



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA  
SALUD ANIMAL

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**USO DE BIOADSORBENTES EN LA PROTECCIÓN CONTRA LA AFLATOXICOSIS  
EN UN MODELO *in vitro* QUE SIMULA LAS CONDICIONES DE pH DEL TRACTO  
GASTROINTESTINAL DE LOS PAVOS (*Meleagris gallopavo*)**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

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

PRESENTA:

**MARÍA DE JESÚS NAVA RAMÍREZ**

TUTOR:

**DR. ABRAHAM MÉNDEZ ALBORES**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

COMITÉ TUTORAL:

**DR. CARLOS LÓPEZ COELLO**

UNAM-FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**DR. GUILLERMO TÉLLEZ ISAÍAS**

UNIVERSIDAD DE ARKANSAS

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, MAYO, 2021



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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 los seres más importantes de mi vida y que más amo:

Mi mamá, por ser la mujer más fuerte y generosa que conozco. Gracias por cuidarme, consentirme y apoyarme incondicionalmente.

Por ser mi mayor impulso y motivación en el estudio y mi ejemplo de vida desde que tengo memoria, Ana. Por cuidarme, quererme y preocuparte por mí como una hija, Magda. Por compartir salidas, conciertos y maquillaje, por jugar conmigo y ser la hermana divertida, Alicia.

Mis sobrinos, por iluminar mis días y ser los niños más bonitos, latosos y amorosos conmigo. Por ser la niña más lista y fuerte, Camila. Por ser el niño más ocurrente y divertido, Dante.

Por impulsarme, enseñarme y apoyarme en todo este largo camino; por amarme y dejar que te ame como no sabía que se podía...con tanta calidez, confianza y respeto. Y lo más importante: por aceptarme con todo y nuestros 9 gatos.

Por hacer mi vida muy feliz y más fácil, sobre todo en la pandemia y por dejarme amarlos tanto, a mis 9 gatos: Zeus, Shawn, Lua, Orfeo, Azazel, Layla, Orión (Chiti), Matusalén y mi nena (Anne) y a mis 4 pollos: El Pepe, Clarita, Emilia y Negrita.

Por haberme querido, cuidado y enseñado a tu manera, papá.

"La vida no es fácil para ninguna de nosotras, pero, ¿y qué? Hay que tener perseverancia y sobre todo, confianza en nosotras mismas. Debemos creer que estamos capacitadas para algo y que podemos lograrlo".

-Marie Curie

## **Agradecimientos**

Agradezco a la UNAM y a la FESC por darme un mar de conocimientos y oportunidades dentro y fuera de las aulas.

Mi más profundo y sincero agradecimiento al Dr. Abraham, quien es uno de mis más grandes guías. Gracias por brindarme su confianza, apoyo y calurosa amistad a lo largo de los años, por creer en mí y ayudarme a crecer como persona y como profesionalista.

Agradezco indudablemente el haber conocido al Dr. Carlos López, es de las personas más agradables, generosas y sencillas que pude conocer, un maestro impecable el cual impulsa y motiva para seguir aprendiendo; toda mi admiración y respeto hacia usted. Gracias por todo.

Expreso mi gratitud al Dr. Guillermo Téllez por sus grandes aportaciones a lo largo de este proyecto; y porque, sin conocerme en persona, me dio el apoyo, el reconocimiento y la confianza necesaria para salir adelante con el trabajo.

A todo mi jurado, la Dra. Raquel López, el Dr. Ernesto Ávila y el Dr. Sergio, por sus aportaciones, disposición, sugerencias y observaciones al momento de leer mi trabajo de tesis.

A todos los integrantes del Laboratorio 14, por la enorme colaboración y amistad que me han brindado, en especial, a la Dra. Alma por todo el apoyo incondicional a lo largo de estos años.

A Alecito, por ser más que un compañero de trabajo, uno de mis mejores amigos, gracias por hacer amenas y divertidas todas las horas de trabajo y por todos tus consejos, conocimientos y horas de plática dentro y fuera del laboratorio, sin tu ayuda, no sé qué hubiera hecho.

A mis compañeros, maestros y amigos de maestría. Al Dr. Montiel por enseñarme a amar la bioquímica aún más y ser una gran persona a la cual admiro. A Cecilia, Lina, Edmundo y Saúl por hacer de las clases muy divertidas y más fáciles. Y por aquella vez que estuvimos en el carro disfrutando del aire fresco y de nuestras compañías, los quiero.

A Emilio y a Luz por ser unos de los amigos más cercanos e incondicionales que tengo, aunque no se note los quiero mucho, son como de mi familia. A Mariana, Karlita Belén, Diana e Iván, por ser mis más grandes amigos de toda la vida. Los amo.

Al CONACYT, por el apoyo económico para la realización de este proyecto.

Contenido	I
Listado de Figuras	III
Listado de Tablas	V
Resumen	1
Abstract	3
1. Introducción	5
2. Antecedentes	7
2.1 Hongos y producción de micotoxinas	7
2.2 Aflatoxinas	8
2.2.1 Estructura química	9
2.3 Condiciones para el crecimiento de <i>Aspergillus</i> y su posterior producción de aflatoxinas	10
2.4 Ocurrencia de las aflatoxinas en los alimentos	12
2.5 Efecto de la AFB <sub>1</sub> en los pavos	17
2.6 Estrategias de descontaminación de las aflatoxinas	18
2.6.1 Agentes adsorbentes de aflatoxinas	25
2.6.1.1 Adsorbentes inorgánicos de aflatoxinas	26
2.6.1.2 Adsorbentes orgánicos de aflatoxinas	29
2.6.2 Características generales de los bioadsorbentes ( <i>Lactuca sativa</i> , <i>Equisetum arvense</i> , <i>Pyracantha koidzumii</i> )	33
3. Justificación	35
4. Hipótesis	36
5. Objetivos	36
5.1 Objetivo general	36
5.2 Objetivos particulares	36
6. Materiales y métodos	37
6.1 Químicos y reactivos	37
6.2 Precauciones de seguridad	37
6.3 Material vegetal y preparación de los bioadsorbentes	37
6.4 Cuantificación de aflatoxina B <sub>1</sub> (AFB <sub>1</sub> )	39
6.5 Experimentos para la adsorción de AFB <sub>1</sub>	39
6.6 Determinación del contenido de clorofilas y experimentos de adsorción con biomateriales sin clorofilas	41
6.7 Caracterización de los bioadsorbentes y de las interacciones entre los adsorbentes y la molécula de AFB <sub>1</sub>	43
6.7.1 Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier con reflexión total atenuada (FTIR-ATR)	43

6.7.2	Espectroscopia UV-Vis con reflectancia difusa	43
6.7.3	Potencial Z ( $\zeta$ ) y movilidad electroforética	44
6.7.4	Punto de carga cero (pHpzc)	45
7.	Diseño experimental y análisis estadístico	46
8.	Resultados y discusión	47
8.1	Experimentos de adsorción	47
8.2	Determinación del contenido de clorofilas y experimentos de adsorción con biomateriales sin clorofilas	55
8.3	Caracterización de los bioadsorbentes y las interacciones con la molécula de AFB <sub>1</sub>	60
8.3.1	Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier y reflexión total atenuada (FTIR-ATR)	60
8.3.2	Espectroscopía UV-Vis con reflectancia difusa	64
8.3.3	Potencial zeta ( $\zeta$ ) y movilidad electroforética	67
8.3.4	Punto de carga cero (pHpzc)	69
9.	Conclusiones	72
10.	Perspectivas	74
11.	Referencias	75
12.	Apéndice	84
13.	Anexos: Publicaciones	85
13.1	Ability of low contents of biosorbents to bind the food carcinogen aflatoxin B <sub>1</sub> <i>in vitro</i>	85
13.2	The effect of moderate-dose aflatoxin B <sub>1</sub> and <i>Salmonella</i> Enteritidis infection on intestinal permeability in broiler chickens	95

## Listado de Figuras

Figura 1. Estructura química de las aflatoxinas	9
Figura 2. Fragmentos cortados de Lechuga, espino de fuego y cola de caballo	38
Figura 3. Molino y malla que proporcionaron un tamaño de partícula <math><250 \mu\text{m}</math>	38
Figura 4. Bioadsorbentes de cola de caballo, lechuga y espino de fuego	38
Figura 5. Procedimiento del experimento de adsorción	40
Figura 6. Procedimiento de la extracción y determinación del contenido de clorofilas de los bioadsorbentes	42
Figura 7. Espectrofotómetro FTIR-ATR	43
Figura 8. Espectrofotómetro Lambda 365 UV-Vis-RD	44
Figura 9. ZetaSizer Pro	45
Figura 10. Celda DTS1070	45
Figura 11. Lectura de pH con un electrodo de vidrio	46
Figura 12. Capacidad de adsorción de AFB <sub>1</sub> de la lechuga, la cola de caballo y el espino de fuego utilizando dos diferentes contenidos de bioadsorbentes (0.5% y 0.1%, p/v)	50
Figura 13. Capacidad de adsorción de AFB <sub>1</sub> de la lechuga, la cola de caballo y el espino de fuego (0.1% p/v) a tres diferentes valores de pH (2, 5 y 7)	52
Figura 14. Capacidad de adsorción de AFB <sub>1</sub> de la lechuga, la cola de caballo y el espino de fuego (0.5% p/v) a tres diferentes valores de pH (2, 5 y 7)	53
Figura 15. Espectro UV-Vis representativo del contenido de clorofilas de los extractos de los bioadsorbentes de la lechuga, la cola de caballo y el espino de fuego	56
Figura 16. Capacidad de adsorción de AFB <sub>1</sub> utilizando los bioadsorbentes con y sin clorofilas a un contenido de 0.1% p/v a un pH de 7	58

Figura 17. Espectro FTIR-ATR de a) lechuga, b) cola de caballo y c) espino de fuego, antes y después de la adsorción de AFB <sub>1</sub>	61
Figura 18. Espectro de reflectancia difusa UV-Vis de bioadsorbente a base de lechuga	65
Figura 19. Espectro de reflectancia difusa UV-Vis de bioadsorbente a base de cola de caballo	66
Figura 20. Espectro de reflectancia difusa UV-Vis de bioadsorbente a base de espino de fuego	66
Figura 21. Relación entre el potencial zeta y el pH de los bioadsorbentes de lechuga, cola de caballo y espino de fuego	67
Figura 22. Movilidad electroforética y el potencial zeta de la molécula de AFB <sub>1</sub> en función del pH	69
Figura 23. Punto de carga cero (pH <sub>pzc</sub> ) de la lechuga, la cola de caballo y el espino de fuego en agua destilada	70
Figura 24. Punto de carga cero (pH <sub>pzc</sub> ) de la lechuga, la cola de caballo y el espino de fuego en buffers con valores de pH de 2, 5 y 7	71
Figura A1. Espectro de absorción de las clorofilas <i>a</i> y <i>b</i>	85
Figura A2. Relación entre la concentración de aflatoxina y el área bajo la curva	85



## Listado de Tablas

Tabla 1. Características químicas de las aflatoxinas	10
Tabla 2. Condiciones óptimas para el crecimiento de <i>Aspergillus</i>	12
Tabla 3. Límite de tolerancia de aflatoxinas en cereales	13
Tabla 4. Límites permitidos de aflatoxinas en los cereales para el consumo animal	14
Tabla 5. Productos más susceptibles a la contaminación por aflatoxinas	15
Tabla 6. Ocurrencia mundial de aflatoxinas en los alimentos	15
Tabla 7. Porcentaje de adsorción de AFB <sub>1</sub> de la lechuga, la cola de caballo y el espino de fuego a tres diferentes valores de pH (2, 5 y 7)	55
Tabla 8. Contenido de clorofilas de los bioadsorbentes a base de lechuga, cola de caballo y espino de fuego	56
Tabla 9. Porcentaje de adsorción de AFB <sub>1</sub> utilizando los bioadsorbentes de lechuga, cola de caballo y espino de fuego con y sin clorofilas a un contenido de 0.1% (p/v) a un pH 7	59
Tabla 10. Asignación de bandas de las vibraciones activas FTIR-ATR de la lechuga, la cola de caballo y el espino de fuego	62

## Resumen

En esta investigación, se evaluó por primera vez en un modelo *in vitro*, la eficacia de dos nuevos bioadsorbentes de aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>): la lechuga (*Lactuca sativa* L.) y la cola de caballo (*Equisetum arvense*). Anteriormente, nuestro grupo de investigación evaluó la efectividad del espino de fuego (*Pyracantha koidzumii*) como bioadsorbente de aflatoxinas, por lo tanto, en este estudio, el espino de fuego se utilizó como material de referencia. Se realizó la caracterización de los biomateriales mediante las técnicas de potencial Z ( $\zeta$ ), movilidad electroforética, punto de carga cero (pHpzc), espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier con reflexión total atenuada (FTIR-ATR) y espectroscopia UV-Vis con reflectancia difusa para conocer la naturaleza de las interacciones físicas y químicas entre los bioadsorbentes y la molécula de AFB<sub>1</sub>.

Para la caracterización de los tres bioadsorbentes con la técnica de potencial zeta se utilizaron tres valores de pH diferentes (2, 5 y 7). Se observó que el comportamiento del potencial zeta de los tres bioadsorbentes aumentó conforme el valor de pH fue acrecentando. Los valores de potencial zeta en un pH de 7 fueron de -32 mV, -40 mV, y -47 mV para la lechuga, la cola de caballo y el espino de fuego, respectivamente. Por consiguiente, se puede considerar que, el tipo de interacciones entre los bioadsorbentes y la AFB<sub>1</sub> son electrostáticas, teniendo en cuenta que la AFB<sub>1</sub> es una molécula polar positiva y la superficie de los bioadsorbentes son de carga negativa, por lo que la adsorción de AFB<sub>1</sub> puede considerarse alta en un pH de 7. A su vez, el punto de carga cero también proporciona información de la carga superficial de los bioadsorbentes. La carga superficial de cada bioadsorbente fue de 5.6, 5.69, y 5.62 para lechuga, la cola de caballo y el espino de fuego, respectivamente. Por lo que se puede asumir que la carga superficial de los bioadsorbentes a estos valores es de cero, tomando en cuenta que, si el pH es menor al punto de carga cero, la superficie está cargada positivamente y, por el contrario, si el pH es mayor al punto de carga cero, la superficie estará cargada negativamente. Considerando la carga positiva de la molécula de aflatoxina y los valores de punto de carga cero de los bioadsorbentes, se puede concluir que la mejor adsorción es a valores de pH mayores de 5.6. La técnica de espectroscopia UV-Vis con reflectancia difusa es idónea para caracterizar biomateriales que contengan pigmentos como las clorofilas, los carotenoides y las antocianinas. Se observó que los tres bioadsorbentes presentaron dos bandas de adsorción en la región de 677 nm y 650 nm, las cuales corresponden a clorofila a y clorofila b, respectivamente. La última técnica que se realizó para caracterizar a los bioadsorbentes fue la de espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier con reflexión total atenuada, la cual identificó los grupos funcionales de cada uno de los bioadsorbentes antes y después de la sorción de AFB<sub>1</sub>. Es bien sabido que, los grupos funcionales que son considerados como los que interaccionan con la AFB<sub>1</sub> son: hidroxilo, carbonilo, amida, fosfato y cetona. Se observó que el porcentaje de transmitancia de las

bandas de los espectros de los bioadsorbentes que contenían AFB<sub>1</sub> tenían menor cantidad de grupos funcionales en comparación con las bandas de los espectros de los bioadsorbentes originales.

Además, se realizó un modelo que emuló las condiciones del tracto gastrointestinal de los pavos, empleando una concentración de AFB<sub>1</sub> de 190 ng/mL, el contenido de cada bioadsorbente (lechuga, cola de caballo y espino de fuego) fue de 0.5 % y 0.1 % p/v, a tres diferentes valores de pH (2, 5 y 7), a una temperatura de 40 °C durante 2 h. En general, cuando se usaron los bioadsorbentes a 0.5% p/v, la AFB<sub>1</sub> fue adsorbida satisfactoriamente: a pH 2, el porcentaje de adsorción de la lechuga, la cola de caballo, y el espino de fuego fue de 70%, 38%, y 84%, respectivamente. A pH 5, el porcentaje de adsorción fue de 79%, 82%, y 87%, respectivamente. A pH 7, el porcentaje de adsorción fue de 99%, 100%, y 100%, respectivamente. Sin embargo, cuando se usaron los adsorbentes al 0.1 % p/v, no se observó adsorción a pH 2. Se registró una mejor adsorción de AFB<sub>1</sub> a pH 5: lechuga (43%), cola de caballo (33%), y espino de fuego (50%). El porcentaje de adsorción de la lechuga a un pH neutro, se destacó por encima del de cola de caballo y el espino de fuego, teniendo un 95% de adsorción de AFB<sub>1</sub>.

Los pigmentos fotosintéticos (clorofilas) presentes en los bioadsorbentes, se determinaron evaluando la absorbancia de los extractos de los bioadsorbentes en etanol al 96% (v/v). Mediante dicho estudio, se pudo observar que la lechuga tuvo una mayor concentración de clorofilas, seguida por el espino de fuego, y la cola de caballo. Cuando los bioadsorbentes quedaron libres de clorofilas, se realizaron los experimentos de adsorción de AFB<sub>1</sub>, desafiándolos con las mismas condiciones de adsorción. Los resultados de adsorción de los bioadsorbentes sin clorofilas fueron inferiores a los que contenían clorofila, dando un porcentaje de adsorción de AFB<sub>1</sub> a pH 7 de: 51% para la lechuga, 37% para la cola de caballo, y 53% para el espino de fuego. En esta investigación, se demostró que la adsorción de la AFB<sub>1</sub> se llevó a cabo principalmente por las interacciones entre la molécula de AFB<sub>1</sub> y los grupos funcionales de los bioadsorbentes, y simultáneamente, por la formación de los complejos entre la AFB<sub>1</sub> y la clorofila presente en los biomateriales.

Tomando estos resultados en conjunto, se concluyó que los desechos de lechuga podrían actuar como un óptimo bioadsorbente, el cual tiene un importante potencial de adsorción de AFB<sub>1</sub> en ciertos compartimientos del tracto gastrointestinal (TGI) de los pavos a niveles bajos de inclusión.

**Palabras clave:** aflatoxina B<sub>1</sub>, adsorción, biomateriales, modelo *in vitro*.

## Abstract

In this research, the efficacy of two new aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) bioadsorbents: lettuce (*Lactuca sativa* L.) and field horsetail (*Equisetum arvense*) was evaluated using an *in vitro* model. Previously, our research group evaluated the effectiveness of Formosa firethorn (*Pyracantha koidzumii*) as an aflatoxin bioadsorbent; therefore, in this study, Formosa firethorn was used as a reference material. The characterization of the biomaterials was carried out using the techniques of Zeta potential ( $\zeta$ ), electrophoretic mobility, point of zero charge (pHpzc), Fourier transform infrared spectroscopy with attenuated total reflection (FTIR-ATR), and diffuse reflection UV-Vis spectroscopy, with the objective to understand the nature of the physical and chemical interactions between the bioadsorbents and the AFB<sub>1</sub> molecule.

