrofotómetro de fluorescencia (modelo LS-55, Perkin Elmer),

adquiriendo los espectros en el rango de 350 – 600 nm con una longitud de onda de excitación de 365 nm y utilizando celdas de cuarzo con paso de luz de 10 mm. El límite de detección para AFB1 fue de 0.5 ng/mL. Para tratar de esclarecer el mecanismo y las interacciones involucrados en la adsorción *in vitro* de la AFB1 se obtuvieron los espectros FTIR-ATR de la formulación, la AFB1 y la combinación de ambos en el rango de 4000 – 400 cm^{-1} , para lo cual se preparó una solución de AFB1 de 1 $\mu\text{g/mL}$ en una solución buffer de pH 6.6, la cual se dividió en 2 partes, a la primera parte se le adicionó el 1% (p/v) de la formulación de los polímeros celulósicos, y a la segunda parte no se le adicionó nada. Se preparó también una suspensión al 1% (p/p) en buffer de pH 6.6 solo con la formulación de los polímeros celulósicos. Estos sistemas se agitaron durante 2 h a 40°C y al término de este tiempo se obtuvieron los espectros. Por último, se obtuvieron los perfiles de disolución de la formulación que contenía la dispersión sólida de CUR, para lo cual se utilizó el Aparato USP IV de celdas de flujo continuo (modelo CE 7Smart, SOTAX). El equipo se utilizó con una configuración de sistema cerrado, por lo que un volumen constante de medio de disolución estuvo recirculando a través de las celdas durante la prueba. En la Tabla 3 se resumen las condiciones de operación con las cuales obtuvieron los perfiles de disolución.

Tabla 3. Condiciones de operación de la prueba de disolución en el Aparato USP IV.

Condición de Operación	Especificación
Equipo de disolución	Equipo IV USP (celdas de flujo continuo) marca SOTAX modelo CE 7Smart
Tipo de celda	Celda para tabletas de 22.6 mm
Medio de disolución	pH 1.6, 5.2 y 7.0
Volumen del medio	150 mL
Filtro	Filtros de Microfibra de Vidrio Whatman® GF/C (1.2 μm)
Temperatura de la prueba	40°C \pm 0.5
Velocidad de flujo	16 mL/min
Perlas de vidrio	Colocar una perla de 5 mm de diámetro y posteriormente llenar la base cónica de la celda con perlas de vidrio de 1mm de diámetro.
Muestra	N = 6
Tiempos de muestreo (min)	2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 30, 45 y 60.

6.6. Evaluación *in vivo* de las formulaciones

6.6.1. Animales, dietas y diseño experimental

La evaluación *in vivo* de las formulaciones desarrolladas se llevó a cabo utilizando 150 pollos de engorda machos Cobb-Vantress de un día de edad, los cuales fueron criados en corrales durante 21 días. El día del nacimiento, los polluelos fueron etiquetados en el cuello, pesados individualmente y asignados aleatoriamente a uno de los cinco grupos experimentales: control negativo (alimento libre de micotoxinas); AFB1 (alimento + 2 ppm de AFB1); CUR (alimento + 2 ppm de AFB1 + 0.2% de dispersión sólida de curcumina); CEL (alimento + 2 ppm de AFB1 + 0.3% de la formulación de polímeros celulósicos); y, CEL+CUR (alimento + 2 ppm de AFB1 + 0.3% de la formulación de polímeros celulósicos + 0.2% de dispersión sólida de curcumina). Cada grupo tuvo 3 réplicas de 10 pollos (n = 30/grupo). Se utilizó alimento iniciador a base de maíz y soya, no fue medicada y se formuló para aproximar los requerimientos nutricionales de los pollos de engorda.

La AFB1 fue proporcionada por el Dr. George E. Rottinghaus, del Laboratorio de Diagnóstico Médico Veterinario, Universidad de Missouri, y fue producida a través de la fermentación de arroz utilizando la cepa *Aspergillus parasiticus* (NRRL 2999). El análisis de las muestras de arroz en polvo arrojó un contenido total de AF de la siguiente forma: 74.62% de AFB1, 22.38% de AFG1, 2.48% de AFB2 y 0.49% de AFG2. La AFB1 se adicionó al alimento de las aves y se mezcló lo suficientemente bien para alcanzar la concentración especificada de manera homogénea. Cada tratamiento se agregó a la concentración especificada en la dieta experimental correspondiente y se mezclaron homogéneamente. Las aves tuvieron acceso *ad libitum* al agua y al alimento. Este estudio se realizó de acuerdo con las recomendaciones del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (IACUC) de la Universidad de Arkansas, Fayetteville, con el protocolo #15006, aprobado el 28 de mayo de 2015.

6.6.2. Parámetros de productivos

Las réplicas en el experimento se usaron como unidades experimentales para el cálculo de los parámetros productivos de las aves. El peso individual de las aves y la ingesta de alimento por corral se registraron semanalmente durante 21 días. El peso corporal (BW), la ganancia de peso corporal (BWG), la ingesta de alimento (FI) y el índice de conversión alimenticia (FCR) se calcularon cada semana.

6.6.3. Peso relativo de los órganos

El día 21, todas las aves fueron sacrificadas humanitariamente por inhalación de CO₂. Se extrajeron el hígado, el bazo, la bolsa de Fabricio y el intestino de 15 aves por grupo (5 aves de cada réplica), se limpiaron los tejidos adherentes, se enjuagaron con solución salina al 0.9% y se conservaron a 4°C hasta determinar su peso. También se calculó la relación del peso bazo/bolsa de Fabricio. El peso de estos órganos se midió y se expresó como peso relativo:

$$\text{Peso relativo} = \frac{\text{Peso del órgano}}{\text{Peso corporal final}} \times 100$$

6.6.4. Evaluación de lesiones histológicas en tejido hepático

Se evaluó la degeneración hepatocelular, la infiltración linfoide y heterófila en el hígado de las aves experimentales. Para esto, se extrajo el hígado de 12 aves de cada grupo experimental (4 aves de cada réplica) el día 21. Los hígados se limpiaron de tejidos adherentes, se enjuagaron con solución salina al 0.9% y luego se fijaron en formaldehído neutro tamponado al 10%. Una vez fijados, una sección transversal de la parte media del lóbulo hepático izquierdo se procesó rutinariamente, se deshidrató en concentraciones crecientes de alcohol y se embebió en parafina. Las muestras de tejido se seccionaron con un espesor de 5 µm, se tiñeron con hematoxilina y eosina, y se montaron en cubreobjetos para su análisis histológico. La degeneración hepatocelular se puntuó de la siguiente manera: 0 =

ausencia de inflamación celular; 0.5 = degeneración vacuolar y/o deposición de grasa leve; 1 = degeneración vacuolar y/o deposición de grasa leve a moderada; 2 = degeneración vacuolar y/o deposición moderada de grasa; 3 = degeneración vacuolar y/o deposición de grasa moderada a severa; y 4 = degeneración vacuolar y/o deposición grasa severa. La puntuación total se obtuvo mediante la evaluación de cinco campos por corte de tejido con un aumento de 20x. Se calculó la mediana, la moda y la varianza de los puntajes obtenidos.

La cuantificación de las células inflamatorias (tanto linfocitos como heterófilos) se obtuvo utilizando la siguiente metodología. En un campo general desde el extremo superior izquierdo del corte de tejido, con el objetivo 5x, se evaluó un área de 3.4 mm². Se contó el número total de áreas perivasculares y grupos de células inflamatorias de cada corte de tejido. Se excluyeron aquellos campos con menos de cuatro áreas perivasculares o grupos de células inflamatorias. Para cuantificar el número de capas en el área perivascular, se usó el radio más grande que contenía un número significativo de capas perivasculares junto al centro del polígono en la vena. En los agregados linfoides, las células inflamatorias se cuantificaron contando el número de capas celulares al considerar el radio resultante del diámetro más grande del grupo. El número de agregados se multiplicó por el número de capas y se obtuvo el promedio. La puntuación de la lesión se asignó de la siguiente forma: Puntuación: 0 = ninguna capa celular por agregado celular (ausencia de infiltrado inflamatorio); 0.5 = 1 – 11 capas celulares por agregado celular (infiltrado inflamatorio leve); 1 = 12 – 24 capas de células por agregado celular (infiltrado inflamatorio leve a moderado); 2 = 25 – 50 capas celulares por agregado celular (infiltrado inflamatorio moderado); 3 = 51 – 100 capas celulares por agregado celular (infiltrado inflamatorio moderado a severo); y 4 = más de 100 capas celulares por agregado celular (infiltrado inflamatorio severo). Se calculó la mediana, la moda y la varianza del total de los puntajes.

6.6.5. Análisis bioquímico en suero

Después del sacrificio de las aves el día 21, se seleccionaron al azar 12 aves de cada tratamiento (4 aves de cada réplica) y se tomaron muestras de sangre de la vena femoral antes

de la necropsia. La sangre se centrifugó a $1100 \times g$ a 4°C durante 15 min; el suero se separó y se conservó a -20°C hasta que se sometió a análisis bioquímico. Se determinó la concentración sérica de albúmina, proteínas totales, fosfatasa alcalina (ALP), alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), gamma-glutamyltransferasa (GGT), nitrógeno ureico en sangre (BUN), colesterol, triglicéridos, glucosa, creatinina, ácido úrico, fósforo, magnesio y hierro utilizando un analizador de química clínica Corning (Chiron Corporation). La actividad de la superóxido dismutasa (SOD), así como los niveles de mucina, citrulina y proteína C reactiva (CRP), se determinaron en muestras de suero usando kits de análisis comerciales y siguiendo las instrucciones del fabricante. Para SOD se usó un kit de ensayo para determinar los tres tipos de SOD (Cu/Zn, Mn y FeSOD) (catálogo no. 706002, Cayman Chemical Company), con una dilución óptima de las muestras de 1:5. Para la determinación cuantitativa de las concentraciones séricas de mucina, citrulina y CRP se utilizaron kits ELISA que emplean la técnica de sandwich de doble antígeno (catálogo no. MBS2505849, MBS2601045 y MBS261842, respectivamente, MyBioSource), utilizando muestras de suero sin diluir para mucina y citrulina, y una dilución óptima de 1:20 para la CRP. Todas las muestras se midieron a 450 nm utilizando un lector de microplacas multimodo (modelo Synergy HT, BioTek Instruments, Inc.).

6.6.6. Niveles intestinales de IgA

Los niveles de IgA intestinal se determinaron en muestras de la mucosa intestinal obtenidas mediante lavados con solución salina. Para esto, se extrajo el intestino de 12 aves por grupo (4 aves de cada réplica) después del sacrificio el día 21. Posteriormente, se tomaron secciones de intestino de 5 cm (a partir del divertículo de Meckel), se enjuagaron y luego se extruyeron 3 veces con 5 mL de solución salina al 0.9% para obtener la mucosa intestinal. El líquido de los enjuagues se recolectó en un tubo y se centrifugó a $2000 \times g$ a 4°C durante 10 min, recuperando el sobrenadante y congelándolo a -20°C hasta que fue utilizado. Para la cuantificación de la IgA se utilizó un ensayo de ELISA indirecto, con el kit comercial (catálogo no. E30-103, Bethyl Laboratories Inc.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se usaron placas de 96 pocillos (catálogo no. 439454, Nunc MaxiSorp) y se leyeron a 450

nm. La dilución óptima para la cuantificación total de IgA en de la mucosa intestinal fue de 1:100.

6.6.7. Evaluación de la inmunidad humoral: producción de anticuerpos contra el virus de la enfermedad de Newcastle

El primer día, antes de que todos los pollitos se separaran para formar los grupos, se tomaron muestras de sangre y se determinó el título de anticuerpos maternos contra el virus de la enfermedad de Newcastle utilizando un kit comercial ELISA (catálogo no. NDV-0200, AffiniTech, LTD.). Posteriormente, todos los pollitos fueron vacunados contra la enfermedad de Newcastle (ND) - Bronquitis infecciosa (BI), (vacuna cepa B1 ND más los serotipos Mass & Ark IB, virus vivo CEO, Merial), mediante administración ocular. El día 14, las aves fueron vacunadas nuevamente con la misma vacuna. El día 21, se seleccionaron al azar 12 aves por tratamiento (4 aves de cada réplica), se sacrificaron humanitariamente por inhalación de CO₂ y se tomaron muestras de sangre de la vena femoral antes de la necropsia. La sangre se centrifugó a $1118 \times g$ a 4°C durante 15 min, el suero se separó y se conservó a -20 ° C hasta su uso. El título de anticuerpos contra ND se determinó usando el mismo kit comercial ELISA.

6.6.8. Evaluación de la inmunidad celular: respuesta cutánea a fitohemaglutinina (PHA)

Para evaluar la actividad inmune celular, se utilizó la respuesta de hipersensibilidad basófila cutánea (CBH) inducida por la fitohemaglutinina en la piel interdigital de las aves. El día 18, se seleccionaron al azar 12 aves de cada tratamiento (4 aves por réplica) y se inyectaron por vía intradérmica en la piel interdigital entre el tercer y cuarto dígito de la pata derecha con 0.1 mL de PHA-M (catálogo no. 10576015, Gibco). La respuesta de CBH se evaluó determinando el grosor de la piel interdigital en el sitio de inyección con un calibrador

digital antes de la inyección, y 12 y 24 h después de la inyección. La respuesta de CBH se calculó mediante:

$$\text{Respuesta CBH (mm)} = \text{grosor a las 12 y 24 h postinyección} - \text{grosor preinyección}$$

6.6.9. Pigmentación de la piel

El perfil de color del sistema CIE de luminosidad (L^*), enrojecimiento (a^*) y amarillez (b^*) se midió usando un colorímetro de reflectancia (modelo Minolta Chroma Meter CR-300, Minolta) para evaluar los cambios de pigmentación en la piel de las aves. Para esto, el día 20 se llevó a cabo la medición de color de 12 aves de cada tratamiento (4 aves por réplica) en la piel del muslo y la almohadilla plantar.

6.7. Evaluación *in vivo* de un DFM contra los efectos tóxicos de la AFB1

6.7.1. Selección del DFM candidato

Diversas investigaciones realizadas en el laboratorio de salud avícola de la Universidad de Arkansas se han centrado en el aislamiento de varias cepas bacterianas de fuentes ambientales y avícolas con propiedades probióticas. En el presente proyecto, el candidato DFM fue un cultivo de esporas que se produce a partir de tres cepas bacterianas del género *Bacillus* combinadas en proporciones iguales (1:1:1), dos cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* y una más de *Bacillus subtilis*, que se identificaron previamente mediante análisis de secuenciación 16S rRNA. Sus procedimientos de evaluación, selección, aislamiento, caracterización y esporulación se han descrito anteriormente [212]. El DFM se agregó al alimento para obtener la dieta experimental con una concentración final de 10^6 esporas/g de alimento.

6.7.2. Animales, dietas y diseño experimental

El estudio se llevó a cabo en 90 pollos de engorda macho Cobb 500 de 1 día de edad (Cobb-Vantress Inc., Arkansas) que fueron criados en corrales durante 21 días. El día de su nacimiento, los pollitos fueron etiquetados en el cuello, pesados individualmente y asignados aleatoriamente a uno de los tres grupos experimentales: control negativo (alimento libre de micotoxinas), AFB1 (alimento + 2 ppm de AFB1) y DFM (alimento + 2 ppm AFB1 + DFM). Cada grupo tuvo tres réplicas de 10 pollos ($n = 30/\text{grupo}$). Se utilizó alimento iniciador a base de maíz y soya, no fue medicada y se formuló para aproximar los requerimientos nutricionales de los pollos de engorda. Se añadió la AFB1 a las dietas y se mezcló para alcanzar la concentración especificada. El candidato *Bacillus*-DFM se agregó a la dieta experimental y se mezcló completamente a la concentración especificada. Las aves tuvieron acceso *ad libitum* al agua y al alimento. Todos los procedimientos de manejo de animales cumplieron con el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (IACUC) en la Universidad de Arkansas, Fayetteville. Específicamente, el IACUC aprobó este estudio bajo el protocolo No. 15006.

6.7.3. Evaluación de los parámetros productivos, inmunológicos y bioquímicos séricos

El resto del estudio se realizó exactamente igual que el estudio *in vivo* para evaluar la efectividad de las formulaciones de polímeros celulósicos y CUR, siguiendo los procedimientos que se encuentran descritos del numeral 6.6.2 al 6.6.8 de esta sección.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del estudio para seleccionar los polímeros con mejor capacidad de adsorción para las micotoxinas evaluadas, utilizando un modelo gastrointestinal *in vitro*, se resumen en la Tabla 4 y la Figura 5. Los grupos control, que no contenían ningún polímero adsorbente, se consideraron con porcentajes de adsorción del 0.00%. Para AFB1, los mejores materiales adsorbentes fueron CMC (44.6%) y HPMC (43.1%), seguidos por CHI (37.5%) y MCC (35.4%). Para FUB1, los materiales que mostraron la mayor capacidad adsorbente fueron los polímeros celulósicos, HPMC (54.1%); CMC (52,9%) y MCC (48,1%); seguidos por el CHI (34%). Curiosamente, HPMC fue el material que mostró la mejor actividad de adsorción para OTA con un 86.3%, seguido de CMC (69.8%) y MCC (60.5%). El material con la capacidad adsorbente más baja contra esta micotoxina fue CHI (50,6%). Los mejores polímeros adsorbentes para T-2 fueron, una vez más, los materiales celulósicos HPMC (51,9%); CCM (40,6%); y, CMC (39.5%). CHI (26.7%) mostró capacidad adsorbente moderada contra T-2. Para DON, CMC (36.3%) y HPMC (31.4%) fueron los dos materiales que mostraron la mejor actividad de adsorción, seguidos por MCC (16.7%). No se observaron diferencias significativas con CHI (3.5%) en comparación con el grupo control (0.0%). MCC (89.7%) y CMC (83.5%) mostraron la mayor actividad de adsorción para ZEA, seguidos por HPMC (77.6%) y CHI (75.6%).

Puesto que es raro encontrar granos contaminados con una sola micotoxina, debido a que muchas especies de hongos pueden crecer y producir diversas micotoxinas en condiciones ambientales similares, y que el alimento para animales se compone de varios ingredientes que pueden estar contaminados con micotoxinas diferentes, el método más práctico para contrarrestar sus efectos tóxicos en animales es el uso de adsorbentes [132,133]. Sin embargo, los adsorbentes de micotoxinas que se utilizan comúnmente no poseen buenas propiedades de adsorción contra múltiples micotoxinas [6]. Se ha demostrado que varios materiales inorgánicos, como las bentonitas y los aluminosilicatos, o las arcillas en general, tienen propiedades adsorbentes para reducir el efecto tóxico de las AF, pero tienen una eficacia limitada contra otras micotoxinas [6,134]; además, deben incorporarse en

concentraciones altas que pueden comprometer la biodisponibilidad de algunos nutrientes de la dieta, reduciendo así el rendimiento de los animales. Por otro lado, algunos de estos materiales inorgánicos también contienen metales pesados, lo que limita su uso como aditivos alimenticios e impiden el uso del estiércol de los animales tratados como fertilizante. Por estas razones, durante la última década se han llevado a cabo varios estudios con otro tipo de materiales adsorbentes [83,103]; y aunque algunos de estos materiales ofrecen un gran potencial para adsorber micotoxinas presentes en el alimento, todavía no existe un material adsorbente que cumpla con todas las características deseables. Los polímeros naturales o sintéticos son moléculas grandes que están compuestas de muchos monómeros que tienen amplias propiedades, los cuales abarcan desde los plásticos sintéticos que se utilizan para la fabricación de plásticos, hasta los biopolímeros naturales como la celulosa, el biopolímero y la fuente de carbono más abundante en la tierra [135]. Su gran peso molecular en relación con el tamaño molecular tan pequeño produce propiedades físicas únicas que desempeñan papeles importantes en nuestra sociedad. En esta primera parte del proyecto, se evaluaron cuatro materiales poliméricos que han sido estudiados como materiales adsorbentes, excepto para micotoxinas, incluyendo el quitosano (CHI) y tres polímeros celulósicos (HPMC, CMC y MCC). Se utilizó un modelo de digestibilidad *in vitro*, el cual tiene la ventaja de que incluye todos los cambios de pH a través del tracto digestivo de las aves de corral (5.2 para el buche; 1.8 para el proventrículo y 6.6 para el tracto intestinal). Los polímeros evaluados se utilizan ampliamente como excipientes y aditivos en las industrias farmacéutica y alimentaria, y aunque los tres polímeros celulósicos HPMC, CMC y MCC se utilizan como adsorbentes para la eliminación de colorantes y contaminantes de medios acuosos [136,137], hasta donde sabemos, esta es la primera vez que se prueba su capacidad para adsorber micotoxinas. Observamos que estos materiales mostraron una excelente actividad adsorbente contra las seis micotoxinas evaluadas. La HPMC tuvo una actividad de unión muy buena; sin embargo, dado que se trata de un polímero no iónico que en contacto con agua o fluidos gastrointestinales se hincha y forma una capa de gel alrededor del núcleo seco de la matriz de polímero [138], la formación de esta capa de gel conduce al aumento significativo de la viscosidad, descalificándolo como un buen candidato para la industria animal, particularmente la de las aves de corral. La CMC y MCC tuvieron una capacidad de adsorción

muy similar contra las seis micotoxinas, excepto que la CMC mostró mayor adsorción contra DON (36.2%), en comparación con la MCC (16.7%). La CMC es un polisacárido aniónico cuyas unidades monoméricas contienen tres grupos OH, los cuales están disponibles para formar puentes de hidrógeno. Diversos estudios han demostrado que las principales fuerzas responsables de la capacidad de adsorción de la CMC es una combinación de interacciones electrostáticas y puentes de hidrógeno [139]. Además, la CMC es neutral a valores de pH bajos pero se hidroliza a valores de pH altos (a pH alto, la CMC pierde su contraión positivo de Na⁺, adquiriendo una carga negativa)[140], lo que sugiere que se comportará bien como adsorbente de micotoxinas en las diferentes condiciones de pH del tracto gastrointestinal de las aves de corral. Por otro lado, la MCC es una celulosa purificada y parcialmente despolimerizada que posee una considerable inercia química y física. Los mecanismos de adsorción de MCC corresponden principalmente a una adsorción de monocapa en su superficie. Algunos estudios han demostrado que la atracción electrostática (adsorción física) es el mecanismo de adsorción dominante de la MCC [97].

Los resultados de esta prueba proponen el uso de MCC como un potencial adsorbente de micotoxinas, aunque aún se requiere una mejora adicional para aumentar la capacidad de adsorción. Con respecto al CHI, este biopolímero ha demostrado tener usos prometedores como adsorbente de algunas micotoxinas, iones de metales pesados y colorantes [103]. Además, se ha probado para eliminar OTA de bebidas contaminadas, demostrando que el CHI puede reducir los niveles de esta micotoxina [141,142]. Nuestros resultados comprueban la capacidad del CHI para adsorber moderadamente cinco de las seis micotoxinas evaluadas, a excepción de DON, aunque su capacidad de adsorción resultó menor en comparación con los polímeros celulósicos. Aunque en este estudio se evaluó la efectividad del CHI no entrecruzado, la formación de partículas de CHI entrecruzado podría mejorar su capacidad de adsorción. Los resultados de este estudio *in vitro* sugieren que los polímeros celulósicos (HPMC, CMC y MCC) mostraron mejor capacidad adsorbente contra las seis micotoxinas evaluadas en comparación con el CHI. Sin embargo, el aumento de la viscosidad causado por HPMC lo descalifica como un buen candidato como material adsorbente para animales monogástricos. Por otro lado, tanto la CMC como la MCC también demostraron notables

propiedades de adsorción contra las seis micotoxinas evaluadas, lo que sugiere que pueden ser candidatos como materiales adsorbentes usados en el alimento para aves de corral y otros animales monogástricos.

Tabla 4. Evaluación de la capacidad adsorbente para micotoxinas en un modelo gastrointestinal *in vitro*¹.

Adsorbente	Micotoxina					
	AFB ₁ (ng/mL)		Adsorción ² (%)	FUB ₁ (ng/mL)		Adsorción ² (%)
	Inicial	No adsorbida		Inicial	No adsorbida	
Control		12.00 ± 0.43 ^a	0.00 ^b		1832.33 ± 43.21 ^a	0.00 ^c
HPMC		6.833 ± 1.12 ^b	43.06 ± 9.33 ^a		840.67 ± 67.98 ^c	54.12 ± 3.71 ^a
CMC	12.00	6.65 ± 0.85 ^b	44.58 ± 7.12 ^a	1832.33	863.00 ± 54.51 ^c	52.90 ± 2.97 ^a
MCC		7.75 ± 0.45 ^b	35.42 ± 3.78 ^a		951.00 ± 44.75 ^c	48.10 ± 2.44 ^a
CHI		7.50 ± 0.31 ^b	37.50 ± 2.55 ^a		1208.67 ± 144.15 ^b	34.04 ± 7.87 ^b
SEM ³	-	0.70	5.63	-	80.30	4.25
Valor de <i>p</i>	-	0.0017	0.0013	-	0.0000	0.0000
Adsorbente	Micotoxina					
	OTA (ng/mL)		Adsorción ² (%)	T-2 (ng/mL)		Adsorción ² (%)
	Inicial	No adsorbida		Inicial	No adsorbida	
Control		28.32 ± 2.52 ^a	0.00 ^d		174.83 ± 7.20 ^a	0.00 ^d
HPMC		3.87 ± 0.48 ^d	86.35 ± 1.70 ^a		84.17 ± 6.27 ^c	51.86 ± 3.59 ^a
CMC	28.32	8.55 ± 0.33 ^{c,d}	69.81 ± 1.15 ^b	174.83	105.83 ± 4.60 ^c	39.47 ± 2.63 ^b
MCC		11.18 ± 2.24 ^{b,c}	60.51 ± 7.90 ^{b,c}		103.83 ± 3.98 ^c	40.61 ± 2.28 ^b
CHI		13.98 ± 0.90 ^b	50.63 ± 3.16 ^c		128.17 ± 10.54 ^b	26.69 ± 6.03 ^c
SEM ³	-	1.58	3.92	-	6.92	3.50
Valor de <i>p</i>	-	0.0000	0.0000	-	0.0000	0.0000
Adsorbente	Micotoxina					
	DON (ng/mL)		Adsorción ² (%)	ZEA (ng/mL)		Adsorción ² (%)
	Inicial	No adsorbida		Inicial	No adsorbida	
Control		99.35 ± 1.86 ^a	0.00 ^c		115.33 ± 7.17 ^a	0.00 ^c
HPMC		68.12 ± 4.09 ^c	31.43 ± 4.12 ^a		25.83 ± 2.83 ^b	77.60 ± 2.46 ^b
CMC	99.35	63.31 ± 3.92 ^c	36.27 ± 3.94 ^a	115.33	19.00 ± 5.25 ^{b,c}	83.53 ± 4.55 ^{a,b}
MCC		82.77 ± 2.96 ^b	16.69 ± 2.98 ^b		11.83 ± 3.06 ^c	89.74 ± 2.65 ^a
CHI		95.82 ± 1.92 ^a	3.55 ± 1.93 ^c		28.17 ± 1.20 ^b	75.58 ± 1.04 ^b
SEM ³	-	3.10	3.00	-	4.42	2.64
Valor de <i>p</i>	-	0.0000	0.0000	-	0.0000	0.0000

¹ Cada valor representa la media ± error estándar. ² Calculado en función del tratamiento control que no contenía adsorbente. ^{a-d} No hay diferencia significativa entre los valores etiquetados con el mismo superíndice en una columna (*p* < 0.05). ³ Error estándar de las medias. HPMC = Hidroxipropilmetilcelulosa, CMC = Carboximetilcelulosa, MCC = Celulosa microcristalina, CHI = Quitosano, AFB₁ = Aflatoxina B₁, FUB₁ = Fumonisinina B₁, OTA = Ocratoxina A, T-2 = Toxina T-2, DON = Deoxinivalenol y ZEA = Zearalenona.

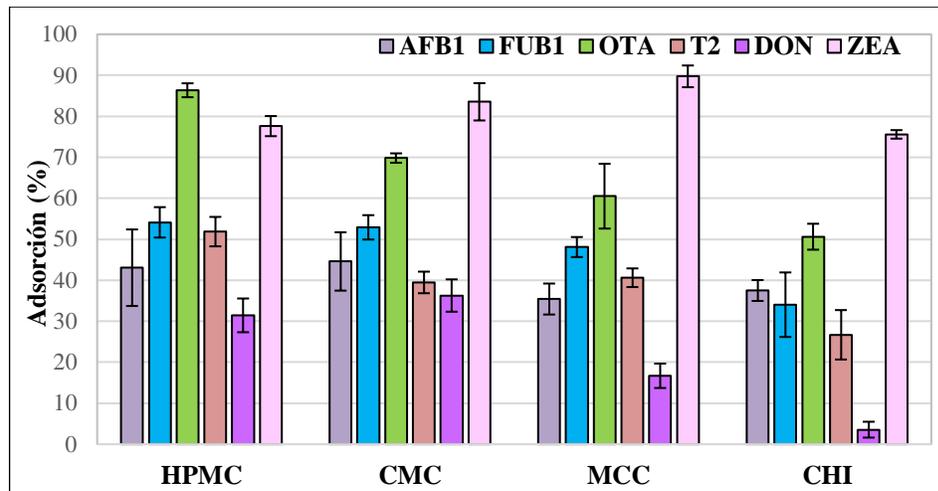


Figura 5. Porcentaje de adsorción de múltiples micotoxinas por los adsorbentes evaluados. Las barras representan los valores promedio. Las barras de error muestran el intervalo alrededor de cada media, basado en el método de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. HPMC = Hidroxipropilmetilcelulosa, CMC = Carboximetilcelulosa, MCC = Celulosa microcristalina, y CHI = Quitosano, AFB1 = Aflatoxina B1, FUB1 = Fumonisina B1, OTA = Ocratoxina A, T-2 = Toxina T-2, DON = Deoxinivalenol y ZEA = Zearalenona.

Con base en los resultados obtenidos, los polímeros seleccionados para llevar a cabo la formulación adsorbente fueron la MCC y la CMC, utilizadas en una proporción de 9:1, respectivamente. Para identificar los grupos funcionales específicos en estos polímeros, se llevaron a cabo estudios de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflexión total atenuada (FTIR-ATR) en los dos polímeros celulósicos y en la mezcla de ambos, en la Figura 6 se muestra la comparación de los espectros FTIR, donde los porcentajes más altos de transmitancia relativa representan menor cantidad de grupos funcionales.