In the characterization of the bioadsorbents with the zeta potential technique, three different pHs values were used (2, 5, and 7). It was observed that the behavior of the zeta potential of the three tested bioadsorbents increased as the pH value increased. At pH 7, zeta potential values of -32 mV, -40 mV, and -47 mV were recorded for lettuce, field horsetail, and Formosa firethorn, respectively. Consequently, it could be considered that the type of interaction between bioadsorbents and AFB<sub>1</sub> molecule are electrostatic in nature, taking into account that AFB<sub>1</sub> is a positive polar molecule and the surface of the bioadsorbents are negatively charged; therefore, the adsorption of AFB<sub>1</sub> could be considered significant at a pH value of 7. Furthermore, the point of zero charge also provides information on the surface charge of the bioadsorbents. The surface charge of each bioadsorbent was 5.6, 5.69, and 5.62 for lettuce, field horsetail and Formosa firethorn, respectively. Therefore, it can be assumed that the surface charge of the bioadsorbents at these values is zero, considering that, if pH is below the point of zero charge, the surface of the biomaterial is positively charged and, on the contrary, if the pH is above the point of zero charge, the surface of the bioadsorbent will be negatively charged. Considering the positive charge of the aflatoxin molecule and the point of zero charge values of the bioadsorbents, it can be concluded that the best adsorption is at pH values higher than 5.6. The diffuse reflection UV-Vis spectroscopy technique is ideal for the characterization of biomaterials containing pigments such as chlorophylls, carotenoids and anthocyanins. It was observed that the three bioadsorbents presented two adsorption peaks in the region of 677 nm and 650 nm, which correspond to chlorophyll *a* and chlorophyll *b*, respectively. The last technique used to characterize the bioadsorbents was Fourier transform infrared spectroscopy with attenuated total reflection, in order to identify the functional groups of each bioadsorbent before and after AFB<sub>1</sub> sorption. It is well known that the functional groups that interact with AFB<sub>1</sub> molecule are: hydroxyl, carbonyl, amide, phosphate and ketone. It was observed that the percentage of

transmittance of the bioadsorbents containing AFB<sub>1</sub> had lower quantities of functional groups compared to those of the original bioadsorbents.

In addition, a model was proposed to emulate the conditions of the gastrointestinal tract of turkeys, using an AFB<sub>1</sub> concentration of 190 ng/mL. The content of each bioadsorbent (lettuce, field horsetail, and Formosa firethorn) was 0.5% and 0.1 % (w/v), using three different pH values (2, 5, and 7), at 40 ° C for 2 h. In general, when bioadsorbents were used at 0.5% (w/v), AFB<sub>1</sub> was satisfactorily adsorbed: at pH 2, the percentages of adsorption for lettuce, field horsetail, and Formosa firethorn were 70%, 38%, and 84%, respectively. At pH 5, the percentages of adsorption were 79%, 82%, and 87%, respectively. At pH 7, the percentages of adsorption were 99%, 100%, and 100%, respectively. However, when adsorbents were used at 0.1% (w/v) no adsorption was observed at pH 2. A moderate AFB<sub>1</sub> adsorption was recorded at pH 5: lettuce (43%), field horsetail (33%), and Formosa firethorn (50%). The percentage of adsorption of lettuce at neutral pH was significantly higher than that of field horsetail and Formosa firethorn, having a 95% adsorption of AFB<sub>1</sub>.

The photosynthetic pigments (chlorophylls) present in the bioadsorbents were determined by evaluating the absorbance of the extracts in 96% (v/v) ethanol. It was observed that lettuce had a higher concentration of chlorophylls, followed by Formosa firethorn, and field horsetail. When the bioadsorbents were free of chlorophylls, the AFB<sub>1</sub> adsorption experiments were performed, challenging them with the same adsorption conditions. The results of AFB<sub>1</sub> adsorption of the bioadsorbents containing negligible amounts of chlorophylls were lower than those of the pristine bioadsorbents, yielding percentages of adsorption at pH 7 of 51%, 37%, and 53% for lettuce, field horsetail, and Formosa firethorn, respectively. In this research, it was shown that the adsorption of AFB<sub>1</sub> was mainly due to the interactions between the AFB<sub>1</sub> molecule and the functional groups of the bioadsorbents, and simultaneously, by the formation of complexes between AFB<sub>1</sub> and the chlorophyll present in the tested biomaterials.

Taking these results together, it was concluded that lettuce wastes could act as an optimal bioadsorbent, which has a significant potential for AFB<sub>1</sub> adsorption in certain compartments of the gastrointestinal tract of turkeys at low inclusion levels.

**Key words:** aflatoxin B<sub>1</sub>, adsorption, biomaterials, *in vitro* model.

## 1. Introducción

Las micotoxinas son metabolitos secundarios de bajo peso molecular producidos por hongos filamentosos de los géneros: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Claviceps* y *Alternaria*. Los metabolitos secundarios no tienen relevancia en cuanto a los procesos bioquímicos indispensables para el crecimiento o desarrollo de los hongos; sin embargo, son capaces de causar enfermedades importantes a los seres humanos y a los animales.

Las especies de los géneros de los hongos anteriormente mencionados son capaces de producir simultáneamente micotoxinas, por ejemplo: las aflatoxinas son producidas por especies del género *Aspergillus*; las fumonisinas producidas por especies del género *Fusarium*; la ocratoxina A producida por especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, los tricotecenos producidos por distintas especies del género *Fusarium*; y la zearalenona producida por especies del género *Fusarium*.

La micotoxina que es considerada como la más toxígena y de carácter ubicuo es la aflatoxina; por lo tanto, ha sido la más investigada en los últimos años. Existen seis tipos de aflatoxinas, las cuales se mencionarán en el orden de toxicidad: la aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), la aflatoxina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>), la aflatoxina G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>), la aflatoxina M<sub>2</sub> (AFM<sub>2</sub>), la aflatoxina B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>), y la aflatoxina G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>).

La AFB<sub>1</sub> es considerada como la de mayor frecuencia en los productos alimenticios, por lo que, puede causar importantes pérdidas económicas y problemas de salud. El consumo de dietas contaminadas con AFB<sub>1</sub> provoca que se desarrolle una enfermedad llamada aflatoxicosis, la cual puede ser aguda o crónica. El curso de dicha enfermedad dependerá de la dosis y el tiempo de exposición a la aflatoxina; además, de la especie, la edad, el sexo y el estado inmunológico y nutricional del individuo.

Los efectos de las aflatoxinas entre los animales son muy parecidos. Algunos efectos que causa la AFB<sub>1</sub> en las aves son: hepatotóxicos, hepatocarcinogénos, teratógenos y mutágenos. También provoca inmunosupresión, anorexia, disminución del crecimiento, mala absorción del alimento, aumento de la morbilidad y mortalidad, cambio de ciertos valores bioquímicos del suero sanguíneo, fragilidad capilar y hemorragias.

Debido a los efectos severos que causa la AFB<sub>1</sub>, numerosos investigadores han desarrollado diversos métodos para reducir sus efectos tóxicos en los animales (basados en estrategias físicas, químicas y biológicas). Entre estos, los métodos físicos son los más usados en la industria de la producción animal, específicamente los adsorbentes, debido a que son considerados como unos de los métodos físicos más efectivos en la eliminación de la AFB<sub>1</sub>.

Los adsorbentes se dividen en inorgánicos y orgánicos, también llamados bioadsorbentes. Los adsorbentes inorgánicos son los más estudiados y utilizados para reducir los efectos tóxicos que provoca la AFB<sub>1</sub>. Sin embargo, los bioadsorbentes han ganado una relevancia importante, ya que, son seguros, rentables y efectivos; además, son capaces de adsorber AFB<sub>1</sub> sin comprometer a los micronutrientes de la dieta animal y/o liberar compuestos tóxicos para los animales, como lo hacen los adsorbentes inorgánicos.

Se ha estudiado la efectividad de adsorción de AFB<sub>1</sub> de diversos bioadsorbentes, los cuales asemejan o superan en su efectividad a los adsorbentes inorgánicos. A continuación, se mencionarán algunos ejemplos de bioadsorbentes ordenándolos desde el que presenta mayor porcentaje de adsorción, al menor porcentaje de adsorción: el algarrobo, los tallos de uva micronizados, las hojas + bayas de *Pyracantha koidzumii*, el orujo de uva, algunas ligninas de plantas aromáticas, el polvo de Aloe vera, las hojas de *Pyracantha koidzumii* y la cáscara de plátano. En consecuencia, la presente investigación tiene como objetivo evaluar el potencial de absorción de AFB<sub>1</sub> de dos nuevos biomateriales a niveles bajos de inclusión, utilizando un modelo *in vitro* que simule las condiciones de pH, temperatura y tiempo (velocidad de tránsito alimenticio) del TGI de los pavos, además de evaluar la naturaleza de la interacción entre los bioadsorbentes y la molécula AFB<sub>1</sub> utilizando varias técnicas de caracterización.

## 2. Antecedentes

### 2.1 Hongos y producción de micotoxinas

Los hongos son microorganismos eucariotas, heterótrofos y ubicuos, los cuales presentan dos tipos de procesos metabólicos: primarios y secundarios (Cortés-Sánchez y Mosqueda-Olivares, 2013). El metabolismo primario sintetiza poca o ninguna aflatoxina, con el tiempo, el fósforo, el nitrógeno y algunos elementos traza son limitados y la síntesis primaria se reduce, por lo que se estimula e inducen la actividad de las enzimas del metabolismo secundario (Prado-Rodríguez, 2018).

*Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Claviceps* y *Alternaria* son algunas especies de hongos capaces de producir diversas micotoxinas simultáneamente como son: las aflatoxinas producidas por especies de *Aspergillus*, las fumonisinas producidas por especies de *Fusarium*, la ocratoxina A producida por especies de *Aspergillus* y *Penicillium*, los tricotecenos producidos por distintas especies de *Fusarium*, y la zearalenona producida por especies de *Fusarium* (Hussain et al., 2010; Grenier y Oswald, 2011).

Algunas especies de hongos filamentosos como: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Claviceps* y *Alternaria* son capaces de producir metabolitos secundarios de bajo peso molecular altamente tóxicos llamados micotoxinas (Huwig et al., 2001; Wang et al., 2020). La palabra micotoxina se deriva de dos palabras: “mikes” haciendo referencia a los “hongos” (griego) y “toxicum” haciendo referencia a “veneno” (latín) (Bhat et al., 2010).

Desde la década de los 60s, se han descubierto cerca de 400 tipos de micotoxinas, categorizadas en grupos basados en sus similitudes estructurales y sus efectos tóxicos (Wielogórska et al., 2016; Bhat et al., 2010).

En la mayoría de los países, los cereales como el trigo, el maíz, la cebada, el centeno, y la avena, son la principal fuente de nutrición, por lo que la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) estima que un importante porcentaje de éstos, son susceptibles a la contaminación por micotoxinas (aproximadamente el 25% de la producción mundial) (Sarocco et al., 2019; Galvano et al., 2001).

Se ha investigado la presencia de micotoxinas en los granos y raciones a nivel mundial y se ha reportado que es posible tener granos con un alto contenido de micotoxinas, los cuales, frecuentemente están contaminados con más de una micotoxina. Además, se ha observado que la inhalación, el contacto de la piel con las micotoxinas, y el consumo de una dieta contaminada con micotoxinas, puede causar el desarrollo de una enfermedad aguda o crónica en la salud de los animales y los humanos (Castillo-Urueta y Durán de Bazúa, 2005; Streit et al., 2013). Dicha enfermedad es llamada micotoxicosis y su



severidad depende de la toxicidad de la micotoxina, la dosis y el tiempo de exposición; así como de la edad, el sexo, el estado inmunológico y nutricional del individuo, causando pérdidas económicas significativas para la industria de la producción animal (Murugesan et al., 2015; Bhat et al., 2010).

## 2.2 Aflatoxinas

Dentro del grupo de las micotoxinas, existe un grupo ampliamente estudiado: las aflatoxinas (AF), las cuales son un grupo de metabolitos relacionados estructuralmente, producidos por hongos del género *Aspergillus*, del cual, sólo 18 de sus especies pueden producir aflatoxinas: *A. flavus*, *A. parasiticus*, y *A. nomius*, *A. aflatoxiformans*, *A. arachidicola*, *A. austwickii*, *A. cerealis*, *A. pseudotamarii*, *A. sergii*, por menciona algunas (Frisvad et al., 2019; Gil-Serna et al., 2019).

El nombre de aflatoxina tiene origen de la combinación de “a” del género *Aspergillus* y “fla” para la especie *flavus* y “toxicum” haciendo referencia a “veneno” (latín) (Abbas et al., 2009).

Previo a que se identificara el agente etiológico, en Inglaterra a principios de la década de 1960, se observaron por primera vez los efectos tóxicos de la AFB<sub>1</sub> en más de 100,000 pavos, a esta condición se le denominó “Enfermedad X de los pavos” (Quist et al., 2000). Los pavos mostraron signos de intoxicación extrema, signos neurológicos (opistótonos), enteritis y una mortalidad del 100 %. En los estudios post-mortem, se observaron lesiones de severa inflamación intestinal, además, los hallazgos histológicos mostraron necrosis aguda hepática, hiperplasia de los conductos biliares y lipidosis hepática. Pronto se descubrió que los pavos eran alimentados con harina de cacahuete y dicha patología se asoció al consumo de la harina contaminada con *A. flavus* proveniente del Brasil (Do y Choi, 2007; Rushing y Selim, 2019; Treviño-Espinosa, 2019).

Las principales aflatoxinas están subdivididas en los grupos B (*blue*) y G (*green*), debido a la fluorescencia azul o verde que presentan bajo la luz ultravioleta ( $\lambda = 365 \text{ nm}$ ), y se denominan como aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), aflatoxina B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>), aflatoxina G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>), aflatoxina G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>); la aflatoxina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) y aflatoxina M<sub>2</sub> (AFM<sub>2</sub>) son derivados metabólicos, los cuales se eliminan en la leche (de ahí su designación *Milk*) de los animales que ingieren raciones contaminadas con AFB<sub>1</sub> y AFB<sub>2</sub>, respectivamente (Jaynes et al., 2007; Méndez y Moreno, 2009; Miranda et al., 2013). Los subíndices 1 y 2 indican la movilidad que éstas presentan en la cromatografía de capa fina (según su peso molecular) (Carvajal, 2013). El orden de toxicidad de las aflatoxinas, de mayor a menor es: AFB<sub>1</sub>, AFM<sub>1</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFM<sub>2</sub>, AFB<sub>2</sub>, y AFG<sub>2</sub>, siendo la AFB<sub>1</sub> el componente de mayor frecuencia en los productos

alimenticios, seguida por la AFG<sub>1</sub> (Méndez y Moreno, 2009; Neeff et al., 2013; Murugesan et al., 2015; Prado-Rodríguez, 2018). Las aflatoxinas B<sub>2</sub> y G<sub>2</sub> son biológicamente inactivas, a menos que estas toxinas se oxiden metabólicamente a AFB<sub>1</sub> y AFG<sub>1</sub> (Bbosa et al., 2013).

### 2.2.1 Estructura química

La estructura de las aflatoxinas está formada por un núcleo cumarínico, otro difurano, y se dividen en dos grupos: el primer grupo, conformado con una ciclopentenona como son AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, aflatoxicol, AFM<sub>1</sub>, AFM<sub>2</sub>, estas dos últimas aflatoxinas (AFM<sub>1</sub> y AFM<sub>2</sub>) son derivados metabólicos hidroxilados de AFB<sub>1</sub> y AFB<sub>2</sub>, respectivamente; y el segundo grupo, conformado con lactonas (AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>) (Tabla 1). El núcleo difurano ocasiona que la molécula tenga mayor rigidez. Las aflatoxinas B<sub>1</sub> y G<sub>1</sub> tienen un enlace insaturado en la posición 8,9 en el anillo terminal de furano (Figura 1) (Miranda et al., 2013).

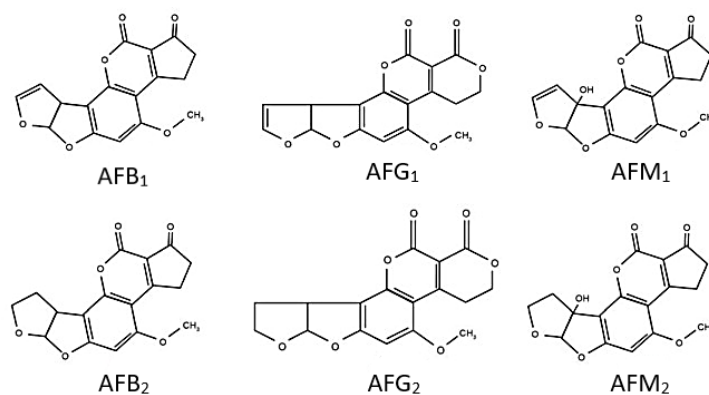


Figura 1. Estructura química de las aflatoxinas.

Las aflatoxinas son consideradas lipofílicas, al igual que el hígado, es por esto que se almacenan y concentran en los hepatocitos (Campagnollo et al., 2016; Kumar et al., 2017; Toso et al., 2018).

Las aflatoxinas son inodoras, insípidas e incoloras, además son moléculas poco solubles en agua, y solubles en disolventes orgánicos moderadamente polares, por lo que son extraídas fácilmente con metanol, cloroformo, acetona, acetonitrilo y dimetilsulfóxido (Miranda et al., 2013). Las AF en solución son sensibles a la luz, se descomponen con soluciones alcalinas o de ácidos suaves (Carvajal, 2013). Químicamente son estables en los alimentos y resistentes a la temperatura de cocción, ultrapasteurización, freído, hervido,

fermentación, y nixtamalización por lo que son difíciles de eliminar una vez que se producen (Carvajal, 2013; Prado-Rodríguez, 2018; Toso et al., 2018). Aunque se pueden destruir en autoclave con amonio o hipoclorito de sodio; en la nixtamalización, el anillo de lactona se abre y pierde su fluorescencia, pensando que están ausentes, pero cuando entran en contacto con soluciones ácidas (jugo gástrico), y posteriormente regresando a un pH neutro, la AF se reactiva fluoresciendo de nuevo (Carvajal, 2013).

Tabla 1. Características químicas de las aflatoxinas

Aflatoxina	Fórmula estructural	Peso molecular (g/mol)	Punto de fusión °C
Serie 1 difuro-cumaro-ciclo-pentanonas			
B <sub>1</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	312	268-269
B <sub>2</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	314	286-289
M <sub>1</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	328	299
M <sub>2</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	330	293
Serie 2 difuro-cumaro-lactonas			
G <sub>1</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	328	244-246
G <sub>2</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	330	237-240

Modificado de (Urrego Novoa y Díaz, 2006).

### 2.3 Condiciones para el crecimiento de *Aspergillus* y su posterior producción de aflatoxinas

Existen diversos factores que influyen en el crecimiento fúngico y la posterior síntesis de micotoxinas en los granos: a) los factores físicos incluyen las condiciones ambientales para la colonización del hongo y la producción de las aflatoxinas, tales como la humedad, el agua libre, la actividad de agua, la temperatura y la integridad física de los granos, b) los factores químicos incluyen el pH, el dióxido de carbono, el oxígeno, la composición del sustrato y los nutrientes minerales, y c) los factores biológicos se basan en las interacciones entre las especies del hongo y su sustrato (presencia de insectos y carga de esporas, variedad de plantas, estrés) (Gimeno y Martins, 2011; Zain, 2011; Bryden, 2012).

El género *Aspergillus* pertenece a un grupo de hongos filamentosos, hialinos, saprófitos, y ubicuos; los cuales pertenecen al phylum *Ascomycot* (Serrano-Coll y Cardona-Castro, 2015). Desde la década de los 60's, varias especies de *Aspergillus* han sido identificadas como productoras de aflatoxinas, siendo *A. flavus* y *A. parasiticus* las más concurrentes

mundialmente en los cultivos agrícolas, durante la cosecha, y el proceso de almacenamiento, su síntesis está regulada por los genes AFLR y AFLS (Abbas et al., 2009; Siegel y Babuscio, 2011; Serrano-Coll y Cardona-Castro, 2015; Prado-Rodríguez, 2018).

El hongo *A. flavus* consiste en un micelio (hifa), conidios (esporas) y esclerocios; cuando los conidios se encuentran en una fuente nutricional adecuada y condiciones ambientales favorables, el hongo es capaz de colonizar rápidamente y producir aflatoxinas (Abbas et al., 2009). *A. flavus* puede llegar a sobrevivir durante el invierno en los residuos de las plantas como micelio o esclerocios, éstos sirven como fuente de nuevos conidios (Abbas et al., 2008; Abbas et al., 2009). En condiciones ambientales adecuadas, los conidios y los esclerocios son capaces de germinar en los micelios, los cuales producen conidióforos que liberan conidios disponibles para colonizar más plantas. Las plantas sanas son menos propensas a ser colonizadas; sin embargo, en condiciones de estrés, falta de humedad y aumento de la temperatura, las plantas son altamente propensas a la contaminación por hongos y posterior síntesis de micotoxinas (Abbas et al., 2009).