En los espectros FTIR de la Figura 6 se puede observar que los dos polímeros y la mezcla de ambos poseen espectros característicos de la celulosa, en los cuales se puede ubicar fácilmente una banda fuerte y amplia entre $3600 - 3000 \text{ cm}^{-1}$, atribuible a las vibraciones de estiramiento de los grupos O-H presentes en el esqueleto polihidroxilado del polisacárido. Se pueden observar otras bandas de absorción más débiles en la región de $3000 - 2850 \text{ cm}^{-1}$, la cual se asocia al estiramiento de los grupos C-H de las unidades de glucosa presentes en la estructura química de la celulosa. Para la MCC y la mezcla de celulosas, la banda entre $1430 - 1400 \text{ cm}^{-1}$ y la banda en 1315 cm^{-1} corresponden a vibraciones de tijera de los enlaces C-H₂, mientras que en el espectro de la CMC se pueden observar las principales bandas

vibratorias relacionadas con los tramos asimétricos en 1600 cm^{-1} , y simétricos en 1420 cm^{-1} y 1323 cm^{-1} , de los grupos carboxilo COO^- , los cuales se encuentran superpuestos con la banda de agua adsorbida entre $1630 - 1650\text{ cm}^{-1}$, la cual si se observa en los espectros de la MCC y la mezcla de los dos polímeros. Las bandas de absorción presente en los tres espectros entre 1100 y 1000 cm^{-1} se atribuyen a las vibraciones de los grupos C–O de los alcoholes secundarios y éteres existentes en la estructura de la celulosa, mientras que la banda que se observa claramente en los espectros de MMC y de la mezcla de los dos polímeros en 1160 cm^{-1} corresponde al estiramiento simétrico y las vibraciones de los grupos C–O–C del anillo de la β -glucopiranososa que constituye a la celulosa. Tanto la MCC como la mezcla de ambas celulosas presentaron una pequeña banda en 900 cm^{-1} , que está relacionada con la deformación del grupo del carbono anomérico C1–H, la flexión del grupo O–H y la vibración del anillo característicos de los enlaces glucosídicos $\beta(1\rightarrow4)$ entre las unidades de anhidroglucosa [143–145].

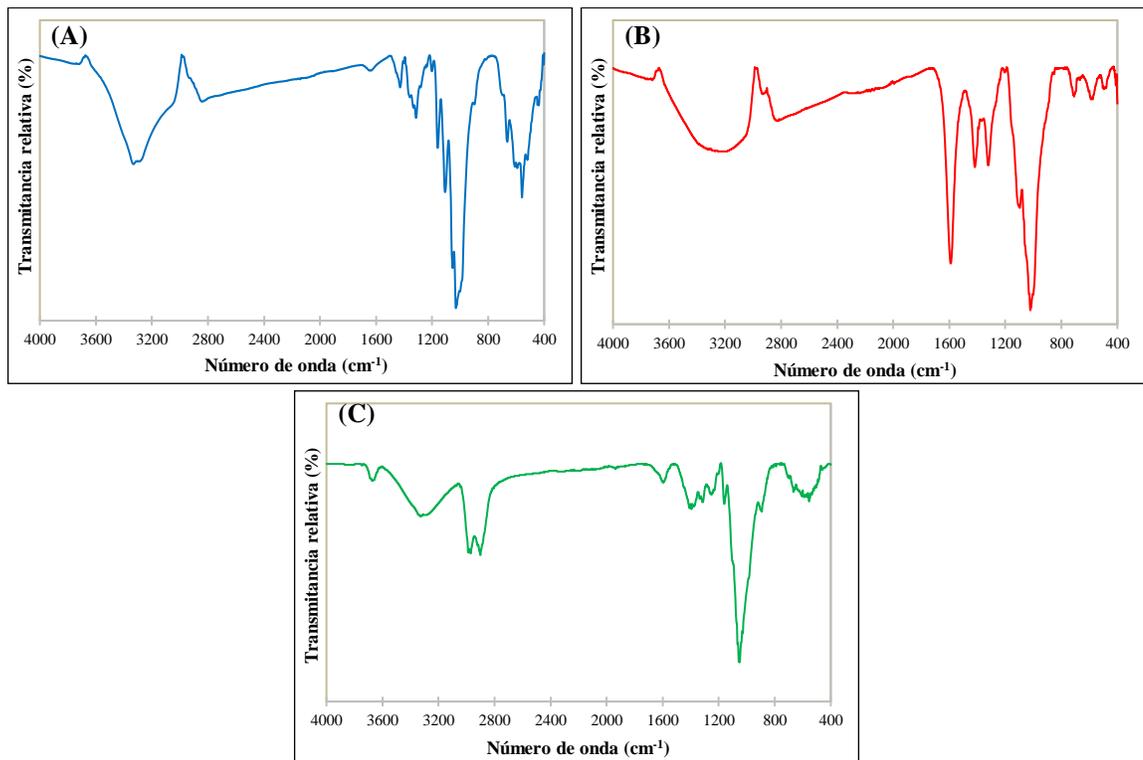


Figura 6. Espectros comparativos FTIR de (A) celulosa microcristalina (MCC), (B) carboximetilcelulosa (CMC) y (C) mezcla de estos dos polímeros celulósicos en proporción 9:1, respectivamente.

Para analizar la morfología y la superficie de los polímeros evaluados se utilizó microscopía electrónica de barrido, las micrografías se presentan en la Figura 7. Como se puede observar, la MCC está compuesta principalmente por agregados y partículas de geometría semi esférica, con bastante porosidad y rugosidad en la superficie; mientras que la CMC presenta una estructura conformada por fibrillas aglomeradas entre sí con una porosidad menor, pero con una superficie rugosa cuyas fibras no presentan continuidad identificable. La mezcla de estos dos polímeros celulósicos resulta en partículas con geometría semi esférica con una superficie fibrilar con bastante porosidad, es decir, una combinación de la estructura y superficie de los dos materiales poliméricos. Por otra parte, el análisis EDS nos indica, como era de esperarse, que los únicos elementos que componen a los polímeros estudiados son carbono y oxígeno, en una composición porcentual de masa aproximada del 72 y 28%, respectivamente.

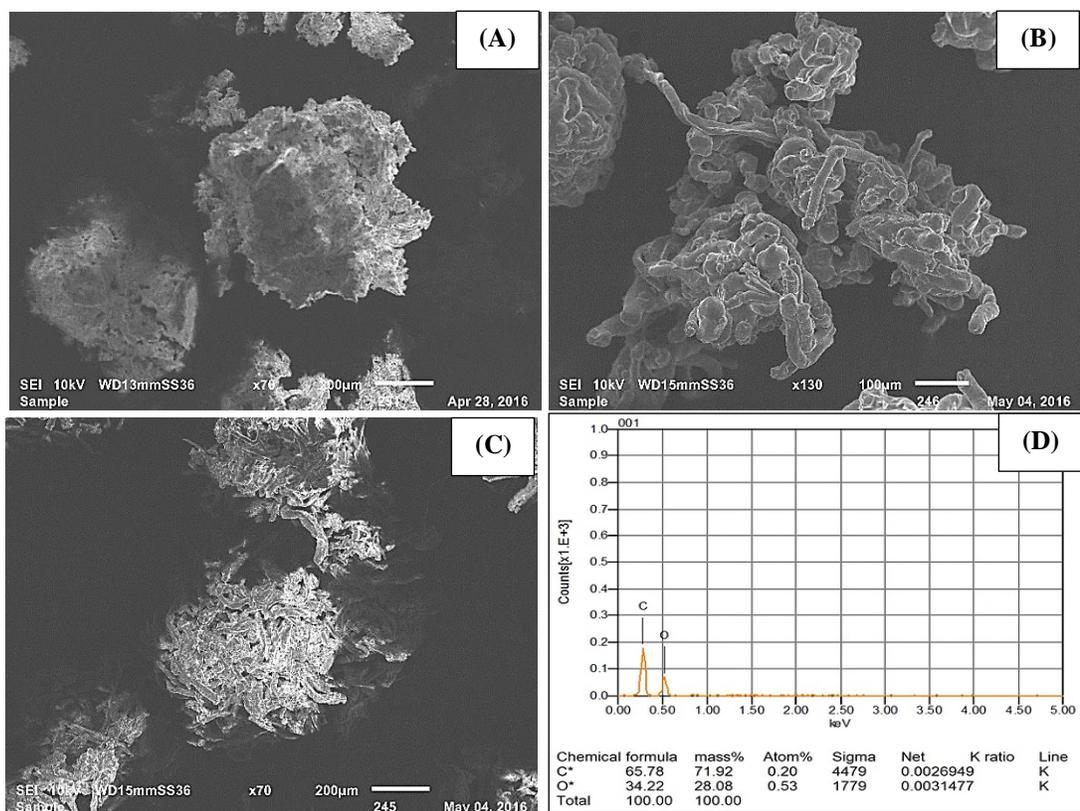


Figura 7. Micrografías de (A) celulosa microcristalina (MCC), (B) carboximetilcelulosa (CMC) y (C) mezcla de estos dos polímeros celulósicos en proporción 9:1, respectivamente, y (D) espectro EDS de los polímeros celulósicos.

Respecto al comportamiento térmico de los polímeros celulósicos, se observaron solamente fenómenos de transición vítrea (T_g), debido a que en este rango de temperatura los polímeros celulósicos no mostraron otro tipo de eventos térmicos debido a su relativa estabilidad térmica, que deriva de su mayor cristalinidad y menor contenido de humedad. Está reportado que los eventos endotérmicos generados por la descomposición de la MCC ocurren después de los 300°C, y las transiciones por debajo de esta temperatura son numerosas, complejas y sutiles, pudiendo estar asociadas con transiciones vítreas que se presentan en tripletes y con posibles transiciones menores a la T_g , ya que los principales factores que afectan la T_g de los materiales poliméricos semi-cristalinos son la composición química de la molécula del polímero y el peso molecular de las regiones amorfas [146–148]. Respecto a la CMC, el termograma muestra un evento endotérmico relativamente amplio alrededor de 130°C, que corresponde a la T_g . Al igual que en la MCC, los eventos térmicos en la CMC comienzan a observarse a temperaturas mayores a 250°C, y corresponden a eventos asociados a la descomposición de la cadena principal [149,150]. La mezcla de los dos polímeros celulósicos resulta en un termograma muy similar al de la MCC, ya que es este polímero el que se encuentra en mayor proporción dentro de la mezcla, lo cual nos indica que no existe ninguna interacción química en la mezcla de estos dos polímeros.

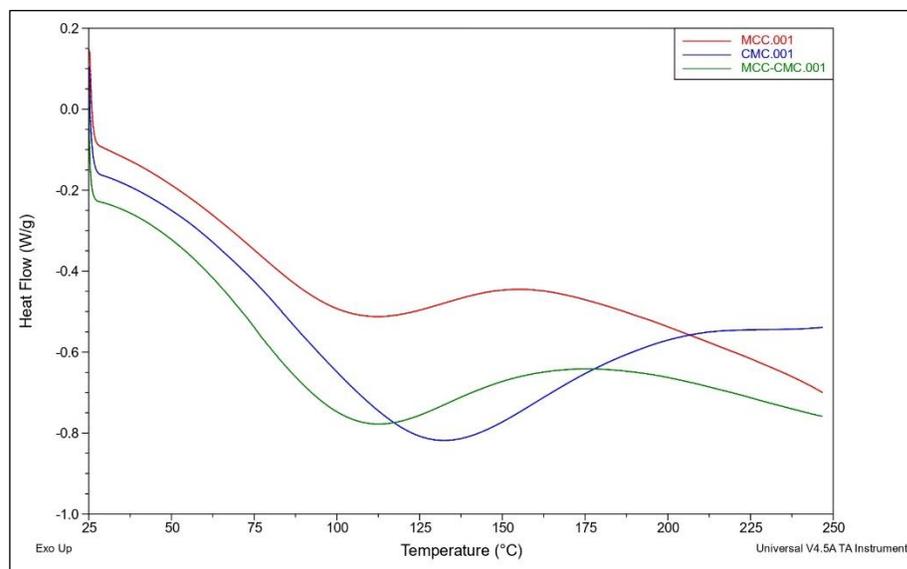


Figura 8. Análisis por DSC de la celulosa microcristalina (MCC), la carboximetilcelulosa (CMC) y la mezcla de estos dos polímeros.

Para incrementar la solubilidad de la CUR se preparó una dispersión sólida utilizando PVP K30 como acarreador. Los resultados respecto a la mejora de la solubilidad de la CUR debido al uso de la dispersión sólida se resumen en la Tabla 5, en donde se puede observar que a pH 1.2 y 5.2, la CUR mostró una solubilidad muy baja (por debajo del límite de detección del método analítico utilizado para la cuantificación), y a pH 6.4 la solubilidad no se pudo determinar debido a la degradación que sufre la CUR. Sin embargo, cuando la CUR se preparó como dispersión sólida utilizando la PVP, su solubilidad mejoró significativamente, particularmente en la relación CUR/PVP de 1:9, lo cual se atribuye a los cambios en el estado sólido de la CUR durante la formación de la dispersión, ya que hay una conversión del estado cristalino de la CUR a una forma amorfa de alta energía [151]. Otra clara ventaja del uso de la dispersión sólida fue la mayor estabilidad que tuvo la CUR en medios con pH de neutros a básicos, lo cual se debe a que entre la PVP y la CUR se forman puentes de hidrógeno en la posición hidroxilo del fenol, y el grupo carbonilo de la PVP forma enlaces iónicos positivos y negativos con el grupo bicarbonilo de la CUR, otorgándole mayor estabilidad [152].

Tabla 5. Solubilidad de la curcumina (CUR) y de las dispersiones sólidas (CUR/PVP) en diferentes proporciones en función del pH a temperatura ambiente¹.

	Concentración de CUR ($\mu\text{g/mL}$)		
	pH 1.2	pH 5.2	pH 6.4
CUR	<1.36 ^c	<1.36 ^c	ND*
CUR/PVP (1:6)	39.95 \pm 0.98 ^b	85.57 \pm 2.02 ^b	94.27 \pm 4.70 ^b
CUR/PVP (1:9)	122.06 \pm 2.59 ^a	184.04 \pm 5.56 ^a	212.82 \pm 1.20 ^a

¹ Cada valor representa la media \pm error estándar. ^{a-c} No hay diferencia significativa entre los valores etiquetados con el mismo superíndice en una columna ($p < 0.05$), $n=3$. *No determinado debido a la inestabilidad de la CUR (degradación). CUR = Curcumina, CUR/PVP = Dispersión sólida de curcumina usando PVP como acarreador

La dispersión sólida resultó en partículas pequeñas de tamaño irregular y con aspecto vítreo, ya no se observaron partículas de CUR con morfología cristalina columnar de tamaño poli disperso, ni la morfología esférica de la PVP (Figura 9A y 9B, respectivamente), lo que nos indica que la CUR se dispersó homogéneamente en la PVP en forma amorfa a nivel molecular como se muestra en la Figura 9C.

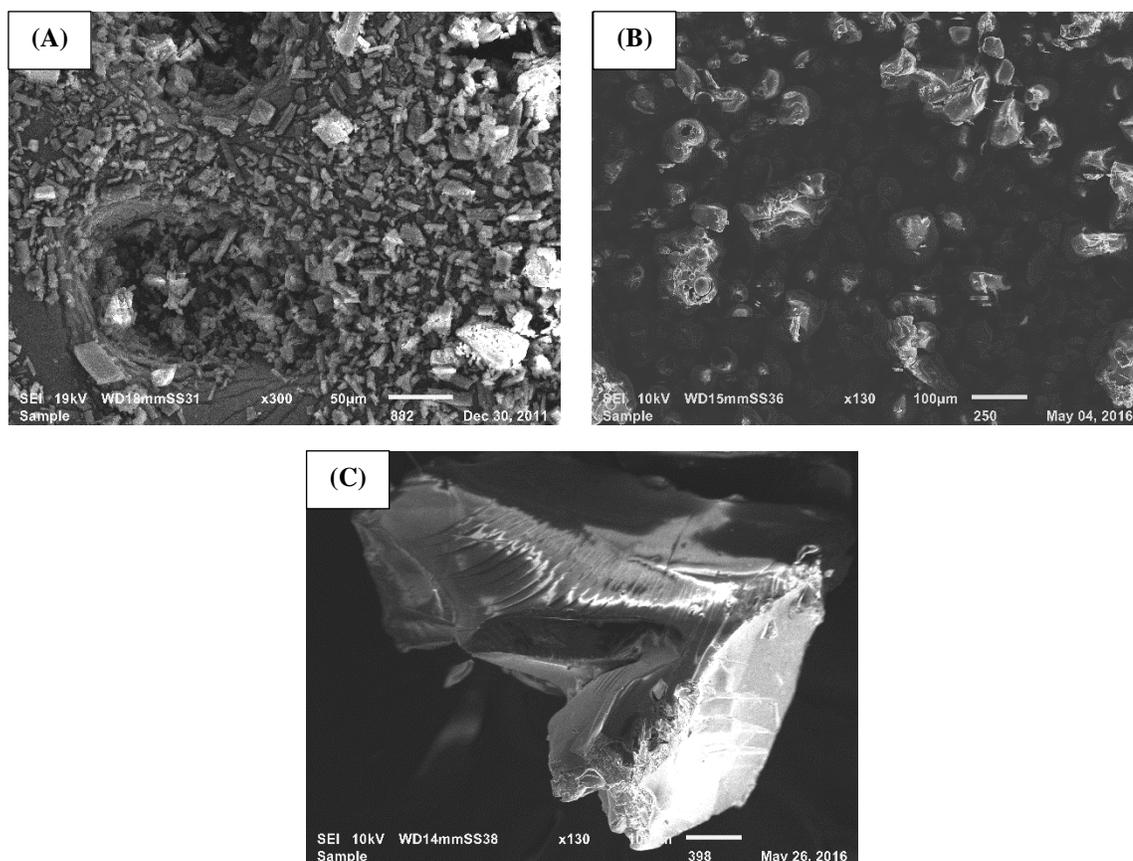


Figura 9. Micrografías de la curcumina (A), la polivinilpirrolidona (B) y la dispersión sólida en una proporción 1:9 (C).

Los termogramas por DSC (Figura 10) muestran un pico endotérmico de la CUR en 173.20°C, que puede atribuirse su punto de fusión [151]. En el termograma de la PVP se puede observar un pico endotérmico alrededor de 100°C, que podría atribuirse a la evaporación del agua de la humedad residual [152], además se puede observar, señalada con el círculo, la T_g de este polímero que se encuentra aproximadamente a los 160°C. En el termograma de la dispersión sólida ya no se observa el pico de fusión de la CUR, lo cual es el resultado del efecto solubilizante de la PVP durante el proceso de calentamiento, en el cual la CUR se dispersa uniformemente en un estado molecular amorfo formando una solución sólida amorfa que se sabe es la responsable del aumento de la solubilidad de la CUR [153].

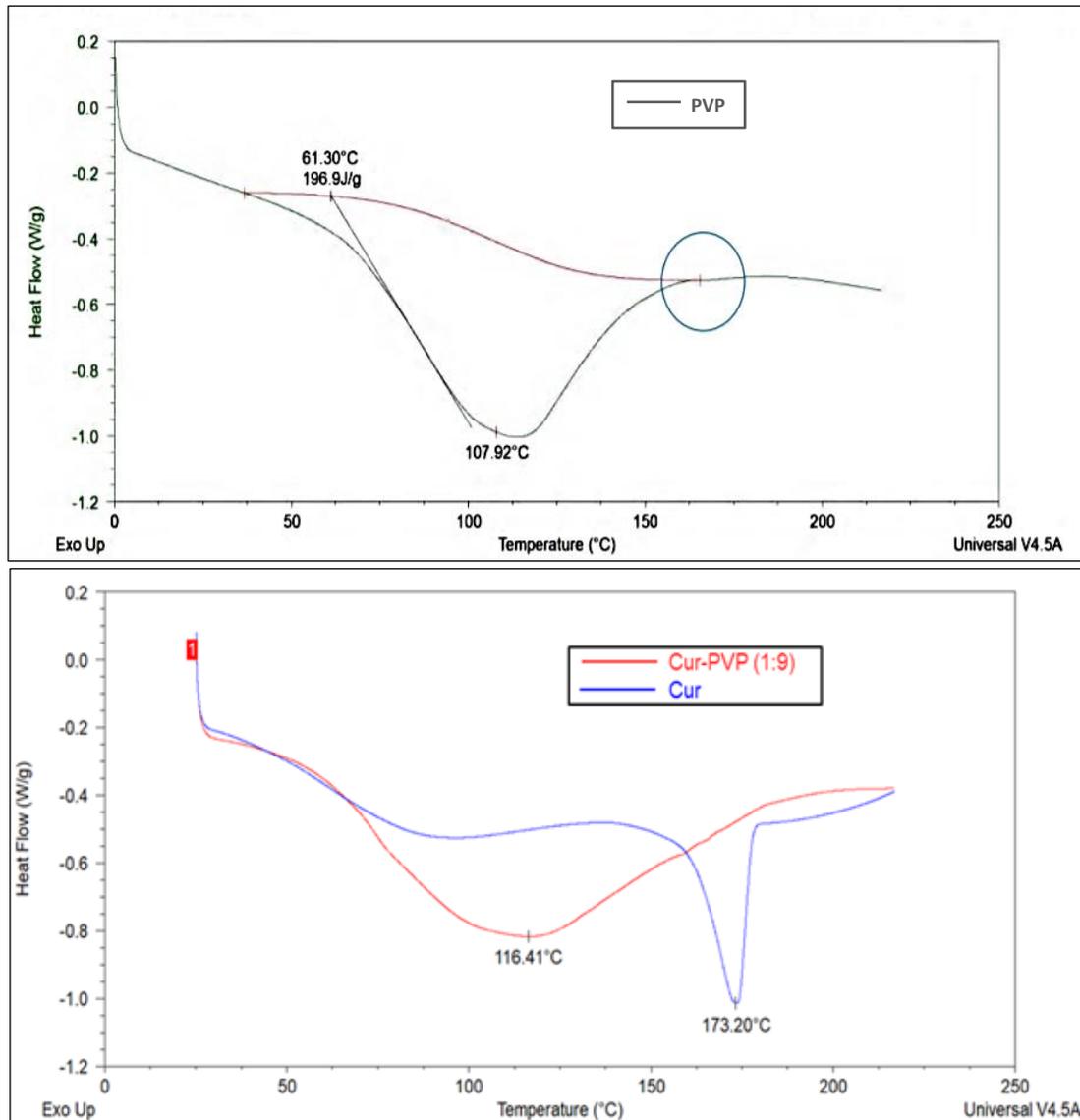


Figura 10. Análisis por DSC de la polivinilpirrolidona (PVP) (superior), la curcumina (CUR) y de la dispersión sólida en proporción 9:1 (CUR/PVP) (inferior).

Como se observa en la Figura 11, la dispersión sólida de CUR no comprometió la viabilidad celular incluso a dosis altas de CUR y PVP, lo cual era de esperarse, ya que estos dos compuestos son de baja toxicidad incluso a dosis relativamente altas [154]. Se evaluaron tres niveles de concentración de CUR (250, 500 y 750 $\mu\text{g/mL}$), tanto curcumina sola como en las dos proporciones con PVP (1:6 y 1:9) de las dispersiones sólidas.

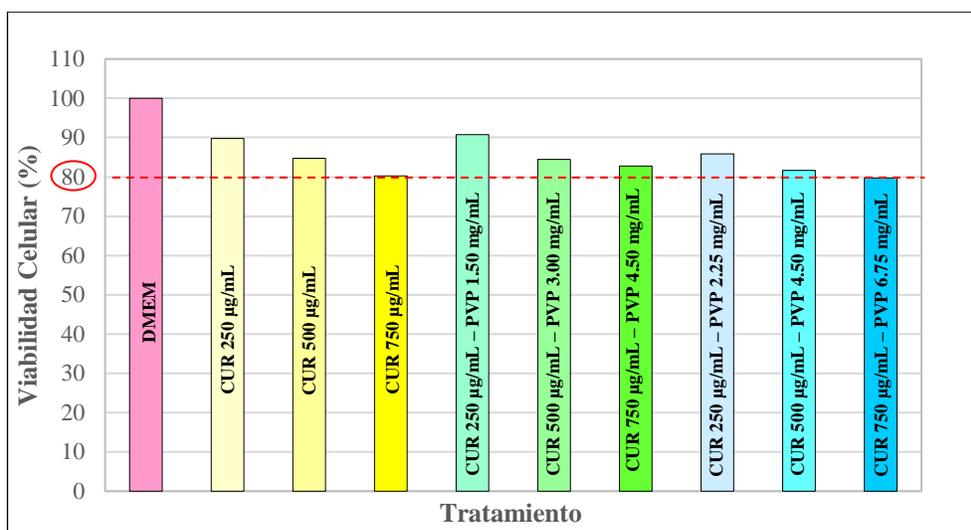


Figura 11. Citotoxicidad de la curcumina (CUR) y de las dispersiones sólidas con polivinilpirrolidona (PVP) en diferentes proporciones en monocapas de células Caco-2 después de 2 h de exposición.

La Tabla 6 muestra los resultados de la evaluación de la permeabilidad aparente media (P_{app}) y la relación de mejora de absorción (R) de la CUR preparada como dispersión sólida con PVP. La permeabilidad de la CUR en las células Caco-2 mejoró significativamente con las dos proporciones de PVP, tanto 1:6 como 1:9, aumentando la permeabilidad de la CUR más de 2 y 6 veces, respectivamente, en comparación con la CUR no formulada como dispersión, lo cual sugiere que el incremento en la permeabilidad se debe al mayor gradiente de concentración que genera el aumento en la solubilidad de la CUR.

Tabla 6. Evaluación de la permeabilidad aparente (P_{app}) y relación de mejora de absorción (R) de la curcumina (CUR) y de las dispersiones sólidas (CUR/PVP) en diferentes proporciones a través de monocapas de células Caco-2 después de 2 h de incubación¹.

	Absorción		$P_{app} \times 10^{-6}$ (cm/s)	R
	µg	%		
CUR	10.00 ± 0.42 ^c	8	4.96 ± 0.21 ^c	-
CUR/PVP (1:6)	21.44 ± 3.42 ^b	17.16	10.64 ± 1.69 ^b	2.14
CUR/PVP (1:9)	66.00 ± 13.58 ^a	52.80	32.74 ± 6.74 ^a	6.60

¹ Cada valor representa la media ± error estándar. ^{a-c} No hay diferencia significativa entre los valores etiquetados con el mismo superíndice en una columna ($p < 0.05$), $n=3$.

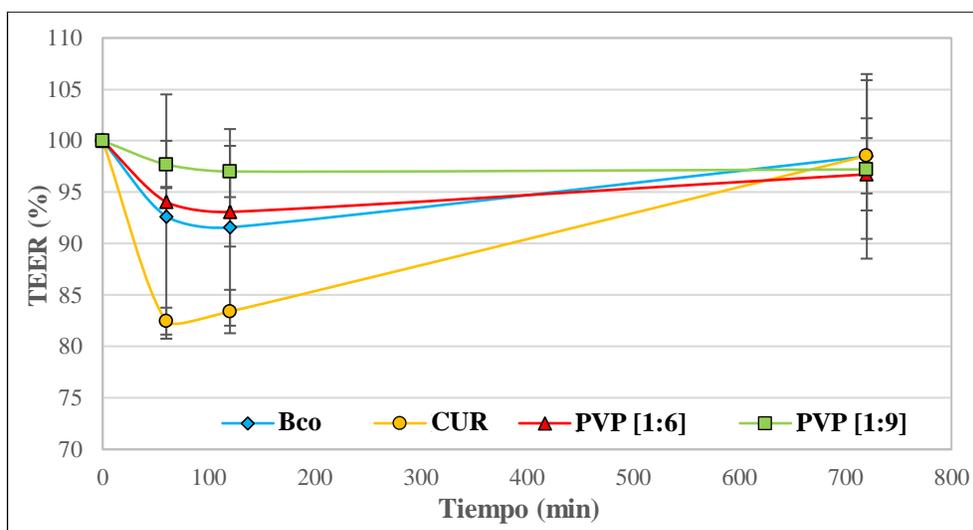


Figura 12. Efecto de la curcumina (CUR) y de las dispersiones sólidas (CUR/PVP) en diferentes proporciones sobre la TEER en función del tiempo (media \pm error estándar, n=3).

La integridad de la monocapa celular se verificó mediante la medición de la TEER de un lado de la monocapa al otro lado durante las 2 h de incubación, y 12 h después de iniciado el estudio. Como se puede observar en la Figura 12, al inicio hubo una caída de los valores de TEER observados para todos los tratamientos, pero con el paso del tiempo la TEER aumentó nuevamente hasta alcanzar los valores iniciales. Esta caída probablemente se debió al estrés, que experimentaron las células debido a la manipulación y a la aspiración del medio de cultivo y la toma de las muestras.

La mejora de estas dos propiedades biofarmacéuticas, solubilidad y permeabilidad, resultó en la mejora de la biodisponibilidad de la CUR, lo cual pudimos corroborar a través de la medición de los niveles plasmáticos de CUR de pollos de engorda dosificados por vía oral con CUR no formulada y con la dispersión sólida. La Figura 13 muestra el perfil plasmático de la CUR en función del tiempo, y los parámetros farmacocinéticos se resumen en la tabla 7. La biodisponibilidad relativa de la CUR en dispersión sólida mostró un incremento de 3.6 veces el área bajo la curva (AUC_{0-t}) y un aumento de casi 4 veces en la concentración máxima ($C_{m\acute{a}x}$), en comparación con la CUR no formulada, lo que indica que la dispersión sólida tuvo un cierto efecto en el aumento de la absorción oral de este fitofármaco.

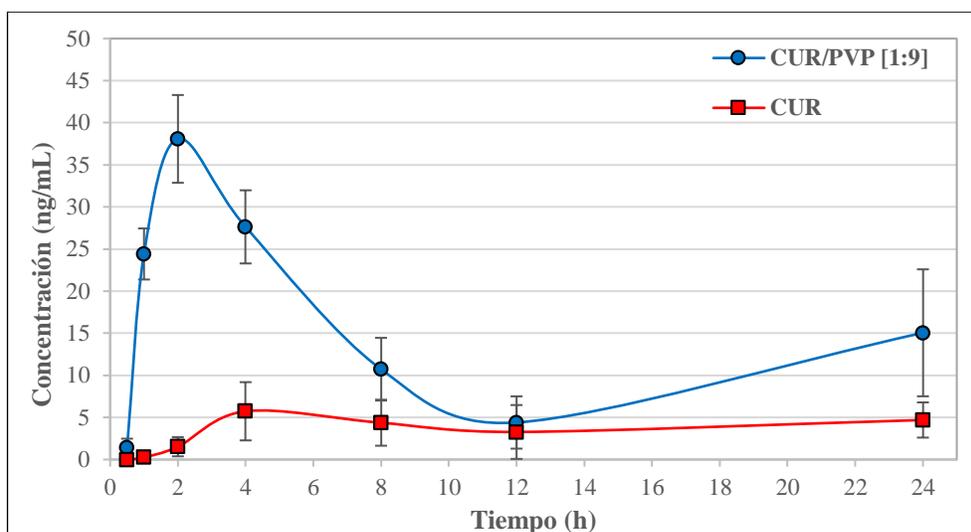


Figura 13. Perfil plasmático de la curcumina (CUR) sin formular y en dispersión sólida (CUR/PVP) después de la administración oral de una dosis única de 15 mg/kg en pollos de engorda machos de la estirpe Ross 308 de 42 días de edad y un peso promedio de 2.0 kg (media \pm error estándar, n=6).

Tabla 7. Parámetros farmacocinéticos después de la administración oral de la curcumina CUR sin formular y en dispersión sólida (CUR/PVP) calculados por un método no compartimental¹.

Parámetro	CUR	CUR/PVP [1:9]
$T_{m\acute{a}x}$ (h)	10.00 \pm 3.06 ^a	2.17 \pm 0.40 ^b
$C_{m\acute{a}x}$ (ng/mL)	10.96 \pm 3.01 ^b	41.10 \pm 4.21 ^a
ABC_{0-t} (ng/mL·h)	91.58 \pm 43.93 ^b	327.50 \pm 53.02 ^a
F	-	3.58

¹ Cada valor representa la media \pm error estándar. ^{a-b} No hay diferencia significativa entre los valores etiquetados con el mismo superíndice en una fila ($p < 0.05$), n=3.

Habiendo seleccionado los polímeros celulósicos adecuados, en las proporciones correctas, se procedió a la fabricación de las formulaciones a través de un proceso de granulación por vía húmeda. Se obtuvieron dos formulaciones de granulados, la primera consistió en la mezcla de los dos polímeros celulósicos previamente seleccionados (MCC y CMC), y la segunda en esta misma mezcla incorporando la dispersión sólida de CUR. Se obtuvieron partículas de tamaño uniforme con un diámetro promedio de 700 μ m. Como se puede observar en la Figura 14, la caracterización de estos granulados por SEM muestra que conservaron la misma superficie rugosa y con una porosidad adecuada.

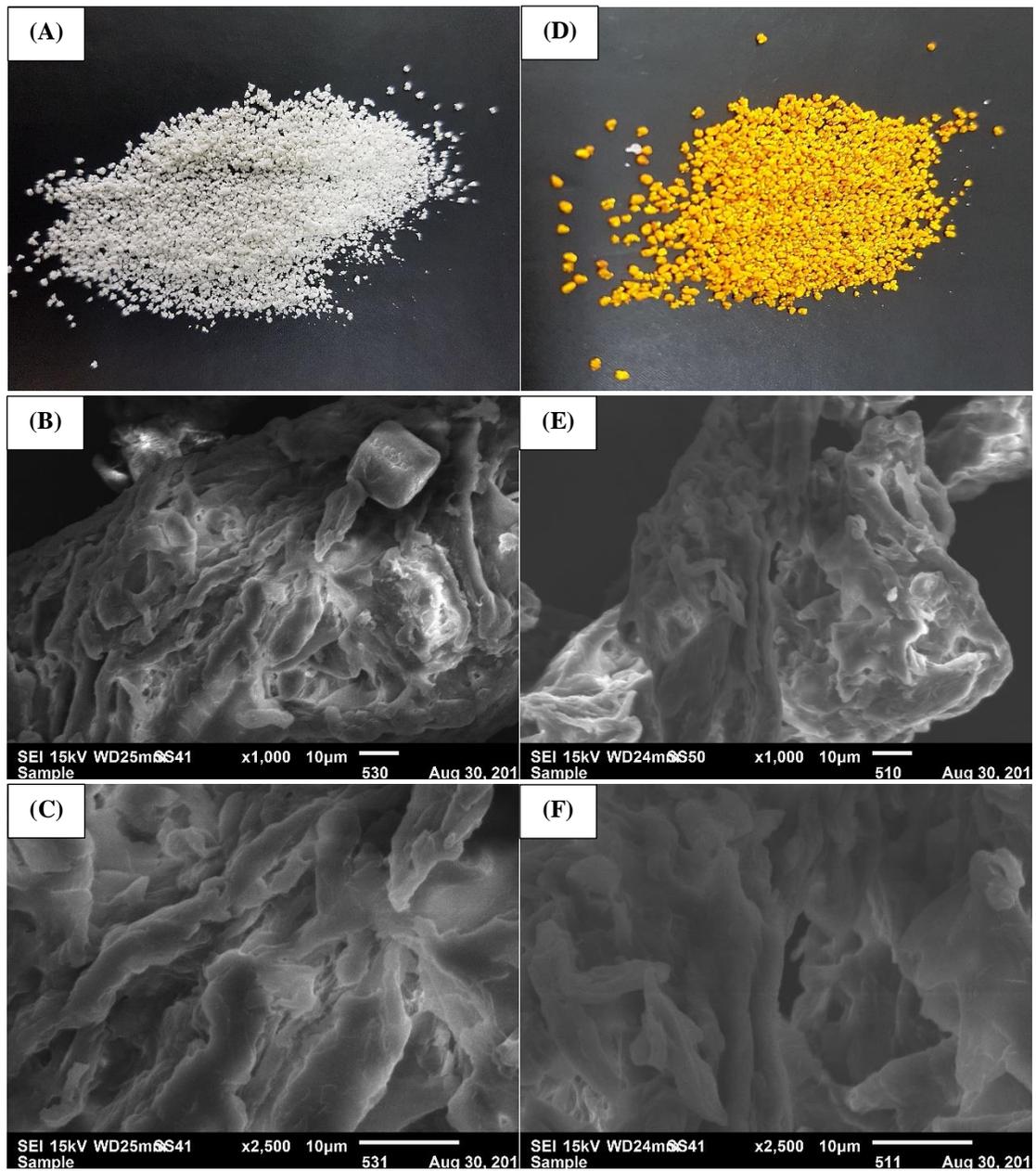


Figura 14. Fotografías y micrografías de la formulación con los polímeros celulósicos (A, B y C), y la formulación con los polímeros y la dispersión sólida de curcúmina (D, E y F).

Debido a que la capacidad de estos polímeros para adsorber AFB1 ya se había determinado, el siguiente paso fue tratar de determinar la influencia del pH en su capacidad de adsorción. Los valores de pH evaluados fueron los mismos que se utilizaron en el modelo *in vitro*, que tratan de simular las condiciones de acidez a lo largo del tracto gastrointestinal del pollo de engorda. Como se puede observar en los espectros de fluorescencia de la Figura 15, la capacidad de adsorción de los polímeros celulósicos varió considerablemente en función del pH.

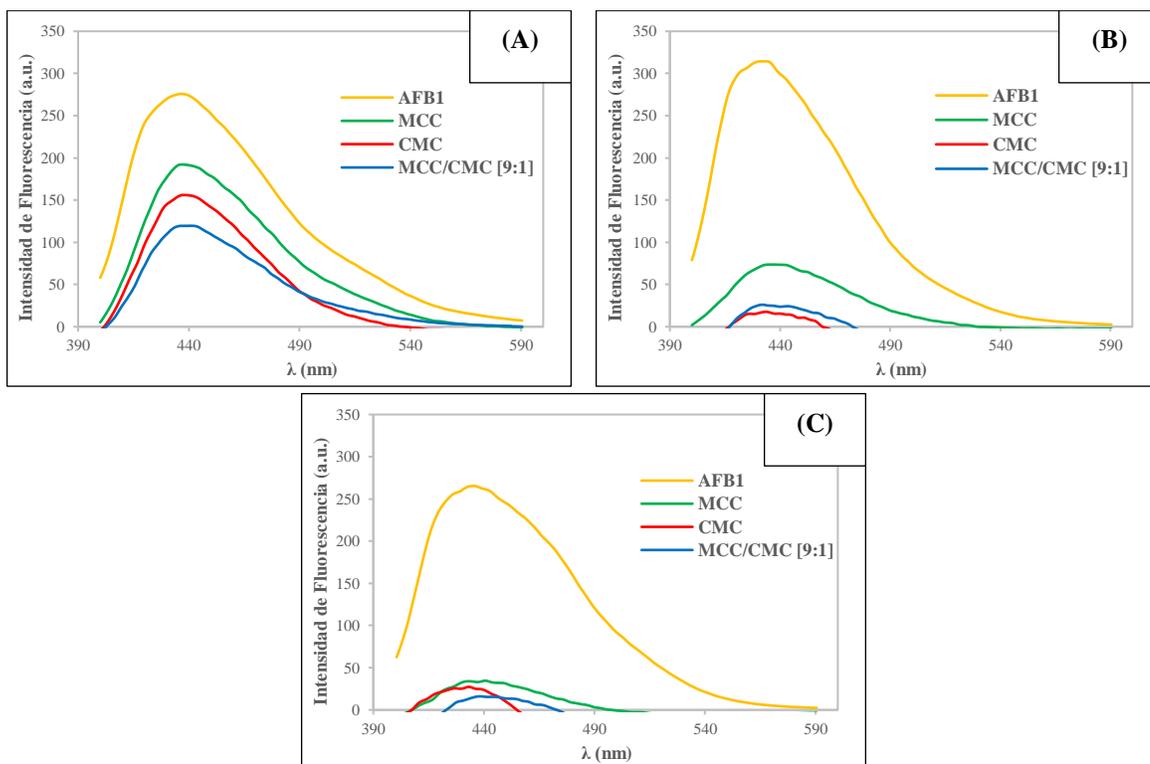


Figura 15. Influencia de los polímeros celulósicos en los espectros de fluorescencia de la AFB1 en función del pH del medio 1.6 (A), 5.2 (B) y 6.6 (C). MCC = celulosa microcristalina, CMC = carboximetilcelulosa, MCC/CMC = formulación con ambos polímeros en proporción 9:1, respectivamente.

En la Tabla 8 también se puede observar que la capacidad de adsorción de estos polímeros se va incrementando significativamente conforme aumenta el pH, lo que sugiere que las interacciones electrostáticas entre las cadenas de celulosa y la AFB1 se favorecen a valores de pH menos ácidos. Esto podría explicarse debido a la naturaleza aniónica de los principales

grupos funcionales de estos dos polímeros, tanto los grupos carboxilos de la CMC, como los grupos hidroxilo presentes en ambos polímeros. A medida que el pH aumenta por encima del pK_a de los grupos carboxilo, se favorece su deprotonación y la formación de especies de carboximetilo disociadas [155]. Además, el incremento del pH y, consecuentemente, en el número de cargas negativas, ocasiona que las cadenas poliméricas se expandan como resultado de las interacciones repulsivas, incrementando la exposición de las cargas negativas al medio en el que se encuentra, así como su viscosidad [156], factores que favorecen las cualidades de la CMC como adsorbente. Por otra parte, respecto a la MCC, es bien sabido que el incremento del pH de las dispersiones acuosas de partículas coloidales de este polímero aumenta también el potencial zeta, esto ocasiona un incremento de la fuerza de repulsión electrostática entre partículas y disminuye su agregación, favoreciendo el área superficial y de contacto para que la MCC pueda interactuar con la AFB1. Además, se ha demostrado que la estructura agregada de las partículas de MCC se refuerza con valores bajos de pH, pero esta estructura colapsa fácilmente por la acción de repulsión electrostática debido a la carga negativa de los grupos hidroxilo al aumentar el pH, induciendo a la formación de una estructura de red tridimensional mediante interacciones no electrostáticas, como interacciones hidrofóbicas y fuerzas de van der Waals [157]. Esta estructura de red tridimensional, cuyos espacios vacíos se calculan alrededor de 450 nm, podría ser la responsable de los sitios de adsorción en la superficie de las partículas de MCC, aunque todavía no existen datos disponibles para la identificación definitiva de estos sitios.

Tabla 8. Efecto del pH sobre la capacidad para adsorber AFB1 de la celulosa microcristalina (MCC), la carboximetilcelulosa (CMC), y de la formulación desarrollada con estos dos polímeros celulósicos¹.

	% Adsorbido		
	pH 1.6	pH 5.2	pH 6.6
MCC	30.12 ± 0.57 ^{c, z}	75.48 ± 0.67 ^{b, y}	86.85 ± 0.87 ^{b, x}
CMC	43.17 ± 1.34 ^{b, y}	94.81 ± 1.72 ^{a, x}	90.95 ± 2.82 ^{ab, x}
MCC/CMC [9:1]	56.34 ± 0.47 ^{a, y}	92.08 ± 1.61 ^{a, x}	94.00 ± 1.55 ^{a, x}

¹ Cada valor representa la media ± error estándar. ^{a-c} No hay diferencia significativa entre los valores etiquetados con el mismo superíndice en una columna ($p < 0.05$). ^{x-z} No hay diferencia significativa entre los valores etiquetados con el mismo superíndice en una fila ($p < 0.05$), $n=3$.

Para tratar de identificar el tipo de interacciones que se llevan a cabo entre la formulación desarrollada y la AFB1, se analizó la segunda derivada de los espectros FTIR. Se utilizó la segunda derivada del espectro debido a que este tratamiento matemático proporciona más información de la estructura fina del espectro, mostrándonos los puntos de inflexión del espectro original, los cuales se convierten en picos máximos y mínimos claramente dos máximos, llamados satélites, y el máximo de absorción en un mínimo, el cual coincide con el máximo de absorción del espectro de orden cero. El análisis de la segunda derivada de los espectros se presenta en la Figura 16, en donde podemos observar como existen picos de la AFB1 y de la formulación que van desapareciendo a lo largo de toda la región infrarroja analizada. Por ejemplo, existen picos en la segunda derivada del espectro de la AFB1 que al estar en contacto con la formulación desaparecen, tal es el caso de los picos en 3660, 3010, 1270, 990 y 850 cm^{-1} . También existen algunos picos en el espectro de la formulación sola que tras el contacto con la AFB1 desaparecen, como los picos en 2970, 2930, 2180 a 2200, 2140 a 2160, 1380, 1200, 1110, 1050, 880 a 910, 850 y 830 cm^{-1} . Por el contrario, existen picos en la segunda derivada del espectro de la mezcla de la formulación con la AFB1 que no pertenecían a movimientos o vibraciones moleculares propios de ninguno de los dos componentes de la mezcla, y que aparecen como consecuencia de la formación de nuevos enlaces e interacciones de tipo no electrostáticas entre ambos componentes. Tal es el caso de los picos que aparecen en 3680, 1140 a 1150, 940, 910 a 930, 880 y 780 cm^{-1} . Estas modificaciones en los espectros FTIR nos confirman que existen interacciones químicas que se llevan a cabo entre los grupos funcionales que constituyen las moléculas de los polímeros celulósicos y la AFB1, actuando unos de estos grupos como donador de protones y el otro como un donador de electrones. En este caso, los polímeros celulósicos jugarían el papel de donadores, ya que los protones serían donados por sus grupos hidroxilo y carboxilo en las unidades de glucosa, mientras que la AFB1 sería el donador de electrones, a través de sus átomos de oxígeno situados sobre los grupos carbonilo, éter y en los anillos compuestos heterocíclicos [158], pudiendo dar lugar a la formación de enlaces débiles por puentes de hidrogeno, interacciones hidrofóbicas y fuerzas de van der Waals, que describimos anteriormente.

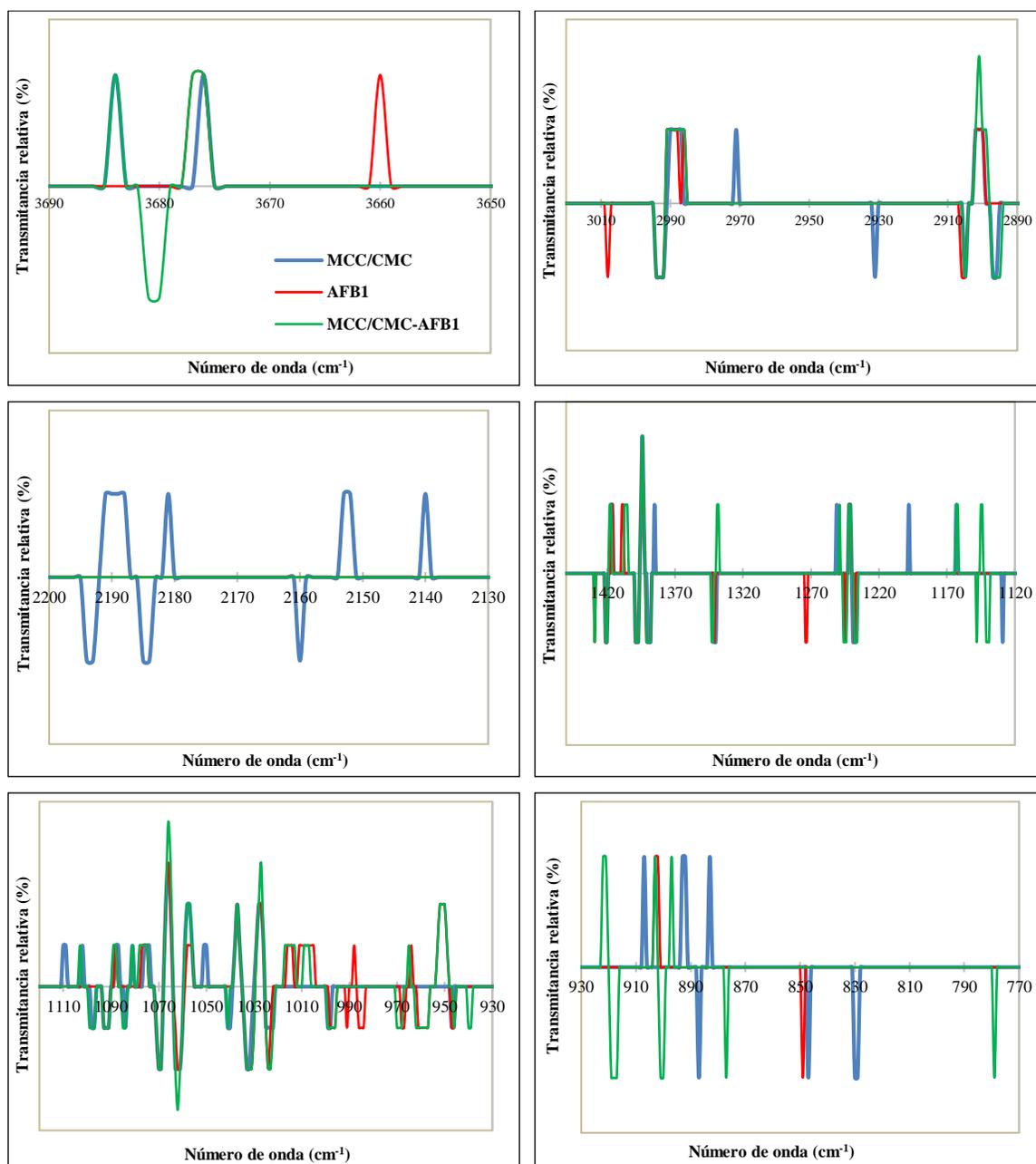


Figura 16. Segunda derivada de los espectros FTIR de la formulación con polímeros celulósicos (azul), la AFB1 (rojo) y la mezcla de ambos (verde) para analizar las posibles interacciones químicas entre ellos.

La última parte de la caracterización de las formulaciones consistió en evaluar la liberación de la CUR a partir del granulado fabricado con los polímeros celulósicos. Los resultados se presentan en la Figura 17, en donde se puede observar que la liberación y la

completa disolución de la CUR se llevaron a cabo en menos de 1 h, tiempo suficiente para permitir su absorción a la circulación sistémica. Como ya se ha explicado anteriormente, esto se debe a que tanto la solubilidad como la estabilidad de la CUR mejoran considerablemente gracias al uso de la dispersión sólida. En la Tabla 9 se presentan los parámetros de disolución modelo independiente calculados para cada medio de disolución y se observa que no existe diferencia entre el Área bajo la curva (ABC) ni la eficiencia de disolución en ninguno de los valores de pH. Únicamente se encontró diferencia significativa entre el valor del tiempo medio de disolución (TMD) en pH 1.6, ya que este resultó ser menor que en los valores de pH superiores. Tenemos que tomar en cuenta que estos parámetros no proporcionan información sobre el proceso de disolución en sí, o de su evolución; más bien indican la capacidad de disolución, y al mismo tiempo nos ayudarían para establecer algún nivel de correlación *in vitro-in vivo* [159].

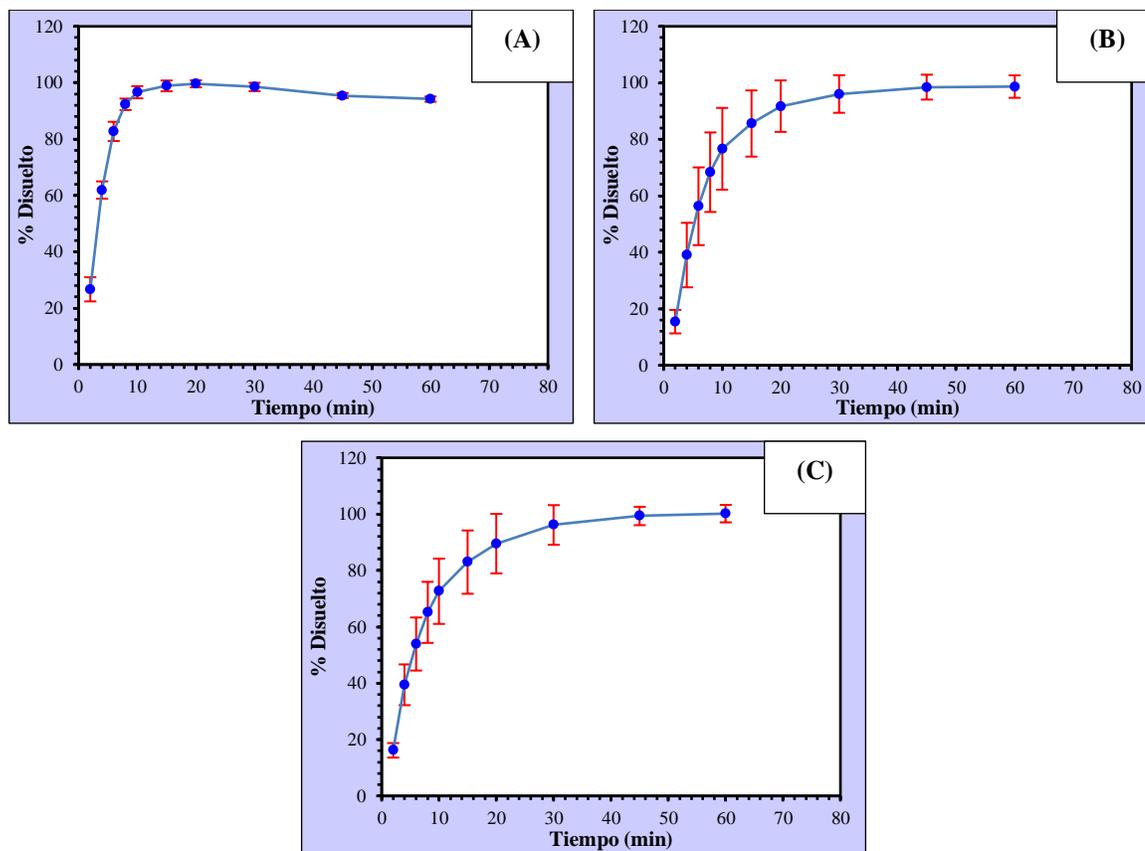


Figura 17. Perfiles de liberación y disolución de la curcumina a partir de la formulación con los polímeros celulósicos en medios con diferentes valores de pH 1.6 (A), 5.2 (B) y 6.6 (C), n = 6.

Tabla 9. Área Bajo la Curva, Eficiencia de Disolución y Tiempo Medio de Disolución de los perfiles de disolución de la formulación con la dispersión sólida de curcumina¹.

	Parámetro		
	ABC (% min)	ED (%)	TMD (min)
pH 1.6	5475.67 ± 28.39 ^a	91.26 ± 0.47 ^a	1.86 ± 0.27 ^b
pH 5.2	5160.96 ± 176.78 ^a	86.02 ± 2.95 ^a	7.77 ± 1.02 ^a
pH 6.6	5133.57 ± 158.07 ^a	85.56 ± 2.63 ^a	8.81 ± 1.01 ^a

¹ Cada valor representa la media ± error estándar. ^{a-b} No hay diferencia significativa entre los valores etiquetados con el mismo superíndice en una columna ($p < 0.05$), $n=6$.

Una vez realizada la caracterización de las formulaciones desarrolladas, se procedió a realizar el estudio *in vivo* para evaluar su efectividad para reducir los efectos tóxicos de la AFB1 sobre los parámetros de rendimiento, parámetros bioquímicos en suero, parámetros de inmunidad celular y humoral, y daños histopatológicos en el hígado de pollos de engorda. El experimento tuvo 5 grupos, un control negativo (CN); un control positivo (AFB1); el grupo tratado con la dispersión de CUR (CUR); el grupo tratado con la formulación de los polímeros celulósicos (CEL); y otro grupo tratado con la formulación de polímeros celulósicos y dispersión de CUR (CEL+CUR). Los resultados de los parámetros productivos del CN, AFB1 y de los grupos tratados con CUR, CEL y CEL+CUR se resumen en la Tabla 10. Las diferencias en el peso corporal (BW) del grupo AFB1 y los otros grupos comenzaron a observarse a partir del día 14 del estudio. Al día 21, los pesos corporales de los tres grupos tratados y el grupo CN fueron significativamente mayores que los de AFB1 ($p < 0.05$). Aunque la ingesta de alimento (FI) durante los 21 días del experimento fue estadísticamente similar para todos los grupos, la segunda semana del estudio comenzaron a observarse diferencias en la ganancia de peso corporal (BWG). Al final del experimento, el valor BWG de AFB1 fue aproximadamente 150 g más bajo que el del grupo CN, y alrededor de 100 g por debajo del resto de los grupos tratados. Por lo tanto, la misma tendencia se observó en la tasa de conversión alimenticia (FCR), cuyos valores fueron significativamente más altos para el grupo AFB1 en comparación con los otros grupos. El efecto negativo ocasionado por la adición en la dieta de 2 ppm de AFB1 sobre los parámetros productivos se vio disminuido por la adición de los tres tratamientos en comparación con los grupos control.

Tabla 10. Evaluación del peso corporal (BW), ganancia de peso corporal (BWG), consumo de alimento (FI) y conversión alimenticia (FCR) en pollos de engorda que consumieron una dieta a base de maíz y soya contaminada con AFB1 (2 ppm) suplementada con tres tratamientos¹.

	CN	AFB1	CUR	CEL	CEL+CUR	SEM ²	Valor de p
BW, g/ave							
d 0	46.48 ± 0.66 ^a	47.77 ± 0.66 ^a	48.12 ± 0.83 ^a	48.46 ± 0.63 ^a	46.71 ± 0.73 ^a	0.3198	0.2181
d 7	135.28 ± 4.37 ^b	132.28 ± 2.79 ^b	138.78 ± 3.79 ^b	154.56 ± 3.96 ^a	132.07 ± 3.33 ^b	1.7493	<0.0001
d 14	326.82 ± 17.18 ^a	286.57 ± 10.30 ^b	318.17 ± 13.33 ^{ab}	349.09 ± 12.03 ^a	325.24 ± 11.73 ^a	5.9347	0.0165
d 21	651.28 ± 30.67 ^a	500.48 ± 18.30 ^b	590.47 ± 20.67 ^a	615.06 ± 20.74 ^a	604.57 ± 18.99 ^a	10.5226	<0.0001
BWG, g/ave							
d 0-7	88.80 ± 4.02 ^b	84.52 ± 2.74 ^b	90.66 ± 3.42 ^b	106.09 ± 3.90 ^a	85.36 ± 3.28 ^b	1.6593	0.0001
d 7-14	191.54 ± 13.79 ^a	154.28 ± 8.49 ^b	179.40 ± 10.71 ^{ab}	194.54 ± 9.45 ^a	193.17 ± 9.45 ^a	4.7468	0.0293
d 14-21	324.46 ± 15.81 ^a	213.92 ± 10.01 ^c	272.29 ± 12.27 ^b	265.96 ± 13.59 ^b	279.33 ± 10.09 ^b	6.1797	<0.0001
d 0-21	604.80 ± 30.43 ^a	452.72 ± 18.40 ^b	542.34 ± 20.52 ^a	566.59 ± 20.65 ^a	557.86 ± 19.02 ^a	10.5017	<0.0001
FI, g/ave							
d 0-7	138.60 ± 4.03 ^b	160.17 ± 3.16 ^a	161.17 ± 4.36 ^a	157.35 ± 7.11 ^a	133.40 ± 4.90 ^b	3.6393	0.0054
d 7-14	219.50 ± 8.81 ^a	237.25 ± 13.63 ^a	241.42 ± 3.44 ^a	233.05 ± 6.75 ^a	234.13 ± 8.34 ^a	3.8787	0.5135
d 14-21	392.45 ± 14.54 ^a	378.52 ± 11.89 ^a	383.63 ± 11.36 ^a	360.48 ± 28.15 ^a	391.97 ± 7.95 ^a	6.9276	0.6461
d 0-21	750.55 ± 17.23 ^a	775.93 ± 3.51 ^a	786.22 ± 17.42 ^a	750.88 ± 39.17 ^a	759.50 ± 21.15 ^a	9.4079	0.7466
FCR							
d 0-7	1.08 ± 0.06 ^{abc}	1.21 ± 0.03 ^a	1.17 ± 0.05 ^{ab}	1.05 ± 0.05 ^{bc}	1.02 ± 0.01 ^c	0.0250	0.0420
d 7-14	1.20 ± 0.07 ^b	1.39 ± 0.05 ^a	1.28 ± 0.03 ^{ab}	1.18 ± 0.02 ^b	1.15 ± 0.02 ^b	0.0288	0.0215
d 14-21	1.27 ± 0.07 ^b	1.55 ± 0.05 ^a	1.35 ± 0.03 ^b	1.29 ± 0.01 ^b	1.27 ± 0.02 ^b	0.0326	0.0036
d 0-21	1.38 ± 0.08 ^b	1.72 ± 0.07 ^a	1.47 ± 0.04 ^b	1.41 ± 0.02 ^b	1.38 ± 0.03 ^b	0.0390	0.0037

¹Los datos se expresan como media ± error estándar. ²Error estándar de la media. ^{a-c} Los superíndices diferentes dentro de las filas indican una diferencia significativa ($p < 0.05$), según la prueba de rangos múltiples de Duncan; $n = 30$. CN = control negativo, AFB1 = control positivo, CUR = dispersión de curcumina, CEL = formulación de polímeros celulósicos, y CEL+CUR = formulación de polímeros celulósicos y dispersión de curcumina.