La producción de aflatoxinas en el campo, ocurre cuando hay sequía, estrés, altas temperaturas; además, las aflatoxinas se sintetizan exponencialmente durante el almacenamiento de varios meses en condiciones de calor y alta humedad (Villers, 2014).

Se encuentran en regiones tropicales y semitropicales, aunque también es común encontrarlas en regiones templadas, en donde el clima es el principal factor que favorece el crecimiento de los hongos productores de aflatoxinas, fundamentalmente en las condiciones inadecuadas de almacenamiento de los granos (Abbas et al., 2009; Prieto et al., 2009). La temperatura mínima que se requiere para producir aflatoxinas es de 10 a 12°C, la temperatura óptima es de 27 a 30°C, y la temperatura máxima es de 40 a 42°C (Viveros-Rivera, 2010; Gimeno y Martins, 2011; Prado-Rodríguez, 2018). Los hongos habitualmente proliferan en un intervalo de pH de 4 a 8 y a niveles de actividad de agua ( $a_w$ ) superiores a 0.70, aunque la  $a_w$  requerida puede variar entre las diversas especies, por ejemplo: *Aspergillus flavus* está entre 0.78 y 0.80  $a_w$ , y *A. parasiticus* 0.78 y 0.82  $a_w$  (Bhat et al., 2010; Gimeno y Martins, 2011; Lizárraga-Paulín et al., 2011). La humedad es otro factor importante en el crecimiento del hongo y la posterior producción de aflatoxinas en los granos durante su almacenamiento, cuando la humedad relativa es superior a 65%, *Aspergillus* es capaz de desarrollarse sin ningún problema (Villers, 2014). En la Tabla 2 se muestran los rangos y las condiciones óptimas para el crecimiento de *Aspergillus*.

Tabla 2. Condiciones óptimas para el crecimiento de *Aspergillus*.

Factor	Rango	Óptimo
Temperatura (°C)	12 - 43	27 - 30
Humedad relativa (%)	62-99	85
pH	2.2-8	5 - 6
Actividad de agua ( $a_w$ )	0.77 - 0.88	0.82 - 0.99
Humedad del grano (%)	13-20	18

Modificado de Villers, (2014) y Denli y Pérez (2006).

Los hongos pueden colonizar y producir micotoxinas durante dos etapas, debido a esto, se les categoriza a los hongos como: a) hongos de campo (hongos que colonizan a los granos y producen micotoxinas precosecha, estos hongos normalmente requieren de altos niveles de humedad en el grano (20-22%), como los géneros *Alternaria* y *Fusarium*), b) hongos de almacenaje (hongos que colonizan a los granos y producen micotoxinas poscosecha de acuerdo a sus condiciones de almacenamiento, como los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*) y c) hongos de deterioro avanzado (hongos que se encuentran en productos con un avanzado estado de deterioro o descomposición) (Martínez, 1988; Prieto et al., 2009). En general, las condiciones para el desarrollo de micotoxinas precosecha son: altas temperaturas, altos niveles de humedad, daños por insectos, los cuales ocasionan estrés en las plantas. Por otro lado, las condiciones inadecuadas poscosecha son: el inadecuado transporte, almacenamiento, secado, manipulación, y embalaje (Bhat et al., 2010; Medina et al., 2015). Para que los hongos de deterioro avanzado se produzcan, se requiere que los productos contengan una humedad relativa de 95 a 100 % (actividad de agua 0.95 a 1.0) (Martínez, 1988). Durante las etapas de precosecha y poscosecha, las micotoxinas son capaces de reducir en gran medida el valor y comerciabilidad de los granos debido a los efectos negativos de las mismas (Marin et al., 2013; Bhatnagar et al., 2018).

## 2.4 Ocurrencia de las aflatoxinas en los alimentos

La producción agrícola tiene como objetivo producir y abastecer una parte fundamental de la dieta, tanto de los humanos como de los animales, para así poder cubrir sus necesidades energéticas y nutritivas (Sarrocchio et al., 2019). En este caso, los cereales, particularmente el trigo y el maíz representan dos tercios de la ingesta mundial, éstos a su vez, son los responsables de muchas enfermedades, principalmente las que son causadas

por los hongos, ya que se estima que entre el 25 y el 40% de los cereales está contaminado con una o varias micotoxinas (Denli y Pérez, 2006; Sarrocco et al., 2019).

La presencia de las aflatoxinas en los alimentos es muy común; sin embargo, su toxicidad varía según la mercancía (Kumar et al., 2017; Mahato et al., 2019). Diversos análisis de muestras de alimentos revelan que la cantidad contenida de AFB<sub>1</sub> es diez veces mayor en comparación con las otras aflatoxinas (AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> and AFG<sub>2</sub>) (Marin et al., 2013).

Investigadores de todo el mundo, han realizado estudios para determinar el porcentaje que representa la presencia de aflatoxinas en ciertas muestras de alimentos (arroz, trigo, sorgo y maíz), se demostró que el 37.6% de los cereales estudiados estaban contaminados por alguna aflatoxina (Andrade y Caldas, 2015). A su vez, otros investigadores han demostrado que el 38.6% de las muestras (arroz, pan y arepas) estuvieron contaminadas por cualquier tipo de aflatoxinas y el 11.4% de las muestras contaminadas con AFB<sub>1</sub> excedió la cantidad de 2 µg/kg (Martinez-Miranda et al., 2019). Distintos países han establecido regulaciones para proteger a su población a la exposición de la AFB<sub>1</sub> (Tabla 3) (Ndagijimana et al., 2020).

Tabla 3. Límite de tolerancia de aflatoxinas en cereales

País	Materia cruda	Límite de tolerancia (µg/kg)
Unión Europea	Todos los cereales excepto maíz y arroz	4
	(total)	10
	Maíz y arroz para procesar (total)	2
	Todos los cereales (AFB <sub>1</sub> )	
Estados Unidos	Todos los cultivos alimenticios (totales)	20
Japón	Todos los cultivos alimenticios	10
China	Maíz	20
	Trigo, cebada, otros cereales (excepto arroz)	5

Total: AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, y AFG<sub>2</sub>.

Modificado de Sarrocco et al. (2019); Méndez y Moreno, (2009); y Ndagijimana et al. (2020)

En México, existe la Norma Oficial Mexicana (NOM-188-SSA1-2010, Productos y servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones Sanitarias que es de observancia obligatoria en el territorio nacional y establece el límite máximo permisible de las aflatoxinas en los cereales para el consumo animal, así como su

correcto transporte y almacenamiento. En el Apéndice A, de los límites permitidos para el consumo animal, menciona que el contenido en los cereales mayor de 20 µg/kg de aflatoxinas, serán destinados al consumo animal, los cuales deberán ajustarse a lo dispuesto en la Tabla 4 (NOM-188-SSA1-2010). La regulación de AFM<sub>1</sub> en productos lácteos según la Unión Europea, permite hasta 0.05 µg/kg en leche líquida, mientras que, en México, según la NOM-243-SSA1-2010 permite hasta 0.5 µg/kg en leche líquida y 5 µg/kg en la leche de polvo (NOM-243-SSA1-2010).

Tabla 4. Límites permitidos de aflatoxinas en los cereales para el consumo animal.

Especie/etapa de producción	Límite máximo (µg/kg)
Aves (excepto pollos de engorda)	100
Cerdos en engorda:	
Entre 25 y 45 kg	100
Mayores de 45 kg	200
Maduros destinados a reproducción	100
Rumiantes:	
Maduros destinados a reproducción	100
De engorda en etapa de finalización	300

(NOM-188-SSA1, 2010)

Se han reportado que los cereales más susceptibles a ser contaminados por aflatoxinas son la cebada, el maíz, el arroz, el sorgo, y el trigo; y las semillas oleaginosas como algodón, maní, colza, girasoles, cacahuates, y frutos secos (Lizárraga-Paulín et al., 2011; Bryden, 2012). Sin embargo, el principal hongo productor de aflatoxina en el maíz, algodón es *A. flavus*, mientras que en el maní, el cacahuate, el arroz, el sorgo y el trigo el principal productor es *A. parasiticus*. Sin embargo, cuando las dos especies de hongos están presentes, *A. parasiticus* es superado por la síntesis de *A. flavus* (Abbas et al., 2009; Gimeno y Martins, 2011).

Tabla 5. Productos más susceptibles a la contaminación por aflatoxinas.

Aflatoxina	Especies productoras de hongos	Productos afectados
AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub>	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. tamarii</i> , <i>A. pseudotamarii</i> , <i>A. bombycis</i> , <i>A. parvisclerotigenus</i> , <i>A. nomius</i> , <i>A. minisclerotigenes</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A. toxicarius</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>A. rambellii</i> , <i>A. arachidicola</i> , <i>A. ochraceoroseus</i>	Semillas de algodón, maní, mantequilla de maní, guisantes, sorgo, arroz, pistacho, maíz, colza, harina de maíz, semillas de girasol, higos, especias, carnes, productos lácteos, jugos de frutas (manzana, guayaba)
AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub>	<i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomius</i> , <i>A. bombycis</i> , <i>A. pseudotamarii</i> , <i>A. terreus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>A. arachidicola</i> , <i>A. toxicarius</i> , <i>A. minisclerotigenes</i>	Cacahuetes, semillas de algodón, semillas de girasol, nueces de árbol, pistacho, mantequilla de maní, harina de maíz, guisantes, cereales, maíz, higos, carnes, especias, productos lácteos, jugos de frutas (manzana, guayaba)

Modificada de Méndez y Moreno, (2009); Mahato et al. (2019).

Las condiciones climáticas son el factor más importante para la producción de aflatoxinas en los cultivos (Tabla 6).

Tabla 6. Ocurrencia mundial de aflatoxinas en los alimentos.

País	AFB <sub>1</sub>	Aflatoxinas totales	AFM <sub>1</sub>
Turquía	Almendras, avellanas, lentejas, harina de maíz, chile rojo	Higos	Mantequilla, crema, queso
Estados Unidos	Chiles		
Zimbabue	Maíz		
India	Maíz, arroz		
Vietnam	Maíz		
Japón	Nueces		
Malawi	Alimentos a base de nuez		



Zambia	Cacahuates		
China	Arroz		Yogurt
Pakistán	Arroz		
Túnez	Sorgo, trigo		
Italia	Especias		Leche (vaca /búfalo)
Malasia	Trigo		
Ecuador	Harina de maíz		
Colombia	Maíz blanco	Maíz, arroz	Leche, queso
Venezuela	Arepas de maíz blanco	Maíz blanco y amarillo	
Panamá	Maíz	Maíz	
Brasil		Anacardos	Leche (vaca)
Costa Rica		Maíz	
Serbia		Maíz	Fórmula de infantes
Nigeria		Jengibre	
Etiopía		Cacahuates	
Egipto		Productos de carne	
Arabia Saudita		Cacahuates	
Taiwán		Productos de cacahuete	
Grecia			Leche
Irán			Leche (vaca), yogurt
Portugal			Leche (vaca)
México		Maíz	
Argentina		Maíz	
Perú		Maíz	
Guatemala		Maíz	
Chile		Cacahuates, nuez, jengibre, comino (semilla), sésamo, curry	

Modificada de Miranda et al. (2013) y Mahato et al. (2019).

Sin embargo, la ocurrencia de las aflatoxinas está cambiando a medida que van aumentando las temperaturas promedio debido al cambio climático en el mundo, aunque *A. flavus* tenga mecanismos fisiológicos para adaptarse a las condiciones climáticas

adversas (Vila-Donat et al., 2018; Mahato et al., 2019). Por lo tanto, se requieren medidas de manejo y prevención y estrategias de control adecuado para combatir los problemas que desencadenan las aflatoxinas.

## **2.5 Efecto de la AFB<sub>1</sub> en los pavos**

Según la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC), la AFB<sub>1</sub> está clasificada en el grupo 1 como una sustancia con alto poder cancerígeno en humanos (IARC, 1995). Los efectos de las aflatoxinas son similares en todos los animales; sin embargo, previamente se mencionó que la susceptibilidad varía entre especie, edad, raza, sexo, y estado nutricional (Dhakal y Sbar, 2020). La susceptibilidad de las aves frente a las aflatoxinas tiene una gran variación, reconociendo a los patos como los más susceptibles, seguidos los pavos, codornices y los pollos como los menos susceptibles (Rawal et al., 2010). Unos de los factores más importantes para determinar la susceptibilidad ante las aflatoxinas es la edad, siendo los jóvenes más vulnerables que los adultos, debido a que éstos últimos son más resistentes a los efectos tóxicos sobre el sistema hematopoyético, lo que propone que los animales jóvenes tienen diferencias metabólicas comparadas con los adultos, los cuales tienen un hígado con mayor concentración de proteínas y enzimas capaces de detoxificar (Fernandez et al., 1995; Rodríguez, 2010).

El órgano que se afecta gravemente es el hígado, y las lesiones primarias incluyen: hemorragia, necrosis, cambios grasos en los hepatocitos y hepatomegalia. Estos efectos pueden ocurrir en la región centrolobulillar o en la región portal, según la especie (Do y Choi, 2007; Lizárraga-Paulín et al., 2011). Los cambios microscópicos del hígado incluyen la degeneración hidrópica, hiperplasia de conductos biliares, y fibrosis periportal (Magnoli et al., 2011). Además, se ha descrito que los hematomas son frecuentemente relacionados con el aumento de la fragilidad capilar y puntos de hemorragia en la superficie de los músculos de la pierna y de la pechuga, atribuyéndolas al consumo de aflatoxinas (Fernandez et al., 1995).

La aflatoxicosis se caracteriza por trastornos metabólicos, rechazo de alimento, alteración del índice de conversión alimenticia, disminución en la ganancia de peso, alteración en la adsorción de nutrientes, disminución del peso corporal e inmunosupresión, lo que conlleva a pérdidas económicas, muchas veces mayor que el impacto causado por la muerte (Lizárraga-Paulín et al., 2011; Gallo et al., 2015; Vila-Donat et al., 2018). Por lo que, el alimento contaminado con aflatoxinas aún es considerado un problema económicamente importante en el sector avícola. Además, el consumo prolongado de la AFB<sub>1</sub> se refleja en la calidad de producción de alimentos como el huevo y carne, lo que

conlleva a un peligro potencial en el sector salud (Lizárraga-Paulín et al., 2011; Vila-Donat et al., 2018).

Debido a estos problemas mundiales, un gran número de organizaciones, instituciones, productores e investigadores se han propuesto en desarrollar diversas estrategias, prácticas de prevención y descontaminación para reducir los riesgos ocasionados por las aflatoxinas en los alimentos.

## 2.6 Estrategias de descontaminación de las aflatoxinas

Existen múltiples orígenes para la presentación de una contaminación por hongos, por lo que los métodos para el control a la exposición de hongos y micotoxinas son principalmente preventivos, y de un carácter integral a lo largo de toda la cadena de producción de alimentos (planta, crecimiento, cosecha, almacenamiento y distribución) (Vila-Donat et al., 2018). Sin embargo, estos métodos no son suficientes, por lo que se requieren de otras estrategias para descontaminar o desintoxicar alimentos contaminados por micotoxinas (Jard et al., 2011).

El Codex Alimentarius ha desarrollado varios códigos de prácticas para la prevención y reducción de las micotoxinas, las cuales se dividen en dos: prácticas recomendadas basadas en Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), y el uso de Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos (HACCP) (Vila-Donat et al., 2018).

Las estrategias de control y prevención de micotoxinas incluyen las estrategias realizadas en la precosecha y la poscosecha, además de los métodos físicos, químicos y biológicos (Huwig et al., 2001; Ringot et al., 2007; Jard et al., 2011).

Las estrategias de precosecha incluyen el uso de plaguicidas, rotación de cultivos, riego, tiempo de plantación, etapa fisiológica de la planta, selección de semillas de alta calidad, uso de semillas genéticamente modificadas que son tolerantes a infección por *Aspergillus* y estresores ambientales (Rushing y Selim, 2019; Ndagijimana et al., 2020). Se ha demostrado que la presencia y el crecimiento de *Aspergillus* puede minimizarse a través de buenas prácticas agrícolas como el adecuado riego y manejo de plagas. El control de la contaminación en cultivos mediante el uso de agentes biológicos, hoy en día es lo más apropiado para evitar el uso de fungicidas, plaguicidas e insecticidas y así evitar intoxicaciones químicas en los individuos (Lizárraga-Paulín et al., 2011).

Las estrategias poscosecha incluyen el buen manejo en el almacenamiento, secado, distribución, control de la humedad, temperatura, cantidad de granos almacenados y el empleo de los métodos físicos, químicos y biológicos (Vila-Donat et al., 2018; Ndagijimana et al., 2020). Si se logra el secado adecuado de los cultivos antes de su almacenaje, se

puede evitar la producción de las aflatoxinas; la clasificación y eliminación de granos mohosos o dañados visiblemente antes de ser almacenados, también es una estrategia efectiva para minimizar la producción de aflatoxinas (Lizárraga-Paulín et al., 2011).

Cuando no se logra la prevención a nivel de campo o durante la cosecha, se necesitan emplear procedimientos de descontaminación de micotoxinas mediante métodos físicos, químicos o biológicos, aunque en algunos métodos utilizan combinaciones de los distintos principios de acción (Kolossova y Stroka, 2011; Prado-Rodríguez, 2018). La destoxificación se define como el conjunto de tratamientos poscosecha dirigidos a eliminar o minimizar los efectos tóxicos de las micotoxinas en los animales (Denli y Pérez, 2006). Las características de un método de destoxificación ideal son: fáciles de usar, económico, no formar compuestos tóxicos, no alterar las propiedades nutricionales ni organolépticas de los alimentos, ser efectivo para eliminar, destruir e inactivar diversas micotoxinas (Viveros-Rivera, 2010; Miranda et al., 2013). Diversos métodos biológicos, químicos y físicos han sido efectivos para destruir o inactivar varias micotoxinas a la vez, pero no cumplen con los demás requisitos igualmente importantes (Díaz, 2008).

### **Métodos biológicos**

Los procedimientos biológicos son los que principalmente implican la degradación de la aflatoxina por medio de microorganismos (Díaz, 2008). El uso de este método tiene diversas ventajas en comparación con los métodos no biológicos; sin embargo, las principales desventajas en el uso de microorganismos, es la utilización de los nutrientes de los alimentos para su propio crecimiento (Vijayanandraj et al., 2014; Ndagijimana et al., 2020). Algunos autores clasifican a los métodos biológicos en: enzimas biotransformadoras, plantas modificadas genéticamente, y el uso de agentes biológicos de control (Miranda et al., 2013; Vila-Donat et al., 2018). En este método se han utilizado bacterias, hongos, levaduras y extractos de plantas (Ndagijimana et al., 2020).

Una de las estrategias es inocular los sustratos alimenticios con cepas de bacterias que reduzcan la AFB<sub>1</sub> a través de su metabolismo (Rushing y Selim, 2019; Ndagijimana et al., 2020). Algunos investigadores han experimentado con varios géneros de bacterias como *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Flavobacterium aurantiacum*, *Cellulosimicrobium* (Rushing y Selim, 2019).

A pesar de que los hongos son productores de micotoxinas, hay algunas cepas de hongos que tienen la capacidad de degradar la AFB<sub>1</sub> como *Aspergillus niger*, *Saccharomyces*, *Eurotium herbariorum*, *Rhizopus sp.* (Ndagijimana et al., 2020).

Numerosos extractos de plantas (*Adhatoda vasica* Ness, *Corymbia citriodora*, *Passiflora alata*, *Psidium cattleianum*, *Rosmarinus officinails*, *Origanum vulgare*, *Citrus limon*, *Trachyspermum ammi*, *Allium sativum* L. x *Allium cepa* L.) (Hajare et al., 2005; Sandoskumar et al., 2007; Bejarano-Rodríguez y Centeno-Briceño, 2009; Brinda et al., 2013; Vijayanandraj et al., 2014; Ponzilacqua et al., 2019; Ndagijimana et al., 2020) se han utilizado para degradar AFB<sub>1</sub>, este tipo de estrategias han demostrado una buena eficacia en la descontaminación de aflatoxinas; sin embargo, el tiempo para la descontaminación es prolongado (uno a tres días) (Ndagijimana et al., 2020).