Uno de los impactos económicos más importantes de la AFB1 en la avicultura es la disminución de los parámetros productivos. Nuestros resultados concuerdan con lo reportado anteriormente [49,70]. En este experimento, la adición de 2 ppm de AFB1 en el alimento de las aves disminuyó significativamente el BW y el BWG, y aumentó el FCR al final del período de alimentación de 21 días, lo cual debe estar relacionado con alteraciones en la utilización de proteína y energía, probablemente como consecuencia del deterioro de la eficiencia digestiva y metabólica de las aves [160,161]. La adición de CUR (0.2%) o CEL (0.3%) a la dieta que contenía AFB1 alivió significativamente sus efectos adversos sobre estos parámetros productivos ya que estos grupos tratados no mostraron diferencias con el

grupo CN, lo cual indica que ni la CUR ni la CEL afectaron negativamente la integridad nutricional. Sin embargo, la inclusión combinada de CUR (0.2%) y CEL (0.3%) en la dieta no resultó en una mejoría adicional de los efectos tóxicos de AFB1 en comparación con los grupos tratados con CUR o CEL solos. Aunque se ha demostrado que la suplementación con CUR mejora el BW, el BWG y muestra mejores resultados de FCR solo en dosis altas (0.5, 1.0 y 1.5%) [162–164], nuestros resultados confirman los mismos efectos incluso con una dosis mucho menor de CUR (0.2%), que podría ser el resultado de la mejora de su solubilidad y biodisponibilidad mediante el uso de una dispersión estable con PVP.

El peso relativo de los órganos de las aves utilizadas en el estudio se presenta en la Tabla 11. No hubo diferencia significativa en el peso de los hígados de las aves que recibieron los tres tratamientos en comparación con el grupo CN, pero si hubo diferencia significativa en comparación con el grupo AFB1. El peso del intestino aumentó significativamente ($p < 0.05$) en el grupo AFB1 en comparación con los grupos CEL y CEL+CUR, pero solo numéricamente cuando se comparó con los grupos CN y CUR. El peso relativo del bazo aumentó significativamente solo en aves del grupo AFB1 y en aquellas tratadas solo con CEL, en comparación con los grupos CN y CEL+CUR, que no mostraron una diferencia significativa entre ellas. El peso del bazo del grupo tratado solo con CUR permaneció estadísticamente similar a ambos grupos control, mientras que el grupo CEL+CUR fue el único que no tuvo una diferencia significativa en comparación con el grupo CN. Con respecto al peso relativo de la bolsa de Fabricio, solo el grupo tratado con CUR permaneció similar al grupo CN, siendo estos dos grupos significativamente diferentes al grupo AFB1. Los grupos CEL y CEL+CUR no mostraron diferencias con ninguno de los grupos control. En la Tabla 11 también se muestra la relación del peso bazo/bolsa, cuyo valor resultó ser más alto para el grupo AFB1, y estadísticamente diferente al resto de los grupos. Aunque la relación bazo/bolsa de todos los grupos tratados fue significativamente más baja respecto al grupo AFB1, solo los grupos CUR y CEL+CUR alcanzaron relaciones bazo/bolsa estadísticamente similares al grupo CN.

Tabla 11. Peso relativo del hígado, bazo, bolsa de Fabricio e intestino de pollos de engorda que consumieron alimento contaminado con AFB1 (2 ppm) durante 21 días suplementados con los tratamientos¹.

Peso relativo (g)	CN	AFB1	CUR	CEL	CEL+CUR	SEM ²	Valor de p
Hígado	3.245 ± 0.101 ^b	4.200 ± 0.158 ^a	3.558 ± 0.179 ^b	3.418 ± 0.147 ^b	3.282 ± 0.111 ^b	0.0739	<0.0001
Intestino	9.635 ± 0.499 ^{ab}	10.620 ± 0.362 ^a	9.326 ± 0.529 ^{ab}	8.813 ± 0.444 ^b	8.873 ± 0.333 ^b	0.2060	0.0330
Bazo	0.119 ± 0.008 ^b	0.159 ± 0.011 ^a	0.136 ± 0.008 ^{ab}	0.157 ± 0.016 ^a	0.123 ± 0.010 ^b	0.0051	0.0257
Bolsa de Fabricio	0.281 ± 0.021 ^a	0.214 ± 0.010 ^b	0.272 ± 0.016 ^a	0.264 ± 0.017 ^{ab}	0.252 ± 0.023 ^{ab}	0.0083	0.0924
Relación Bazo / Bolsa	0.433 ± 0.020 ^c	0.755 ± 0.050 ^a	0.528 ± 0.050 ^{bc}	0.600 ± 0.040 ^b	0.527 ± 0.047 ^{bc}	0.022	<0.0001

¹Los datos se expresan como media ± error estándar. ²Error estándar de la media. ^{a-c} Los superíndices diferentes dentro de las filas indican una diferencia significativa ($p < 0.05$), según la prueba de rangos múltiples de Duncan; $n = 15$. CN = control negativo, AFB1 = control positivo, CUR = dispersión de curcumina, CEL = formulación de polímeros celulósicos, y CEL+CUR = formulación de polímeros celulósicos y dispersión de curcumina.

El análisis histológico del hígado reveló un grado de lesión hepática significativamente más crítico en el grupo AFB1, en comparación con el grupo CN (Tabla 12). Como se muestra en la Figura 18, se observó una extensa degeneración vacuolar en los hígados del grupo AFB1. Además, se observó un cambio en la disposición y proliferación de células en los conductos biliares cerca del espacio portal del hígado o entre los hepatocitos, con la presencia de necrosis focal, así como infiltrados de células inflamatorias (Figura 19). La degeneración hepatocelular y la infiltración linfoide disminuyeron al usar cualquiera de los tres tratamientos, ya que pudieron mantener puntuaciones de lesiones significativamente más bajas que las del grupo AFB1. Sin embargo, la combinación de CEL+CUR fue el único tratamiento que redujo la infiltración heterófila a una puntuación de lesión estadísticamente similar al grupo CN.

Tabla 12. Degeneración hepatocelular e infiltración de células inflamatorias en hígado de pollos de engorda que consumieron alimento contaminado con AFB1 (2 ppm) durante 21 días suplementados con los tratamientos¹.

	CN	AFB1	CUR	CEL	CEL+CUR
Degeneración hepatocelular	2.50 (2.00; 1.37) ^a	3.50 (3.00; 1.07) ^b	2.00 (2.00; 0.40) ^a	2.00 (2.00; 0.50) ^a	1.50 (1.00; 1.60) ^a
Infiltración linfoide	1.00 (1.00; 0.40) ^a	3.50 (4.00; 1.37) ^b	1.50 (1.00; 0.67) ^a	2.00 (1.50; 0.70) ^a	2.00 (2.00; 0.27) ^a
Infiltración heterófila	0.50 (1.00; 0.30) ^a	1.50 (1.00; 3.87) ^b	2.50 (2.50; 1.87) ^b	3.00 (3.00; 1.80) ^b	1.00 (1.00; 0.97) ^{ab}

¹Los datos se expresan como mediana (moda; varianza). ^{a-b} Los superíndices diferentes dentro de las filas indican una diferencia significativa ($p < 0.05$), según la prueba de Mann-Whitney U; $n = 12$. CN = control negativo, AFB1 = control positivo, CUR = dispersión de curcumina, CEL = formulación de polímeros celulósicos, y CEL+CUR = formulación de polímeros celulósicos y dispersión de curcumina.

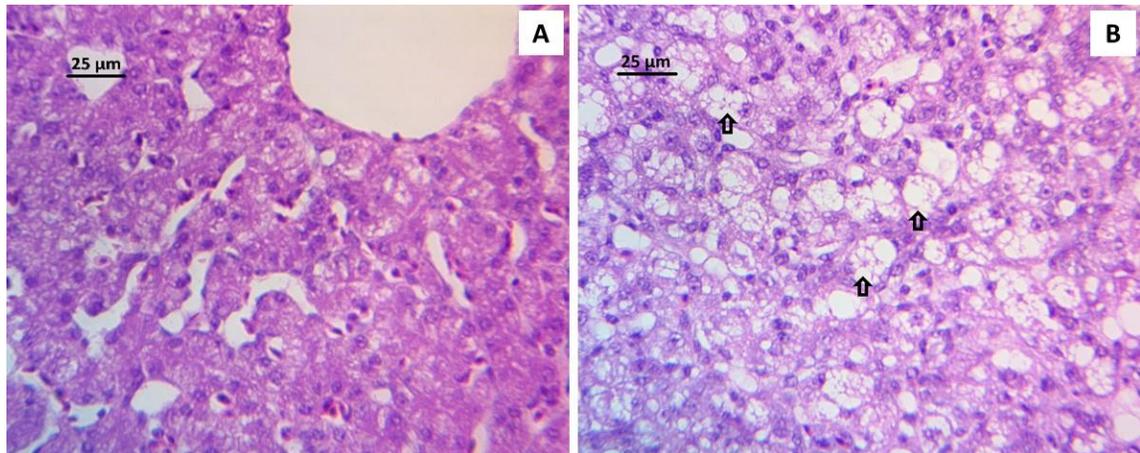


Figura 18. Histopatología del hígado que muestra los diferentes valores de la puntuación de las lesiones utilizada para evaluar la degeneración hepatocelular. (A) Puntuación de degeneración hepatocelular de 0.5: sección del hígado de un ave del grupo CN que muestra un número escaso de vacuolas intracitoplasmáticas. (B) Puntuación de degeneración hepatocelular de 3.0: sección hepática de un ave del grupo AFB1, después de 21 días de recibir una dieta con 2 ppm de AFB1, que muestra un aumento del número de vacuolas intracitoplasmáticas (flechas). Tinción: hematoxilina y eosina.

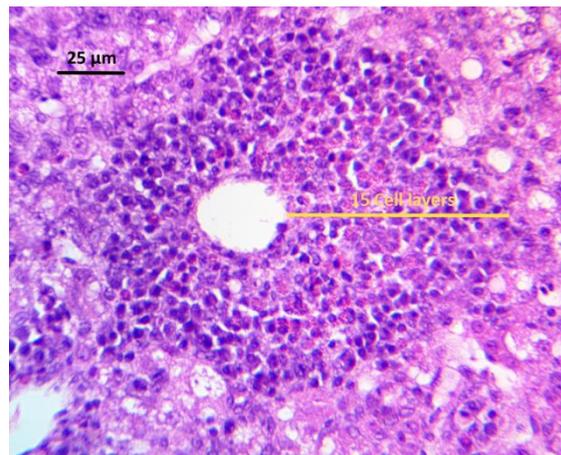


Figura 19. Capas de células inflamatorias (heterófilos) alrededor de los espacios perivasculares hepáticos en una sección de hígado de un ave del grupo AFB1, después de 21 días de recibir una dieta con 2 ppm de AFB1. La línea amarilla indica las capas celulares inflamatorias contadas contenidas en el radio con el mayor número de capas celulares, considerando el centro del espacio perivascular como el origen del radio.

Los resultados muestran que la contaminación del alimento con 2 ppm de AFB1 causó un aumento significativo en el peso relativo del hígado y el bazo, y una disminución en el peso relativo de la bolsa de Fabricio, mientras que no se observó una diferencia significativa en el

peso relativo del intestino. Estos resultados son consistentes con los hallazgos de varios estudios [165,166], en los cuales el aumento en el peso relativo del hígado se atribuye a la deposición de lípidos, produciendo características de hígado agrandado, friable y graso [167]. Además, los resultados histopatológicos respaldan los resultados del peso relativo del hígado, que también concuerdan con estudios previos [168,169]. Las lesiones de degeneración hepatocelular registradas en el hígado de las aves pertenecientes al grupo AFB1 fueron resultado de una degeneración vacuolar y una deposición severa de grasa (Figura 18), que podría deberse al transporte lipídico deteriorado, y al aumento en la biosíntesis de lípidos [170]. En este grupo también observamos infiltrados severos de células inflamatorias, principalmente compuestos por linfocitos y heterófilos, como un mecanismo para responder a los hepatocitos vacuolados degenerados [171]. Los resultados del peso relativo del hígado y los hallazgos histopatológicos obtenidos de los grupos tratados son similares a los del grupo CN, lo que demuestra que la adición en el alimento de CEL y CUR (0.2 y 0.3%, respectivamente) podría ser una opción para disminuir los efectos perjudiciales de la AFB1, ya sean solos o en combinación, principalmente a través de las propiedades de adsorción que hemos demostrado de los polímeros celulósicos, pero también a través de las propiedades de hepatoprotección de la CUR [172].

Por otro lado, la disminución en el peso relativo de la bolsa de Fabricio podría ser causada por la necrosis o el agotamiento celular de este órgano linfoide, ya que se ha demostrado que los folículos de la bolsa se reducen de tamaño durante la aflatoxicosis como resultado del agotamiento de los linfocitos tanto corticales como medulares, así como un arresto del ciclo celular en las células de los pollos de engorda [173], lo que podría explicar también el aumento del peso relativo del bazo como mecanismo compensatorio del daño causado en la bolsa de Fabricio [174]. Este efecto se confirmó con la relación bazo/bolsa, cuyos valores son indicativos del desarrollo y crecimiento de estos órganos linfoides. La mayor relación bazo/bolsa en el grupo AFB1 puede indicar atrofia de la bolsa y un aumento de la migración de las subpoblaciones de linfocitos al bazo y su proliferación [175,176], y por lo tanto puede ser utilizado como un indicador de campo del estado inmunológico. La adición de CUR y CEL en combinación pareció ser efectiva para reducir el peso relativo del bazo, mientras que

CUR fue el único tratamiento que mantuvo el peso de la bolsa de Fabricio estadísticamente similar al del grupo CN, evidenciando su efecto inmunomodulador al reducir la severidad de las lesiones en este órgano. Curiosamente, tanto CUR como CEL, solos o en combinación, mostraron valores de la relación bazo/bolsa similares a los del grupo CN, lo que significa que estos tratamientos podrían ayudar a disminuir los efectos tóxicos de la AFB1 en la bolsa de Fabricio. No hubo diferencia entre los pesos relativos del intestino en los grupos control, lo que sugiere que este es un órgano dinámico que puede adaptarse a una exposición crónica de AFB1 como se ha demostrado [177]. Este hallazgo confirma los resultados de la mucina sérica y la citrulina, dos biomarcadores de la salud de la barrera intestinal [178,179], que no se modificaron significativamente ni en los grupos control ni en los tratados (Tabla 13).

Tabla 13. Efecto de los tres tratamientos sobre los niveles séricos de superóxido dismutasa (SOD), mucina, citrulina y proteína C reactiva (CRP), los títulos de anticuerpos contra la enfermedad de Newcastle (ND) y los niveles de IgA intestinal en pollos de engorda que consumieron una dieta a base de maíz y soya contaminada con AFB1 (2 ppm) durante 21 días¹.

	SOD (U/mL)	Mucina (pg/mL)	Citrulina (nmol/mL)	CRP (ng/mL)	Título de anticuerpos contra ND	IgA intestinal (µg/mL)
CN	13.33 ± 0.15 ^a	104.00 ± 28.25 ^a	22.30 ± 3.54 ^{ab}	25.10 ± 1.35 ^{ab}	1327.4 ± 99.70 ^a	42.47 ± 7.46 ^a
AFB1	9.83 ± 0.81 ^c	68.67 ± 14.24 ^a	13.90 ± 1.97 ^b	30.18 ± 4.11 ^a	846.5 ± 29.03 ^b	25.47 ± 2.38 ^b
CUR	11.32 ± 0.49 ^{bc}	62.67 ± 7.06 ^a	21.40 ± 3.19 ^{ab}	21.86 ± 2.31 ^b	1258.8 ± 112.72 ^a	36.39 ± 2.84 ^{ab}
CEL	11.50 ± 0.67 ^b	92.00 ± 15.90 ^a	26.27 ± 3.77 ^a	22.51 ± 1.87 ^b	1467.2 ± 126.66 ^a	39.62 ± 5.28 ^{ab}
CEL+CUR	11.45 ± 0.13 ^b	73.67 ± 16.90 ^a	17.72 ± 2.89 ^{ab}	20.88 ± 2.13 ^b	1313.9 ± 165.06 ^a	41.43 ± 4.72 ^a
SEM ²	0.2753	7.9510	1.5035	1.1861	57.8831	2.2718
Valor de p	0.0010	0.4522	0.0793	0.0871	0.0063	0.1129

¹Los datos se expresan como media ± error estándar. ²Error estándar de la media. ^{a-c} Los superíndices diferentes dentro de la misma columna indican una diferencia significativa (p < 0.05), según la prueba de rangos múltiples de Duncan; n = 12.

CN = control negativo, AFB1 = control positivo, CUR = dispersión de curcumina, CEL = formulación de polímeros celulósicos, y CEL+CUR = formulación de polímeros celulósicos y dispersión de curcumina.

En la Tabla 13, se presentan el efecto de 2 ppm de AFB1 sobre algunos parámetros séricos. En comparación con el grupo AFB1, la actividad de la enzima SOD en el grupo CN fue significativamente mayor. La actividad de la SOD en los grupos tratados también fue más alta que la del grupo AFB1, pero más baja que la del grupo CN. No se observó diferencia estadística en los niveles séricos de mucina en ninguno de los grupos. Para los niveles séricos

de citrulina, no hubo diferencia estadística entre ambos grupos control, ni entre CEL y CEL+CUR. Solo el grupo tratado con CEL fue significativamente mayor en comparación con el grupo AFB1. Con respecto a los niveles de CRP, tampoco hubo diferencias estadísticas entre los grupos control, pero los grupos tratados tuvieron una concentración significativamente más baja en comparación con el grupo AFB1.

Se determinó la actividad sérica de la SOD para investigar el efecto de los tratamientos contra el estrés oxidativo inducido por AFB1, ya que esta enzima es una parte fundamental del sistema antioxidante. En la Tabla 13, nuestros datos muestran que la actividad de la SOD disminuyó notablemente en el grupo AFB1 en comparación con la del grupo CN, lo que sugiere que los pollos alimentados con 2 ppm de AFB1 pueden tener una regulación negativa en la expresión del gen SOD, lo cual es consistente con estudios anteriores [180]. En comparación con el grupo AFB1, la actividad de la SOD fue mayor en los pollos alimentados con la dieta complementada con los tres tratamientos; aunque no pudieron alcanzar niveles de SOD similares a los del grupo CN. Estos datos sugieren que tanto CUR como CEL solos, pero más eficientemente su combinación, contrarrestan el daño oxidativo causado por AFB1 a través de la adsorción de esta micotoxina por la CEL y la capacidad antioxidante de la CUR que reduce la peroxidación lipídica y el daño a la membrana celular [181].

Para evaluar los parámetros inmunológicos, se midió el título de anticuerpos contra la enfermedad de Newcastle y los niveles de IgA intestinal. En ambos casos, el grupo AFB1 mostró niveles significativamente más bajos con respecto al grupo CN. Se encontró que los tres grupos tratados tenían títulos de anticuerpos estadísticamente similares al grupo CN, mientras que los niveles de IgA intestinal mostraron similitud estadística solo entre el grupo CN y el grupo tratado con la combinación CEL+CUR. Para los grupos CUR y CEL, los niveles de IgA intestinal fueron solo numéricamente más altos que los del grupo AFB1. Estos resultados sugieren que la inclusión de estos tratamientos en la dieta de los pollos de engorda mejora la respuesta inmune humoral local y sistémica, ya que la concentración de IgA intestinal y los títulos de anticuerpos contra la enfermedad de Newcastle fueron similares a los del grupo CN sin aflatoxina. Este efecto también se observó para la respuesta inmune celular, evaluada mediante la respuesta de CBH que se incrementó con el uso de los

tratamientos evaluados, especialmente con la combinación CEL+CUR (Tabla 14). Los resultados del grupo AFB1 confirmaron el efecto supresor de AFB1 sobre el sistema inmunológico de las aves, ya que hubo una disminución significativa en la respuesta de CBH a las 12 y 24 h después de la inyección de PHA-M en comparación con el grupo CN. A las 12 horas después de la inyección, el grupo tratado con CUR no fue diferente del grupo AFB1, mientras que los grupos CEL y CEL+CUR solo fueron numéricamente más altos. A las 48 h posteriores a la inyección, los tres tratamientos fueron numéricamente más altos que el grupo AFB1, pero solo el grupo tratado con la combinación CEL+CUR resultó significativamente diferente del grupo AFB1.

Tabla 14. Respuesta a la hipersensibilidad cutánea por basófilos (CBH) a las 12 y 24 h después de la inyección de PHA-M en pollos de engorda que consumieron una dieta a base de maíz y soya contaminada con AFB1 (2 ppm) suplementada con los tratamientos¹.

	12 h (mm)	24 h (mm)
CN	0.692 ± 0.052 ^a	0.788 ± 0.072 ^a
AFB1	0.486 ± 0.041 ^b	0.577 ± 0.057 ^b
CUR	0.481 ± 0.060 ^b	0.702 ± 0.043 ^{ab}
CEL	0.555 ± 0.040 ^{ab}	0.719 ± 0.036 ^{ab}
CEL+CUR	0.617 ± 0.047 ^{ab}	0.741 ± 0.050 ^a
SEM²	0.023	0.025
Valor de p	0.0151	0.0798

¹Los datos se expresan como media ± error estándar. ²Error estándar de la media. ^{a-b} Los superíndices diferentes dentro de la misma columna indican una diferencia significativa ($p < 0.05$), según la prueba de rangos múltiples de Duncan; $n = 12$.

CN = control negativo, AFB1 = control positivo, CUR = dispersión de curcumina, CEL = formulación de polímeros celulósicos, y CEL+CUR = formulación de polímeros celulósicos y dispersión de curcumina.

Los resultados con respecto a las evaluaciones de la inmunidad humoral y en mucosa coinciden con estudios previos y confirman el efecto inmunosupresor de la AFB1 en pollos de engorda [49,62]. Los pollos del grupo AFB1 mostraron la respuesta de anticuerpos más baja a la vacuna ND y la más baja concentración total de IgA intestinal. Este efecto podría deberse a la capacidad de AFB1 para inhibir la ARN polimerasa, lo que resulta en una disminución de la síntesis de proteínas en general, pero en particular de las

inmunoglobulinas; o al aumento de la digestión lisosomal de las inmunoglobulinas, con un agotamiento grave y degeneración de los linfocitos en los folículos de la bolsa de Fabricio, así como al deterioro de la formación de citocinas por los linfocitos [182,183]. CUR (0.2%), CEL (0.3%) y la combinación de ambos tratamientos pudieron mejorar los efectos inmunosupresores de la AFB1 con respecto al título de anticuerpos contra ND; sin embargo, la combinación CEL+CUR (0.5%) fue el único tratamiento que pudo mantener un nivel de IgA intestinal comparable al nivel del grupo NC.

Del mismo modo, con los resultados de la prueba de CBH quedó claro que alimentar a las aves con 2 ppm de AFB1 implica una disminución significativa de la inmunidad celular. La prueba cutánea de PHA se utiliza para evaluar la inmunidad celular, ya que el PHA es un potente estimulante que activa las células inmunitarias que infiltran el tejido de la sangre periférica, lo que causa una inflamación local temporal en el sitio de la inyección [184]. En el presente estudio, los pollos del grupo AFB1 también mostraron la respuesta más baja a CBH a las 12 y 24 horas después de la inyección de PHA. Curiosamente, a las 12 horas después de la inyección, ningún tratamiento fue significativamente diferente del grupo AFB1. Sin embargo, a las 24 horas, solo el grupo CEL+CUR tuvo una respuesta de CBH estadísticamente similar a la del grupo CN, lo que indica que ni CUR ni CEL por sí solos podrían mejorar la función inmunitaria celular, pero la combinación de ambos logró una mejoría en esta respuesta. Estos hallazgos sugieren que los efectos inmunomoduladores de la CUR están relacionados principalmente con una mejora en la respuesta inmune humoral, ejerciendo efectos nulos o beneficiosos en las funciones inmunes celulares, debido a su actividad antiinflamatoria, por lo que se inhibe la proliferación de linfocitos y las funciones de inmunidad mediadas por células T se suprimen [185,186]. Sin embargo, una combinación de CUR con las propiedades de adsorción de CEL podría ayudar a mejorar los efectos adversos de AFB1 también en la respuesta inmune celular.

Tabla 15. Efecto de los tratamientos sobre los parámetros bioquímicos séricos en pollos de engorda que consumieron una dieta a base de maíz y soya contaminada con AFB1 (2 ppm) durante 21 días¹.

	CN	AFB1	CUR	CEL	CEL+CUR	SEM ²	Valor de p
Albúmina (g/dL)	1.12 ± 0.03 ^a	0.63 ± 0.07 ^c	0.82 ± 0.07 ^b	0.71 ± 0.07 ^{bc}	1.00 ± 0.03 ^a	0.0360	<0.0001
Proteínas totales (g/dL)	2.09 ± 0.06 ^a	1.61 ± 0.18 ^b	2.27 ± 0.18 ^a	1.96 ± 0.11 ^{ab}	2.34 ± 0.10 ^a	0.0694	0.0040
ALP (U/L)	278.10 ± 19.96 ^{ab}	344.50 ± 28.76 ^a	247.40 ± 27.30 ^b	242.40 ± 34.21 ^b	299.90 ± 25.14 ^{ab}	12.9300	0.0712
ALT (U/L)	1.78 ± 0.22 ^b	3.49 ± 0.59 ^a	1.16 ± 0.24 ^b	1.24 ± 0.24 ^b	0.96 ± 0.23 ^b	0.1952	<0.0001
AST (U/L)	201.43 ± 7.48 ^{ab}	200.39 ± 14.45 ^{ab}	175.02 ± 7.49 ^b	194.66 ± 10.17 ^{ab}	207.43 ± 6.92 ^a	4.4586	0.1797
GGT (U/L)	12.70 ± 0.68 ^b	15.30 ± 0.76 ^a	13.10 ± 0.62 ^b	15.20 ± 0.76 ^a	13.90 ± 0.57 ^{ab}	0.3295	0.0272
BUN (mg/dL)	2.89 ± 0.07 ^a	2.54 ± 0.19 ^{ab}	2.54 ± 0.14 ^{ab}	2.69 ± 0.20 ^{ab}	2.29 ± 0.15 ^b	0.0732	0.1170
Colesterol (mg/dL)	115.20 ± 4.95 ^a	66.70 ± 8.41 ^c	104.50 ± 8.95 ^{ab}	91.30 ± 11.09 ^b	126.20 ± 3.58 ^a	4.4809	<0.0001
Triglicéridos (mg/dL)	135.10 ± 11.91 ^a	69.50 ± 6.44 ^b	70.50 ± 6.98 ^b	80.90 ± 10.11 ^b	96.20 ± 6.97 ^b	5.1114	<0.0001
Glucosa (mg/dL)	422.00 ± 18.09 ^a	287.50 ± 12.60 ^d	331.10 ± 9.69 ^{bc}	297.20 ± 12.29 ^{cd}	353.40 ± 12.69 ^b	8.9404	<0.0001
Creatinina (mg/dL)	0.28 ± 0.01 ^a	0.20 ± 0.00 ^b	0.20 ± 0.01 ^b	0.18 ± 0.02 ^b	0.18 ± 0.02 ^b	0.0090	0.0006
Ácido úrico (mg/dL)	11.56 ± 0.72 ^b	13.61 ± 0.89 ^a	9.66 ± 0.32 ^b	11.29 ± 0.71 ^b	11.12 ± 0.49 ^b	0.3350	0.0032
P (mg/dL)	9.04 ± 0.29 ^a	7.36 ± 0.41 ^b	7.88 ± 0.41 ^{ab}	8.59 ± 0.51 ^a	8.48 ± 0.30 ^{ab}	0.1883	0.0381
Mg (mEq/L)	3.75 ± 0.15 ^a	2.72 ± 0.10 ^b	2.57 ± 0.12 ^b	2.99 ± 0.21 ^b	2.98 ± 0.21 ^b	0.0913	<0.0001
Fe (µg/dL)	130.30 ± 5.21 ^a	95.40 ± 8.94 ^b	116.70 ± 5.95 ^{ab}	110.70 ± 4.22 ^{ab}	120.80 ± 10.09 ^a	3.5183	0.0212

¹Los datos se expresan como media ± error estándar. ²Error estándar de la media. ^{a-d} Los superíndices diferentes dentro de la misma fila indican una diferencia significativa ($p < 0.05$), según la prueba de rangos múltiples de Duncan; $n = 12$. ALP = fosfatasa alcalina, ALT = alanina aminotransferasa, AST = aspartato aminotransferasa, GGT = gamma glutamiltransferasa, BUN = nitrógeno ureico en sangre, P = fosforo, Mg = magnesio, Fe = hierro, CN = control negativo, AFB1 = control positivo, CUR = dispersión de curcumina, CEL = formulación de polímeros celulósicos, y CEL+CUR = formulación de polímeros celulósicos y dispersión de curcumina.

El efecto de los tratamientos evaluados sobre las variables bioquímicas séricas se muestra en la Tabla 15. La ingesta de 2 ppm de AFB1 causó cambios significativos en casi todos los parámetros bioquímicos entre ambos grupos control, excepto para los valores de AST y BUN. Para ALP tampoco hubo una diferencia significativa, aunque hay una diferencia numérica

muy clara de más de 60 U/L entre los grupos control y niveles más bajos para los grupos tratados con CUR y CEL en comparación con el grupo AFB1. Se observó una disminución significativa en los niveles séricos de albúmina, proteínas totales, colesterol, triglicéridos, glucosa, creatinina, fósforo inorgánico, magnesio y hierro en el grupo AFB1 en comparación con el grupo CN. Los grupos tratados con CUR y CEL, así como el grupo tratado con la combinación CEL+CUR, ayudaron a disminuir los efectos adversos de la AFB1 manteniendo concentraciones séricas más altas de albúmina, proteínas totales, colesterol, glucosa, fósforo inorgánico y hierro, en comparación con el grupo AFB1. Sin embargo, ninguno de estos tratamientos logró mantener valores séricos similares a los valores del grupo CN de triglicéridos, creatinina ni magnesio, ya que fueron estadísticamente similares a los del grupo AFB1. De acuerdo con los resultados, se observó un incremento en los niveles séricos de ALT, GGT y ácido úrico en el grupo AFB1 en comparación con el grupo CN. Los resultados también sugieren un efecto positivo de los tres tratamientos sobre estos parámetros, ya que el aumento en la actividad de las enzimas y los niveles de ácido úrico se controlaron con al menos uno de los tratamientos. Para la ALT y el ácido úrico, todos los grupos tratados se mantuvieron estadísticamente similares al grupo CN. Para GGT, el grupo tratado con CUR fue el único grupo que permaneció estadísticamente similar al grupo CN, mientras que el grupo CEL+CUR resultó solo numéricamente más bajo que el grupo AFB1, y el grupo CEL no tuvo diferencias en comparación con el grupo AFB1.