La capacidad de degradación de las enzimas también se ha estudiado exhaustivamente, se ha demostrado que éstas tienen la capacidad de modificar a la micotoxina en compuestos derivados menos tóxicos (Miranda et al., 2013). Sin embargo, al igual que los extractos de plantas, se emplean en técnicas de tiempo prolongado y en algunos casos no se ha demostrado claramente su efectividad (Rushing y Selim, 2019; Ndagijimana et al., 2020).

Recientemente se ha investigado la tecnología del plasma frío inducido por microondas, la cual se basa en la ionización de un gas a presión atmosférica para la eliminación o degradación de AFB<sub>1</sub>, según Park et al. (2007) este sistema tiene características ventajosas para eliminar o inactivar materiales peligrosos en un tiempo corto (5 s) (Park et al., 2007; Ndagijimana et al., 2020).

### **Métodos químicos**

Los procedimientos químicos incluyen el tratamiento con soluciones ácido/base, uso de sustancias como amoniaco, ozonización y aditivos como el bisulfito de sodio (Diaz, 2008). Los alimentos contaminados con AFB<sub>1</sub> también pueden ser descontaminados usando métodos químicos, los cuales se han convertido en unas de las estrategias más populares ya que son estudiados y evaluados por la bondad de cambiar las estructuras moleculares de las micotoxinas; sin embargo, en la mayoría de los casos, no necesariamente se reduce su toxicidad (He et al., 2010; Ndagijimana et al., 2020). Los productos químicos incluyen compuestos oxidantes como el peróxido de hidrógeno, compuestos reductores, compuestos ácidos como el ácido clorhídrico, láctico, cítrico, fórmico y propiónico, compuestos alcalinos como el amonio y el hidróxido de sodio y calcio, sales inorgánicas y la cloración. Se ha reportado que estos agentes químicos son poco eficaces, además disminuyen el valor nutricional o la palatabilidad del alimento (Viveros-Rivera, 2010; Kolosova y Stroka, 2011; Ndagijimana et al., 2020).

Algunas micotoxinas se destruyen con hidróxido de calcio, monoetilamina, ozono o amoníaco (Vila-Donat et al., 2018). El amoníaco se usa para la descontaminación de aflatoxinas en varios países (Vila-Donat et al., 2018; Rushing y Selim, 2019), y el costo promedio varía de 5% a 20% del valor del producto agrícola (Huwig et al., 2001). Este método requiere un ambiente alcalino y temperatura ambiente, el tiempo en que se lleva a cabo puede ser desde las 24 h hasta los 15 días, y el grado de descontaminación es alto (99%). Sin embargo, la infraestructura que se requiere para realizar la amoniólisis y los efectos negativos en la salud de los animales por exceso residual de amoníaco en las dietas, ha impedido el uso de esta técnica mundialmente (Vila-Donat et al., 2018; Rushing y Selim, 2019).

La acidificación de alimentos contaminados con AFB<sub>1</sub> ha sido efectiva cuando se utilizan ácido cítrico, láctico, tartárico y ácido clorhídrico; sin embargo, cuando se usan ácidos como el succínico, acético, ascórbico y fórmico, el éxito de descontaminación ha sido mínima (Rushing y Selim, 2019). Este método consiste en remojar los alimentos contaminados en soluciones de ácido por un periodo de tiempo determinado. Unas de las ventajas de este método es que es sencillo de realizar y no requiere un equipo especial o habilidades específicas (Rushing y Selim, 2019).

La ozonización es otro método que se utiliza comúnmente para la descontaminación de la AFB<sub>1</sub> (Jouany, 2007). El ozono reacciona con el doble enlace 8,9 del anillo furano de la AFB<sub>1</sub>, dando como resultado la formación de ozónidos primarios (Miranda et al., 2013). Esta técnica requiere una concentración de 6 a 90 mg/L y se lleva a cabo en tiempos relativamente cortos (desde los 20 min hasta los 180 min) (Rushing y Selim, 2019).

El tratamiento de agua oxidante electrolizada (EOW), es una técnica que se ha desarrollado recientemente para descontaminar alimentos con AFB<sub>1</sub> debido a su actividad biocida y a sus propiedades fisicoquímicas: pH, potencial de oxidación-reducción (ORP) y concentración de cloro disponible (ACC) (Gómez-Espinosa et al., 2017; Ndagijimana et al., 2020). El EOW contiene muchos grupos OH que juegan un papel importante para reducir AFB<sub>1</sub> (Ndagijimana et al., 2020). El EOW se produce por la electrólisis de agua pura combinada con cloruro de sodio en un aparato de electrólisis. Durante la electrólisis, se genera agua electrolizada neutra (NEW) la cual no es tóxica, ni corrosiva, y es segura por sus propiedades fisicoquímicas, al tener la capacidad de revertirse cuando se diluye con agua del grifo (Gómez-Espinosa et al., 2017). Gómez-Espinoza et al. (2017), reportaron que los grupos -Cl y -OH del HOCl se agregaron a los C8 y C9 del anillo de furano terminal de la AFB<sub>1</sub> dando como resultado 8-cloro-9-hidroxi-aflatoxina B<sub>1</sub>, lo cual reduce significativamente la citotoxicidad y genotoxicidad en los animales (Gómez-Espinosa et al., 2017). La desventaja de este método es que el agua electrolizada pierde rápidamente su actividad cuando entra en contacto con materia orgánica (Gómez-Espinosa et al., 2017).

Estos métodos químicos han tenido éxito de moderado a alto; sin embargo, si se combinan, los niveles de descontaminación pueden llegar a ser más altos, ya sea reduciendo el tiempo en el que se llevan a cabo o aumentando el porcentaje de descontaminación de AFB<sub>1</sub> (Rushing y Selim, 2019).

### **Métodos físicos**

La mayoría de los métodos físicos tienen una eficacia variable y depende del nivel de contaminación y distribución de micotoxinas en los granos (Kolossova y Stroka, 2011; Prado-Rodríguez, 2018). Además, algunos de los métodos físicos son costosos, pueden provocar grandes pérdidas del producto, y eliminan o destruyen nutrientes esenciales del alimento (Kolossova y Stroka, 2011).

Los procedimientos físicos principalmente se basan en la eliminación de los productos contaminados o por la inactivación de las micotoxinas los cuales incluyen la clasificación mecánica, la separación, la segregación por densidad, el lavado, el pulido, la flotación, la molienda, la extracción con disolventes, la suplementación de agentes adsorbentes, la inactivación térmica, el autoclave, la extrusión, la irradiación, el tratamiento con ultrasonido, el tostado y el uso de microondas (Díaz, 2008; Kolossova y Stroka, 2011).

El tratamiento térmico puede llegar a obtener resultados positivos y las ventajas de este método son que es económico, rápido (2 h o menos) y fácil de realizar (Rushing y Selim, 2019; Ndagijimana et al., 2020). Sin embargo, las micotoxinas son suficientemente resistentes al calor en un rango de temperatura de procesamientos convencionales (80-121°C), especialmente la AFB<sub>1</sub>, por lo que este método no es lo suficientemente efectivo para la descontaminación de AFB<sub>1</sub>. La sensibilidad de la micotoxina al tratamiento térmico se ve afectada por la humedad, el pH y la fuerza iónica de los alimentos. Además, si los tiempos de procesamiento son mayores, pueden llegar a afectar la calidad del alimento, aunque los resultados sean más efectivos (Viveros-Rivera, 2010; Kolossova y Stroka, 2011; Ndagijimana et al., 2020). Se ha reportado que la cocción a presión reduce mayoritariamente la contaminación por aflatoxinas en el alimento en comparación con otros métodos térmicos. Asimismo, la presencia de sales aumenta la degradación de las aflatoxinas por calor; y se ha sugerido que el agua favorece que se abra el anillo de lactona de la AFB<sub>1</sub> para así formar un ácido carboxílico terminal, el cual se somete a descarboxilación por calor (Kolossova y Stroka, 2011).

La molienda no tiene efecto directo sobre la eliminación de las micotoxinas en los granos, esta estrategia está encaminada para cambiar la distribución de toxinas entre las

diferentes fracciones resultantes. En experimentos realizados para saber el destino de las aflatoxinas en los productos molidos secos, las fracciones con aflatoxina dependen de la penetración del hongo en el endospermo del grano, por lo que en productos donde la distribución de aflatoxinas está en la superficie del grano, el nivel más bajo de aflatoxina se encuentra en la harina y el mayor nivel se encuentra en germen y salvado (Kolossova y Stroka, 2011).

La aplicación de los métodos físicos simultáneamente como la clasificación, el lavado, la molienda y el descascarado de los granos, fueron efectivos para una descontaminación significativa de aflatoxinas (Zain, 2011). Es de importancia señalar que la eficacia de estos métodos depende de muchos factores como la humedad, el nivel de contaminación, la distribución de la micotoxina y la presencia de aditivos en el alimento (Rios et al., 2009; Kolossova y Stroka, 2011).

La autoclave puede reducir la presencia de AFB<sub>1</sub> en un 29% a 95% a 120°C durante 30 a 240 minutos en productos como harina de maíz, harina de cacahuate, arroz, frutas y especias (Gimeno y Martins, 2011).

La extracción con disolventes (etanol al 95%, acetona acuosa al 90%, isopropanol al 80%, hexano-metanol, metanol-agua, acetonitrilo-agua, hexano-etanol-agua, acetona-hexano-agua) tiene la capacidad de remover trazas de aflatoxinas; sin embargo, su aplicación a gran escala es limitada por los costos altos y por la disposición de los residuos tóxicos (Miranda et al., 2013).

Las microondas y la cocción por extrusión tienen la capacidad de reducir la cantidad de micotoxinas en el alimento. Durante la extrusión, la reducción de micotoxinas depende de la temperatura, la humedad y el tiempo; a temperaturas superiores a 150°C la reducción de aflatoxinas es moderada, en comparación con zearalenona y fumonisina, ya que su reducción es mayor. En un estudio se observó una reducción mayor de aflatoxinas en presencia de nucleófilos como amoníaco, metilamina y lisina, aunque esta estrategia ya es meramente fisicoquímica (Kolossova y Stroka, 2011).

La irradiación gamma ( $\gamma$ ) es un método común para descontaminar alimento para animales (Ndagijimana et al., 2020). Consiste en irradiar productos alimenticios con una fuente de rayos gamma (<sup>60</sup>Co), esta técnica mostró una efectividad de reducción del 65% (Kolossova y Stroka, 2011; Ndagijimana et al., 2020). La presencia del agua en la radiación gamma para la degradación de aflatoxinas juega un papel importante, ya que la radiólisis que sufre el agua da como resultado la formación de radicales libres altamente reactivos, los cuales interactúan con el anillo terminal de furano de la AFB<sub>1</sub> generando compuestos de baja actividad biológica (Kolossova y Stroka, 2011; Miranda et al., 2013). Las aflatoxinas



también son sensibles a la radiación UV, lo cual puede llevar a la formación de productos menos tóxicos (Kolossova y Stroka, 2011).

Investigadores realizaron un estudio usando dióxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ) por el cual la fotocatálisis de  $\text{AFB}_1$  (aproximadamente 99.4%) fue eliminado en 4 minutos de irradiación. Esta técnica se considera favorable en comparación con la radiación gamma, ya que no causa cambios en los nutrientes (Ndagijimana et al., 2020).

La tecnología de luz pulsada también se ha estudiado para la reducción de  $\text{AFB}_1$  en los alimentos, los resultados obtenidos han demostrado que esta técnica es poderosa para la degradación de micotoxinas (98 %) a través de ocho destellos de luz pulsada (Moreau et al., 2013; Ndagijimana et al., 2020).

### **Agentes desintoxicantes**

Actualmente, los esfuerzos mayores se han dirigido a eliminar o reducir el efecto de las micotoxinas mediante el uso de diferentes productos que pueden suprimir o reducir la absorción, promover la excreción o modificar el modo de acción de las micotoxinas, estas sustancias han sido reconocidas por la Comisión Europea (EC) como agentes desintoxicantes (Denli y Pérez, 2006; Vila-Donat et al., 2018).

Los aditivos han sido el método de elección para la protección de los animales (principalmente cerdos, aves, y ganado) frente al consumo de ingredientes contaminados, para reducir la absorción de micotoxinas en el tracto gastrointestinal y su posterior distribución en sangre y órganos diana (Vijayanandraj et al., 2014; Vila-Donat et al., 2018). Según su modo de acción, actúan mediante la unión de micotoxinas con su superficie (adsorción) o mediante la degradación o transformación de las micotoxinas en metabolitos menos tóxicos (biotransformación). Dichos agentes desintoxicantes se dividen en agentes adsorbentes y agentes biotransformadores, los agentes adsorbentes se dividen en adsorbentes orgánicos y adsorbentes inorgánicos (Vila-Donat et al., 2018).

### 2.6.1 Agentes adsorbentes de aflatoxinas

Desde 1990, se han realizado estudios basados en el uso de adsorbentes, ya que es uno de los métodos más prácticos para la descontaminación de aflatoxinas dentro de la industria animal (Magnoli et al., 2011; Vijayanandraj et al., 2014).

Los adsorbentes de micotoxinas son compuestos de gran peso molecular que tienen la capacidad de unirse a las micotoxinas, y su modo de acción se basa en prevenir la absorción de la AFB<sub>1</sub> presente en el alimento al no disociarse en el tracto gastrointestinal (TGI) del animal después de su ingestión, limitando su biodisponibilidad para así disminuir la exposición a la AFB<sub>1</sub> y prevenir sus efectos hepatotóxicos (Vila-Donat et al., 2018; Rushing y Selim, 2019).

Los adsorbentes unen a las micotoxinas por diferentes mecanismos que pueden estar involucrados en el mismo proceso de adsorción que incluyen: puentes de hidrógeno, unión hidrofóbica, atracción electrostática, intercambio iónico, complejación, quelación y precipitación, los cuales llevan a la inmovilización de las moléculas de micotoxinas (Ringot et al., 2007; Di Gregorio et al., 2014; Vila-Donat et al., 2018).

La adsorción física o fisorción, normalmente es un fenómeno reversible, como lo son las interacciones de Van der Waals, y las interacciones de atracción electrostática las cuales incluyen las interacciones de polarización; estas interacciones son importantes en el caso de adsorbentes que tienen una estructura iónica (zeolitas) (Di Gregorio et al., 2014). La unión hidrofóbica es un proceso complejo que involucra más de un tipo de enlace, pero la característica más importante es el equilibrio lipofílico-hidrofílico y permite la predicción cuantitativa y cualitativa (Boudergue et al., 2009). La unión electrostática es un proceso en el que la característica que domina es la atracción electrostática entre una molécula ionizada y un adsorbente (Boudergue et al., 2009). Ya sea unión electrostática o unión hidrofóbica, pueden verse afectados por el pH: si la molécula y el adsorbente son aniónicos por encima de cierto pH, la repulsión electrostática evitará la unión hidrofóbica, la cual sería posible a un pH más bajo (Di Gregorio et al., 2014).

En la adsorción química o quimisorción, existe un intercambio de electrones entre el adsorbente y el adsorbato, formando una sola capa sobre una superficie sólida de manera irreversible, lo que implica una considerable cantidad de energía (Di Gregorio et al., 2014)

Las interacciones fisicoquímicas entre la superficie del adsorbente y la toxina como la adsorción física, intercambio iónico y complejación, no dependen del metabolismo. Algunos adsorbentes están compuestos principalmente por polisacáridos, proteínas, lípidos, y diversos grupos funcionales como los grupos carboxilo, hidroxilo, fosfato y

amino, así como sitios de adsorción hidrofóbica como cadenas de carbono alifáticas y anillos aromáticos. Estos fenómenos fisicoquímicos son rápidos y pueden ser reversibles (Ringot et al., 2007). Es así como se forma un complejo estable micotoxina-adsorbente, aún en pH variable a través de todo el tracto gastrointestinal del animal hasta ser eliminado en las heces. La estabilidad del complejo está influenciada por las propiedades físicas del adsorbente: carga total y distribución de carga, el tamaño de los poros y la superficie de área accesible, y las propiedades fisicoquímicas de las toxinas: polaridad, solubilidad, peso molecular, y forma; en el caso de compuestos ionizados también es importante la distribución de carga y las constantes de disociación (Vila-Donat et al., 2018; Ringot et al., 2007).

La EC establece que cualquier persona o empresa que solicite una autorización de un aditivo para raciones o un aditivo alimentario, debe presentar la solicitud ante la EC para reenviarla a la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) para que realice una evaluación del expediente (Di Gregorio et al., 2014). Los criterios más comunes a considerar para la evaluación incluyen la estabilidad del enlace adsorbente-toxina, su efectividad en un amplio rango de pH (ya que se espera que funcione a lo largo de todo el TGI), realizar ensayos *in vivo* para demostrar la eficiencia de los agentes desintoxicantes de micotoxinas, considerando que existen variaciones entre las diferentes especies (Di Gregorio et al., 2014).

### **2.6.1.1 Adsorbentes inorgánicos de aflatoxinas**

#### **Aluminosilicatos**

Los aluminosilicatos son el grupo más abundante de minerales formadores de rocas. La estructura molecular de los aluminosilicatos consiste en la combinación de láminas tetraédricas de sílice y láminas octaédricas de aluminio, ambas estructuras unidas mediante grupos de oxígeno e hidroxilo (Di Gregorio et al., 2014; Vila-Donat et al., 2018). Este tipo de arcillas son altamente sensibles a presentar sustituciones isomórficas en las láminas, generando cargas negativas, por lo tanto, las esmectitas tienen una carga negativa alta y un elevado grado de expansión (Treviño-Espinosa, 2019).

El grupo de los aluminosilicatos se divide en dos: los filosilicatos (bentonitas, montmorillonitas, esmectitas, caolinitas e illitas) y los tectosilicatos (zeolitas). Los filosilicatos adsorben en su superficie o dentro de su espacio laminar y los tectosilicatos proveen una larga y específica unión y son adecuados para la distinción de diferentes

moléculas por tamaño, selectividad de forma y carga (Huwig et al., 2001; Vila-Donat et al., 2018). Los filosilicatos se caracterizan por una estructura cristalina en forma de lámina con, una fórmula química en común  $\text{Si}_2\text{O}_5^{2-}$ . Los tectosilicatos incluyen aluminosilicatos hidratados con estructura tridimensional, que consiste en tetraedros de  $\text{SiO}_4$  y  $\text{AlO}_4$  (Wielogórska et al., 2016).

Se ha reportado que las arcillas también son capaces de adsorber micronutrientes de la dieta animal y tienen efectos negativos en la disponibilidad de minerales y oligoelementos. Además, existe el riesgo de que las arcillas naturales se contaminen con dioxinas y metales pesados (Vila-Donat et al., 2018).

### **Aluminosilicatos de calcio y sodio hidratado (HSCAS)**

Los HSCAS son investigados ampliamente debido a que forman un complejo estable con la  $\text{AFB}_1$ . Se ha reportado que en agua a pH 2, 7 y 10 y a una temperatura de 25 y 37°C, el porcentaje de adsorción de  $\text{AFB}_1$  es del 80% (Boudergue et al., 2009).

Los HSCAS contienen iones de calcio y protones que se intercambian contra los iones de sodio naturales (Kolossova y Stroka, 2011). Diversos estudios determinaron que la unión de aflatoxinas y HSCAS se atribuye a la quimisorción de aflatoxinas en la región interlamelar de los HSCAS dando como resultado una mejor adsorción, mientras que en las superficies exteriores se dio una menor adsorción de  $\text{AFB}_1$  (Boudergue et al., 2009; Vila-Donat et al., 2018). Además, se ha sugerido un mecanismo de aceptación de electrones donantes (compartir electrones de la superficie negativa de la arcilla con la molécula adsorbida). El sistema dicarbonilo de la aflatoxina es parcialmente positivo y se ha reportado que es esencial para la adsorción (Kolossova y Stroka, 2011).