Los resultados de proteínas totales y albúmina disminuyeron significativamente en el grupo AFB1 con respecto al grupo CN, lo cual es un indicador de lesión hepática [37]. Dado que las proteínas séricas, incluida la albúmina, son sintetizadas principalmente por el hígado, se espera que la lesión hepática causada por el consumo de AFB1 resulte en una síntesis de proteínas comprometida. Existen tres mecanismos probables por los cuales la AFB1 podría causar una disminución en los niveles de proteínas séricas, que están relacionados con la formación de aductos. AFB1 puede formar aductos de ADN o ARN que alteran la transcripción y la traducción en la expresión génica, y también puede formar aductos de lisina que resultan en la degradación o excreción de proteínas, o al alterar la síntesis de ARN mensajero por inhibición selectiva de la ARN polimerasa II [187,188]. A pesar de que CUR

y CEL solos podrían mejorar los efectos tóxicos de AFB1 en los niveles séricos de proteínas totales y albúmina, fue la combinación CEL+CUR la que mostró resultados estadísticamente similares a los del grupo CN. Los cambios en la actividad enzimática sérica de las aves de corral como resultado de la lesión hepatocelular causada por la AFB1 se han reportado previamente [60]. En este estudio, los pollos del grupo AFB1 que recibieron 2 ppm de AFB1 mostraron un aumento significativo en la actividad sérica de las enzimas ALT y GGT, y aunque fue solo numérico, también hubo un claro aumento en la actividad ALP. Este aumento en los niveles de enzimas séricas podría interpretarse como una consecuencia de la degeneración de los hepatocitos y la subsiguiente pérdida de enzimas en el torrente sanguíneo, así como la colestasis biliar y la hiperplasia de los conductos biliares [37,187].

Por otro lado, no se encontraron cambios significativos en la actividad de la AST cuando las aves se alimentaron con 2 ppm de AFB1, lo que podría atribuirse a que la AST no es exclusivamente una enzima hepática en las especies domésticas, sino que también está presente en el citoplasma y las mitocondrias de tejidos como el músculo esquelético y cardíaco de todos [189]. La actividad de las enzimas séricas ALP y ALT disminuyó con cualquiera de los tratamientos evaluados, ya sea solo con CUR o CEL, o con la combinación de ambos. Sin embargo, para alcanzar una actividad sérica de GGT similar al grupo CN, únicamente funcionó CUR sola o en combinación con CEL (CEL+CUR), lo que demuestra una vez más la actividad hepatoprotectora de la CUR, y las buenas propiedades de adsorción de la CEL contra AFB1. Los resultados no muestran diferencias significativas en los niveles de BUN entre los grupos AFB1 y CN cuando los pollos se alimentaron con 2 ppm de AFB1, mientras que, si se observó una disminución significativa en los niveles séricos de colesterol, triglicéridos, glucosa y creatinina, así como un aumento del ácido úrico. Se ha reportado que la AFB1 causa alteraciones en el metabolismo de los lípidos, disminuyendo los niveles séricos de colesterol y triglicéridos, nuestros resultados coinciden con los que se han reportado anteriormente [190,191]. Una disminución significativa en los niveles séricos de colesterol y triglicéridos podría atribuirse a la inhibición de la biosíntesis del colesterol y de los ácidos grasos, concomitante con una inhibición de la movilización y transporte de estos lípidos al tejido periférico, que resulta en la acumulación de estos lípidos en el hígado

[192,193], como se describió anteriormente. Estudios más recientes han demostrado que la AFB1 puede regular negativamente el receptor alfa activado por proliferador de peroxisoma hepático (PPAR α), una proteína receptora nuclear que es un importante regulador de la homeostasis de los lípidos y la glucosa, lo que lleva a un aumento de la expresión y la actividad de una enzima lipolítica, lipoproteína lipasa, y por lo tanto promueve la eliminación de las lipoproteínas ricas en triglicéridos, así como los niveles de triglicéridos circulantes [194]. Los cambios observados en los niveles séricos de colesterol y triglicéridos y el hígado graso observados en este estudio corroboran el efecto nocivo de la AFB1 en el metabolismo lipídico de los pollos de engorda. Curiosamente, ni CUR ni CEL solos pudieron contrarrestar completamente estos efectos, aunque se encontraron niveles numéricamente más altos de estos lípidos en los grupos tratados en comparación con el grupo AFB1. Solo el grupo tratado con la combinación de CEL+CUR alcanzó niveles de colesterol estadísticamente similares al grupo CN, mientras que ninguno de los tres tratamientos alcanzó niveles de triglicéridos similares a los del grupo CN. Tanto la glucosa como los niveles séricos de creatinina disminuyeron en el grupo AFB1 en comparación con el grupo CN, lo que coincide con lo que se reportó anteriormente cuando las aves se alimentaron con AFB1 [194,195]. La disminución de la glucosa en suero podría ser una consecuencia de la actividad reducida de las enzimas involucradas en el metabolismo de la glucosa, unida a la regulación negativa de PPAR α por AFB1 [194,196]. Por otro lado, el bajo nivel de creatinina sérica se debe al menor aumento de masa muscular que se asocia con una lesión hepática grave durante la aflatoxicosis, ya que la creatinina es un metabolito resultante de la degradación de la fosfocreatina muscular, por lo que su nivel aumenta cuando las tasas de actividad muscular aumentan [194,197]. Ningún tratamiento fue capaz de mantener niveles séricos de glucosa similares al grupo CN, hubo una mejoría con CUR y CEL solos, pero el mayor aumento en los niveles séricos de glucosa se observó con la combinación CEL+CUR. Sin embargo, la inclusión de estos tratamientos no fue suficiente para mejorar los niveles de creatinina sérica. Se observó un aumento en el nivel sérico de ácido úrico en los pollos del grupo AFB1 con respecto a los del grupo CN, lo que podría ser un indicativo de la función excretora renal alterada debido al efecto tóxico de AFB1 en el tejido renal [198,199]. Aunque no se observaron cambios en los niveles séricos de creatinina durante los 21 días de estudio,

probablemente se incrementarían en los días posteriores, ya que se ha reportado que los cambios más pronunciados en los niveles séricos de creatinina ocurren después de los 42 días de exposición a AFB1 [200]. Los resultados sugieren que el incremento en los niveles séricos de ácido úrico se contrarrestó con la suplementación de CUR y CEL, ya sea individualmente o en combinación.

Los niveles de minerales en suero, como P, Mg y Fe, se redujeron significativamente después de que las aves consumieron 2 ppm de AFB1, lo que coincide con informes anteriores [95,191]. Los niveles más bajos de P y Mg pueden deberse a la alteración de su metabolismo, ya que la AFB1 altera directamente la regulación renal, intestinal y paratiroidea de estos minerales [201,202]. Además, también se ha informado que la AFB1 produce cambios en el nivel sérico de Fe, que probablemente esté relacionado con la inflamación del hígado y el metabolismo alterado de las proteínas [203]. Sin embargo, las causas exactas de la alteración en el metabolismo mineral causada por AFB1 en pollos de engorda no se han establecido y no se pueden dilucidar a partir de los resultados de este estudio. Ningún tratamiento fue completamente capaz de revertir por completo la disminución de los niveles séricos de minerales en las aves; sin embargo, tanto CUR como CEL solos o en combinación pudieron mejorar numéricamente los niveles séricos de P y Fe, mientras que ninguno de ellos ayudó a regular los niveles de Mg. De acuerdo con los resultados de este estudio, la mejora en la mayoría de los parámetros bioquímicos de los pollos alimentados con 2 ppm de AFB1 corroboró la capacidad intrínseca de la CUR y la CEL para mantener la homeostasis bioquímica [198,204,205], así como sus efectos protectores contra AFB1, lo que podría deberse a la actividad hepatoprotectora y antioxidante del CUR y la capacidad de adsorción de CEL en el tracto digestivo.

Finalmente, el efecto que tuvo la inclusión de CUR en la dieta de las aves sobre el perfil de color de la piel del muslo y de la almohadilla plantar se muestra en la Tabla 16. La suplementación dietética con CUR y CEL+CUR produjo un valor de amarillamiento promedio (b^*) significativamente mayor tanto en la piel del muslo y como en la almohadilla plantar de los pollos ($p < 0.05$) en comparación con el resto de los grupos que no recibieron CUR como parte de la dieta. Los valores de b^* en la almohadilla plantar fueron más altos

que los de la piel del muslo. En el muslo hubo diferencias significativas en la luminosidad (L*) y enrojecimiento (a*) entre algunos de los grupos. Por otro lado, no hubo diferencia significativa en L* ni a* en la almohadilla plantar entre ninguno de los grupos del estudio.

Tabla 16. Efecto de los tratamientos sobre el color de la piel del muslo y la almohadilla plantar de los pollos de engorda que consumieron una dieta a base de maíz y soya contaminada con AFB1 (2 ppm)¹.

	CN	AFB1	CUR	CEL	CEL+CUR	SEM ²	Valor de p
Muslo							
L*	71.14 ± 0.47 ^{ab}	72.27 ± 0.50 ^a	70.55 ± 0.28 ^{bc}	70.98 ± 0.38 ^b	69.71 ± 0.38 ^c	0.2118	0.0015
a*	3.36 ± 0.43 ^a	2.15 ± 0.29 ^b	1.89 ± 0.29 ^b	1.88 ± 0.31 ^b	1.79 ± 0.17 ^b	0.1460	0.0011
b*	2.75 ± 0.56 ^c	4.89 ± 0.41 ^b	7.83 ± 0.57 ^a	6.13 ± 0.29 ^b	7.54 ± 0.29 ^a	0.3270	<0.0001
Almohadilla							
L*	70.89 ± 0.76 ^a	70.94 ± 0.53 ^a	71.65 ± 0.97 ^a	70.66 ± 0.58 ^a	70.66 ± 0.32 ^a	0.2978	0.5395
a*	2.36 ± 0.26 ^a	2.03 ± 0.32 ^a	1.92 ± 0.11 ^a	2.56 ± 0.44 ^a	1.82 ± 0.31 ^a	0.1376	0.4001
b*	13.08 ± 0.59 ^b	13.65 ± 0.34 ^b	19.12 ± 0.96 ^a	14.66 ± 0.55 ^b	17.25 ± 1.36 ^a	0.4875	<0.0001

¹Los datos se expresan como media ± error estándar. ²Error estándar de la media. ^{a-c} Los superíndices diferentes dentro de la misma fila indican una diferencia significativa (p <0.05), según la prueba de rangos múltiples de Duncan; L* = luminosidad; a* = enrojecimiento; b* = amarillez; n = 12. CN = control negativo, AFB1 = control positivo, CUR = dispersión de curcumina, CEL = formulación de polímeros celulósicos, y CEL+CUR = formulación de polímeros celulósicos y dispersión de curcumina.

El efecto de la suplementación con CUR en la pigmentación de la piel se evaluó y comparó con el grupo CN, ya que se informó anteriormente que la CUR tiene, además de los efectos beneficiosos para contrarrestar la toxicidad de AFB1, efectos positivos en la pigmentación de la piel de pollos de engorda que es una calidad esencial de la carne de aves de corral para los consumidores en muchos países [206]. En el presente estudio, no tuvimos mucho interés en el enrojecimiento de la piel, ya que no es un buen parámetro cuando las aves están vivas porque el enrojecimiento de los vasos sanguíneos interfiere con la lectura. Además, los pigmentos amarillos de la CUR podrían haber enmascarado el enrojecimiento de los vasos sanguíneos y los músculos, lo que tal vez sea la razón por la que el grupo CN tuvo los valores más altos de a* en la piel [207]. No obstante, los resultados de este estudio mostraron que los grupos cuya dieta incluía CUR como parte del tratamiento contra los efectos tóxicos de la AFB1 dieron como resultado una mejor pigmentación de la piel que aquellos que no la

recibieron, produciendo un color amarillo en la piel del muslo y la almohadilla plantar de las aves de estos grupos. Este resultado puede dar un beneficio adicional al uso de la CUR para lograr el control de la aflatoxicosis en aves de corral y aumentar la aceptación del color de la piel por parte del consumidor.

El uso de materiales adsorbentes contra AFB1 es un campo que se ha explorado en las últimas décadas; aunque la mayoría de estos estudios se han centrado en materiales inorgánicos, nuevos adsorbentes orgánicos o biopolímeros, y polímeros sintéticos se están estudiando y probando recientemente [208]. En este proyecto hemos demostrado la eficiencia de adsorción de los polímeros celulósicos *in vitro*, y los resultados sugieren que tienen una alta capacidad de adsorción para unirse a AFB1, y con los resultados del estudio *in vivo* se confirma la efectividad de estos polímeros para prevenir los efectos tóxicos de esta micotoxina en pollos de engorda.

Además, se observó un aumento de la respuesta inmune celular con la adición de la CEL a la dieta, lo que coincide con informes previos de actividad inmunomoduladora de la CEL. Esto puede resultar de los cambios en la expresión génica de varias moléculas tras la estimulación con CEL; moléculas como el factor nuclear kappa B (NF- κ B) se activan a través de vías de señalización cuando la CEL se une a receptores de lectina tipo Toll y tipo C, además de que varios genes dentro de estas vías tienen una expresión regulada negativamente, lo que modula los perfiles de citoquinas y el estado inmunitario [209,210]. Además, como se mencionó anteriormente, se ha demostrado que la CUR es un quimioprotector natural eficaz contra los efectos tóxicos de la AFB1 a través de tres mecanismos primarios, sus efectos antioxidantes, acciones inmunomoduladoras y actividades inhibitorias contra las isoenzimas del citocromo P450, sin olvidar sus importantes propiedades hepatoprotectoras [172,211], que se potencializaron debido al aumento de su biodisponibilidad y, por lo tanto, a su eficiencia y funcionalidad.

La siguiente parte del proyecto consistió en evaluar la efectividad de una combinación de bacterias probióticas del género *Bacillus*, incorporadas como aditivo microbiano para alimentación directa (DFM) en la dieta de las aves, para contrarrestar los efectos tóxicos ocasionados por la AFB1. Por cuestiones de espacio-tiempo, y por razones prácticas y económicas, se decidió evaluar este DFM directamente *in vivo* sin tener estudios *in vitro* indicativos de su efectividad contra los efectos de esta micotoxina. No obstante, las características biológicas de las bacterias probióticas que constituyen este DFM nos permitían inferir que su incorporación en la dieta de las aves tendría un efecto benéfico para contrarrestar la toxicidad de la AFB1. Una de estas características es su capacidad para producir enzimas, compuestos antimicrobianos y biopelículas, los cuales pudieran ser efectivos para prevenir y controlar los efectos tóxicos de AFB1. Las cepas de *Bacillus* que se evaluaron fueron seleccionadas por su capacidad para formar esporas que pueden sobrevivir y colonizar el tracto intestinal de las aves, y por su superioridad para la producción de enzimas [212]; las cuales han demostrado tener un papel importante en la degradación e inactivación de esta micotoxina [78,213]. Por otra parte, también ha sido reportada la capacidad de estas cepas bacterianas para adsorber a la AFB1 en su pared celular [214].

Como se observa en la Tabla 17, las diferencias en el BW son significativas a partir del día 14 del experimento, cuando el BW del grupo AFB1 comenzó a ser más bajo en comparación con los grupos CN y DFM. Al día 21, el BW de los grupos CN y DFM fue mayor que el grupo AFB1. Las diferencias en BWG comenzaron a observarse a partir de la segunda semana (días 7–14), con valores más altos para los grupos CN y DFM. La última semana del experimento (días 14-21), el valor del BWG del grupo DFM permaneció más alto que el grupo AFB1, pero más bajo que el grupo CN. Al final del experimento, los grupos CN y DFM obtuvieron valores de BWG más altos en comparación con el grupo AFB1. Ninguno de los grupos mostró cambios en el consumo de alimento durante todo el experimento. El grupo AFB1 tuvo el valor más alto de FCR en comparación con los grupos CN y DFM, mientras que no hubo diferencias entre los grupos CN y DFM.

Tabla 17. Evaluación del peso corporal (BW), ganancia de peso corporal (BWG), consumo de alimento (FI) y conversión alimenticia (FCR) en pollos de engorda que consumieron una dieta a base de maíz y soya contaminada con AFB1 (2 ppm) suplementada con o sin DFM¹.

	CN	AFB1	DFM	SEM ²	Valor de p
BW, g/ave					
d 0	46.23 ± 0.68 ^a	47.92 ± 0.72 ^a	48.12 ± 0.74 ^a	0.4174	0.1275
d 7	133.29 ± 4.64 ^a	129.92 ± 2.78 ^a	137.02 ± 4.19 ^a	2.2763	0.4502
d 14	320.92 ± 17.53 ^a	272.06 ± 8.54 ^b	318.42 ± 14.65 ^a	8.4215	0.0263
d 21	640.10 ± 31.51 ^a	474.81 ± 15.57 ^b	571.60 ± 25.47 ^a	16.2361	0.0001
BWG, g/ave					
d 0-7	87.06 ± 4.24 ^a	82.00 ± 2.71 ^a	88.90 ± 4.15 ^a	2.1705	0.4103
d 7-14	187.63 ± 13.82 ^a	142.13 ± 7.06 ^b	181.40 ± 11.38 ^a	6.7337	0.0097
d 14-21	319.17 ± 16.08 ^a	202.75 ± 9.77 ^c	253.17 ± 14.89 ^b	9.5832	< 0.0001
d 0-21	593.87 ± 31.21 ^a	426.88 ± 15.66 ^c	523.48 ± 25.42 ^b	16.2105	0.0001
FI, g/ave					
d 0-21	750.55 ± 17.23 ^a	775.93 ± 3.51 ^a	731.97 ± 82.35 ^a	25.1292	0.8193
FCR					
d 0-21	1.27 ± 0.06 ^b	1.82 ± 0.06 ^a	1.40 ± 0.06 ^b	0.0875	0.0016

¹Los datos se expresan como media ± error estándar. ²Error estándar de la media. ^{a-c} Los superíndices diferentes dentro de las filas indican una diferencia significativa ($p < 0.05$), según la prueba de rangos múltiples de Duncan; $n = 30$. CN = control negativo, y AFB1 = control positivo.

Como se mencionó anteriormente, ya existen muchos informes de los efectos perjudiciales de AFB1 en los parámetros de rendimiento, de hecho, este es el efecto económicamente más significativo de la aflatoxicosis en las aves de corral [215,216]. La disminución en los parámetros de rendimiento resulta de alteraciones en los mecanismos de utilización de proteínas y lípidos, así como del efecto inhibitorio de la AFB1 sobre la síntesis de proteínas y la lipogénesis, que deteriora la eficiencia digestiva y metabólica de las aves y, por lo tanto, afecta su crecimiento y salud general [160,216]. La adición del DFM a la dieta contaminada con AFB1 mejoró los parámetros productivos, lo que podría ocurrir principalmente a través de la mejora en la digestión enzimática y de nutrientes, ya que las cepas de *Bacillus* pueden producir ciertos nutrientes esenciales y enzimas extracelulares, así como proporcionar los factores de crecimiento necesarios para promover el crecimiento del hospedero [216,217]. Además, las cepas de *Bacillus* han demostrado la capacidad de esporular y resistir diferentes condiciones bioquímicas del tracto gastrointestinal de las aves de corral, secretando sustancias activas que podrían degradar AFB1 y, por lo tanto, reducir su absorción [218,219].

Como se mencionó anteriormente, la selección de estas cepas de *Bacillus* para la formulación del DFM estuvo justificada en el hecho de que estos microorganismos pueden producir un conjunto variable de enzimas [212], que podrían actuar sobre la lactona o el anillo de difurano en la molécula de la AFB1, reduciendo su toxicidad [220,221].

Como se muestra en la Tabla 18, no hubo diferencia en el peso de los hígados de las aves que recibieron el DFM en comparación con el grupo CN, pero fue menor en comparación con el grupo AFB1. No se observaron diferencias significativas en el peso de los intestinos de los tres grupos. El peso relativo del bazo aumentó solo en las aves del grupo AFB1, mientras que las tratadas con DFM se mantuvieron similares al grupo CN. Con respecto al peso relativo de la bolsa de Fabricio, el grupo CN mostró valores más altos en comparación con el grupo AFB1, mientras que el grupo DFM no mostró diferencias con ninguno de los otros grupos. El grupo AFB1 tuvo el valor más bajo de la relación del peso del bazo respecto al de la bolsa de Fabricio, mientras que el grupo DFM fue similar al grupo CN.

Tabla 18. Peso relativo del hígado, bazo, bolsa de Fabricio e intestino de pollos de engorda que consumieron alimento contaminado con AFB1 (2 ppm) durante 21 días suplementados c suplementada con o sin DFM¹.

Peso relativo (g)	CN	AFB1	DFM	SEM ²	Valor de p
Hígado	3.301 ± 0.103 ^b	4.427 ± 0.166 ^a	3.516 ± 0.141 ^b	0.1078	< 0.0001
Intestino	9.804 ± 0.507 ^a	10.211 ± 0.409 ^a	9.781 ± 0.525 ^a	0.2741	0.7796
Bazo	0.121 ± 0.008 ^b	0.168 ± 0.012 ^a	0.118 ± 0.006 ^b	0.0062	0.0006
Bolsa de Fabricio	0.286 ± 0.021 ^a	0.226 ± 0.011 ^b	0.260 ± 0.016 ^{ab}	0.0100	0.0454
Relación Bazo / Bolsa	2.380 ± 0.113 ^a	1.435 ± 0.125 ^b	2.259 ± 0.140 ^a	0.0953	< 0.0001

¹Los datos se expresan como media ± error estándar. ²Error estándar de la media. ^{a, b} Los superíndices diferentes dentro de las filas indican una diferencia significativa ($p < 0.05$), según la prueba de rangos múltiples de Duncan; n = 15. CN = control negativo, y AFB1 = control positivo.

El análisis histológico del hígado reveló un mayor nivel de lesión hepática en el grupo AFB1, en comparación con los grupos CN y DFM, como se muestra en la Tabla 19. El análisis reveló degeneración hepatocelular caracterizada por una extensa vacuolización en el grupo AFB1, en comparación con el grupo CN. Los hallazgos histológicos en las muestras de hígado del grupo AFB1 también revelaron un cambio en la disposición y proliferación de células en los conductos biliares cerca del espacio portal del hígado o entre los hepatocitos,

con la presencia de necrosis focal e infiltrados inflamatorios de células. Tanto la degeneración hepatocelular como la infiltración linfoide disminuyeron cuando se agregó el DFM a la dieta, ya que las aves de este grupo mostraron puntuaciones de las lesiones más bajas que las del grupo AFB1.

Tabla 19. Degeneración hepatocelular e infiltración de células inflamatorias en hígado de pollos de engorda que consumieron alimento contaminado con AFB1 (2 ppm) durante 21 días suplementados con o sin DFM ¹.

	CN	AFB1	DFM
Degeneración hepatocelular	2.50 (2.00; 1.37) ^b	3.50 (3.00; 1.07) ^a	1.00 (1.00; 0.27) ^c
Infiltración linfoide	1.00 (1.00; 0.40) ^b	3.50 (4.00; 1.37) ^a	1.00 (1.00; 0.40) ^b
Infiltración heterófila	0.50 (1.00; 0.30) ^b	1.50 (1.00; 3.87) ^a	1.00 (1.00; 1.37) ^{ab}

¹Los datos se expresan como mediana (moda; varianza). ^{a-c} Los superíndices diferentes dentro de las filas indican una diferencia significativa ($p < 0.05$), según la prueba de Mann-Whitney U; n = 12. CN = control negativo, y AFB1 = control positivo.

El incremento en el tamaño y en el peso del hígado se atribuyen al aumento en el contenido de lípidos, que produce un hígado friable y graso [167,222]. Estos resultados están respaldados por las observaciones histopatológicas, en las que se observó degeneración vacuolar y deposición severa de grasa en el hígado de las aves del grupo AFB1, como resultado del transporte de lípidos deteriorado más que por el aumento en la biosíntesis de lípidos [170]. En el grupo AFB1 también se observaron grandes infiltrados de células inflamatorias, compuestos principalmente por linfocitos y heterófilos, como mecanismo para responder a los hepatocitos degenerados vacuolados [171]. El mantenimiento del peso del hígado y la menor gravedad de las lesiones histopatológicas en el grupo DFM probablemente se debieron a una modificación en la síntesis, el transporte y la acumulación de lípidos en el hígado, ya que se ha demostrado que la suplementación dietética con cepas de *Bacillus* puede influir en el metabolismo de los lípidos a través de la promoción y/o supresión de los metabolitos de los lípidos en suero [223]. La bolsa de Fabricio en el grupo AFB1 mostró una disminución en su peso relativo, que podría ser causada por la necrosis o el deterioro celular de este órgano linfoide, ya que se ha demostrado un menor número de células mitóticas durante la aflatoxicosis, así como deterioro linfocelular y arresto en el ciclo celular de las

células de la bolsa de Fabricio de los pollos de engorda [173,224]. Por otro lado, el aumento del peso relativo del bazo podría ser un mecanismo compensatorio para la disminución del peso y la actividad de la bolsa de Fabricio [174,224], sumado a la congestión de la pulpa roja de este órgano, lo que resulta en la función inmune humoral y celular posiblemente alterada [225].

La relación del peso de la bolsa de Fabricio y el bazo confirmó este efecto, ya que los valores más bajos en el grupo AFB1 pueden reflejar el mayor peso del bazo debido a la mayor migración de las subpoblaciones de linfocitos y su proliferación, así como a la disminución del peso de la bolsa causada por su atrofia [175,176]. La suplementación dietética con este *Bacillus*-DFM mostró una mayor relación bolsa/bazo porque la bolsa de Fabricio conservó la mayor parte de su integridad y el bazo no recibió subpoblaciones de linfocitos migratorios; por lo tanto, esta relación puede usarse como un indicador de campo del estado inmune, mejor que el peso relativo de la bolsa sola. Se ha demostrado que un mecanismo esencial de la acción probiótica es la estimulación del sistema inmune [226], y también se podría hipotetizar que estas cepas de *Bacillus* pueden unirse o degradar con éxito la AFB1 en el tracto gastrointestinal de los pollos de engorda, evitando su absorción y, por lo tanto, mejorando el peso relativo de estos tejidos linfoides, lo que también puede explicar los efectos positivos observados en la capacidad de producir anticuerpos tanto sistémicos (contra ND) como locales (IgA).

Respecto al peso relativo del intestino, no hubo diferencias entre ninguno de los grupos experimentales, lo que sugiere que es un órgano dinámico que puede adaptarse a una exposición crónica a la AFB1 como se ha demostrado previamente [177]. Esto también puede explicar los resultados de la mucina sérica y la citrulina, dos biomarcadores confiables de la salud y la función de la barrera intestinal [179,227], que no se modificaron significativamente en ninguno de los grupos experimentales.

La actividad de la SOD en los grupos CN y DFM fue similar y mayor que en el grupo AFB1. Con respecto a los marcadores de integridad intestinal mucina y citrulina, no se observaron diferencias estadísticas entre los grupos. Respecto a los niveles de CRP, el grupo

CN tuvo una concentración sérica más baja en comparación con el grupo AFB1, mientras que el grupo DFM estaba entre los dos otros grupos control. El título de anticuerpos contra la enfermedad de Newcastle y los niveles de IgA intestinal se midieron como indicadores inmunológicos (Tabla 20). En ambas mediciones, el grupo CN mostró niveles más altos que el grupo AFB1. El grupo DFM tuvo un título de anticuerpos más alto en comparación con el grupo AFB1 y similares al grupo CN, pero respecto a los niveles de IgA intestinal, este grupo solo mostró niveles numéricamente más altos que el grupo AFB1, lo que sugiere que la inclusión de DFM en la dieta de los pollos de engorda ayuda a preservar la respuesta inmune humoral sistémica y local.

Tabla 20. Efecto del DFM sobre los niveles séricos de superóxido dismutasa (SOD), mucina, citrulina y proteína C reactiva (CRP), los títulos de anticuerpos contra la enfermedad de Newcastle (ND) y los niveles de IgA intestinal en pollos de engorda que consumieron una dieta a base de maíz y soya contaminada con AFB1 (2 ppm) durante 21 días¹.

	SOD (U/mL)	Mucina (pg/mL)	Citrulina (nmol/mL)	CRP (ng/mL)	Título de anticuerpos contra ND	IgA intestinal (µg/mL)
CN	13.14 ± 0.18 ^a	53.78 ± 10.18 ^a	18.40 ± 2.64 ^a	23.89 ± 1.17 ^b	1327.40 ± 99.70 ^a	42.47 ± 7.46 ^a
AFB1	10.25 ± 0.73 ^b	50.81 ± 8.24 ^a	13.90 ± 1.97 ^a	33.42 ± 4.43 ^a	846.50 ± 29.03 ^b	25.47 ± 2.38 ^b
DFM	12.24 ± 0.36 ^a	54.18 ± 6.04 ^a	13.62 ± 3.24 ^a	24.97 ± 2.54 ^{ab}	1144.70 ± 93.06 ^a	33.73 ± 3.06 ^{ab}
SEM²	0.3434	4.4983	1.5394	1.8910	58.0181	2.9942
Valor de p	0.0006	0.9507	0.3754	0.0731	0.0010	0.0629

¹Los datos se expresan como media ± error estándar. ²Error estándar de la media. ^{a-c} Los superíndices diferentes dentro de la misma columna indican una diferencia significativa ($p < 0.05$), según la prueba de rangos múltiples de Duncan; $n = 12$. CN = control negativo, y AFB1 = control positivo.

Dado que la SOD es una enzima que forma parte fundamental de los sistemas de defensa antioxidante, su actividad se determinó para investigar el efecto del DFM contra las especies reactivas de oxígeno generadas intracelularmente por el consumo de AFB1. Los datos de este experimento muestran que la actividad de la SOD disminuyó en los pollos tratados con AFB1, lo que confirma que existe una regulación negativa de la expresión del gen SOD, como se describió anteriormente [180]. La actividad de SOD fue mayor en pollos alimentados con la dieta suplementada con el tratamiento DFM, lo que sugiere que este *Bacillus*-DFM contrarresta el daño oxidativo causado por la AFB1, ya sea por su capacidad

de absorción o su capacidad antioxidante. Los probióticos dietéticos, específicamente las cepas de *Bacillus*, han demostrado ser benéficos para mejorar los efectos adversos del estrés oxidativo y promover la actividad de las enzimas antioxidantes, ayudando así a la resistencia contra la oxidación, eliminando los radicales hidroxilo y aumentando la capacidad antioxidante [228,229].