Se ha reportado que el uso de HSCAS, a un nivel de adición de 0.5% – 2% en el alimento de los animales, disminuyó significativamente los efectos adversos de las aflatoxinas. La dosis que se recomienda para antiaglomerar es de 0.5%, y simultáneamente se demostró que dicha dosis tuvo alta eficacia en la protección de pollos que consumieron niveles de aflatoxinas de 7.5 mg/kg (Kolossova y Stroka, 2011). Otro estudio con corderos, indicó que la inclusión de HSCAS al 0.5%, no influyó en la ingesta de materia seca, aumento de peso corporal, utilización de materia seca o calcio, fósforo y magnesio; sin embargo, la adsorción intestinal de elementos traza como Cu, Zn, Fe y Mn, fueron reducidos significativamente. Por lo que se sugiere la suplementación de dichos minerales cuando se utilicen los HSCAS (Gowda et al., 2007).

### **Arcillas de esmectita (montmorillonitas/bentonitas)**

Se les llama como esmectitas porque es la arcilla mineral dominante, la esmectita incluye montmorillonitas principalmente. La estructura de la montmorillonita está compuesta principalmente por filosilicato en capas de aluminio octaédrico y silicio tetraédrico coordinado con átomos de oxígeno. La efectividad de la adsorción de la bentonita depende del contenido de montmorillonita y de los cationes intercambiables. Las bentonitas son arcillas de filosilicatos que consisten principalmente en montmorillonita, poseen una microestructura cristalina en capas de composición variable (Vila-Donat et al., 2018).

Se han estudiado las interacciones estructurales que existen entre las arcillas y las aflatoxinas; y se ha demostrado que el tamaño de partícula y la composición estructural de las esmectitas influyen en su efectividad como agentes aglutinantes de aflatoxinas (Kolossova y Stroka, 2011).

Diversos estudios sugirieron que la interacción de la montmorillonita-aflatoxina es por la presencia de una superficie adsorbente heterogénea, o la coexistencia de diferentes mecanismos de adsorción, o ambos simultáneamente (Kolossova y Stroka, 2011). Se ha sugerido que el mecanismo de adsorción de las bentonitas depende principalmente de los cationes intercambiables ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) presentes entre sus capas (Galvano et al., 2001).

Los mecanismos de adsorción de aflatoxinas de las esmectitas, influyen si las condiciones son secas o húmedas; en condiciones secas, las aflatoxinas se unen a la esmectita mediante un ión-dipolo y por coordinación entre cationes intercambiables y grupos carbonilo, mientras que, en condiciones húmedas, las aflatoxinas se unen a las esmectitas por enlaces de H entre los oxígenos del carbonilo (Vila-Donat et al., 2018).

### **Tectosilicatos (zeolitas y clinoptilolitas)**

Las zeolitas son aluminosilicatos cristalinos microporosos y su estructura se basa en un conjunto de tetraedros de  $\text{SiO}_4$  y  $\text{AlO}_4$  unidos a través de átomos de oxígeno compartidos para formar una red tridimensional infinita (Sánchez et al., 2012; Wielogórska et al., 2016; Vila-Donat et al., 2018). Las zeolitas tienen una gran superficie interna, asociada con su elevada capacidad de intercambio catiónico y con la adsorción de moléculas polares (Di Gregorio et al., 2014).

Su uso se destaca como aditivo en la alimentación animal, aunque también se utilizan como adsorbentes de micotoxinas, donde comúnmente se utilizan zeolitas naturales, principalmente la clinoptilolita (Sánchez et al., 2012). Si el tamaño de los poros de las zeolitas es compatible con la micotoxina, la adsorción puede ocurrir; sin embargo, la adsorción puede ser baja o nula debido a la ausencia de poros de tamaño intermedio (Galvano et al., 2001).

Estudios realizados en pollos de engorde, reportaron que el consumo de una dieta contaminada con AFB<sub>1</sub> a 2.5 µg/kg más la adición de una zeolita natural al 1%, redujo la depresión de crecimiento de los pollos y el aumento de la concentración de lípidos en el hígado; sin embargo, la zeolita disminuyó las concentraciones séricas del fósforo y cloruro (Boudergue et al., 2009). Un grupo de investigadores realizaron un estudio en donde compararon la eficacia de utilizar HSCAS o clinoptilolita. En el estudio *in vitro*, reportaron que la clinoptilolita podía unirse a la AFB<sub>1</sub> 50% menos que los HSCAS, al realizar el estudio *in vivo* en ratas, se confirmaron los resultados *in vitro*, afirmando que la clinoptilolita tiene una baja eficiencia en adsorber AFB<sub>1</sub>, inclusive ésta resultó tóxica para los animales (Boudergue et al., 2009). Las zeolitas son sensibles al pH, por debajo de pH 4 son parcialmente hidrolizadas y su estructura cristalina se destruye (Mézes et al., 2010).

### 2.6.1.2 Adsorbentes orgánicos de aflatoxinas

A lo largo de los años, se han llevado a cabo diversos estudios de adsorbentes inorgánicos para comprobar su eficacia para adsorber micotoxinas; sin embargo, muchos de estos adsorbentes inorgánicos tienen algunas desventajas, ya que además de adsorber aflatoxinas, simultáneamente adsorben indiscriminadamente micronutrientes de la dieta y presentan la posibilidad de liberar componentes tóxicos, como ciertos metales pesados o dioxinas (Zavala-Franco et al., 2018). Es por esto que, en los últimos años se ha mostrado un gran interés en el estudio de los adsorbentes orgánicos de micotoxinas, ya que se han caracterizado por ser seguros, rentables y efectivos. Existen numerosos adsorbentes orgánicos (fibras de plantas, extractos de paredes celulares de levadura y bacterias) que han sido prometedores en su eficacia de adsorción de aflatoxinas (*in vitro* e *in vivo*), aunque pocos han sido investigados de manera *in vivo* (Bueno et al., 2001).

## **Pared celular de *Saccharomyces cerevisiae***

Dentro de las especies de hongos, se encuentran las levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* que han sido utilizadas para realizar procesos de fermentación por las industrias de producción de pan y de bebidas alcohólicas (Vargas y Ramírez, 2016). Actualmente, las paredes celulares (YCW), que son compuestos obtenidos a partir de la autólisis de la célula completa de la levadura *S. cerevisiae*, han sido utilizadas en el área de alimentación animal como parte de la suplementación alimenticia ya que mejoran los parámetros productivos de los animales (Verduzco et al., 2009; Vargas y Ramírez, 2016).

Los componentes principales de YCW son carbohidratos, pertenecientes al grupo de oligosacáridos que están presentes en un 85-90 % y son principalmente  $\beta$ -glucanos y mananooligosacáridos (MOS), mientras que el 10-15 % restante son proteínas (Verduzco et al., 2009; Mendieta et al., 2017). El 30-50 % corresponde a 1,3-  $\beta$ - glucanos, el 5-10 % corresponde a 1,6-  $\beta$ -glucanos, el 30-50 % corresponde a mananoproteínas, y el 1.5-6 % corresponde a quitina (Mendieta et al., 2017).

Las YCW tienen diversos mecanismos de unión con las aflatoxinas como enlaces de hidrógeno, interacciones iónicas e hidrofóbicas (Vila-Donat et al., 2018). Se ha sugerido que la estructura tridimensional de las YCW, que consiste principalmente en oligosacáridos, es capaz de reaccionar con las aflatoxinas (Mendieta et al., 2017).

En la industria avícola, los  $\beta$ -glucanos son utilizados como inmunoestimulantes (Adams, 2004). Además, diversos estudios han reportado la capacidad de los mananooligosacáridos para adsorber AFB<sub>1</sub> (Verduzco et al., 2009). De acuerdo con un estudio realizado con pollos de engorde alimentados con una dieta contaminada con AFB<sub>1</sub> a 5 ppm y la adición de YCW a 0.1 % y 0.5 %, se demostró que los efectos negativos de la AFB<sub>1</sub> en los pollos, se lograron minimizar significativamente (Boudergue et al., 2009).

## **Carbón activado**

El carbón activado es un polvo no soluble y es formado por la pirólisis de materiales orgánicos (Jard et al., 2011). Su capacidad de adsorción está determinada por su área superficial, su distribución del tamaño del poro y su materia prima (Vila-Donat et al., 2018). El carbón activado no adsorbe únicamente a las micotoxinas, simultáneamente adsorbe nutrientes esenciales (vitaminas y minerales) (Huwig et al., 2001). Existe evidencia de la alta capacidad de adsorción que tiene el carbón activado en estudios *in*

*vitro* para AFB<sub>1</sub> (Galvano et al., 2001). Sin embargo, diversos investigadores han realizado estudios *in vivo* para conocer la capacidad de adsorción del carbón activado con las aflatoxinas; los resultados han sido variables, por lo que se infiere que su fuente, el nivel de inclusión, y el tamaño del poro pueden influir en su efectividad en los estudios *in vivo* (Kolossova y Stroka, 2011).

### **Ácidos húmicos**

Los ácidos húmicos son compuestos químicos ubicuos que se derivan de la materia orgánica del suelo o humus, que se forma mediante la descomposición de las plantas y el material animal (Van Rensburg et al., 2006; Ghahri et al., 2010).

Investigadores han demostrado que los ácidos húmicos tienen afinidad para unirse a varios compuestos, entre ellos las aflatoxinas (Ghahri et al., 2010). Una categoría de ácidos húmicos son los oxihumatos, los cuales son formados desde carbón bituminoso al revertir el proceso por el cual se formó el carbón (Van Rensburg et al., 2006).

Un grupo de investigadores realizó estudios *in vivo* e *in vitro* para comprobar la eficacia del oxihumato como adsorbente de aflatoxinas. El experimento *in vitro* indicó que el oxihumato tiene un alto potencial para adsorber AFB<sub>1</sub> a diferentes valores de pH. Asimismo, el estudio *in vivo* se realizó con pollos de engorde, el cual demostró que el oxihumato tuvo la capacidad de proteger a los pollos de los efectos adversos de las aflatoxinas (Boudergue et al., 2009).

Además, se han obtenido hallazgos de estudios *in vitro* de ácidos húmicos procedentes de la descomposición natural de materiales orgánicos vegetales, los cuales también tienen la capacidad de adsorber AFB<sub>1</sub> (Vila-Donat et al., 2018).

### **Fibras micronizadas y bioadsorbentes**

La tecnología de la bioadsorción se ha considerado como una alternativa óptima, caracterizada por una alta eficiencia, bajos costos y el uso de niveles mínimos de inclusión. Además, evita la reducción del valor nutricional de las dietas contaminadas y promueve el tratamiento sostenible de las plantas, las cuales generalmente son considerados como desecho.



Los biomateriales de desecho como la paja, cáscaras de nueces, avellanas, almendras y coco, semillas y pulpa de frutas, olotes de maíz, guisantes, etc., y las fibras micronizadas que se pueden obtener de diversos materiales vegetales como el trigo, la cebada, la alfalfa, la avena, las cáscaras de guisantes, etc., están conformados principalmente de celulosa, lignina, hemicelulosa, pectina, lípidos, entre otros compuestos que son ricos en diferentes grupos funcionales responsables de la unión con los contaminantes (Bočarov-Stančić et al., 2018; Vila-Donat et al., 2018).

Además, los componentes vegetales de las plantas también incluyen los fenólicos, flavonoides, cumarinas, clorofila y sus derivados como la clorofilina. Todos estos tienen propiedades quimioprotectoras contra compuestos cancerígenos como la AFB<sub>1</sub> (Boudergue et al., 2009).

La clorofila (pigmento vegetal) y su derivado soluble en agua, la clorofilina (la cual es una mezcla semisintética de sales de sodio y cobre), se han estudiado ampliamente como antígenotóxicos, antioxidantes, y anticancerígenos (Jubert et al., 2009; Nagini et al., 2015).

La clorofila posee 4 anillos de nitrógeno de pirrol unidos a un átomo central de magnesio y un quinto anillo que contiene átomos de carbono y una cadena larga de fitol, la cual le confiere hidrofobicidad y limita la eficacia de unión con carcinógenos y mutágenos. Lo que diferencia a la clorofilina de la clorofila es el reemplazo de los iones de magnesio por cobre, grupos de metil y fitil éster por sodio y potasio, y la ausencia de la cadena de fitol (Nagini et al., 2015).

Se conoce que el efecto antígenotóxico de la clorofilina está mediado por el anillo de porfirina, ya sea eliminando radicales libres o formando complejos estables con carcinógenos como la AFB<sub>1</sub>, bloqueando así su disponibilidad, impidiendo su adsorción y mejorando su eliminación en las heces, lo cual conduce a una reducción del daño al ADN (Nagini et al., 2015).

En comparación con la clorofilina, la clorofila ha sido menos estudiada; sin embargo, algunos autores han demostrado los efectos positivos de la clorofila los cuales incluyen propiedades quimiopreventivas, antimutágenas, inducen la producción de enzimas detoxificantes de la fase II y reducen la biodisponibilidad de AFB<sub>1</sub> (Simonich et al., 2007).

Diversos estudios han observado el efecto de la clorofila y la clorofilina en presencia de aflatoxinas y los resultados de protección de dichos compuestos han sido similares (Simonich et al., 2007).

Un grupo de investigadores, realizó un estudio *in vitro* en células Caco-2 (una línea de células inmortalizadas de adenocarcinoma colorrectal humano) para evaluar el efecto de la clorofila en el transporte intestinal; añadiendo 1 mg/ml de clorofila a 50 ng/ml de

aflatoxinas en el modelo celular. Los autores observaron una disminución considerable del transporte intestinal de las aflatoxinas, lo que concluyó que la clorofila es un buen adsorbente de aflatoxinas (Lin et al., 2019). Es por eso, que ciertos investigadores han concluido que el consumo de vegetales de hoja verde, reduce sustancialmente la adsorción de las aflatoxinas en el TGI.

Los bioadsorbentes tienen una capa múltiple de estructura porosa, con cavidades y canales que proporcionan un gran volumen por unidad de superficie adsorbente, lo que es favorable en el proceso de adsorción. El diámetro medio de los poros es de menos de 1  $\mu\text{m}$ , y podría favorecer la difusión y adsorción de las micotoxinas. Los mecanismos de biosorción son simples o múltiples intercambios iónicos, complejas construcciones, interacciones electrostáticas, y construcciones de quelatos (Bočarov-Stančić et al., 2018). Algunos estudios reportan porcentajes altos de adsorción de aflatoxinas en el orujo de uva (82%), el algarrobo (100%), el orujo de oliva (74%), los tallos de uva micronizados (96%), las hojas+bayas de *Pyracantha koidzumii* (82%), y algunas ligninas de plantas aromáticas (80%) (Avantaggiato et al., 2014; Greco et al., 2019; Fernandes et al., 2019; Karmanov et al., 2020; Ramales-Valderrama et al., 2016). Nuestro grupo de trabajo, ha realizado diversos estudios *in vitro* e *in silico* para conocer la capacidad de adsorción de la AFB<sub>1</sub> de la cáscara de plátano (28%), las hojas de *Pyracantha* (46%), el polvo de Aloe vera (69%) (Zavala-Franco et al., 2018; Méndez-Albores et al., 2020); y las hojas de *Pyracantha koidzumii* (86%), las hojas+bayas de *Pyracantha koidzumii* (82%) y las bayas de *Pyracantha koidzumii* (46%).

### 2.6.2 Características generales de los bioadsorbentes (*Lactuca sativa*, *Equisetum arvense*, *Pyracantha koidzumii*)

*Lactuca sativa*, es uno de los más famosos vegetales de hojas verdes conocida como lechuga, la cual es miembro de la familia Compositae (Agüero, 2008; De Vries, 1997; Sayyah, 2004).

Las hojas y el tallo de la lechuga son comestibles, y sus semillas comúnmente se utilizan para la producción de aceite (De Vries, 1997). Aunque el valor nutricional por unidad es relativamente bajo, en algunos países de América del Sur, el consumo *per cápita* ha crecido (Agüero et al., 2008). La lechuga es un vegetal que se consume todo el año debido a su tipo de cultivo: al aire libre y en invernadero (De Vries, 1997).

El consumo de la lechuga proporciona fibra, vitamina A, vitamina B, vitamina C, y vitamina E, carotenoides, calcio, potasio y magnesio (Agüero et al., 2008; De Vries, 1997). Las semillas contienen vitamina E (De Vries, 1997). El contenido de fitoquímicos, vitaminas y provitaminas en diversas frutas y verduras, se ha considerado crucial en la prevención de

enfermedades crónicas como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y diabetes (Chu et al., 2002). Diversos autores han reportado que los efectos de las hojas de lechuga son anticonvulsivos y sedantes-hipnóticos. Actualmente, se ha estudiado que, la actividad antioxidante de la lechuga está relacionada con la prevención de enfermedades relacionadas al estrés oxidativo (Sayyah et al., 2004).

*Equisetum arvense* L. es una planta que está distribuida por todo el hemisferio norte, conocida como cola de caballo, pertenece a la familia Equisetaceae, del subgénero Equisetum (Al-Snafi, 2017; Mimica-Dukic et al., 2008; Radulović et al., 2006). La cola de caballo es una de las plantas más antiguas de la tierra, la cual se caracteriza por su alta carga de sustancias inorgánicas: sílice y sales de potasio (Holzhüter, 2003; Mimica-Dukic et al., 2008). Además, es una planta rica en esteroides, ácido ascórbico, ácidos fenólicos, ácidos poliénicos, flavonoides, estirilpironas, taninos, alcaloides, carbohidratos, proteínas, aminoácidos, saponinas, aceites volátiles, entre otros componentes como las vitaminas C, E, K, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>5</sub>, ácido nicotínico, ácido fólico y ácido pantoténico (Al-Snafi, 2017; Mimica-Dukic et al., 2008; Štajner et al., 2009). Es rica en oligoelementos como: Na, K, Ca, Mg, P, Fe, Zn, Cu, Mn, Si, Sr, Ti (Štajner et al., 2009). Diversos autores, correlacionan la cantidad de clorofila con las cantidades de polifenoles y flavonoides presentes (si las cantidades son menores, la cantidad de clorofila se verá disminuida) (Pallag et al., 2016).

Se han descrito las amplias aplicaciones medicinales y terapéuticas de la cola de caballo como diurético, vasorrelajante, cicatrizante, hepatoprotector, antiinflamatorio, sedante, anticonvulsivo, antibacteriano, antiséptico, hemostático, antioxidante, propiedades astringentes, entre otras más (Al-Snafi, 2017; Oh, 2004; Radulović et al., 2006). Los romanos la usaban como un vegetal y como alimento para los animales (Štajner et al., 2009).

*Pyracantha koidzumii* (Hayata) Reheder, mejor conocida como espino de fuego, es una planta que se difunde como una planta ornamental y se utiliza para cercos vivos de parques y jardines debido a su follaje perenne, abundante floración y frutos llamativos (Jocou, 2020; Jocou y Gandullo, 2019). Es un arbusto originario de Europa y Asia, naturalizada en África, Australia y diversas regiones de América, muchas veces es considerada como maleza de alto riesgo o invasora debido a que, escapan del cultivo que impacta los entornos naturales (Jocou, 2020; Jocou y Gandullo, 2019).

Se caracteriza por ser un arbusto de 3 a 4 m de alto, con ramas laterales cortas espiniscentes, las hojas son oblanceoladas (más anchas en el ápice), la parte adaxial (superior) de la hoja es de color verde oscuro y la parte abaxial (inferior) es de color verde claro. Su inflorescencia se caracteriza por ser en corimbo (recemosa con los pedicelos de distintos tamaños, pero alcanzando la misma altura), con abundantes flores blancas de 3 a 5 cm de diámetro, los frutos son subglobosos (casi esféricos), de color rojo brillante,

anaranjado o amarillo el cual persiste en otoño e invierno (Jocou y Gandullo, 2019; Thurn et al., 2018).

Además de su uso ornamental, debido a la presencia de espinas, se utiliza como barrera natural y cobertura para la vida silvestre (Thurn et al., 2018). En diversas partes del mundo, sus frutos son usados por sus efectos diuréticos, cardíacos y tónicos (Akar et al., 2009). Algunas investigaciones han demostrado la eficacia de esta planta como adsorbente de colorantes sintéticos (Akar et al., 2009; Akar et al., 2010; Ari y Celik, 2013). Sin embargo, actualmente se han reportado estudios por parte de nuestro grupo de trabajo, con respecto a la capacidad bioadsorbente del espino de fuego contra las aflatoxinas (Ramales-Valderrama et al., 2016; Zavala-Franco et al., 2018).