La respuesta de anticuerpos a la vacuna contra ND y la concentración total de IgA intestinal fueron menores en las aves del grupo AFB1 como resultado de la inmunodepresión, lo que podría deberse a la capacidad de AFB1 para inhibir la ARN polimerasa. Esta inhibición da como resultado la disminución de la síntesis de proteínas en general, pero particularmente de las inmunoglobulinas; además, hay un aumento de la digestión lisosómica de las inmunoglobulinas, con reducción y degeneración de los linfocitos en los folículos bursales y el deterioro de la formación de citocinas por los linfocitos [62,183]. El DFM mantuvo la capacidad de las aves para producir anticuerpos contra ND al mismo nivel que los pollos que no reciben AFB1 y mostró una tendencia a producir un mayor nivel de IgA intestinal en comparación con el grupo AFB1. Se ha reportado que los DFM basados en *Bacillus* modulan las respuestas inmunes humoral y celular en pollos de engorda al aumentar el número de células de los órganos linfoides y, por lo tanto, activan la respuesta inmune del bazo y el timo [217]. Varios estudios han informado que los DFM mejoran la respuesta humoral de los pollos de engorda, posiblemente al aumentar la frecuencia de las células secretoras de inmunoglobulina circulantes [230,231], lo que puede estar relacionado con la activación y maduración de las células inmunes epiteliales, así como con el aumento de la actividad y el número de células T y B, lo que conduce a la proliferación activa, la inducción local de citocinas específicas y el aumento de la síntesis de inmunoglobulinas [232].

Curiosamente, se observó el mismo efecto para la respuesta inmune celular, evaluada con la respuesta CBH, que mejoró con el uso del DFM, como se muestra en la Tabla 21. Los resultados revelaron una disminución en la respuesta CBH en las aves del grupo AFB1 a las 12 y 24 horas después de la inyección de PHA-M en comparación con el grupo CN. El grupo tratado con DFM permaneció sin diferencias en comparación con el grupo CN a las 12 y 48 horas después de la inyección y mostró una respuesta de CBH más alta que el grupo AFB1.

Tabla 21. Efecto del DFM en la respuesta a la hipersensibilidad cutánea por basófilos (CBH) inducida por la PHA-M en pollos de engorda que consumieron una dieta a base de maíz y soya contaminada con AFB1 (2 ppm)¹.

	12 h (mm)	24 h (mm)
CN	0.692 ± 0.052 ^a	0.788 ± 0.072 ^a
AFB1	0.486 ± 0.041 ^b	0.577 ± 0.057 ^b
DFM	0.639 ± 0.053 ^a	0.779 ± 0.059 ^a
SEM²	0.0312	0.0389
Valor de p	0.0153	0.0376

¹Los datos se expresan como media ± error estándar. ²Error estándar de la media. ^{a-b} Los superíndices diferentes dentro de la misma columna indican una diferencia significativa ($p < 0.05$), según la prueba de rangos múltiples de Duncan; $n = 12$. CN = control negativo, y AFB1 = control positivo.

Nuestros resultados muestran que las aves del grupo AFB1 tuvieron una respuesta a CBH más baja a las 12 y 24 horas después de la inyección de PHA, que es el resultado de la inhibición de la capacidad quimiotáctica de los leucocitos y la capacidad fagocítica de los heterófilos en los pollos [233]. Curiosamente, las aves del grupo DFM mostraron una respuesta CBH similar al grupo CN a las 12 y 24 horas después de la inyección de PHA, lo que indica que esta DFM podría mejorar la función inmune celular. Esto podría estar relacionado con el posible efecto de las bacterias probióticas para activar las células dendríticas en las placas de Peyer, estimulando el conjunto circulante de linfocitos T de la mucosa [234], o la capacidad bien estudiada de las cepas de *B. subtilis* para regular significativamente las citocinas proinflamatorias necesarias para el inicio y la regulación de la inmunidad celular a través de la diferenciación de las células T vírgenes en células Th-1 [235,236].

Finalmente, el efecto del DFM contra 2 ppm de AFB1 en las variables bioquímicas séricas se muestra en la Tabla 22. La inclusión de AFB1 en la alimentación indujo cambios significativos en la mayoría de los parámetros bioquímicos del grupo control, excepto ALP, AST, BUN y ácido úrico. Se observó una disminución en los niveles séricos de albúmina, proteínas totales, colesterol, triglicéridos, glucosa, creatinina y minerales como fósforo inorgánico, magnesio y hierro en el grupo AFB1 en comparación con el grupo CN. El tratamiento con DFM ayudó a disminuir los efectos adversos de AFB1 manteniendo concentraciones séricas más altas de albúmina, proteínas totales, colesterol, triglicéridos y

glucosa en comparación con el grupo AFB1. Aunque para algunos parámetros, como la albúmina, el colesterol y la glucosa, el grupo DFM no alcanzó niveles séricos similares al grupo CN, mostró niveles más altos que el grupo AFB1. Con respecto a los minerales, el tratamiento con DFM ayudó a mantener los niveles de magnesio más altos que el grupo AFB1, mientras que el fósforo inorgánico y el hierro solo mejoraron numéricamente. Por otro lado, el tratamiento con DFM no ayudó a mantener valores séricos de creatinina similares al grupo CN, permaneciendo similares a los del grupo AFB1. También se mostró un aumento en los niveles séricos de ALT y GGT en el grupo AFB1 en comparación con los grupos CN y DFM.

Tabla 22. Efecto del DFM sobre los parámetros bioquímicos séricos en pollos de engorda que consumieron una dieta a base de maíz y soya contaminada con AFB1 (2 ppm) durante 21 días¹.

	CN	AFB1	DFM	SEM ²	Valor de p
Albúmina (g/dL)	1.12 ± 0.03 ^a	0.61 ± 0.07 ^c	0.78 ± 0.05 ^b	0.0488	< 0.0001
Proteínas totales (g/dL)	2.09 ± 0.06 ^a	1.60 ± 0.18 ^b	1.99 ± 0.11 ^a	0.0805	0.0256
ALP (U/L)	278.10 ± 19.96 ^a	344.50 ± 28.76 ^a	267.80 ± 29.79 ^a	16.0744	0.1043
ALT (U/L)	1.78 ± 0.22 ^b	3.69 ± 0.49 ^a	2.32 ± 0.46 ^b	0.2703	0.0074
AST (U/L)	201.81 ± 7.72 ^a	200.28 ± 14.48 ^a	208.34 ± 9.61 ^a	6.1510	0.8597
GGT (U/L)	12.70 ± 0.68 ^b	15.30 ± 0.76 ^a	12.00 ± 0.70 ^b	0.4779	0.0075
BUN (mg/dL)	2.89 ± 0.07 ^a	2.47 ± 0.15 ^a	2.55 ± 0.19 ^a	0.0881	0.1162
Colesterol (mg/dL)	116.20 ± 4.43 ^a	65.70 ± 7.76 ^c	88.20 ± 8.59 ^b	5.5329	0.0001
Triglicéridos (mg/dL)	136.10 ± 11.61 ^a	70.00 ± 6.64 ^b	108.70 ± 14.42 ^a	8.0853	0.0013
Glucosa (mg/dL)	422.00 ± 18.09 ^a	287.50 ± 12.60 ^c	329.20 ± 7.33 ^b	12.8366	< 0.0001
Creatinina (mg/dL)	0.27 ± 0.01 ^a	0.21 ± 0.01 ^b	0.22 ± 0.01 ^b	0.0088	0.0067
Ácido úrico (mg/dL)	11.54 ± 0.73 ^a	13.61 ± 0.89 ^a	12.85 ± 0.60 ^a	0.4472	0.1622
P (mg/dL)	9.14 ± 0.23 ^a	7.36 ± 0.41 ^b	8.22 ± 0.36 ^{ab}	0.2328	0.0040
Mg (mEq/L)	3.79 ± 0.14 ^a	2.72 ± 0.10 ^c	3.14 ± 0.10 ^b	0.1043	< 0.0001
Fe (µg/dL)	130.30 ± 5.21 ^a	95.40 ± 8.94 ^b	112.50 ± 5.01 ^{ab}	4.5471	0.0038

¹Los datos se expresan como media ± error estándar. ²Error estándar de la media. ^{a-d} Los superíndices diferentes dentro de la misma fila indican una diferencia significativa (p < 0.05), según la prueba de rangos múltiples de Duncan; n = 12. ALP = fosfatasa alcalina, ALT = alanina aminotransferasa, AST = aspartato aminotransferasa, GGT = gamma glutamiltransferasa, BUN = nitrógeno ureico en sangre, P = fósforo, Mg = magnesio, Fe = hierro, CN = control negativo, y AFB1 = control positivo.

Los resultados mostraron una disminución aparente en las proteínas totales y los niveles séricos de albúmina en aves del grupo AFB1, en comparación con el grupo CN. Dado que el consumo de AFB1 causa daño hepático, la síntesis de proteínas se ve comprometida, lo que resulta en una disminución de los niveles de proteínas séricas, incluida la albúmina. La disminución en la síntesis de proteínas podría deberse a la formación de aductos, ya que se ha informado que la AFB1 puede formar aductos de ADN o ARN que alteran la transcripción y la traducción en la expresión génica, también puede formar aductos de lisina que producen degradación o excreción de proteínas, o por inhibición selectiva de la ARN polimerasa II, perjudicando la síntesis de ARN mensajero [187,188].

Otro indicador de daño hepático causado por la AFB1 es la alteración en los niveles séricos de enzimas hepáticas [237]. En este experimento, las aves del grupo AFB1 mostraron una mayor actividad sérica de las enzimas ALT y GGT, y también hubo un aumento aparente en la actividad de ALP en comparación con las aves del grupo CN. Estas enzimas se encuentran en el citoplasma y las mitocondrias de los hepatocitos, por lo que cuando se daña la integridad estructural del hígado y aumenta la permeabilidad de la membrana celular o la necrosis de los hepatocitos, estas enzimas se filtran del citosol al torrente sanguíneo [238]. Además, estos cambios también se observan en casos de obstrucción o daño en el sistema biliar, ya sea dentro del hígado o en los canales biliares más grandes fuera del hígado [37]. Por el contrario, no hubo diferencias significativas en los niveles séricos de AST cuando las aves fueron alimentadas con AFB1, lo cual coincide con las observaciones realizadas anteriormente [239]. Esto también podría estar relacionado con el hecho de que la AST también está presente en el citoplasma y las mitocondrias de tejidos como los músculos esquelético y cardíaco [189]. La ingesta de probióticos se ha reconocido por su efecto hepatoprotector y su capacidad para reducir la alteración de las actividades de las enzimas hepáticas [240]. En la salud del hígado, los principales beneficios de los probióticos pueden ocurrir al prevenir la producción y la absorción de lipopolisacáridos en el intestino y, por lo tanto, reducir los niveles de inflamación de bajo grado [241].

Estudios anteriores también han demostrado que el consumo de AFB1 causa alteraciones en el metabolismo de los lípidos [242,243], lo que podría ser una consecuencia del

metabolismo hepático alterado después del daño hepatocelular, lo que lleva a una biosíntesis reducida de colesterol y triglicéridos, relacionado con la inhibición de la movilización y el transporte de estos lípidos al tejido periférico, lo que resulta en la acumulación de estos lípidos en el hígado [192,222] Además, estudios recientes han demostrado que la AFB1 puede regular negativamente el PPAR α , una proteína del receptor nuclear que es un regulador primario de la homeostasis de los lípidos y la glucosa. Esta regulación negativa puede conducir a un aumento de la expresión y la actividad de una enzima de la lipólisis, la lipoproteína lipasa, y por lo tanto promueve la eliminación de las lipoproteínas ricas en triglicéridos, así como de los niveles de triglicéridos circulantes [194]. Curiosamente, los niveles séricos de colesterol y triglicéridos en el grupo DFM fueron más altos que en el grupo AFB1, pero no pudieron alcanzar niveles similares a los del grupo CN. Esto se debe a que la suplementación con probióticos reduce significativamente los niveles séricos de colesterol y triglicéridos en pollos de engorde al afectar el metabolismo de los lípidos a nivel de absorción, movilización y recirculación [244]. Se han establecido varios mecanismos a través de los cuales los microorganismos probióticos causan este efecto hipolipidémico. Algunos de estos microorganismos podrían usar el colesterol presente en el tracto gastrointestinal para su metabolismo, reduciendo así la cantidad absorbida. Otros microorganismos reducen el colesterol en la sangre al desconjugar las sales biliares en el intestino, evitando así que actúen como precursores en la síntesis de colesterol. Además, también se ha demostrado que los microorganismos probióticos inhiben o disminuyen la actividad de enzimas como la acetil-CoA carboxilasa y la hidroximetilglutaril-coenzima A, enzimas relacionadas con la esterificación de ácidos grasos a triglicéridos y vías de síntesis de colesterol, reduciendo el almacenamiento de estos lípidos en suero e hígado [245]. Este efecto también podría explicar el menor peso relativo del hígado observado en el grupo DFM en comparación con el grupo AFB1, ya que la menor absorción intestinal de lípidos o su mayor catabolismo evita la redistribución de lípidos del suero al hígado.

Con respecto a los niveles séricos de glucosa y creatinina, ambos disminuyeron cuando las aves fueron alimentadas con AFB1, lo que también ha sido reportado anteriormente [246,247]. Los niveles séricos más bajos de glucosa podrían ser consecuencia de la actividad

reducida de las enzimas involucradas en el catabolismo de carbohidratos y la distrofia hepática asociada con la glucogenólisis y la gluconeogénesis, pero también de la regulación negativa de PPAR α [194,196]. Aunque el nivel de glucosa en suero de las aves del grupo DFM no pudo alcanzar un nivel similar al grupo CN, hubo un aumento significativo en comparación con el grupo AFB1. Los efectos pro-absorbentes del DFM pueden causar este efecto a través de la estimulación de la absorción difusional trans y paracelular de glucosa, debido al aumento de las tasas de producción de células de la cripta, el mayor número de poros pequeños en las vellosidades, el aumento de la actividad enzimática en la membrana del borde de cepillo, aumento del flujo de glucosa en la mucosa y una estimulación marcada de la absorción de D-glucosa dependiente de sodio en las vesículas de la membrana del borde de cepillo con el aumento correspondiente del cotransportador de sodio-glucosa tipo 1 en todas las diferentes regiones de la sección intestinal [248,249]. Por otro lado, un nivel de creatinina sérica más bajo en el grupo AFB1 puede indicar toxicidad renal y enfermedad hepática grave [194,246]. La disminución del nivel sérico de creatinina en el grupo AFB1 es el resultado de una menor ganancia de masa muscular asociada con problemas hepáticos causados por esta micotoxina, ya que la creatinina es un metabolito resultante de la degradación de la fosfocreatina muscular, y su nivel disminuye cuando hay una utilización reducida de fosfocreatina para las contracciones musculares inferiores [197]. El nivel sérico de creatinina del grupo DFM no fue comparable al del grupo CN, lo que sugiere que este *Bacillus*-DFM no pudo disminuir o prevenir la lesión renal causada por AFB1.

Finalmente, se analizaron los niveles séricos de algunos minerales como P, Mg y Fe, cuyos valores en las aves que consumieron 2 ppm de AFB1 fueron más bajos que en las aves de grupo CN, lo cual coincide con informes anteriores que indican que durante la aflatoxicosis se produce una alteración severa en el metabolismo o absorción de minerales principalmente debido a las lesiones hepáticas y renales [95,250,251]. La disminución de los niveles de P y Mg puede ser el resultado de un desequilibrio entre la absorción intestinal y la excreción renal con regulación adicional por las glándulas suprarrenales, tiroideas y paratiroides [201,250]; mientras tanto, las alteraciones de Fe probablemente estén relacionadas con la inflamación del hígado y el metabolismo alterado de las proteínas [203]. Aunque la inclusión

en la dieta de este DFM no pudo mejorar por completo la disminución de los niveles de minerales en suero en las aves que consumieron AFB1, hubo un marcado aumento en sus niveles séricos. Esto podría atribuirse al ambiente favorable en el tracto intestinal ocasionado por el consumo de *Bacillus spp.*, ya que se ha demostrado que las cepas probióticas pueden disminuir el pH de la superficie en el duodeno, el yeyuno, el íleon y el ciego, creando un mejor ambiente para la absorción de minerales [203,252].

Como se pudo observar en los resultados de los experimentos realizados para evaluar la efectividad de las formulaciones y los tratamientos desarrollados contra los efectos tóxicos de la AFB1 en pollos de engorda, todos mostraron resultados favorables y prometedores para su aplicación práctica en la industria avícola. No obstante, cuando se evaluó la formulación desarrollada con los polímeros celulósicos y la dispersión sólida de CUR, en combinación con el *Bacillus*-DFM, los resultados no mostraron más ventajas de las que tuvieron ambos tratamientos de manera individual, por lo que se descartó la posibilidad de desarrollar un producto con ambos tratamientos.

8. CONCLUSIONES

- Los resultados del primer estudio demostraron que los polímeros celulósicos tuvieron la mayor capacidad de adsorción para todas las micotoxinas evaluadas, mostrando la capacidad adsorbente más baja para DON, y los porcentajes de adsorción más altos para ZEA y OTA.
- Aunque el quitosano de alto peso molecular y no reticulado que se evaluó mostró propiedades adsorbentes significativas contra cinco de las seis micotoxinas que se evaluaron, es posible que un quitosano de diferente peso molecular, grado de desacetilación o reticulado, pueda mostrar diferentes propiedades de adsorción contra estas micotoxinas.
- La caracterización fisicoquímica de los materiales poliméricos por técnicas como SEM, FTIR-ATR, y DSC, permitió sugerir un probable mecanismo mediante el cual se lleva a cabo el fenómeno de adsorción de la AFB1.
- El presente estudio confirmó que la PVP K30 resultó ser un acarreador apropiado para la preparación de una dispersión sólida de CUR por el método de evaporación del solvente, pudiendo confirmar la transformación de la curcumina del estado cristalino al amorfo con las técnicas de DSC y SEM.
- El uso de la dispersión sólida de CUR permitió mejorar sus propiedades biofarmacéuticas de solubilidad y permeabilidad, además de su estabilidad química, lo cual se vio reflejado en el incremento de su biodisponibilidad oral, sin incrementar su citotoxicidad.
- Debido a la naturaleza química de los polímeros celulósicos utilizados para el desarrollo de la formulación, su capacidad de adsorción depende del pH, siendo mayor a valores de pH superiores a 3.0.
- Los datos obtenidos del estudio *in vivo* comprobaron los efectos tóxicos ocasionados por el consumo crónico de AFB1 en pollos de engorda, afectando los parámetros productivos, bioquímicos e inmunológicos, así como un daño hepático grave.
- Aunque existen muchos métodos para contrarrestar los efectos tóxicos causados por la contaminación con AFB1, todavía no existe la estrategia perfecta para eliminar este

problema, por lo tanto, se deben combinar estrategias efectivas para superar las limitantes que cada una tiene, lo que conduce a una mejor prevención o incluso a la eliminación de problemas de aflatoxicosis en la industria avícola, mejorando la seguridad alimentaria, los problemas de salud pública y los beneficios económicos.

- La adición dietética de 0.3% de la formulación desarrollada con los polímeros celulósicos y 0.2% de la dispersión sólida de CUR por separado disminuyó significativamente algunos de los efectos tóxicos resultantes de la ingesta de AFB1. Sin embargo, el uso combinado de los polímeros celulósicos y la dispersión de CUR mostró un enfoque mejor integrado para el manejo de los problemas de salud en la avicultura relacionados con el consumo de AFB1, ya que tienen diferentes mecanismos de acción con diferentes efectos positivos.
- Actualmente existen métodos diferentes y efectivos para contrarrestar los efectos adversos causados por la contaminación con AFB1; sin embargo, la suplementación dietética con probióticos proporciona efectos benéficos adicionales, como la regulación en el equilibrio de la flora intestinal y las bacterias enterotoxigénicas, función de barrera, actividad antiinflamatoria y antioxidante, así como inmunomodulación humoral y celular.
- Nuestros resultados sugieren que el uso del *Bacillus*-DFM evaluado, en una concentración de 10^6 esporas/gramo de alimento, puede usarse para contrarrestar los efectos adversos que ocurren cuando los pollos de engorda consumen dietas contaminadas con altos niveles de AFB1, mostrando efectos benéficos sobre los parámetros productivos, el peso relativo de los órganos, las lesiones hepáticas, la respuesta inmune y las variables bioquímicas séricas.
- La combinación de la formulación desarrollada con los polímeros celulósicos y la dispersión sólida de CUR, con el *Bacillus*-DFM, no mostró más ventajas de las que tuvieron ambos tratamientos de manera individual, por lo que se descartó la posibilidad de desarrollar un producto con ambos tratamientos.

9. PUBLICACIONES

- Solís-Cruz, B., Hernández-Patlán, D., Beyssac, E., Latorre, J., Hernandez-Velasco, X., Merino-Guzman, R., Tellez G. and López-Arellano, R. (2017). Evaluation of chitosan and cellulosic polymers as binding adsorbent materials to prevent aflatoxin B1, fumonisin B1, ochratoxin, trichothecene, deoxynivalenol, and zearalenone mycotoxins through an *in vitro* gastrointestinal model for poultry. *Polymers*, 9(10), 529.



Communication

Evaluation of Chitosan and Cellulosic Polymers as Binding Adsorbent Materials to Prevent Aflatoxin B1, Fumonisin B1, Ochratoxin, Trichothecene, Deoxynivalenol, and Zearalenone Mycotoxins Through an In Vitro Gastrointestinal Model for Poultry

Bruno Solís-Cruz¹ , Daniel Hernández-Patlán¹ , Eric Beyssac², Juan D. Latorre³ , Xochitl Hernandez-Velasco⁴, Ruben Merino-Guzman⁴ , Guillermo Tellez^{3,*} and Raquel López-Arellano¹

¹ Unidad de Investigación Multidisciplinaria. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuautitlán Izcalli, Estado de México 54714, México; bruno_sc@comunidad.unam.mx (B.S.-C.); danielpatlan@comunidad.unam.mx (D.H.-P.); rlajjd@yahoo.com.mx (R.L.-A.)

² Clermont-Université, Université d'Auvergne, EA4678, Conception Ingénierie et Développement de L'aliment et du Médicament, 63001 Clermont-Ferrand, France; eric.beyssac@udamail.fr

³ Department of Poultry Science, University of Arkansas, Fayetteville, AR 72701, USA; juandlatorre@gmail.com

⁴ Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, México; xochitl_h@yahoo.com (X.H.-V.); onirem@unam.mx (R.M.-G.)

* Correspondence: gtellez@uark.edu; Tel.: +1-(479)-575-8495; Fax: +1-(479)-575-8490

Received: 28 August 2017; Accepted: 14 October 2017; Published: 19 October 2017

Abstract: Mycotoxins are secondary toxic metabolites that are produced by fungi representing threats to human and animal health. The objective of this study was to evaluate the adsorption capacity of Chitosan (CHI), and three cellulosic polymers (HPMC, CMC, and MCC), on six mycotoxins (AFB₁; FUB₁; OTA; T-2; DON; and, ZEA) using an *in vitro* digestive model for poultry. The adsorbent capacity of the materials in the supernatant of each compartment was evaluated by a non-competitive chemiluminescent assay. Control groups with no adsorbent material had an adsorption value of 0.00% against all six mycotoxins that were evaluated. All four materials tested showed significant ($p < 0.05$) binding activity against all of the mycotoxins when compared with the control non-treated group. However HPMC, CMC, and MCC showed better adsorbent capacity when compared with CHI.

Keywords: adsorption; cellulosic polymers; chitosan; *in vitro*; mycotoxins

- Solis-Cruz, B., Hernandez-Patlan, D., Petrone, V. M., Pontin, K. P., Latorre, J. D., Beyssac, E., Hernandez-Velasco, X., Merino-Guzman, R., Owens, C., Hargis, B. M., López-Arellano, R., and Tellez G. (2019). Evaluation of Cellulosic Polymers and Curcumin to Reduce Aflatoxin B1 Toxic Effects on Performance, Biochemical, and Immunological Parameters of Broiler Chickens. *Toxins*, 11(2), 121.



Article

Evaluation of Cellulosic Polymers and Curcumin to Reduce Aflatoxin B1 Toxic Effects on Performance, Biochemical, and Immunological Parameters of Broiler Chickens

Bruno Solis-Cruz ¹, Daniel Hernandez-Patlan ¹, Victor M. Petrone ¹, Karine P. Pontin ², Juan D. Latorre ³, Eric Beyssac ⁴, Xochitl Hernandez-Velasco ⁵, Ruben Merino-Guzman ⁵, Casey Owens ³, Billy M. Hargis ³, Raquel Lopez-Arellano ¹ and Guillermo Tellez-Isaias ^{3,*}

¹ Laboratorio 5: LEDEFAR, Unidad de Investigación Multidisciplinaria, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuautitlán Izcalli 54714, Estado de Mexico, Mexico; bruno_sc@comunidad.unam.mx (B.S.-C.); danielpatlan@comunidad.unam.mx (D.H.-P.); vmpetrone@hotmail.com (V.M.P.); lopezar@unam.mx (R.L.-A.)

² Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre RS 97105-900, Brazil; pontin.karine@gmail.com

³ Department of Poultry Science, University of Arkansas, Fayetteville, AR 72704, USA; juandlatorre@gmail.com (J.D.L.); cmowens@uark.edu (C.O.); bhargis@uark.edu (B.M.H.)

⁴ Laboratoire de Biopharmacie et Technologie Pharmaceutique, UFR de Pharmacie, Faculté de Pharmacie, Université Clermont Auvergne, 63001 Clermont-Ferrand, France; eric.beyssac@uca.fr

⁵ Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, Mexico; xochitl_h@yahoo.com (X.H.-V.); onirem@unam.mx (R.M.-G.)

* Correspondence: gtellez@uark.edu; Tel: +1-(479)-575-8495; Fax: +1-(479)-575-8490

Received: 24 January 2019; Accepted: 13 February 2019; Published: 16 February 2019



Abstract: To evaluate the effect of cellulosic polymers (CEL) and curcumin (CUR) on aflatoxin B1 (AFB1) toxic effects on performance, and the biochemical and immunological parameters in broiler chickens, 150 one-day-old male broiler chicks were randomly allocated into five groups with three replicates of 10 chickens per pen: Negative Control (feed); AFB1 (feed + 2 ppm AFB1); CUR (feed + 2 ppm AFB1 + Curcumin 0.2%); CEL (feed + 2 ppm AFB1 + 0.3% Cellulosic polymers); and, CEL + CUR (feed + 2 ppm AFB1 + 0.3% Cellulose polymers + 0.2% Curcumin). Every week, body weight, body weight gain, feed intake, and feed conversion ratio were calculated. On day 21, liver, spleen, bursa of Fabricius, and intestine from five broilers per replicate per group were removed to obtain relative organ weight. Histopathological changes in liver, several biochemical biomarkers, antibody titers, and muscle and skin pigmentation were also recorded. Dietary addition of 0.3% CEL and 0.2% CUR separately significantly diminished some of the toxic effects resulting from AFB1 on performance parameters, relative organs weight, histopathology, immune response, and serum biochemical variables ($P < 0.05$); however, the combination of CUR and CEL showed a better-integrated approach for the management of poultry health problems that are related with the consumption of AFB1, since they have different mechanisms of action with different positive effects on the responses of broiler chickens.

Keywords: aflatoxin B1; broiler chickens; cellulosic polymers; curcumin; performance

Key Contribution: The dietary addition of 0.3% cellulosic polymers and 0.2% curcumin, separately or in combination, significantly diminished some of the toxic effects that resulted from AFB1 on performance parameters, relative organs weight, histopathology, immune response, and serum biochemical variables.

- Solis-Cruz, B., Hernandez-Patlan, D., Petrone, V. M., Pontin, K. P., Latorre, J. D., Beyssac, E., Hernandez-Velasco, X., Merino-Guzman, R., Arreguin, M. A., Hargis, B. M., López-Arellano, R., and Tellez G. (2019). Evaluation of a *Bacillus*-based direct fed microbial on aflatoxin B1 toxic effects, performance, immunological status and serum biochemical parameters in broiler chickens. *Avian Diseases*.

AVIAN DISEASES 63:000–000, 2019

Evaluation of a *Bacillus*-Based Direct-Fed Microbial on Aflatoxin B1 Toxic Effects, Performance, Immunologic Status, and Serum Biochemical Parameters in Broiler Chickens

Bruno Solis-Cruz,^A Daniel Hernandez-Patlan,^A Victor M. Petrone,^A Karine P. Pontin,^B Juan D. Latorre,^C Eric Beyssac,^D Xochitl Hernandez-Velasco,^E Ruben Merino-Guzman,^E Margarita A. Arreguin,^F Billy M. Hargis,^C Raquel Lopez-Arellano,^A and Guillermo Tellez-Isaias^{CG}

^ALaboratorio 5: LEDEFAR, Unidad de Investigación Multidisciplinaria, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuautitlan Izcalli 54714, State of Mexico, Mexico

^BDepartamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre RS 97105-900, Brazil

^CDepartment of Poultry Science, University of Arkansas, Fayetteville, AR 72704

^DLaboratoire de Biopharmacie et Technologie Pharmaceutique, UFR de Pharmacie, Faculté de Pharmacie, Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand 63001, France

^EDepartamento de Medicina y Zootecnia de Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, Mexico

^FEco-Bio LLC, Fayetteville, AR 72701

Received 10 April 2019; Accepted 17 August 2019; Published ahead of print 17 August 2019

SUMMARY. The aim of the present study was to evaluate the effect of a commercial *Bacillus* direct-fed microbial (DFM) on aflatoxin B1 toxic effects, performance, and biochemical and immunologic parameters in broiler chickens. Ninety 1-day-old Cobb 500 male broiler chicks were raised in floor pens for a period of 21 days. Chicks were neck-tagged, individually weighed, and randomly allocated to one of three groups: Negative control (basal feed), aflatoxin B1 (basal feed + 2 ppm AFB1), and DFM (basal feed + 2 ppm AFB1 + *Bacillus* direct-fed microbial). Each group had three replicates of 10 chickens ($n = 30/\text{group}$). Body weight and body weight gain were calculated weekly, while feed intake and feed conversion ratio were determined when broilers were 21 days old. On day 21, all chickens were bled, gastrointestinal samples were collected, and spleen and bursa of Fabricius were weighed. This study confirmed that 2 ppm of AFB1 causes severe detrimental effects on performance, biochemical parameters, and immunologic parameters, generating hepatic lesions in broiler chickens ($P < 0.05$). However, it was also observed that DFM supplementation provided beneficial effects that might help to improve gut barrier function, anti-inflammatory and antioxidant activities, as well as humoral and cellular immunomodulation. The results of the present study suggest that this *Bacillus*-DFM added at a concentration of 10^6 spores/gram of feed can be used to counteract the negative effects that occur when birds consume diets contaminated with AFB1, showing beneficial effects on performance parameters, relative organ weights, hepatic lesions, immune response, and serum biochemical variables. The addition of this *Bacillus*-DFM might mitigate and decrease aflatoxicosis problems in the poultry industry, improving food security, alleviating public health problems, and providing economic benefits. Future studies are needed to fully elucidate the specific mechanisms by which this *Bacillus*-DFM counteracts the toxic effects of aflatoxin B1.

- Solis-Cruz, B., Hernandez-Patlan, D., Hargis, B., and Téllez, G. (2018). Control of Aflatoxicosis in Poultry Using Probiotics and Polymers. In *Mycotoxins - Impact and Management Strategies*. IntechOpen.

Chapter 8

Control of Aflatoxicosis in Poultry Using Probiotics and Polymers

Bruno Solis-Cruz, Daniel Hernandez-Patlan,
Billy M. Hargis and Guillermo Tellez

Additional information is available at the end of the chapter

<http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.76371>

Abstract

An important approach to prevent aflatoxicosis in poultry is the addition of non-nutritional adsorbents in the diet to bind aflatoxin B1 (AFB1) in the gastrointestinal tract. These adsorbents are large molecular weight compounds that are able to bind the mycotoxin, forming a stable complex adsorbent-mycotoxin, which can pass through the gastrointestinal tract. In this chapter, we evaluate the use of polymers and probiotics to reduce AFB1 toxic effects in poultry. Our results on the efficacy of polymers and probiotics in sequestering mycotoxins are highly promising, although this field is still in its infancy and further research is needed. Furthermore, *in vivo* studies are needed to confirm the effectiveness of these materials against AFB1 toxic effects, since results in the past have indicated that there is great variability in the efficacy of adsorbing materials *in vivo*, even though the compounds may show potential adsorption capacity of the mycotoxin *in vitro*.

Keywords: aflatoxins, chickens, polymers, adsorption, probiotics

- Hernandez-Patlan, D., Solis-Cruz, B., Hargis, B. M., & Tellez, G. (2019). The Use of Probiotics in Poultry Production for the Control of Bacterial Infections and Aflatoxins. In *Prebiotics and Probiotics-Potential Benefits in Human Nutrition and Health*. IntechOpen.

Chapter

The Use of Probiotics in Poultry Production for the Control of Bacterial Infections and Aflatoxins

Daniel Hernandez-Patlan, Bruno Solis-Cruz, Billy M. Hargis and Guillermo Tellez

Abstract

In intensive poultry production, a large number of antimicrobials are frequently employed to prevent (prophylactic use) and treat (therapeutic use) diseases, as well as for growth promotion (subtherapeutic use), in order to increase productivity. However, it has been reported that the use of antimicrobials at subtherapeutic doses is closely related to the increase in bacterial resistance and with the treatment failure. In addition to antimicrobial resistance, another problem derived from the use of antimicrobials is the presence of residues in animal products. Therefore, these problems and the ban of antimicrobial as growth promoters have prompted the poultry industry to look for alternatives with similar benefits to antibiotics. Among these alternatives, probiotics are one of the most widely studied and interesting groups. Hence, in the present chapter, the effect of probiotics and direct-fed microbial against foodborne pathogens and mycotoxins will be summarized.

Keywords: probiotics, direct-fed microbial, foodborne pathogens, antimicrobial resistance, aflatoxins

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hussein HS, Brasel JM. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*. Elsevier; 2001;167(2):101–34.
2. Adebo O, Njobeh P, Gbashi S, Nwinyi O, Mavumengwana V. Review on microbial degradation of aflatoxins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Taylor & Francis; 2017;57(15):3208–17.
3. Kabak B, Dobson ADW, Var I. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2006;46(8):593–619.
4. Coulombe Jr RA. Biological action of mycotoxins. *Journal of Dairy Science*. Elsevier; 1993;76(3):880–91.
5. Bondy GS, Pestka JJ. Immunomodulation by fungal toxins. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews*. Taylor & Francis; 2000;3(2):109–43.
6. Rawal S, Kim JE, Coulombe Jr R. Aflatoxin B1 in poultry: Toxicology, metabolism and prevention. *Research in Veterinary Science*. Elsevier; 2010;89(3):325–31.
7. Avantaggiato G, Solfrizzo M, Visconti A. Recent advances on the use of adsorbent materials for detoxification of Fusarium mycotoxins. *Food Additives and Contaminants*. Taylor & Francis; 2005;22(4):379–88.
8. Huwig A, Freimund S, Käppeli O, Dutler H. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicol Lett*. 2001;122(2):179–88.
9. Wielogórska E, MacDonald S, Elliott C. A review of the efficacy of mycotoxin detoxifying agents used in feed in light of changing global environment and legislation. *World Mycotoxin Journal*. Wageningen Academic Publishers; 2016;9(3):419–33.
10. Galvano F, Piva A, Ritieni A, Galvano G. Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins: a review. *Journal of Food Protection*. International Association for Food Protection; 2001;64(1):120–31.
11. Limaye A, Yu R-C, Chou C-C, Liu J-R, Cheng K-C. Protective and detoxifying effects conferred by dietary selenium and curcumin against AFB1-mediated toxicity in livestock: a review. *Toxins*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2018;10(1):25.
12. Abdel-Wahhab MA, Aly SE. Antioxidants and radical scavenging properties of vegetable extracts in rats fed aflatoxin-contaminated diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ACS Publications; 2003;51(8):2409–14.
13. Surai PF. Natural antioxidants and mycotoxins. In: Surai, P. F., editor. Nottingham, UK.: Nottingham University Press; 2002. p. 455–509.

14. Rawal S, Bauer MM, Mendoza KM, El-Nezami H, Hall JR, Kim JE, et al. Aflatoxicosis chemoprevention by probiotic *Lactobacillus* and lack of effect on the major histocompatibility complex. *Research in Veterinary Science*. Elsevier; 2014;97(2):274–81.
15. Xia X, Zhang Y, Li M, Garba B, Zhang Q, Wang Y, et al. Isolation and characterization of a *Bacillus subtilis* strain with aflatoxin B1 biodegradation capability. *Food Control*. Elsevier; 2017;75:92–8.
16. Zuo R, Chang J, Yin Q, Wang P, Yang Y, Wang X, et al. Effect of the combined probiotics with aflatoxin B1-degrading enzyme on aflatoxin detoxification, broiler production performance and hepatic enzyme gene expression. *Food and Chemical Toxicology*. Elsevier; 2013;59:470–5.
17. Aliabadi MA, Alikhani FE, Mohammadi M, Darsanaki RK. Biological control of aflatoxins. *European Journal of Experimental Biology*. 2013;3(2):162–6.
18. Halasz A, Lasztity R, Abonyi T, Bata A. Decontamination of mycotoxin-containing food and feed by biodegradation. *Food Reviews International*. Taylor & Francis; 2009;25(4):284–98.
19. Tipu M, Saleem U, Rehman T, Aslam M, Muhammad K, Hussain K, et al. Protective role of *Lactobacillus acidophilus* against aflatoxin B1-induced immunosuppression. *Journal of Animal and Plant Sciences*. *Pakistan Agricultural Scientists Forum*; 2015;25(6):1566–71.
20. Vinderola G, Ritieni A. Role of probiotics against mycotoxins and their deleterious effects. *Journal of Food Research*. 2014;4(1):10.
21. Kurhan S, Çakir I. DNA-bioprotective effects of lactic acid bacteria against aflatoxin B1. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal*. 2016;4(Special Issue Nutrition in Conference October 2016):87–91.
22. Marin S, Ramos A, Cano-Sancho G, Sanchis V. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*. Elsevier; 2013;60:218–37.
23. Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*. 2003;16(3):497–516.
24. Micotoxinas [Internet]. [cited 2019 5–8]. Available from: <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/mycotoxins/es/>
25. FAO. Alimentación Nutrición. Manual sobre la aplicación del sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC) en la prevención y control de las micotoxinas. 2003;
26. Glenn A. Mycotoxigenic *Fusarium* species in animal feed. *Animal Feed Science and Technology*. Amsterdam: Elsevier Scientific Pub. Co., 1976-; 2007;137(3):213–40.
27. Pestka J, Casale W. Naturally occurring fungal toxins. *Advances in environmental science and technology (USA)*. 1990;23.
28. Speijers GJA, Speijers MHM. Combined toxic effects of mycotoxins. *Toxicology letters*. Elsevier; 2004;153(1):91–8.

29. Grenier B, Oswald I. Mycotoxin co-contamination of food and feed: meta-analysis of publications describing toxicological interactions. *World Mycotoxin Journal*. Wageningen Academic Publishers; 2011;4(3):285–313.
30. Huffman J, Gerber R, Du L. Recent advancements in the biosynthetic mechanisms for polyketide-derived mycotoxins. *Biopolymers*. 2010;93(9):764–76.
31. Wang Y, Liu J, Zhang L, He X, Zhang JZ. Computational search for aflatoxin binding proteins. *Chemical Physics Letters*. Elsevier; 2017;685:1–8.
32. Newberne PM, Butler WH. Acute and chronic effects of aflatoxin on the liver of domestic and laboratory animals: a review. *Cancer research*. American Association for Cancer Research; 1969;29(1):236–50.
33. Khalil M, Gomaa A, Sebaei A. Reliable HPLC determination of aflatoxin m1 in eggs. *Journal of analytical methods in chemistry*. Hindawi Limited; 2013;2013:817091–817091.
34. Herzallah SM. Determination of aflatoxins in eggs, milk, meat and meat products using HPLC fluorescent and UV detectors. *Food Chemistry*. Elsevier; 2009;114(3):1141–6.
35. Zain ME. Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*. Elsevier; 2011;15(2):129–44.
36. Mishra H, Das C. A review on biological control and metabolism of aflatoxin. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2003;43(3):245–64.
37. Bbosa GS, Kitya D, Lubega A, Ogwal-Okeng J, Anokbonggo WW, Kyegombe DB. Review of the Biological and Health Effects of Aflatoxins on Body Organs and Body Systems. *Aflatoxins-Recent Advances and Future Prospects*. IntechOpen; 2013.
38. Smela ME, Currier SS, Bailey EA, Essigmann JM. The chemistry and biology of aflatoxin B(1): from mutational spectrometry to carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2001;22(4):535–45.
39. Lozano M, Diaz G. Microsomal and cytosolic biotransformation of aflatoxin B1 in four poultry species. *British poultry science*. Taylor & Francis; 2006;47(6):734–41.
40. Diaz GJ, Murcia HW. Biotransformation of aflatoxin B1 and its relationship with the differential toxicological response to aflatoxin in commercial poultry species. *Aflatoxins-Biochemistry and Molecular Biology*. IntechOpen; 2011.
41. Gregorio MCD, Bordin K, Souto PCM de C, Corassin CH, Oliveira CAF. Comparative biotransformation of aflatoxin B1 in swine, domestic fowls, and humans. *Toxin Reviews*. Taylor & Francis; 2015;34(3):142–50.
42. UNA. Compendio de Indicadores Económicos del Sector Avícola 2018. Dirección de Estudios Económicos, editor. Unión Nacional de Avicultores. Compendio de Indicadores Económicos. Dirección de Estudios Económicos. Unión Nacional de Avicultores; 2018.
43. Magnoli AP, Poloni VL, Cavaglieri L. Impact of mycotoxin contamination in the animal feed industry. *Current Opinion in Food Science*. Elsevier; 2019;

44. Blount W. Turkey “X” disease. *Turkeys*. 1961;9:52–77.
45. Siller W, Ostler D, others. The histopathology of an entero-hepatic syndrome of turkey poults. *Veterinary Record*. 1961;73:134–8.
46. Nesbitt BF, O’kelly J, Sargeant K, Sheridan A, others. Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. *Nature*, London. 1962;195(4846).
47. Cole RJ. Etiology of turkey “X” disease in retrospect: a case for the involvement of cyclopiazonic acid. *Mycotoxin research*. Springer; 1986;2(1):3–7.
48. Rawal S, Coulombe Jr RA. Metabolism of aflatoxin B1 in turkey liver microsomes: the relative roles of cytochromes P450 1A5 and 3A37. *Toxicology and applied pharmacology*. Elsevier; 2011;254(3):349–54.
49. Yunus AW, Razzazi-Fazeli E, Bohm J. Aflatoxin B1 in affecting broiler’s performance, immunity, and gastrointestinal tract: A review of history and contemporary issues. *Toxins. Molecular Diversity Preservation International*; 2011;3(6):566–90.
50. Greco MV, Franchi ML, Rico Golba SL, Pardo AG, Pose GN. Mycotoxins and mycotoxigenic fungi in poultry feed for food-producing animals. *The Scientific World Journal*. Hindawi; 2014;2014.
51. Dalvi R. An overview of aflatoxicosis of poultry: Its characteristics, prevention and reduction. *Veterinary research communications*. Springer; 1986;10(1):429–43.
52. Huff W, Kubena L, Harvey R, Corrier D, Mollenhauer H. Progression of aflatoxicosis in broiler chickens. *Poultry Science*. Oxford University Press Oxford, UK; 1986;65(10):1891–9.
53. Mottet A, Tempio G. Global poultry production: current state and future outlook and challenges. *World’s Poultry Science Journal*. Cambridge University Press on behalf of World’s Poultry Science Association; 2017;73(2):245–56.
54. Muller R, Carlson C, Semeniuk G, Harshfield G. The response of chicks, ducklings, goslings, pheasants and poults to graded levels of aflatoxins. *Poultry Science*. Oxford University Press Oxford, UK; 1970;49(5):1346–50.
55. Adav S, Govindwar SP. Effects of aflatoxin B1 on liver microsomal enzymes in different strains of chickens. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*. Elsevier; 1997;118(2):185–9.
56. Perusia OR, Rodríguez R. Micotoxicosis. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2001;12(2):87–116.
57. Jones F, Hagler W, Hamilton P. Association of low levels of aflatoxin in feed with productivity losses in commercial broiler operations. *Poultry Science*. Oxford University Press Oxford, UK; 1982;61(5):861–8.
58. Khlangwiset P, Shephard GS, Wu F. Aflatoxins and growth impairment: a review. *Critical reviews in toxicology*. Taylor & Francis; 2011;41(9):740–55.

59. Hussain Z, Khan MZ, Hassan Z. Production of aflatoxins from *Aspergillus flavus* and acute aflatoxicosis in young broiler chicks. *Pak J Agri Sci.* 2008;45(1):95–102.
60. Quezada T, Cuellar H, Jaramillo-Juarez F, Valdivia A, Reyes J. Effects of aflatoxin B1 on the liver and kidney of broiler chickens during development. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology.* Elsevier; 2000;125(3):265–72.
61. Qureshi M, Brake J, Hamilton P, Hagler Jr W, Nesheim S. Dietary exposure of broiler breeders to aflatoxin results in immune dysfunction in progeny chicks. *Poultry Science.* Oxford University Press Oxford, UK; 1998;77(6):812–9.
62. Ghosh R, Chauhan H, Jha G. Suppression of cell-mediated immunity by purified aflatoxin B1 in broiler chicks. *Veterinary immunology and immunopathology.* Elsevier; 1991;28(2):165–72.
63. Azzam A, Gabal M. Interaction of aflatoxin in the feed and immunization against selected infectious diseases. I. Infectious bursal disease. *Avian Pathology.* Taylor & Francis; 1997;26(2):317–25.
64. Gabal M, Azzam A. Interaction of aflatoxin in the feed and immunization against selected infectious diseases in poultry. II. Effect on one-day-old layer chicks simultaneously vaccinated against Newcastle disease, infectious bronchitis and infectious bursal disease. *Avian Pathology.* Taylor & Francis; 1998;27(3):290–5.
65. Otim MO, Mukibi-Muka G, Christensen H, Bisgaard M. Aflatoxicosis, infectious bursal disease and immune response to Newcastle disease vaccination in rural chickens. *Avian Pathology.* Taylor & Francis; 2005;34(4):319–23.
66. Oguz H, Hadimli H, Kurtoglu V, Erganis O. Evaluation of humoral immunity of broilers during chronic aflatoxin (50 and 100 ppb) and clinoptilolite exposure. *Revue de Medecine Veterinaire. Ecole nationale vétérinaire de Toulouse;* 2003;154(7):483–6.
67. Hassan MK, Afify M, Aly MM. Susceptibility of vaccinated and unvaccinated Egyptian chickens to very virulent infectious bursal disease virus. *Avian Pathology.* Taylor & Francis; 2002;31(2):149–56.
68. Bryden WL. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Animal Feed Science and Technology.* Elsevier; 2012;173(1-2):134–58.
69. Ortatatlı M, Oğuz H, Hatipoğlu F, Karaman M. Evaluation of pathological changes in broilers during chronic aflatoxin (50 and 100 ppb) and clinoptilolite exposure. *Research in Veterinary Science.* Elsevier; 2005;78(1):61–8.
70. Suganthi RU, Suresh K, Parvatham R. Effect of aflatoxin on feed conversion ratio in broilers: A meta-analysis. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences.* Asian-Australasian Association of Animal Production Societies; 2011;24(12):1757–62.
71. Udomkun P, Wiredu AN, Nagle M, Müller J, Vanlauwe B, Bandyopadhyay R. Innovative technologies to manage aflatoxins in foods and feeds and the profitability of application-A review. *Food Control.* Elsevier; 2017;76:127–38.

72. Pankaj S, Shi H, Keener KM. A review of novel physical and chemical decontamination technologies for aflatoxin in food. *Trends in Food Science & Technology*. Elsevier; 2018;71:73–83.
73. Commission CA. Code of practice for the prevention and reduction of mycotoxin contamination of cereals, including annexes on ochratoxin A, zearalenone, fumonisins and trichothecenes. CAC/RCP. 2003;51–2003.
74. Jouany JP. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. *Animal Feed Science and Technology*. Elsevier; 2007;137(3-4):342–62.
75. Méndez-Albores A, Arambula-Villa G, Loarca-Piña M, Castano-Tostado E, Moreno-Martínez E. Safety and efficacy evaluation of aqueous citric acid to degrade B-aflatoxins in maize. *Food and chemical toxicology*. Elsevier; 2005;43(2):233–8.
76. Galarza-Seeber R, Latorre J, Wolfenden A, Hernandez-Velasco X, Merino-Guzman R, Ledoux D, et al. Evaluation of *Bacillus* spp. as direct fed microbial (DFM) candidates for aflatoxin B1 biodegradation in broiler chickens. *International Journal of Probiotics & Prebiotics*. New Century Health Publishers, LLC; 2016;11(1):29–37.
77. Aziz NH, el-Zeany SA, Moussa LAA. Influence of gamma-irradiation and maize lipids on the production of aflatoxin B1 by *Aspergillus flavus*. *Nahrung*. 2002;46(5):327–31.
78. Verheecke C, Liboz T, Mathieu F. Microbial degradation of aflatoxin B1: current status and future advances. *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier; 2016;237:1–9.
79. Young JC, Zhou T, Yu H, Zhu H, Gong J. Degradation of trichothecene mycotoxins by chicken intestinal microbes. *Food and Chemical Toxicology*. Elsevier; 2007;45(1):136–43.
80. McKenzie KS, Sarr AB, Mayura K, Bailey RH, Miller DR, Rogers TD, et al. Oxidative degradation and detoxification of mycotoxins using a novel source of ozone. *Food Chem Toxicol*. 1997;35(8):807–20.
81. Kubena L, Harvey R, Bailey R, Buckley S, Rottinghaus G. Effects of a hydrated sodium calcium aluminosilicate (T-Bind) on mycotoxicosis in young broiler chickens. *Poultry Science*. Oxford University Press Oxford, UK; 1998;77(10):1502–9.
82. Boudergue C, Burel C, Dragacci S, FAVROT M-C, FREMY J-M, Massimi C, et al. Review of mycotoxin-detoxifying agents used as feed additives: mode of action, efficacy and feed/food safety. EFSA Supporting Publications. Wiley Online Library; 2009;6(9):22E.
83. Kong C, Shin SY, Kim BG. Evaluation of mycotoxin sequestering agents for aflatoxin and deoxynivalenol: an *in vitro* approach. *SpringerPlus*. SpringerOpen; 2014;3(1):346.
84. Dixon J, Kannewischer I, Arvide MT, Velazquez AB. Aflatoxin sequestration in animal feeds by quality-labeled smectite clays: An introductory plan. *Applied Clay Science*. Elsevier; 2008;40(1-4):201–8.
85. Jaynes W, Zartman R, Hudnall W. Aflatoxin B1 adsorption by clays from water and corn meal. *Applied Clay Science*. Elsevier; 2007;36(1-3):197–205.

86. Pasha T, Farooq M, Khattak F, Jabbar M, Khan A. Effectiveness of sodium bentonite and two commercial products as aflatoxin absorbents in diets for broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology*. Elsevier; 2007;132(1-2):103–10.
87. Phillips TD, Kubena LF, Harvey RB, Taylor DR, Heidelbaugh ND. Hydrated sodium calcium aluminosilicate: a high affinity sorbent for aflatoxin. *Poultry science*. Oxford University Press Oxford, UK; 1988;67(2):243–7.
88. Chung T, Ekdman JR J, Baker D. Hydrated sodium calcium aluminosilicate: effects on zinc, manganese, vitamin A, and riboflavin utilization. *Poultry Science*. Oxford University Press Oxford, UK; 1990;69(8):1364–70.
89. Moshtaghian J, Parsons C, Leeper R, Harrison P, Koelkebeck K. Effect of sodium aluminosilicate on phosphorus utilization by chicks and laying hens. *Poultry science*. Oxford University Press Oxford, UK; 1991;70(4):955–62.
90. Abad E, Llerena JJ, Sauló J, Caixach J, Rivera J. Comprehensive study on dioxin contents in binder and anti-caking agent feed additives. *Chemosphere*. Elsevier; 2002;46(9-10):1417–21.
91. Trckova M, Matlova L, Dvorska L, others. Kaolin, bentonite, and zeolites as feed supplements for animals: health advantages and risks. A review. *Veterinarni Medicina-UZPI (Czech Republic)*. 2004;
92. Kolosova A, Stroka J. Substances for reduction of the contamination of feed by mycotoxins: a review. *World Mycotoxin Journal*. Wageningen Academic Publishers; 2011;4(3):225–56.
93. Celik I, Oguz H, Demet O, Donmez H, Boydak M, Sur E. Efficacy of polyvinylpyrrolidone in reducing the immunotoxicity of aflatoxin in growing broilers. *British Poultry Science*. Taylor & Francis; 2000;41(4):430–9.
94. Kiran M, Demet Ö, Ortatath M, Oğuz H. The preventive effect of polyvinylpyrrolidone on aflatoxicosis in broilers. *Avian Pathology*. Taylor & Francis; 1998;27(3):250–5.
95. Kececi T, Oguz H, Kurtoglu V, Demet O. Effects of polyvinylpyrrolidone, synthetic zeolite and bentonite on serum biochemical and haematological characters of broiler chickens during aflatoxicosis. *British Poultry Science*. Taylor & Francis; 1998;39(3):452–8.
96. Kolosova A, Stroka J. Evaluation of the effect of mycotoxin binders in animal feed on the analytical performance of standardised methods for the determination of mycotoxins in feed. *Food Additives & Contaminants: Part A*. Taylor & Francis; 2012;29(12):1959–71.
97. Tan KB, Abdullah AZ, Horri BA, Salamatinia B. Adsorption mechanism of microcrystalline cellulose as green adsorbent for the removal of cationic methylene blue dye. *J Chem Soc Pak*. 2016;38(04):651.
98. Hokkanen S, Bhatnagar A, Sillanpää M. A review on modification methods to cellulose-based adsorbents to improve adsorption capacity. *Water research*. Elsevier; 2016;91:156–73.
99. Ngah WW, Hanafiah M. Removal of heavy metal ions from wastewater by chemically modified plant wastes as adsorbents: a review. *Bioresource technology*. Elsevier; 2008;99(10):3935–48.

100. Hubbe MA, Hasan SH, Ducoste JJ. Cellulosic substrates for removal of pollutants from aqueous systems: A review. 1. Metals. *BioResources*. 2011;6(2):2161–287.
101. Sun R. Cereal straw as a resource for sustainable biomaterials and biofuels: chemistry, extractives, lignins, hemicelluloses and cellulose. Elsevier; 2010.
102. Lopičić Z, Milojković J, Šoštarić T, Petrović M, Mihajlović M, Lačnjevac C, and Stojanović, M. Influence of pH value on Cu (II) biosorption by lignocellulose peach shell waste material. *Hemijska industrija*. *Hemijska Industrija*; 2013;67(6):1007.
103. Zhao Z, Liu N, Yang L, Wang J, Song S, Nie D, et al. Cross-linked chitosan polymers as generic adsorbents for simultaneous adsorption of multiple mycotoxins. *Food Control*. Elsevier; 2015;57:362–9.
104. Hayes J, Judah D, McLellan L, Kerr L, Peacock S, Neal G. Ethoxyquin-induced resistance to aflatoxin B1 in the rat is associated with the expression of a novel alpha-class glutathione S-transferase subunit, Yc2, which possesses high catalytic activity for aflatoxin B1-8, 9-epoxide. *Biochemical journal*. Portland Press; 1991;279(2):385–98.
105. Valencia-Quintana R, Sánchez-Alarcón J, Tenorio MG, Deng Y, Waliszewski SM, Valera MÁ. Preventive strategies aimed at reducing the health risks of Aflatoxin B 1. *Toxicology and Environmental Health Sciences*. Springer; 2012;4(2):71–9.
106. Brahmi D, Bouaziz C, Ayed Y, Mansour HB, Zourgui L, Bacha H. Chemopreventive effect of cactus *Opuntia ficus indica* on oxidative stress and genotoxicity of aflatoxin B1. *Nutrition & metabolism*. BioMed Central; 2011;8(1):73.
107. Hewlings S, Kalman D. Curcumin: a review of its' effects on human health. *Foods*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2017;6(10):92.
108. Priyadarsini K. The chemistry of curcumin: from extraction to therapeutic agent. *Molecules*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2014;19(12):20091–112.
109. Lee S-E, Campbell BC, Molyneux RJ, Hasegawa S, Lee H-S. Inhibitory effects of naturally occurring compounds on aflatoxin B1 biotransformation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ACS Publications; 2001;49(11):5171–7.
110. Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Molecular Pharmaceutics*. ACS Publications; 2007;4(6):807–18.
111. Mazzarino L, Dora CL, Bellettini IC, Minatti E, Cardoso SG, Lemos-Senna E. Curcumin-loaded polymeric and lipid nanocapsules: preparation, characterization and chemical stability evaluation. *Lat Am J Pharm*. 2010;29(6):933–40.
112. Lin C-C, Lin H-Y, Chen H-C, Yu M-W, Lee M-H. Stability and characterisation of phospholipid-based curcumin-encapsulated microemulsions. *Food Chemistry*. Elsevier; 2009;116(4):923–8.
113. Liu W, Zhai Y, Heng X, Che FY, Chen W, Sun D, et al. Oral bioavailability of curcumin: problems and advancements. *Journal of Drug Targeting*. Taylor & Francis; 2016;24(8):694–702.

114. Suresh K, Nangia A. Curcumin: Pharmaceutical solids as a platform to improve solubility and bioavailability. *CrystEngComm*. Royal Society of Chemistry; 2018;20(24):3277–96.
115. Kaur H, Kaur G. A critical appraisal of solubility enhancement techniques of polyphenols. *Journal of pharmaceutics*. Hindawi; 2014;2014.
116. Ciegler A, Lillehoj E, Peterson R, Hall H. Microbial detoxification of aflatoxin. *Appl Environ Microbiol*. Am Soc Microbiol; 1966;14(6):934–9.
117. Magan N, Olsen M. *Mycotoxins in food: detection and control*. Woodhead Publishing; 2004.
118. Poloni V, Dogi C, Pereyra CM, Fernández Juri MG, Köhler P, Rosa CA, et al. Potentiation of the effect of a commercial animal feed additive mixed with different probiotic yeast strains on the adsorption of aflatoxin B1. *Food Additives & Contaminants: Part A*. Taylor & Francis; 2015;32(6):970–6.
119. Karabulut S, Paytakov G, Leszczynski J. Reduction of aflatoxin B1 to aflatoxicol: a comprehensive DFT study provides clues to its toxicity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Wiley Online Library; 2014;94(15):3134–40.
120. Barati M, Chamani M, Mousavi SN, Hoseini SA, Taj Abadi Ebrahimi M. Effects of biological and mineral compounds in aflatoxin-contaminated diets on blood parameters and immune response of broiler chickens. *Journal of Applied Animal Research*. Taylor & Francis; 2018;46(1):707–13.
121. Gacem MA, El Hadj-Khelil AO. Toxicology, biosynthesis, bio-control of aflatoxin and new methods of detection. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. Elsevier; 2016;6(9):808–14.
122. Ji C, Fan Y, Zhao L. Review on biological degradation of mycotoxins. *Animal Nutrition*. Elsevier; 2016;2(3):127–33.
123. Wu Q, Jezkova A, Yuan Z, Pavlikova L, Dohnal V, Kuca K. Biological degradation of aflatoxins. *Drug Metabolism Reviews*. Taylor & Francis; 2009;41(1):1–7.
124. Galarza-Seeber R, Latorre JD, Hernandez-Velasco X, Wolfenden AD, Bielke LR, Menconi A, et al. Isolation, screening and identification of *Bacillus* spp. as direct-fed microbial candidates for aflatoxin B1 biodegradation. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. Elsevier; 2015;5(9):702–6.
125. Gao X, Ma Q, Zhao L, Lei Y, Shan Y, Ji C. Isolation of *Bacillus subtilis*: screening for aflatoxins B 1, M 1, and G 1 detoxification. *European Food Research and Technology*. Springer; 2011;232(6):957.
126. Hamidi A, Mirnejad R, Yahaghi E, Behnod V, Mirhosseini A, Amani S, et al. The aflatoxin B1 isolating potential of two lactic acid bacteria. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*. Elsevier; 2013;3(9):732–6.
127. Haskard CA, El-Nezami HS, Kankaanpää PE, Salminen S, Ahokas JT. Surface binding of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol*. Am Soc Microbiol; 2001;67(7):3086–91.