En consecuencia, debido a que los bioadsorbentes han sido considerados como una alternativa importante para la reducción o eliminación de las aflatoxinas, la presente investigación tiene como objetivo principal estudiar la eficacia de dos nuevos bioadsorbentes (lechuga y cola de caballo) y el bioadsorbente espino de fuego contra la eliminación de AFB<sub>1</sub> de manera *in vitro*.

### 3. Justificación

Debido a que la aflatoxicosis provoca importantes daños en la economía, salud, y producción dentro de la industria avícola, es relevante realizar nuevos estudios que generen conocimiento científico y/o tecnológico en el área de la alimentación para poder disminuir los efectos negativos provocados por las aflatoxinas. Una de las opciones que existen para prevenir los efectos adversos de las aflatoxinas es con el uso de agentes adsorbentes, los cuales tienen la finalidad de reducir la disponibilidad de las micotoxinas en el TGI de las aves. El riesgo que existe al usar adsorbentes inorgánicos es la baja selectividad, debido a la adsorción de otras moléculas presentes en la dieta, limitando la disponibilidad de nutrientes esenciales (vitaminas y minerales). Además, tienen la desventaja de liberar componentes tóxicos como ciertos metales pesados y dioxinas. Es por esto que la tecnología de los bioadsorbentes se ha considerado una alternativa óptima, ya que se caracteriza por presentar una alta eficiencia, bajos costos, niveles mínimos de inclusión, y lo más importante, evita la reducción del valor nutricional de las dietas. En décadas recientes, se ha estudiado la eficacia de los bioadsorbentes de aflatoxinas en modelos *in vitro*; sin embargo, es necesario determinar si existe la misma eficacia de éstos en modelos *in vitro* pero que simulen ciertas condiciones del TGI de las aves. Además, con miras de que estos biomateriales sean competitivos en el mercado de los adsorbentes, es necesario evaluar niveles bajos de inclusión y estudiar las interacciones entre los bioadsorbentes y la AFB<sub>1</sub>, mediante diversas técnicas de caracterización del área de los materiales.

#### 4. Hipótesis

Si se adicionan los bioadsorbentes provenientes de las plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.), cola de caballo (*Equisetum arvense* L.), y espino de fuego [*Pyracantha koidzumii* (Hayata) Rehder] en soluciones acuosas contaminadas con AFB<sub>1</sub> que simulan las condiciones del pH, temperatura y tiempo (velocidad de paso) en el tracto gastrointestinal (TGI) de las aves, éstos reducirán significativamente la concentración de AFB<sub>1</sub>, debido a la existencia de interacciones físicas y químicas entre los bioadsorbentes y la molécula de AFB<sub>1</sub>.

#### 5. Objetivos

##### 5.1 Objetivo general

- Evaluar la capacidad adsorbente de tres biomateriales contra AFB<sub>1</sub>: lechuga (*Lactuca sativa* L.), cola de caballo (*Equisetum arvense* L.), y espino de fuego [*Pyracantha koidzumii* (Hayata) Rehder], en un modelo *in vitro* que emula ciertas condiciones del tracto gastrointestinal de los pavos; además, analizar la interacción entre los bioadsorbentes y la molécula de aflatoxina empleando diversas técnicas de caracterización.

##### 5.2 Objetivos particulares

- Elaborar tres adsorbentes a partir de tres biomateriales como la lechuga (*Lactuca sativa* L.), la cola de caballo (*Equisetum arvense* L.), y el espino de fuego [*Pyracantha koidzumii* (Hayata) Rehder], para disminuir la concentración de AFB<sub>1</sub> en un modelo *in vitro* que emula ciertas condiciones del tracto gastrointestinal de los pavos.
- Caracterizar los biomateriales: lechuga (*Lactuca sativa* L.), cola de caballo (*Equisetum arvense* L.), y espino de fuego [*Pyracantha koidzumii* (Hayata) Rehder], mediante las técnicas de potencial Z ( $\zeta$ ), movilidad electroforética, punto de carga cero (pHpzc), espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier con reflexión total atenuada (FTIR-ATR), y espectroscopía UV-Vis de reflectancia difusa.
- Evaluar la capacidad de adsorción de los tres biomateriales contra AFB<sub>1</sub> en un modelo que emula ciertas condiciones del tracto gastrointestinal de los pavos, empleando niveles bajos de inclusión (0.5 y 0.1% p/v), y tres valores de pH (2, 5, y 7) a una temperatura de 40 °C durante 2 h.

- Extraer y evaluar el contenido de clorofilas de los tres bioadsorbentes y determinar la capacidad de adsorción de AFB<sub>1</sub> de los biomateriales con cantidades insignificantes de clorofilas empleando las mismas condiciones del experimento original.
- Analizar las interacciones entre los bioadsorbentes y la molécula de aflatoxina empleando diversas técnicas de caracterización como potencial Z ( $\zeta$ ), movilidad electroforética, punto de carga cero (pHpzc), espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier con reflexión total atenuada (FTIR-ATR), y espectroscopía UV-Vis de reflectancia difusa.

## 6. Materiales y métodos

### 6.1 Químicos y Reactivos

Los químicos y reactivos que se usaron para realizar los experimentos de adsorción fueron tres buffers de diferentes valores de pH: pH 2 (0.1 M KCl/HCl), pH 5 (0.15 M C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>/Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O), y pH 7 (0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O), y AFB<sub>1</sub> (312.3 g/mol) de *Aspergillus flavus*, la cual se obtuvo de Merck KGaA (Darmstadt, Alemania). Se preparó una solución estándar primaria de AFB<sub>1</sub> (100 µg/ml) en dimetilsulfóxido (DMSO). Esta solución de aflatoxina se diluyó por separado con cada uno de los buffers, hasta alcanzar la concentración final de 190 ng AFB<sub>1</sub>/mL cada uno. Se eligió trabajar con esta concentración de AFB<sub>1</sub>, con el fin de igualar las condiciones de aflatoxinas totales presentes a nivel de campo en Centroamérica y el límite máximo permitido en México en las raciones destinadas a las aves (100 ng/g) (NOM-188-SSA1-2010).

### 6.2 Precauciones de seguridad

Para manipular y destoxificar las superficies de los equipos y las áreas de trabajo contaminadas con aflatoxinas, se utilizó hipoclorito de sodio al 6% (p/v), esta técnica se implementó a partir de las recomendaciones publicadas por Castegnaro et al. (1981).

Para la obtención del material vegetal, se recolectaron muestras de lechuga (*Lactuca sativa* L.), de cola de caballo (*Equisetum arvense* L.), y del espino de fuego [*Pyracantha koidzumii* (Hayata) Rehder], las cuales se cultivaron en el Jardín Botánico de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (Universidad Nacional Autónoma de México). El procedimiento para preparar los nuevos bioadsorbentes (lechuga y cola de caballo) fue similar al descrito por Ramales-Valderrama et al. (2016), quienes previamente elaboraron el bioadsorbente a base de espino de fuego (*Pyracantha koidzumii*). Inicialmente, las plantas se recolectaron y se lavaron con abundante agua destilada para retirar el polvo. Después del lavado, cada una de las muestras se cortaron en fragmentos pequeños (aproximadamente 2 cm<sup>2</sup>) y se colocaron por separado en una bandeja de aluminio. Posteriormente, se secaron los biomateriales por separado en un horno (Binder modelo RE-115, Tuttlingen, Alemania) a 50°C, hasta que no se registraron variaciones en el peso de cada muestra (aproximadamente 48 h) (Figura 2). Finalmente, se molieron y se tamizaron con una malla 60 (Figura 3), proporcionando un tamaño promedio de partícula <250 µm para los experimentos de adsorción (Figura 4). Los bioadsorbentes se almacenaron en envases de plástico sellados al vacío a -20°C hasta su posterior utilización.



Figura 2. Fragmentos cortados de Lechuga, espino de fuego y cola de caballo.



Figura 3. Molino y malla que proporcionaron un tamaño de partícula <250 µm.



Figura 4. Bioadsorbentes de cola de caballo, lechuga y espino de fuego.

#### 6.4 Cuantificación de aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>)

La detección de AFB<sub>1</sub> se llevó a cabo con un espectrofotómetro de fluorescencia (modelo LS-55, Perkin Elmer, Waltham, MA, EE. UU), adquiriendo los espectros en el rango de 350-600 nm con una longitud de onda de excitación de 365 nm. El límite de detección para AFB<sub>1</sub> fue de 0.5 ng/mL. La concentración de AFB<sub>1</sub> se calculó utilizando un estándar (AFB<sub>1</sub>, número CAS: 1162-65-8, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) con una curva de calibración (Figura 1, Apéndice A).

#### 6.5 Experimentos de adsorción de AFB<sub>1</sub>

Se realizó un estudio *in vitro* (Figura 5) para evaluar la capacidad de adsorción de AFB<sub>1</sub> de los tres bioadsorbentes (lechuga, cola de caballo, y espino de fuego), el cual simuló ciertas condiciones del tracto gastrointestinal de los pavos como el pH (2, 5 y 7), la temperatura corporal (40°C) y la velocidad de paso del alimento en el tracto gastrointestinal de los pavos (2 h). Primeramente, se pesó cada bioadsorbente por separado realizando un primer pesaje de 25 mg (0.5% p/v) y otro segundo pesaje de 5 mg (0.1% p/v). Los bioadsorbentes se agregaron a frascos de vidrio con 5 ml de las soluciones buffer (pH 2, 5 y 7) que contenían la AFB<sub>1</sub> (190 ng/ml). Posteriormente, para llevar a cabo la interacción entre los bioadsorbentes con la AFB<sub>1</sub>, los frascos se incubaron a 40°C durante 2 horas con una agitación de 120 rpm. Después de este tiempo, las muestras se centrifugaron durante 10 min a 6300 × *g*. Finalmente, se filtraron los sobrenadantes (PTFE-0.22 μm de tamaño de poro) para la cuantificación de aflatoxinas.

Para calcular el porcentaje de adsorción de AFB<sub>1</sub> de cada uno de los bioadsorbentes, se utilizó la siguiente ecuación:

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

Donde *C<sub>i</sub>* es la concentración de AFB<sub>1</sub> del grupo control (ng/mL), y *C<sub>s</sub>* es la concentración de AFB<sub>1</sub> en el sobrenadante (ng/mL).

Simultáneamente, se utilizaron muestras control sin la adición de los bioadsorbentes, cuyos valores de concentración de AFB<sub>1</sub> fueron usados como referencia. Todas las determinaciones se realizaron por quintuplicado. La eficacia de adsorción de AFB<sub>1</sub> de cada bioadsorbente se evaluó con la reducción de AFB<sub>1</sub> en las muestras *in vitro*. El pH de cada solución se determinó utilizando un electrodo de vidrio (Conductronic PC-45, Puebla, México).



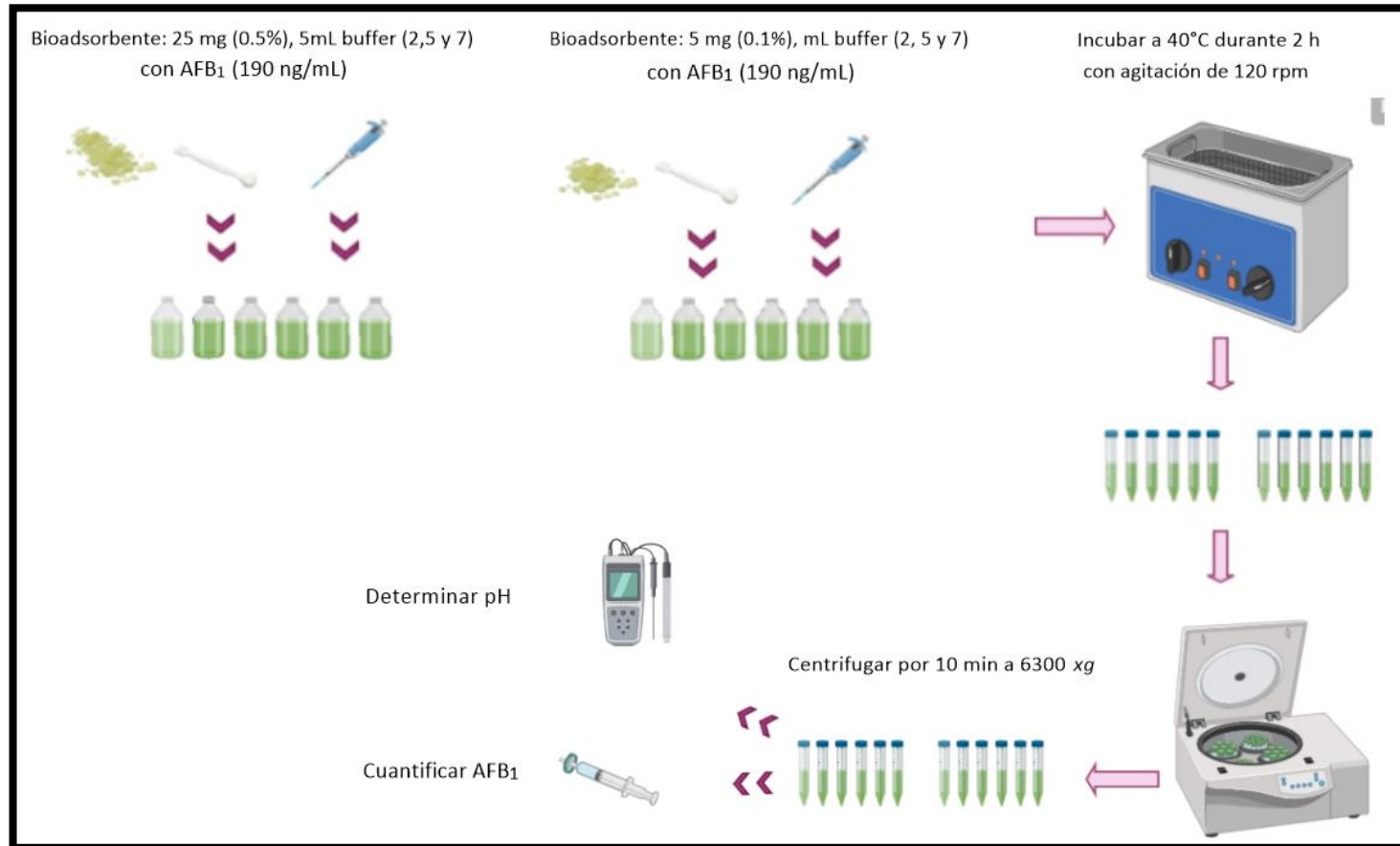


Figura 5. Procedimiento del experimento de adsorción.

## 6.6 Determinación del contenido de clorofilas y experimentos de adsorción con biomateriales sin clorofilas

La estrategia elegida para la extracción y determinación del contenido de clorofilas contenidas en cada uno de los bioadsorbentes (Figura 6) fue la descrita por Wintermans y De Mots (1965). Anticipadamente, se pesaron 25 mg de cada bioadsorbente por separado, los cuales, se mezclaron con 5 ml de disolvente (etanol al 96% v/v) en un tubo Falcon para, posteriormente, someterlo a sonicación durante 10 minutos. Al haber finalizado la extracción de las clorofilas, se centrifugaron las muestras durante 10 min a  $6300 \times g$ . Finalmente, el contenido de clorofilas de los extractos de cada bioadsorbente, se determinó mediante el uso de un espectrofotómetro Cary 8454 UV-Vis Diode Array System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

La determinación de la clorofila *a* ( $Cl\ a$ ), la clorofila *b* ( $Cl\ b$ ) y la clorofila total ( $Cl\ a + b$ ) de los extractos de cada bioadsorbente en alcohol al 96%, se calcularon empleando las siguientes ecuaciones:

$$Cl\ a = 13.70 (A_{665}) - 5.76 (A_{649}) \quad (1)$$

$$Cl\ b = 25.80 (A_{649}) - 7.60 (A_{665}) \quad (2)$$

$$Cl\ a + b = 6.10 (A_{665}) + 20.04 (A_{649}) \quad (3)$$

\*Los espectros representativos UV-Vis de la clorofila *a* y la clorofila *b* se muestran en la Figura A1 del Apéndice, los cuales fueron tomados de Makarska-Bialokoz y Kaczor, (2014).

Donde  $A_{665}$  es el valor de absorbancia de la  $Cl\ a$  en una longitud de onda de 665 nm, la cual se obtuvo de la lectura por espectrofotometría.

Donde  $A_{649}$  es el valor de absorbancia de la  $Cl\ b$  en una longitud de onda de 649 nm, la cual se obtuvo de la lectura por espectrofotometría.

Posterior a la extracción de las clorofilas con alcohol al 96%, cada bioadsorbente se lavó vigorosamente con agua desionizada, centrifugando durante 5 min a  $6300 \times g$  y desechando el sobrenadante entre cada enjuague. Finalmente, cada bioadsorbente fue secado en un horno a  $50^{\circ}\text{C}$  hasta que se llegó a un peso constante, de este modo, se pudieron realizar los experimentos de adsorción, trabajando con las mismas condiciones (pH, temperatura y tiempo) descritas con anterioridad.

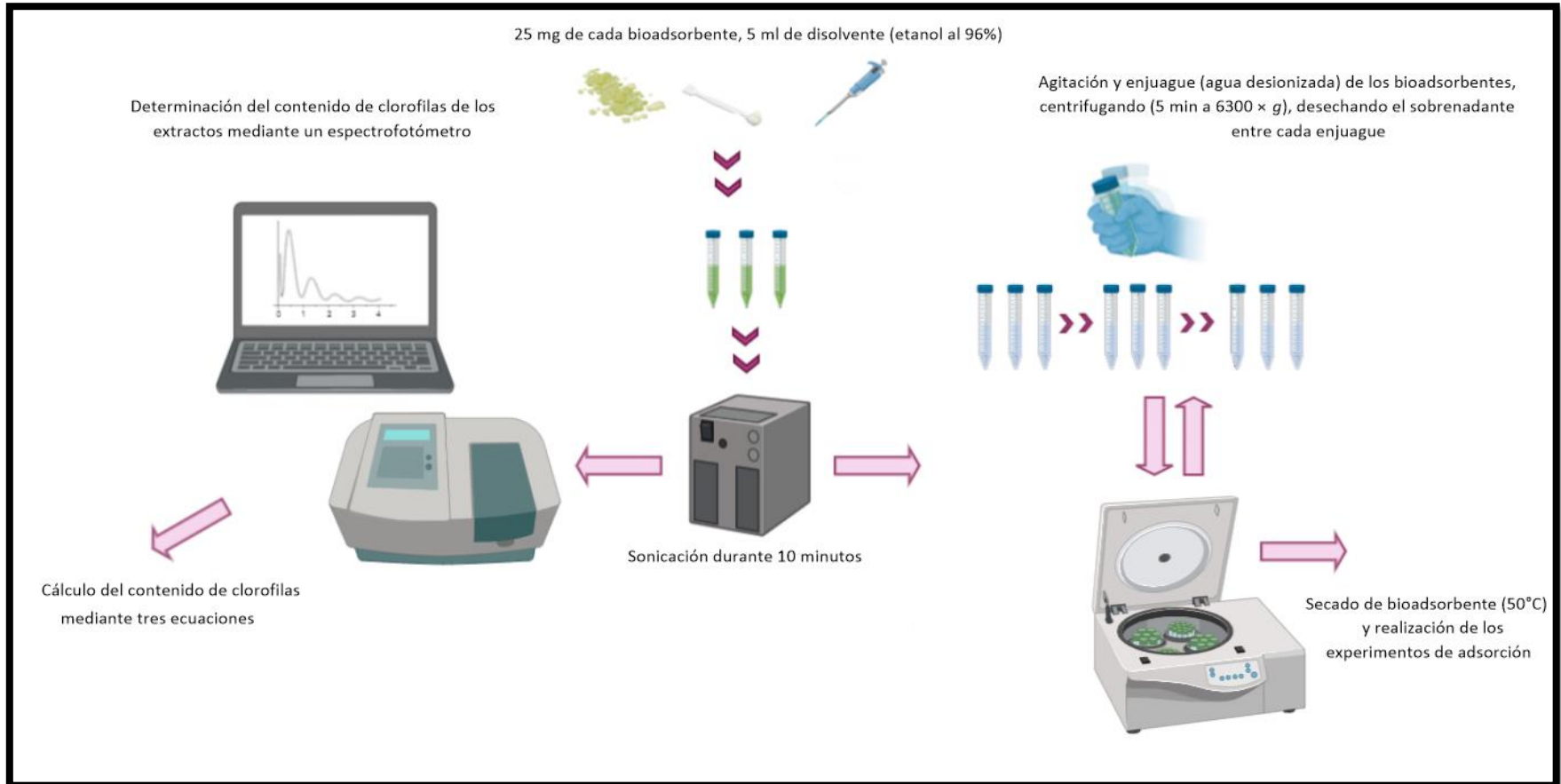


Figura 6. Procedimiento de la extracción y determinación del contenido de clorofilas de los bioadsorbentes.

## 6.7 Caracterización de los bioadsorbentes y las interacciones entre los adsorbentes y la molécula de AFB<sub>1</sub>

### 6.7.1 Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier con reflexión total atenuada (FTIR-ATR)

Las plantas que fueron probadas como bioadsorbentes de AFB<sub>1</sub> se caracterizaron mediante un espectrofotómetro FTIR Frontier SP8000 (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA), equipado con un accesorio de diamante de reflectancia total atenuada (ATR) (DuraSamplIR II, Smiths Detection, Warrington, Reino Unido) (Figura 7). Este equipo permite la identificación de los diversos grupos funcionales de los materiales orgánicos. Por consiguiente, se evaluó cada bioadsorbente antes y después de la interacción con la molécula de AFB<sub>1</sub>. Para ello, cada bioadsorbente se colocó por separado sobre el cristal de ATR (aproximadamente 25 mg) y posteriormente, fueron presionados con el pistón del aparato hacia el cristal. Todos los espectros fueron colectados en un rango de 4000-500 cm<sup>-1</sup>, siguiendo las recomendaciones de Estrada-Urbina et al. (2018). Las áreas de las bandas de cada grupo funcional se calcularon utilizando el software Spectrum 10.4.2.



Figura 7. Espectrofotómetro FTIR-ATR

### 6.7.2 Espectroscopía UV-Vis con reflectancia difusa

La reflectancia difusa de los bioadsorbentes se realizó para estimar el contenido de pigmentos (clorofilas) en los bioadsorbentes, para ello se utilizó un espectrofotómetro Lambda 365 UV-Vis-RD (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) equipado con una esfera integradora para capturar la luz difusa reflejada (Figura 8). Se utilizó como referencia sulfato de bario (BaSO<sub>4</sub>) para proporcionar una reflectancia del 100%. Los espectros de

absorción óptica se colectaron en el rango de 300 a 700 nm y posteriormente se convirtieron con la función Kubelka–Munk.



Figura 8. Espectrofotómetro Lambda 365 UV-Vis-RD

### 6.7.3 Potencial Z ( $\zeta$ ) y movilidad electroforética

Las mediciones resultantes del potencial zeta ( $\zeta$ ) y la movilidad electroforética permitieron reforzar la caracterización de los bioadsorbentes utilizando un equipo ZetaSizer Pro (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido) (Figura 9). Esta técnica permite conocer y evaluar la carga superficial de los bioadsorbentes mediante la relación entre el potencial zeta de los bioadsorbentes y los tres pH probados. Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente diluyendo 100  $\mu$ L de las suspensiones de cada uno de los bioadsorbentes en los tres diferentes pHs (2, 5 y 7) en 1.9 mL de agua desionizada. Después de la preparación de las diluciones, se realizaron las lecturas utilizando una jeringa de 3 mL para transferirlas a la celda (Figura 10). La concentración final de las muestras correspondió a 0.25 mg/mL. Cada muestra se evaluó por triplicado y cada medición comprendió al menos 10 corridas (Ramales-Valderrama et al. 2016).



Figura 9. ZetaSizer Pro



Figura 10. Celda DTS1070

#### 6.7.4 Punto de carga cero ( $\text{pH}_{\text{pzc}}$ )

El punto de carga cero ( $\text{pH}_{\text{pzc}}$ ) es el valor del pH en el que la carga neta de las partículas es cero, es decir, existe el mismo número de sitios positivos que negativos, de manera que, es uno de los procedimientos que proporciona información sobre la carga superficial de los bioadsorbentes. Para determinar el punto de carga cero, se utilizaron dos métodos: uno con los buffers (pH 2, 5 y 7) y el otro con agua destilada la cual se ajustó al pH requerido con la adición de HCl 0.1 M o NaOH 0.1 M. Primeramente, se pesaron 5 mg de cada uno de los bioadsorbentes, los cuales fueron agregados en vasos de precipitado con 5 ml de buffer (pH 2, 5 y 7). Simultáneamente, se agregaron 5 mg de cada uno de los bioadsorbentes en vasos de precipitado con 5 ml de agua destilada ajustada en un rango de pHs (1.5 a 11.5) mediante la adición de HCl 0.1 M o NaOH 0.1 M. Posteriormente, los frascos se agitaron a 250 rpm durante 120 min. Finalmente, el pH final ( $\text{pH}_f$ ) de cada muestra, se determinó con un electrodo de vidrio (Conductronic PC-45, Puebla, México) (Figura 11) y se calculó la diferencia ( $\Delta\text{pH}$ ). El  $\Delta\text{pH}$  se graficó frente al pH inicial ( $\text{pH}_i$ ), y el punto donde la línea cruza el eje x representó el  $\text{pH}_{\text{pzc}}$  del bioadsorbente.



Figura 11. Lectura de pH con un electrodo de vidrio

## 7. Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento se realizó con base en un diseño factorial  $3 \times 3 \times 2$  completamente aleatorizado., con dieciocho condiciones experimentales y cinco repeticiones. El primer factor correspondió al tipo de bioadsorbente (lechuga, cola de caballo, y espino de fuego), el segundo factor al pH (2, 5, y 7), y el tercer factor al contenido del adsorbente (0.5 % y 0.1% p/v). Los datos se evaluaron mediante un análisis de varianza (ANOVA de 2 vías) de dos vías, y la prueba de rango múltiple de Tukey ( $p < 0.05$ ) se usó para comparar la significancia entre los tratamientos utilizando el Sistema de Análisis Estadístico SAS (SAS, 2002).

## 8. Resultados y discusión

En esta sección se describen y comparan los resultados de las técnicas que evaluaron la capacidad adsorbente de los tres biomateriales: lechuga, cola de caballo, y espino de fuego contra la AFB<sub>1</sub> de un modelo *in vitro* que emuló ciertas condiciones del TGI de los pavos, y de las técnicas de caracterización de los bioadsorbentes, las cuales permitieron analizar las interacciones entre los bioadsorbentes y la molécula de AFB<sub>1</sub>.

### 8.1 Experimentos de adsorción

Los resultados que se obtuvieron de los experimentos *in vitro* para evaluar la capacidad de adsorción de AFB<sub>1</sub> utilizando dos diferentes contenidos de bioadsorbentes (0.5% y 0.1% p/v), emulando algunas condiciones del TGI de los pavos como: el pH (pH 2, simulando el proventrículo; pH 5, simulando el buche; y pH 7, simulando el intestino), la temperatura (40°C) y el tiempo (2 h, simulando la velocidad de tránsito alimenticio), se presentan en las Figuras 12, 13 y 14 y en la Tabla 7.

En la Figura 12 se muestran algunos espectros de fluorescencia que corresponden a: la AFB<sub>1</sub> a una concentración de 190 ng/mL (color rojo), a la AFB<sub>1</sub> después de la adsorción con los bioadsorbentes a un contenido de 0.5% p/v (color azul), y a la AFB<sub>1</sub> después de la adsorción con los bioadsorbentes a un contenido de 0.1% p/v (color verde), a los tres diferentes pHs. Si la intensidad de fluorescencia está ligeramente aumentada o es similar a la del espectro de la molécula de AFB<sub>1</sub> (rojo), significa que la cantidad de AFB<sub>1</sub> presente es de 190 ng/mL, por lo que, se puede interpretar que el bioadsorbente no adsorbió a la AFB<sub>1</sub>; si, por el contrario, la intensidad de fluorescencia disminuye, significa que la cantidad de AFB<sub>1</sub> es más baja de 190 ng/mL, en otras palabras, el bioadsorbente logró adsorber a la molécula de AFB<sub>1</sub>.

En todas las gráficas de la Figura 12, se observa que la intensidad de fluorescencia de la AFB<sub>1</sub> después de la adsorción con el contenido de bioadsorbente más alto utilizado (0.5% p/v) a los tres valores de pH, fue menor en comparación con la intensidad de fluorescencia de la AFB<sub>1</sub> después de la adsorción con los contenidos más bajos, por lo que; en general, cuando se usaron los bioadsorbentes a un contenido de 0.5% (p/v) la adsorción de AFB<sub>1</sub> fue mayor en comparación con el contenido más bajo (0.1% p/v). En este contexto, Avantaggiato et al. (2014) estudiaron el efecto de la dosis del orujo de uva para la adsorción de AFB<sub>1</sub>, los autores reportaron que la adsorción de la AFB<sub>1</sub> se vio significativamente afectada por la dosis del bioadsorbente. El contenido mínimo de inclusión a la que trabajaron fue de 0.5%, y conforme se aumentó el contenido del bioadsorbente, el porcentaje de adsorción de AFB<sub>1</sub> fue cada vez mayor, por lo que los



resultados obtenidos de estos investigadores concuerdan con la investigación presente. Es bien sabido que el porcentaje de inclusión del bioadsorbente afecta la capacidad de adsorción de la AFB<sub>1</sub>, ya que se puede alterar el número de sitios activos en la superficie del bioadsorbente (Rasheed et al., 2020).

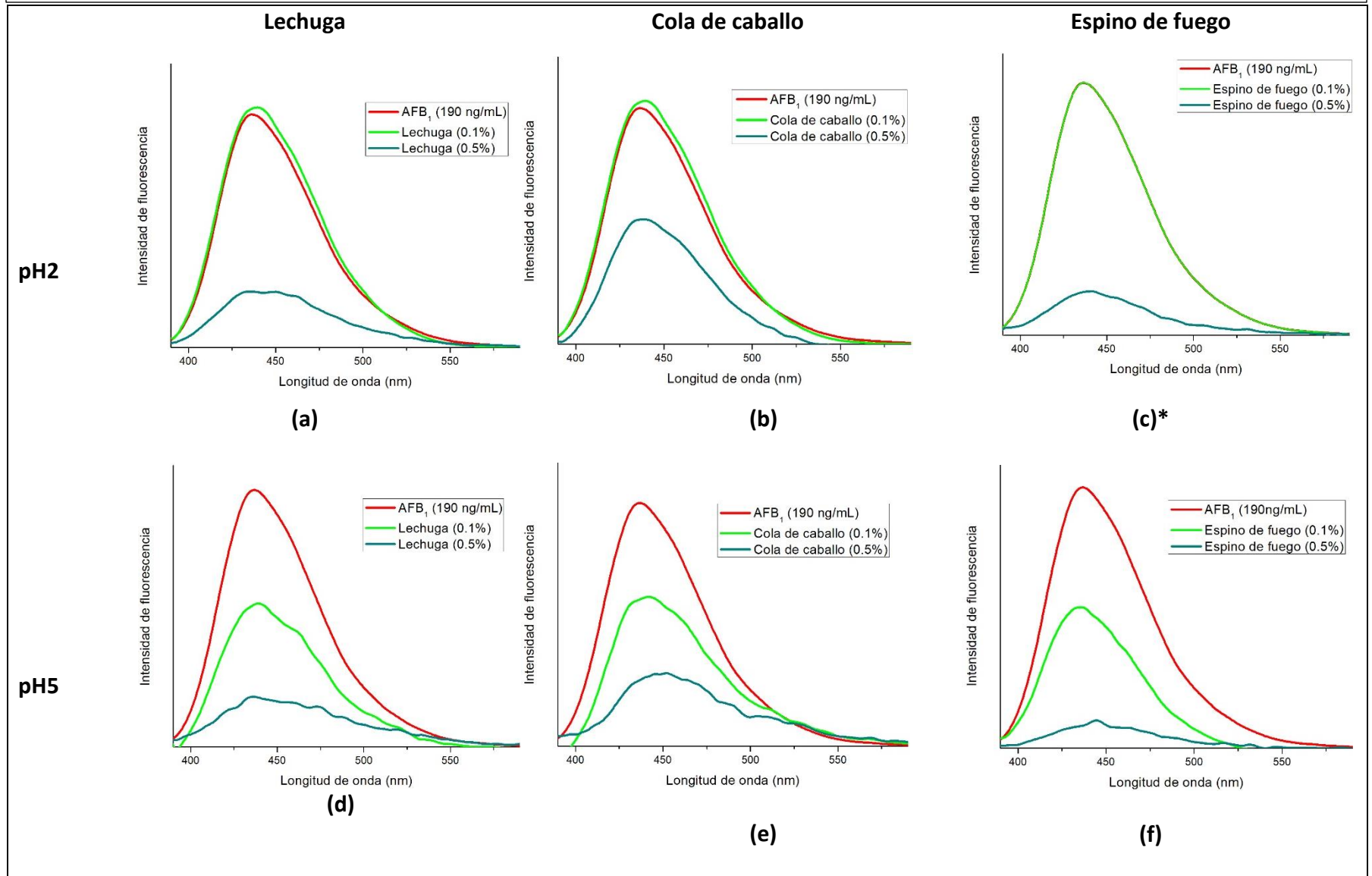
En la Figura 12 (perfiles a, b, c) se puede observar que cuando los bioadsorbentes se usaron a un porcentaje de inclusión de 0.1% (p/v), el comportamiento de los espectros de la AFB<sub>1</sub> después de la adsorción con los tres bioadsorbentes fue similar en un pH de 2, observando que los espectros (color verde) estaban ligeramente aumentados (lechuga y cola de caballo) o sobrepuestos (espino de fuego) al espectro de la AFB<sub>1</sub> (color rojo), estos resultados son interpretados como una baja o nula adsorción de AFB<sub>1</sub> en este particular valor de pH. Sin embargo, cuando los bioadsorbentes fueron usados a un contenido de 0.5% (p/v) a pH 2, los espectros (color azul) disminuyeron notablemente su intensidad de fluorescencia, por lo tanto, la adsorción de AFB<sub>1</sub> fue mejor usando la dosis más alta en un pH de 2. Contrastando la capacidad de adsorción entre el contenido de los bioadsorbentes a 0.1% y 0.5% (p/v) a un pH de 5 (Figura 12, perfiles d, e, f), se puede apreciar que, la intensidad de fluorescencia de los espectros de AFB<sub>1</sub> después de la adsorción con los bioadsorbentes a un contenido de 0.5% (p/v) es más baja con respecto al contenido de 0.1% (p/v), lo que también se interpreta como una mejor adsorción de AFB<sub>1</sub> con la utilización del porcentaje de inclusión más alto de los bioadsorbentes.

Finalmente, se observa que los espectros de AFB<sub>1</sub> después de la adsorción con los bioadsorbentes de lechuga, cola de caballo y espino de fuego a pH 7 (Figura 12, perfiles g, h, i) muestran el mismo comportamiento, en comparación con los resultados de los bioadsorbentes a un pH de 2 y 5, observando que a un pH de 7 y a un porcentaje de inclusión de 0.5% (p/v), la adsorción de AFB<sub>1</sub> es mayor en comparación con la dosis de 0.1% (p/v). Greco et al. (2019) realizaron estudios *in vitro* para conocer la eficacia de diversos bioadsorbentes contra la eliminación de AFB<sub>1</sub>, los investigadores reportaron que, independientemente de la utilización de los bioadsorbentes en soluciones ácidas y neutras, el porcentaje de adsorción de AFB<sub>1</sub> mejoró conforme el contenido de inclusión de los bioadsorbentes aumentó. Rasheed et al. (2020) reportaron distintos porcentajes de inclusión del orujo de arándano (0.5% - 3%, p/v) como bioadsorbente de AFB<sub>1</sub>. Sus estudios señalan que, al aumentar la dosis de inclusión del bioadsorbente, la adsorción de AFB<sub>1</sub> mejoró significativamente. Sin embargo, también reportaron que, al aumentar el contenido del bioadsorbente, el porcentaje de adsorción de AFB<sub>1</sub> fue sumamente elevado al principio y posteriormente, éste se volvió más tenue después de alcanzar el equilibrio. Los autores atribuyen este efecto a que, al incrementar el contenido del bioadsorbente, se provocó un aumento de las superficies específicas y de los sitios de unión necesarios para una adsorción eficaz de la molécula de AFB<sub>1</sub>.

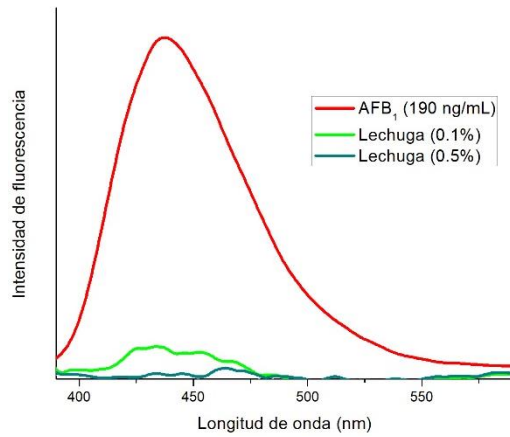
Es importante destacar que, el espectro de fluorescencia de la AFB<sub>1</sub> después de la adsorción con la lechuga a 0.1% p/v a pH 7, es similar al de 0.5% p/v, lo que nos permite

afirmar que la lechuga desempeña un excelente papel como bioadsorbente de AFB<sub>1</sub> a un contenido de 0.1% p/v, en comparación con el contenido de 0.5% p/v y con los otros dos adsorbentes. Lin et al. (2019) realizaron un estudio para determinar la bioaccesibilidad de las aflatoxinas en la dieta diaria de diversas muestras de maíz contaminado naturalmente en China. Debido a que el aceite, la carne, las verduras y el maíz, son los alimentos comunes en la dieta diaria, se realizaron mezclas de estos componentes en un modelo de digestión *in vitro*. Se tomó como vegetal representativo a la lechuga, reportando que la reducción de la bioaccesibilidad de la AF fue más evidente en las muestras mezcladas con lechuga.

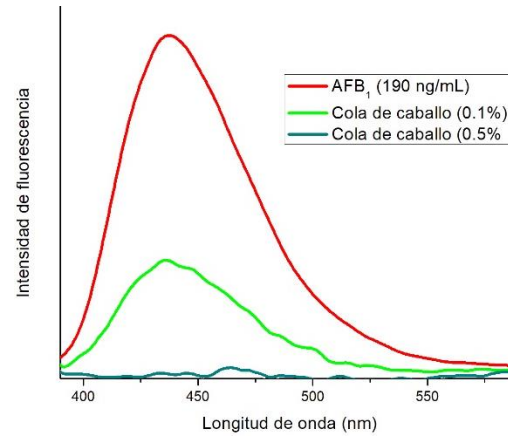
Figura 12. Capacidad de adsorción de AFB<sub>1</sub> de la lechuga, la cola de caballo y el espino de fuego utilizando dos diferentes contenidos de bioadsorbentes (0.5% y 0.1%, p/v).