128. El-Nezami H, Mykkänen H, Kankaanpää P, Salminen S, Ahokas J. Ability of *Lactobacillus* and *Propionibacterium* strains to remove aflatoxin B1 from the chicken duodenum. *Journal of food protection*. International Association for Food Protection; 2000;63(4):549–52.
129. Nada S, Amra H, Deabes M, Omara E. *Saccharomyces cerevisiae* and probiotic bacteria potentially inhibit aflatoxins production *in vitro* and *in vivo* studies. *Int J Toxicol*. 2010;8(1):32.
130. Fijan S. Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature. *International journal of environmental research and public health*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2014;11(5):4745–67.
131. Patterson JA, Burkholder KM. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poultry science*. Oxford University Press Oxford, UK; 2003;82(4):627–31.
132. Wang R, Fui S, Miao C, Feng D. Effects of different mycotoxin adsorbents on performance, meat characteristics and blood profiles of avian broilers fed mold contaminated corn. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. Asian-Australian Association of Animal Production Societies; 2006;19(1):72–9.
133. Kana J, Gnonlonfin B, Harvey J, Wainaina J, Wanjuki I, Skilton R, et al. Assessment of aflatoxin contamination of maize, peanut meal and poultry feed mixtures from different agroecological zones in Cameroon. *Toxins*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2013;5(5):884–94.
134. Khan FA, Zahoor M. *In vivo* detoxification of aflatoxinB1 by magnetic carbon nanostructures prepared from bagasse. *BMC veterinary research*. BioMed Central Ltd; 2014;10(1):255.
135. Siró I, Plackett D. Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: a review. *Cellulose*. Springer; 2010;17(3):459–94.
136. Suteu D, Biliuta G, Rusu L, Coseri S, Nacu G. Cellulose cellets as new type of adsorbent for the removal of dyes from aqueous media. *Environmental Engineering and Management Journal*. 2015;14(3):525–32.
137. Sawyer CB, Reed JS. Adsorption of hydroxypropyl methyl cellulose in an aqueous system containing multicomponent oxide particles. *Journal of the American Ceramic Society*. Wiley Online Library; 2001;84(6):1241–9.
138. Tritt-Goc J, Kowalczyk J, Pislewski N. Hydration of hydroxypropylmethyl cellulose: Effects of pH and molecular mass. *Acta Physica Polonica-Series A General Physics*. Warszawa: Panstwowe Wydawnictwo Naukowe, 1970-; 2005;108(1):197–206.
139. Wang J, Somasundaran P. Adsorption and conformation of carboxymethyl cellulose at solid-liquid interfaces using spectroscopic, AFM and allied techniques. *Journal of Colloid and Interface Science*. Elsevier; 2005;291(1):75–83.
140. Pensini E, Yip CM, O’Carroll D, Sleep BE. Carboxymethyl cellulose binding to mineral substrates: Characterization by atomic force microscopy-based Force spectroscopy and quartz-crystal microbalance with dissipation monitoring. *Journal of colloid and interface science*. Elsevier; 2013;402:58–67.

141. Bornet A, Teissedre P. Chitosan, chitin-glucan and chitin effects on minerals (iron, lead, cadmium) and organic (ochratoxin A) contaminants in wines. *European Food Research and Technology*. Springer; 2008;226(4):681–9.
142. Mine Kurtbay H, Bekçi Z, Merdivan M, Yurdakoç K. Reduction of ochratoxin A levels in red wine by bentonite, modified bentonites, and chitosan. *Journal of agricultural and food chemistry*. ACS Publications; 2008;56(7):2541–5.
143. Veeramachineni A, Sathasivam T, Muniyandy S, Janarthanan P, Langford S, Yan L. Optimizing Extraction of Cellulose and Synthesizing Pharmaceutical Grade Carboxymethyl Sago Cellulose from Malaysian Sago Pulp. *Applied Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2016;6(6):170.
144. Capanema NS, Mansur AA, de Jesus AC, Carvalho SM, de Oliveira LC, Mansur HS. Superabsorbent crosslinked carboxymethyl cellulose-PEG hydrogels for potential wound dressing applications. *International journal of biological macromolecules*. Elsevier; 2018;106:1218–34.
145. Ramli S, Ja'afar SM, Sisak MAA, Zainuddin N, Rahman IA. Formulation and physical characterization of microemulsions based carboxymethyl cellulose as vitamin C carrier. *Malaysian J Anal Sci*. 2015;19(1):275–83.
146. Nada A, Hassan ML. Thermal behavior of cellulose and some cellulose derivatives. *Polymer Degradation and Stability*. Elsevier; 2000;67(1):111–5.
147. Picker KM, Hoag SW. Characterization of the thermal properties of microcrystalline cellulose by modulated temperature differential scanning calorimetry. *Journal of pharmaceutical sciences*. Elsevier; 2002;91(2):342–9.
148. Azubuike CP, Odulaja JO, Okhamafe AO. Physicotechnical, spectroscopic and thermogravimetric properties of powdered cellulose and microcrystalline cellulose derived from groundnut shells. *Journal of Excipients and Food Chemicals*. International Pharmaceutical Excipients Council of the Americas; 2016;3(3):1105.
149. Ali H, Atta A, Senna M. Physico-chemical properties of carboxymethyl cellulose (CMC)/nanosized titanium oxide (TiO₂) gamma irradiated composite. *Arab Journal of Nuclear Science and Applications*. 2015;48(4):44–52.
150. Han F, Xiong D, Wang Q, Shao B, Chen M. Thermal properties of carboxymethylcellulose and methyl methacrylate graft copolymers. *Journal of Macromolecular Science, Part B*. Taylor & Francis; 2013;52(9):1242–9.
151. Paradkar A, Ambike AA, Jadhav BK, Mahadik K. Characterization of curcumin-PVP solid dispersion obtained by spray drying. *International journal of pharmaceutics*. Elsevier; 2004;271(1-2):281–6.
152. He Y, Liu H, Bian W, Liu Y, Liu X, Ma S, et al. Molecular Interactions for the Curcumin-Polymer Complex with Enhanced Anti-Inflammatory Effects. *Pharmaceutics*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2019;11(9):442.
153. Kaewnopparat N, Kaewnopparat S, Jangwang A, Maneenaun D, Chuchome T, Panichayupakaranant P. Increased solubility, dissolution and physicochemical studies of curcumin-

polyvinylpyrrolidone K-30 solid dispersions. World academy of science, engineering and technology. 2009;55:229–34.

154. Soleimani V, Sahebkar A, Hosseinzadeh H. Turmeric (*Curcuma longa*) and its major constituent (curcumin) as nontoxic and safe substances. *Phytotherapy research*. Wiley Online Library; 2018;32(6):985–95.

155. Zhivkov AM. Electric properties of carboxymethyl cellulose. *Cellulose-Fundamental Aspects*. Rijeka, Croatia, InTech; 2013;

156. Dogsa I, Tomvsivc M, Orehek J, Benigar E, Jamnik A, Stopar D. Amorphous supramolecular structure of carboxymethyl cellulose in aqueous solution at different pH values as determined by rheology, small angle X-ray and light scattering. *Carbohydrate polymers*. Elsevier; 2014;111:492–504.

157. Yaginuma Y, Kijima T. Effect of pH on rheological properties of microcrystalline cellulose dispersions. *Journal of dispersion science and technology*. Taylor & Francis; 2006;27(3):365–70.

158. Iturbe LCC. Aplicaciones de la FTIR al estudio de las interacciones polímero-polímero. *Revista Iberoamericana de polímeros*. Universidad del País Vasco; 2004;5(3):1.

159. Cardot J, Beyssac E, Alric M, others. *In vitro-in vivo* correlation: importance of dissolution in IVIVC. *Dissolution technologies*. 2007;14(1):15.

160. Denli M, Blandon J, Guynot M, Salado S, Perez J. Effects of dietary AflaDetox on performance, serum biochemistry, histopathological changes, and aflatoxin residues in broilers exposed to aflatoxin B1. *Poultry Science*. Oxford University Press Oxford, UK; 2009;88(7):1444–51.

161. Verma J, Swain BK, Johri TS. Effect of various levels of aflatoxin and ochratoxin A and combinations thereof on protein and energy utilisation in broilers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Wiley Online Library; 2002;82(12):1412–7.

162. Al-Sultan S. The effect of *Curcuma longa* (turmeric) on overall performance of broiler chickens. *Int J Poult Sci*. Citeseer; 2003;2(5):351–3.

163. Muhammad A, Muhammad A, Jumshaid I, Mund M, others. Effect of turmeric (*Curcuma longa*) supplementation on growth performance, immune response, carcass characteristics and cholesterol profile in broilers. *Veterinaria (Sarajevo)*. Veterinarski Fakultet Univerziteta u Sarajevu; 2017;66(1):16–20.

164. Durrani F, Ismail M, Sultan A, Suhail S, Chand N, Durrani Z. Effect of different levels of feed added turmeric (*Curcuma longa*) on the performance of broiler chicks. *Journal of Agricultural and Biological Science*. 2006;1(2):9–11.

165. Aravind K, Patil V, Devegowda G, Umakantha B, Ganpule S. Efficacy of esterified glucomannan to counteract mycotoxicosis in naturally contaminated feed on performance and serum biochemical and hematological parameters in broilers. *Poultry Science*. Oxford University Press Oxford, UK; 2003;82(4):571–6.

166. Indresh H, Devegowda G, Ruban SW, Shivakumar M. Effects of high grade bentonite on performance, organ weights and serum biochemistry during aflatoxicosis in broilers. *Veterinary World*. 2013;6(6).
167. Tung H-T, Donaldson W, Hamilton P. Altered lipid transport during aflatoxicosis. *Toxicology and applied pharmacology*. Elsevier; 1972;22(1):97–104.
168. Tessari ENC, Oliveira CAF de, Cardoso A, Ledoux D, Rottinghaus G. Effects of aflatoxin B1 and fumonisin B1 on body weight, antibody titres and histology of broiler chicks. *British poultry science*. Taylor & Francis; 2006;47(3):357–64.
169. Fan Y, Zhao L, Ji C, Li X, Jia R, Xi L, et al. Protective effects of *Bacillus subtilis* ANSB060 on serum biochemistry, histopathological changes and antioxidant enzyme activities of broilers fed moldy peanut meal naturally contaminated with aflatoxins. *Toxins*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2015;7(8):3330–43.
170. McLean M, Dutton MF. Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: an update. *Pharmacology & therapeutics*. Elsevier; 1995;65(2):163–92.
171. Hinton DM, Myers MJ, Raybourne RA, Francke-Carroll S, Sotomayor RE, Shaddock J, et al. Immunotoxicity of aflatoxin B1 in rats: effects on lymphocytes and the inflammatory response in a chronic intermittent dosing study. *Toxicological Sciences*. Oxford University Press; 2003;73(2):362–77.
172. Farkhondeh T, Samarghandian S. The hepatoprotective effects of curcumin against drugs and toxic agents: an updated review. *Toxin reviews*. Taylor & Francis; 2016;35(3-4):133–40.
173. Hu P, Zuo Z, Li H, Wang F, Peng X, Fang J, et al. The molecular mechanism of cell cycle arrest in the Bursa of Fabricius in chick exposed to Aflatoxin B 1. *Scientific reports*. Nature Publishing Group; 2018;8(1):1770.
174. Hesham M, Hegazy AA, Yehia A. Efficiency of kaolin and activated charcoal to reduce the toxicity of low level of aflatoxin in broilers. *Sci J King Faisal Univ (Basic Appl Sci)*. 2004;5:14–25.
175. Li Z, Nestor K, Saif YM, Anderson J, Patterson R. Effect of selection for increased body weight in turkeys on lymphoid organ weights, phagocytosis, and antibody responses to fowl cholera and Newcastle disease-inactivated vaccines. *Poultry Science*. Oxford University Press Oxford, UK; 2001;80(6):689–94.
176. Madej J, Stefaniak T, Bednarczyk M. Effect of in ovo-delivered prebiotics and synbiotics on lymphoid-organs' morphology in chickens. *Poultry Science*. Poultry Science Association, Inc.; 2015;94(6):1209–19.
177. Galarza-Seeber R, Latorre JD, Bielke LR, Kuttappan VA, Wolfenden AD, Hernandez-Velasco X, et al. Leaky gut and mycotoxins: Aflatoxin B1 does not increase gut permeability in broiler chickens. *Frontiers in veterinary science*. Frontiers; 2016;3:10.
178. Berkeveld M, Langendijk P, Verheijden J, Taverne M, Van Nes A, Van Haard P, et al. Citrulline and intestinal fatty acid-binding protein: Longitudinal markers of postweaning small intestinal function in pigs? *Journal of animal science*. Oxford University Press; 2008;86(12):3440–9.

179. Chen J, Tellez G, Richards JD, Escobar J. Identification of potential biomarkers for gut barrier failure in broiler chickens. *Frontiers in veterinary science*. Frontiers; 2015;2:14.
180. Yarru L, Settivari R, Gowda N, Antoniou E, Ledoux D, Rottinghaus G. Effects of turmeric (*Curcuma longa*) on the expression of hepatic genes associated with biotransformation, antioxidant, and immune systems in broiler chicks fed aflatoxin. *Poultry Science*. Oxford University Press Oxford, UK; 2009;88(12):2620–7.
181. El-Bahr S. Effect of curcumin on hepatic antioxidant enzymes activities and gene expressions in rats intoxicated with aflatoxin B1. *Phytotherapy research*. Wiley Online Library; 2015;29(1):134–40.
182. Corrier D. Mycotoxicosis: mechanisms of immunosuppression. *Veterinary immunology and immunopathology*. Elsevier; 1991;30(1):73–87.
183. Thaxton J, Tung H, Hamilton P. Immunosuppression in chickens by aflatoxin. *Poultry Science*. Oxford University Press Oxford, UK; 1974;53(2):721–5.
184. Santiago-Quesada F, Albano N, Castillo-Guerrero JA, Fernández G, González-Medina E, Sánchez-Guzmán JM. Secondary phytohaemagglutinin (PHA) swelling response is a good indicator of T-cell-mediated immunity in free-living birds. *Ibis*. Wiley Online Library; 2015;157(4):767–73.
185. Gao X, Kuo J, Jiang H, Deeb D, Liu Y, Divine G, et al. Immunomodulatory activity of curcumin: suppression of lymphocyte proliferation, development of cell-mediated cytotoxicity, and cytokine production *in vitro*. *Biochem Pharmacol*. 2004;68(1):51–61.
186. Varalakshmi C, Ali AM, Pardhasaradhi B, Srivastava RM, Singh S, Khar A. Immunomodulatory effects of curcumin: in-vivo. *International immunopharmacology*. Elsevier; 2008;8(5):688–700.
187. Hussain Z, Rehman H-, Manzoor S, Tahir S, Mukhtar M. Determination of liver and muscle aflatoxin B1 residues and select serum chemistry variables during chronic aflatoxicosis in broiler chickens. *Veterinary clinical pathology*. Wiley Online Library; 2016;45(2):330–4.
188. Monson MS, Coulombe RA, Reed KM. Aflatoxicosis: Lessons from toxicity and responses to aflatoxin B1 in poultry. *Agriculture*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2015;5(3):742–77.
189. Rocha TM, Andrade MA, Gonzales E, Stringhini JH, Santana ES, Pôrto RNG, et al. Liver function and bacteriology of organs in broiler inoculated with nalidixic acid-resistant *Salmonella* Typhimurium and treated with organic acids. *Italian Journal of Animal Science*. Taylor & Francis; 2013;12(3):e55.
190. Gowda N, Ledoux D, Rottinghaus G, Bermudez A, Chen Y. Efficacy of turmeric (*Curcuma longa*), containing a known level of curcumin, and a hydrated sodium calcium aluminosilicate to ameliorate the adverse effects of aflatoxin in broiler chicks. *Poultry science*. Oxford University Press Oxford, UK; 2008;87(6):1125–30.
191. Huff W, Harvey R, Kubena L, Rottinghaus G. Toxic synergism between aflatoxin and T-2 toxin in broiler chickens. *Poultry Science*. Oxford University Press Oxford, UK; 1988;67(10):1418–23.

192. Donaldson W, Tung H-T, Hamilton P, others. Depression of fatty acid synthesis in chick liver (*Gallus domesticus*) by aflatoxin. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 1972;(4):843–7.
193. Siloto E, Oliveira E, Sartori JR, Fascina V, Martins B, Ledoux D, et al. Lipid metabolism of commercial layers fed diets containing aflatoxin, fumonisin, and a binder. *Poultry science*. Oxford University Press Oxford, UK; 2013;92(8):2077–83.
194. Chen X, Horn N, Cotter P, Applegate T. Growth, serum biochemistry, complement activity, and liver gene expression responses of Pekin ducklings to graded levels of cultured aflatoxin B1. *Poultry science*. Poultry Science Association, Inc.; 2014;93(8):2028–36.
195. Ledoux D, Rottinghaus G, Bermudez A, Alonso-Debolt M. Efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broiler chicks. *Poultry science*. Oxford University Press Oxford, UK; 1999;78(2):204–10.
196. Zhao J, Shirley R, Dibner J, Uraizee F, Officer M, Kitchell M, et al. Comparison of hydrated sodium calcium aluminosilicate and yeast cell wall on counteracting aflatoxicosis in broiler chicks. *Poultry Science*. Oxford University Press Oxford, UK; 2010;89(10):2147–56.
197. Sobrane Filho ST, Junqueira OM, Laurentiz AC de, Filardi R da S, Rubio M da S, Duarte KF, et al. Effects of mycotoxin adsorbents in aflatoxin B 1-and fumonisin B 1-contaminated broiler diet on performance and blood metabolite. *Revista Brasileira de Zootecnia*. SciELO Brasil; 2016;45(5):250–6.
198. Gholami-Ahangaran M, Rangsz N, Azizi S. Evaluation of turmeric (*Curcuma longa*) effect on biochemical and pathological parameters of liver and kidney in chicken aflatoxicosis. *Pharmaceutical biology*. Taylor & Francis; 2016;54(5):780–7.
199. Rathod P, Gangadhar K, Gangane G, Bhojane N. Effect of aflatoxin on haematological and biochemical alteration in broilers. *Int J Sci Environ Tech*. 2017;6(1):824–31.
200. Valchev I, Kanakov D, Hristov T, Lazarov L, Binev R, Grozeva N, et al. Effects of experimental aflatoxicosis on renal function in broiler chickens. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. 2014;17:314–24.
201. Chen X, Horn N, Applegate T. Efficiency of hydrated sodium calcium aluminosilicate to ameliorate the adverse effects of graded levels of aflatoxin B1 in broiler chicks. *Poultry Science*. Poultry Science Association, Inc.; 2014;93(8):2037–47.
202. Glahn R, Beers K, Bottje W, Wideman Jr R, Huff W, Thomas W. Aflatoxicosis alters avian renal function, calcium, and vitamin D metabolism. *Journal of toxicology and environmental health*. Taylor & Francis; 1991;34(3):309–21.
203. Edrington T, Harvey R, Kubena L. Effect of aflatoxin in growing lambs fed ruminally degradable or escape protein sources. *Journal of animal science*. Oxford University Press; 1994;72(5):1274–81.
204. Graham A. Curcumin adds spice to the debate: lipid metabolism in liver disease. *British journal of pharmacology*. Wiley Online Library; 2009;157(8):1352–3.
205. Peschel D, Koerting R, Nass N. Curcumin induces changes in expression of genes involved in cholesterol homeostasis. *The Journal of nutritional biochemistry*. Elsevier; 2007;18(2):113–9.

206. Rajput N, Naeem M, Ali S, Zhang J, Zhang L, Wang T. The effect of dietary supplementation with the natural carotenoids curcumin and lutein on broiler pigmentation and immunity. *Poultry science*. Oxford University Press Oxford, UK; 2013;92(5):1177–85.
207. Castaneda M, Hirschler E, Sams A. Skin pigmentation evaluation in broilers fed natural and synthetic pigments. *Poultry science*. Oxford University Press Oxford, UK; 2005;84(1):143–7.
208. Vila-Donat P, Martín S, Sanchis V, Ramos A. A review of the mycotoxin adsorbing agents, with an emphasis on their multi-binding capacity, for animal feed decontamination. *Food and Chemical Toxicology*. Elsevier; 2018;114:246–59.
209. Vogt LM, Boekschoten MV, de Groot PJ, Faas MM, de Vos P. Cellulose alters the expression of nuclear factor kappa B-related genes and Toll-like receptor-related genes in human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Functional Foods*. Elsevier; 2015;18:520–31.
210. Di Caro V, Cummings JL, Alcamo AM, Piganelli JD, Clark RS, Morowitz MJ, et al. Dietary cellulose supplementation modulates the immune response in a murine endotoxemia model. *Shock*. LWW; 2019;51(4):526–34.
211. Mohajeri M, Behnam B, Cicero AF, Sahebkar A. Protective effects of curcumin against aflatoxicosis: A comprehensive review. *Journal of cellular physiology*. Wiley Online Library; 2018;233(4):3552–77.
212. Latorre JD, Hernandez-Velasco X, Wolfenden RE, Vicente JL, Wolfenden AD, Menconi A, et al. Evaluation and selection of *Bacillus* species based on enzyme production, antimicrobial activity, and biofilm synthesis as direct-fed microbial candidates for poultry. *Frontiers in veterinary science*. Frontiers; 2016;3:95.
213. Farzaneh M, Shi Z-Q, Ghassempour A, Sedaghat N, Ahmadzadeh M, Mirabolfathy M, et al. Aflatoxin B1 degradation by *Bacillus subtilis* UTBSP1 isolated from pistachio nuts of Iran. *Food control*. Elsevier; 2012;23(1):100–6.
214. Bagherzadeh Kasmani F, Karimi Torshizi M, Allameh A, Shariatmadari F. A novel aflatoxin-binding *Bacillus* probiotic: Performance, serum biochemistry, and immunological parameters in Japanese quail. *Poultry science*. Oxford University Press Oxford, UK; 2012;91(8):1846–53.
215. Neeff D, Ledoux D, Rottinghaus G, Bermudez A, Dakovic A, Murarolli R, et al. *In vitro* and *in vivo* efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to bind and reduce aflatoxin residues in tissues of broiler chicks fed aflatoxin B1. *Poultry Science*. Oxford University Press Oxford, UK; 2013;92(1):131–7.
216. Oguz H, Kurtoglu V. Effect of clinoptilolite on performance of broiler chickens during experimental aflatoxicosis. *British Poultry Science*. Taylor & Francis; 2000;41(4):512–7.
217. Guo M, Hao G, Wang B, Li N, Li R, Wei L, et al. Dietary administration of *Bacillus subtilis* enhances growth performance, immune response and disease resistance in Cherry Valley ducks. *Frontiers in microbiology*. Frontiers; 2016;7:1975.
218. Fan Y, Zhao L, Ma Q, Li X, Shi H, Zhou T, et al. Effects of *Bacillus subtilis* ANSB060 on growth performance, meat quality and aflatoxin residues in broilers fed moldy peanut meal naturally contaminated with aflatoxins. *Food and chemical toxicology*. Elsevier; 2013;59:748–53.

219. Salem R, El-Habashi N, Fadl SE, Sakr OA, Elbially ZI. Effect of probiotic supplement on aflatoxicosis and gene expression in the liver of broiler chicken. *Environmental toxicology and pharmacology*. Elsevier; 2018;60:118–27.
220. Guan S, Zhao L, Ma Q, Zhou T, Wang N, Hu X, et al. *In vitro* efficacy of *Myxococcus fulvus* ANSM068 to biotransform aflatoxin B1. *International journal of molecular sciences*. Molecular Diversity Preservation International; 2010;11(10):4063–79.
221. Liu D-L, Yao D-S, Liang R, Ma L, Cheng W-Q, Gu L-Q. Detoxification of aflatoxin B1 by enzymes isolated from *Armillariella tabescens*. *Food and Chemical Toxicology*. Elsevier; 1998;36(7):563–74.
222. Smith J, Hamilton P. Aflatoxicosis in the broiler chicken. *Poultry Science*. Oxford University Press Oxford, UK; 1970;49(1):207–15.
223. Aliakbarpour HR, Chamani M, Rahimi G, Sadeghi AA, Qujeq D. Intermittent feeding programme and addition of *Bacillus subtilis* based probiotics to the diet of growing broiler chickens: Influence on growth, hepatic enzymes and serum lipid metabolites profile. *Archives Animal Breeding*. Copernicus GmbH; 2013;56(1):410–22.
224. Santin E, Paulillo AC, Maiorka A, Nakaghi LSO, Macari M, Silva A, et al. Evaluation of the efficacy of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broilers. *International Journal of Poultry Science*. Asian Network for Scientific Information; 2003;2(5):341–4.
225. Peng X, Bai S, Ding X, Zeng Q, Zhang K, Fang J. Pathological changes in the immune organs of broiler chickens fed on corn naturally contaminated with aflatoxins B1 and B2. *Avian pathology*. Taylor & Francis; 2015;44(3):192–9.
226. Mirza RA. Probiotics and Prebiotics for the Health of Poultry. *Probiotics and Prebiotics in Animal Health and Food Safety*. Springer; 2018. p. 127–54.
227. Celi P, Verlhac V, Calvo EP, Schmeisser J, Kluentner A-M. Biomarkers of gastrointestinal functionality in animal nutrition and health. *Animal Feed Science and Technology*. Elsevier; 2019;250:9–31.
228. Bai K, Huang Q, Zhang J, He J, Zhang L, Wang T. Supplemental effects of probiotic *Bacillus subtilis* fmbJ on growth performance, antioxidant capacity, and meat quality of broiler chickens. *Poultry Science*. Poultry Science Association Inc.; 2016;96(1):74–82.
229. Rajput IR, Li YL, Xu X, Huang Y, Zhi WC, Yu DY, et al. Supplementary effects of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus subtilis* B10 on digestive enzyme activities, antioxidation capacity and blood homeostasis in broiler. *International Journal of Agriculture and Biology*. AsiaNet Pakistan (Pvt) Ltd.; 2013;15(2).
230. Huang M, Choi Y, Houde R, Lee J-W, Lee B, Zhao X. Effects of Lactobacilli and an acidophilic fungus on the production performance and immune responses in broiler chickens. *Poultry Science*. Oxford University Press Oxford, UK; 2004;83(5):788–95.
231. Salim H, Kang H, Akter N, Kim D, Kim J, Kim M, et al. Supplementation of direct-fed microbials as an alternative to antibiotic on growth performance, immune response, cecal microbial

- population, and ileal morphology of broiler chickens. *Poultry Science*. Oxford University Press Oxford, UK; 2013;92(8):2084–90.
232. Ahmed ST, Islam MM, Mun H-S, Sim H-J, Kim Y-J, Yang C-J. Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* as a probiotic strain on growth performance, cecal microflora, and fecal noxious gas emissions of broiler chickens. *Poultry Science*. Poultry Science Association, Inc.; 2014;93(8):1963–71.
233. Shivachandra S, Sah R, Singh S, Kataria J, Manimaran K. Immunosuppression in broiler chicks fed aflatoxin and inoculated with fowl adenovirus serotype-4 (FAV-4) associated with hydropericardium syndrome. *Veterinary research communications*. Springer; 2003;27(1):39–51.
234. Koenen M, Kramer J, Van Der Hulst R, Heres L, Jeurissen S, Boersma W. Immunomodulation by probiotic lactobacilli in layer-and meat-type chickens. *British Poultry Science*. Taylor & Francis; 2004;45(3):355–66.
235. Lee K, Lee S, Lillehoj H, Li G, Jang S, Babu U, et al. Effects of direct-fed microbials on growth performance, gut morphometry, and immune characteristics in broiler chickens. *Poultry Science*. Oxford University Press Oxford, UK; 2010;89(2):203–16.
236. Lee K-W, Kim DK, Lillehoj HS, Jang SI, Lee S-H. Immune modulation by *Bacillus subtilis*-based direct-fed microbials in commercial broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology*. Elsevier; 2015;200:76–85.
237. Raju M, Devegowda G. Influence of esterified-glucomannan on performance and organ morphology, serum biochemistry and haematology in broilers exposed to individual and combined mycotoxicosis (aflatoxin, ochratoxin and T-2 toxin). *British poultry science*. Taylor & Francis; 2000;41(5):640–50.
238. Valchev I, Kanakov D, Hristov T, Lazarov L, Binev R, Grozeva N, et al. Investigations on the liver function of broiler chickens with experimental aflatoxicosis. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. 2014;17(4).
239. Fernandez A, Verde MT, Gascon M, Ramos J, Gomez J, Luco D, et al. Variations of clinical biochemical parameters of laying hens and broiler chickens fed aflatoxin-containing feed. *Avian Pathology*. Taylor & Francis; 1994;23(1):37–47.
240. Kirpich IA, Solovieva NV, Leikhter SN, Shidakova NA, Lebedeva OV, Sidorov PI, et al. Probiotics restore bowel flora and improve liver enzymes in human alcohol-induced liver injury: a pilot study. *Alcohol*. Elsevier; 2008;42(8):675–82.
241. Gratz SW, Mykkanen H, El-Nezami HS. Probiotics and gut health: a special focus on liver diseases. *World journal of gastroenterology: WJG*. Baishideng Publishing Group Inc; 2010;16(4):403.
242. Kubena L, Huff W, Harvey R, Yersin A, Elissalde M, Witzel D, et al. Effects of a hydrated sodium calcium aluminosilicate on growing turkey poults during aflatoxicosis. *Poultry Science*. Oxford University Press Oxford, UK; 1991;70(8):1823–30.
243. Sakhare PS, Harné SD, Kalorey DR, Warke SR, Bhandarkar AG, Kurkure NV. Effect of Toxiroak® polyherbal feed supplement during induced aflatoxicosis, ochratoxicosis and combined

- mycotoxicoses in broilers. *Veterinarski arhiv. Veterinarski fakultet Sveucilivsta u Zagrebu*; 2007;77(2):129–46.
244. Kalavathy R, Abdullah N, Jalaludin S, Ho Y. Effects of *Lactobacillus* cultures on growth performance, abdominal fat deposition, serum lipids and weight of organs of broiler chickens. *British Poultry Science*. Taylor & Francis; 2003;44(1):139–44.
245. Santoso U, Tanaka K, Ohtani S. Effect of dried *Bacillus subtilis* culture on growth, body composition and hepatic lipogenic enzyme activity in female broiler chicks. *British Journal of Nutrition*. Cambridge University Press; 1995;74(4):523–9.
246. Andretta I, Kipper M, Lehnen C, Lovatto P. Meta-analysis of the relationship of mycotoxins with biochemical and hematological parameters in broilers. *Poultry science*. Oxford University Press Oxford, UK; 2012;91(2):376–82.
247. Basmacioglu H, Oguz H, Ergul M, Col R, Birdane Y, others. Effect of dietary esterified glucomannan on performance, serum biochemistry and haematology in broilers exposed to aflatoxin. *Czech Journal of Animal Science*. 2005;50(1):31–9.
248. Chichlowski M, Croom J, McBride B, Havenstein G, Koci M. Metabolic and physiological impact of probiotics or direct-fed-microbials on poultry: a brief review of current knowledge. *International Journal of Poultry Science*. Asian Network for Scientific Information; 2007;6(10):694–704.
249. Murugesan G, Gabler N, Persia M. Effects of direct-fed microbial supplementation on broiler performance, intestinal nutrient transport and integrity under experimental conditions with increased microbial challenge. *British poultry science*. Taylor & Francis; 2014;55(1):89–97.
250. Ramos J, Fernández A, Saez T, Sanz M, Marca M. Effect of aflatoxicosis on blood mineral constituents of growing lambs. *Small Ruminant Research*. Elsevier; 1996;21(3):233–8.
251. Scheideler S. Effects of various types of aluminosilicates and aflatoxin B1 on aflatoxin toxicity, chick performance, and mineral status. *Poultry science*. 1993;72(2):282–8.
252. Jadhav K, Sharma K, Katoch S, Sharma V, Mane B. Probiotics in broiler poultry feeds: A review. *Journal of Animal Nutrition and Physiology*. 2015;1:0–16.