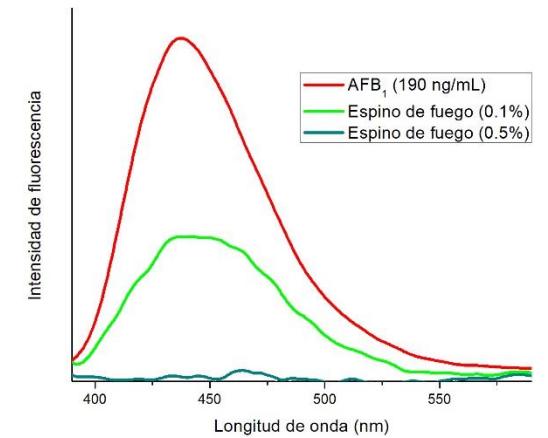
pH7



(g)



(h)

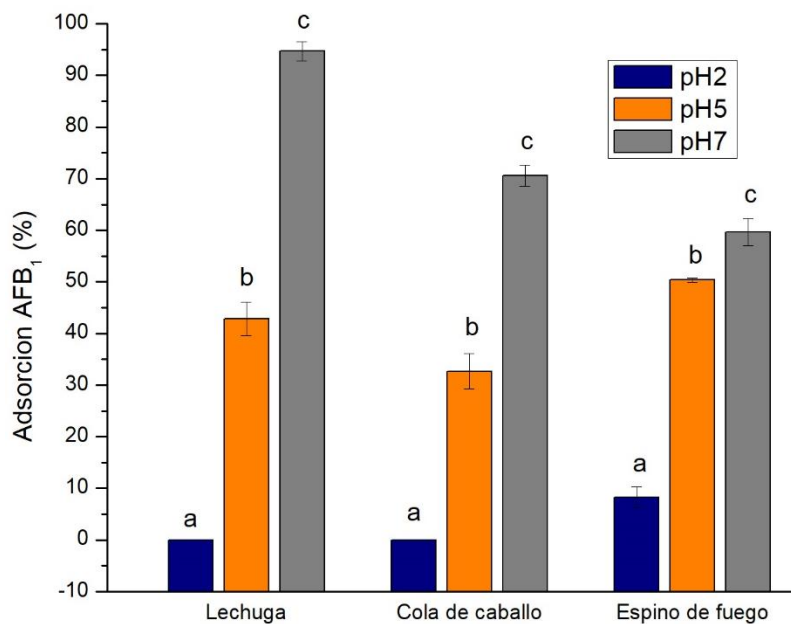


(i)

\*Perfil (c) el espectro de la AFB<sub>1</sub> después de la adsorción con el espino de fuego a 0.1% (p/v) (verde), está sobrepuesto al espectro de AFB<sub>1</sub> (rojo).

En las Figuras 13 y 14 se puede observar el comportamiento de los bioadsorbentes de lechuga, cola de caballo y espino de fuego, a los tres distintos pH (2, 5 y 7). Cuando los bioadsorbentes fueron sometidos a un pH de 2, el porcentaje de adsorción de AFB<sub>1</sub> fue notoriamente menor en comparación con el pH 5 y el pH 7, respectivamente. La eficacia de adsorción de AFB<sub>1</sub> en un medio acuoso, en la mayoría de los casos, varía dependiendo del tipo de producto y del valor del pH del medio (Greco et al., 2019). Se ha reportado que el pH modifica significativamente las cargas superficiales y las interacciones adsorbente-adsorbato (Rasheed et al., 2020).

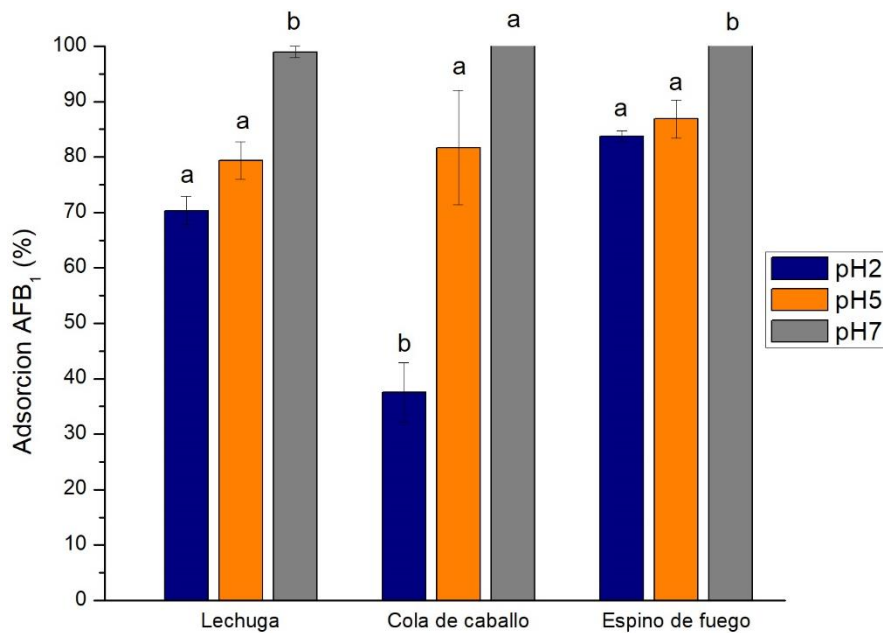
Figura 13. Capacidad de adsorción de AFB<sub>1</sub> de la lechuga, la cola de caballo y el espino de fuego (0.1% p/v) a tres diferentes valores de pH (2, 5 y 7).



Concentración de AFB<sub>1</sub>: 190 ng/mL a una temperatura de 40° C con 2 h de incubación.

Media ± error estándar. Datos con la misma letra del mismo bioadsorbente, no son significativamente diferentes, Tukey ( $p > 0.05$ ).

Figura 14. Capacidad de adsorción de AFB<sub>1</sub> de la lechuga, la cola de caballo y el espino de fuego (0.5% p/v) a tres diferentes valores de pH (2, 5 y 7).



Concentración de AFB<sub>1</sub>: 190 ng/mL a una temperatura de 40° C con 2 h de incubación.

Media ± error estándar. Datos con la misma letra del mismo bioadsorbente, no son significativamente diferentes, Tukey ( $p > 0.05$ ).

Investigadores realizaron estudios con el orujo de oliva micronizada, Fernandes et al. (2019) reportaron que la mejor adsorción de este biomaterial fue a un porcentaje de inclusión alto (2%) en muestras que contenían 1 µg de AFB<sub>1</sub> /mL; a pH 2 el porcentaje de adsorción de AFB<sub>1</sub> fue del 76% y a pH 7 fue de 90%. Este estudio concuerda con los resultados de la presente investigación, en el cual se puede observar que el porcentaje de adsorción de la AFB<sub>1</sub> cuando se utilizó el contenido más bajo de la lechuga y la cola de caballo a pH 2 fue de 0 % en ambos casos y de  $8 \pm 4\%$  en el caso del espino de fuego (Figura 13 y Tabla 7); además, se reportó que con el uso del contenido más alto de bioadsorbentes a pH 2, los porcentajes de adsorción fueron mayores, reportando valores de  $70 \pm 4\%$  para la lechuga,  $38 \pm 9\%$  para la cola de caballo, y  $84 \pm 2\%$  para el espino de fuego. Sin embargo, se puede observar que, cuando se utilizó la cola de caballo a un contenido de 0.5% (p/v), el porcentaje de adsorción de AFB<sub>1</sub> fue significativamente menor, en comparación con el de la lechuga y el espino de fuego. Este efecto podría deberse a cambios en la carga del adsorbente inducida por el pH de las soluciones también (Nava-Ramírez et al., 2020).

El porcentaje de adsorción de AFB<sub>1</sub> a pH 5 fue mayor con respecto al registrado a un pH de 2 y menor con respecto al observado a pH 7. Los valores del porcentaje de adsorción de AFB<sub>1</sub> para los tres bioadsorbentes a un contenido de 0.1% (p/v) fueron de 43 ± 6% para la lechuga, 23 ± 17% para la cola de caballo y 50 ± 1% para el espino de fuego; y para el contenido de 0.5% (p/v), los porcentajes de adsorción de AFB<sub>1</sub> fueron de 79 ± 6% para la lechuga, 69 ± 25% para la cola de caballo y 87 ± 6% para el espino de fuego (Tabla 7). Rames-Valderrama et al. (2016) realizaron un estudio *in vitro* utilizando el bioadsorbente espino de fuego para evaluar su capacidad de adsorción de AFB<sub>1</sub>, el cual se utilizó en un porcentaje de inclusión del 0.5% (p/v) en muestras que contenían 0.1 µg de AFB<sub>1</sub>/mL en un medio de pH de 5.4. Los investigadores reportaron una adsorción de AFB<sub>1</sub> del hasta 86% al utilizar únicamente las hojas del espino de fuego y hasta un 82% de adsorción de AFB<sub>1</sub> al utilizar la combinación de las hojas y las bayas del espino de fuego. Estos resultados, concuerdan con el estudio actual.

Sin embargo, si los bioadsorbentes están en un pH de 7, los porcentajes de adsorción de AFB<sub>1</sub> son notoriamente mayores, en comparación con el pH de 2 y el pH de 5. En la Tabla 7, se reportan los porcentajes de adsorción de AFB<sub>1</sub> realizados por la lechuga, la cola de caballo y el espino de fuego con un contenido de 0.1% (p/v), los cuales fueron de 95 ± 3%, 71 ± 4% y 60 ± 5%, respectivamente. Para el contenido de 0.5% (p/v), los valores fueron de 99 ± 2% para la lechuga y 100 % para la cola de caballo y el espino de fuego, respectivamente. Estos resultados nos permitieron confirmar que, el bioadsorbente desarrollado a partir de la lechuga, es muy eficaz para adsorber AFB<sub>1</sub> en cualquiera de los dos porcentajes de inclusión evaluados. Estos resultados son congruentes con los reportados por Greco et al. (2019), quienes realizaron un estudio *in vitro* en donde compararon la capacidad de diversos subproductos agrícolas para adsorber AFB<sub>1</sub> en medios líquidos a dos valores de pH (3 y 7). Los autores demostraron que, la alcachofa y las distintas partes de esta verdura (cogollos, corazones, tallos, brácteas y hojas), tuvieron la capacidad de adsorber más AFB<sub>1</sub> a un pH de 7 que a un pH de 3. Simultáneamente, los investigadores observaron el mismo comportamiento que el descrito en el presente estudio en otros tres diferentes bioadsorbentes, en ellos el mejor porcentaje de adsorción de AFB<sub>1</sub> fue a un pH de 7, en comparación con un pH de 3. Los porcentajes de adsorción de AFB<sub>1</sub> a pH 7 para las ramas de olivo, el orujo de uva de Malvasia y el orujo de uva de Aglianico fueron de 30%, 58% y 58%, respectivamente; y los porcentajes de adsorción de AFB<sub>1</sub> a pH 3 fueron de 21%, 53% y 52%, respectivamente.

Tabla 7. Porcentaje de adsorción de AFB<sub>1</sub> de la lechuga, la cola de caballo y el espino de fuego a tres diferentes valores de pH (2, 5 y 7).

pH	Lechuga (% p/v)		Cola de caballo (% p/v)		Espino de fuego (% p/v)	
	0.1	0.5	0.1	0.5	0.1	0.5
2	0 ± 0 a	70 ± 4 b	0 ± 0 a	38 ± 9 b	8 ± 4 a	84 ± 2 b
5	43 ± 6 a	79 ± 6 b	23 ± 17 a	69 ± 25 a	50 ± 1 a	87 ± 6 b
7	95 ± 3 a	99 ± 2 a	71 ± 4 a	100 ± 0 b	60 ± 5 a	100 ± 0 b

Media ± error estándar. Datos con la misma letra en el mismo renglón y del mismo bioadsorbente, no son significativamente diferentes, Tukey (p > 0.05).

## 8.2 Determinación del contenido de clorofilas y experimentos de adsorción con biomateriales sin clorofilas

Simonich et al. (2007) informaron que los compuestos vegetales como los fenólicos, flavonoides, cumarinas, clorofila y su derivado (clorofilina), tienen propiedades químicas protectoras contra la AFB<sub>1</sub>. Esto es posible debido a la capacidad que tiene la clorofila y la clorofilina para formar complejos covalentes con la AFB<sub>1</sub>, reduciendo así la adsorción de la AFB<sub>1</sub> (Boudergue et al., 2009).

Los resultados de la determinación del contenido de clorofilas se muestran en la Tabla 8, y en la Figura 15, se observan los espectros de absorción de los extractos de los bioadsorbentes en etanol al 96%. Los espectros se obtuvieron de la lectura por espectrofotometría; la clorofila *a* (Cl *a*) corresponde a la longitud de onda de 665 nm y la clorofila *b* (Cl *b*) a la longitud de onda de 649 nm. El espectro con mayor absorbancia fue la lechuga, lo que indica que contiene la mayor cantidad de clorofilas, seguida por el espino de fuego y finalmente por la cola de caballo (Figura 15). En la Tabla 8 el contenido de clorofila *a* se muestran de manera decreciente: para la lechuga fue de 3.48 ± 0.1 mg/g de bioadsorbente, para el espino de fuego fue de 2.16 ± 0.1 mg/g de bioadsorbente y para la cola de caballo fue de 0.92 ± 0.1 mg/g de bioadsorbente. Mientras que, el contenido de clorofila *b* para la lechuga fue 4.05 veces y 1.65 veces más que la cola de caballo y el espino de fuego, respectivamente. El contenido total de clorofilas fue significativamente diferente entre los tres bioadsorbentes, se encontró que la lechuga fue el bioadsorbente que mayor cantidad de clorofilas totales contuvo (5.1 ± 0.3 mg/g de bioadsorbente), en comparación con los otros dos bioadsorbentes. La lechuga tuvo 3.86 veces y 1.62 veces más de clorofila total que la cola de caballo y el espino de fuego, respectivamente (Tabla 8).



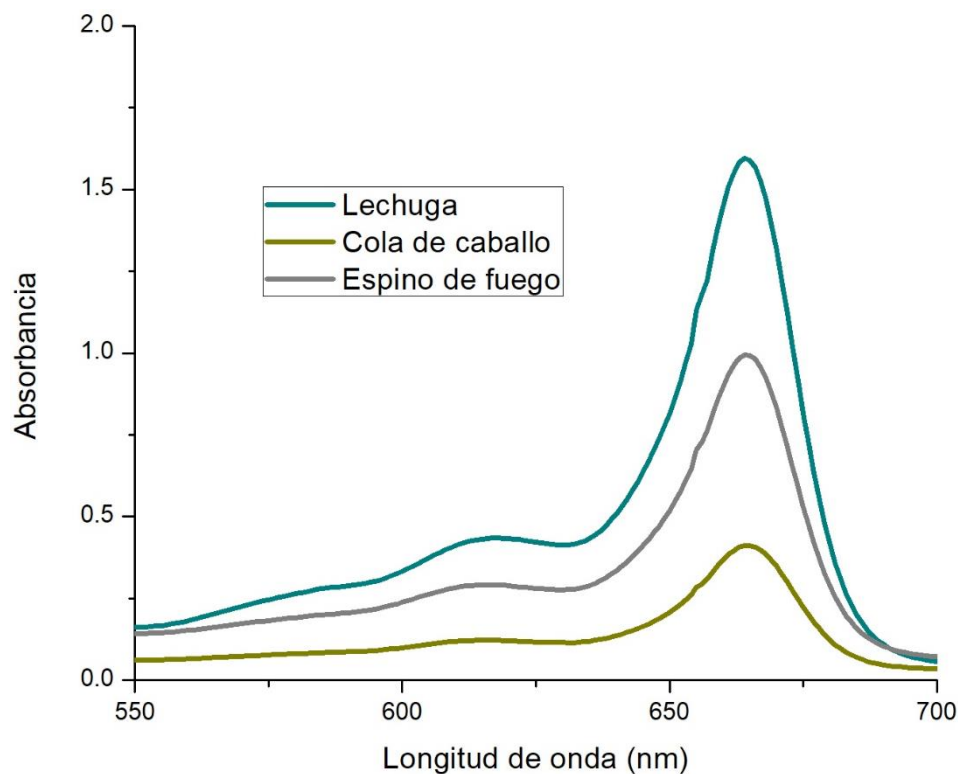
En este sentido, Diaz (2008) consideró a la clorofila como uno de los principales agentes adsorbentes de micotoxinas en la cadena alimentaria humana. Además, Arimoto et al. (1993) señalaron que la clorofilina cuando se mezcla con quitosano, forma un material similar a una sal insoluble que puede formar un enlace no covalente con compuestos policíclicos como la AFB<sub>1</sub>.

Tabla 8. Contenido de clorofilas de los bioadsorbentes a base de lechuga, cola de caballo y espino de fuego.

Bioadsorbente	Contenido de clorofila (mg/g adsorbente)		
	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Clorofila <i>a + b</i>
Lechuga	3.48 ± 0.1 a	1.62 ± 0.2 a	5.1 ± 0.3 a
Cola de caballo	0.92 ± 0.1 b	0.4 ± 0.0 b	1.32 ± 0.1 b
Espino de fuego	2.16 ± 0.1 c	0.98 ± 0.3 c	3.14 ± 0.2 c

Media ± error estándar. Datos con la misma letra en la misma columna, no son significativamente diferente. Tukey ( $p > 0.05$ ).

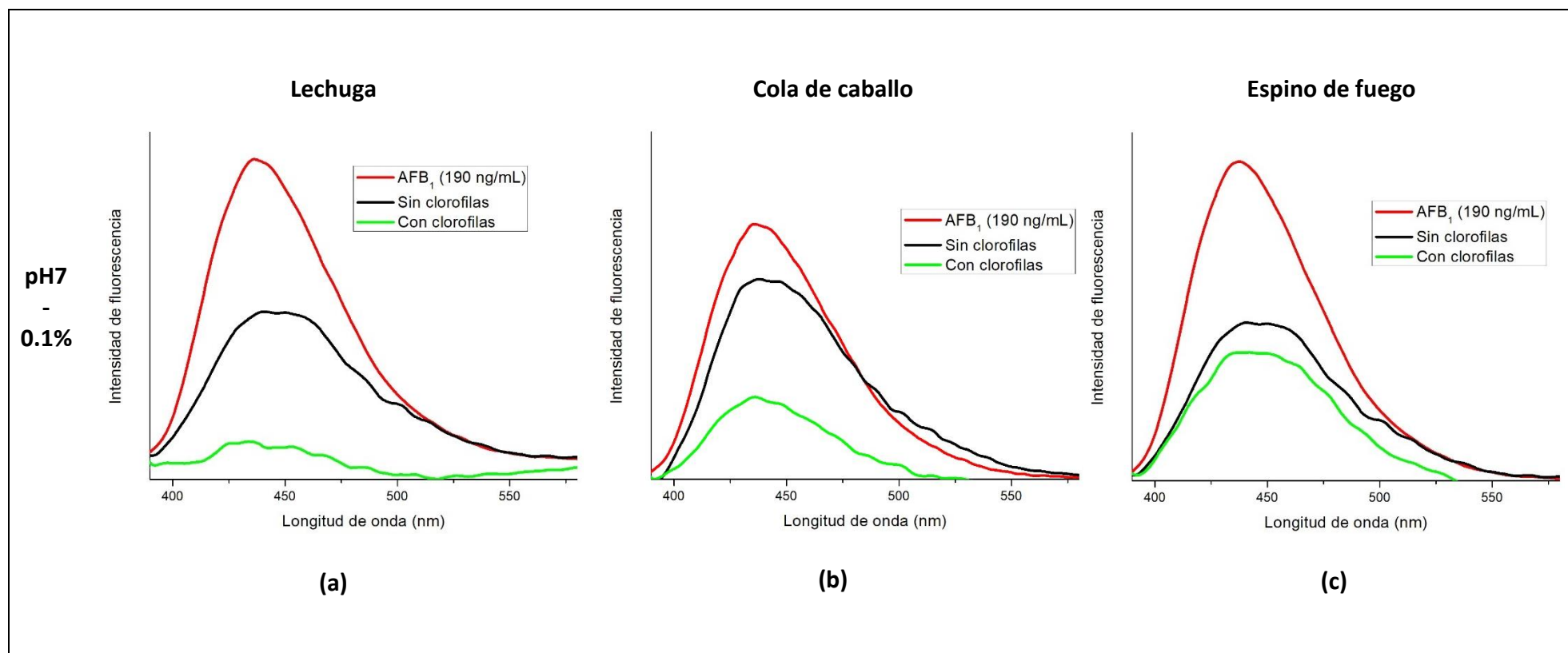
Figura 15. Espectro UV-Vis representativo del contenido de clorofilas de los extractos de los bioadsorbentes de la lechuga, la cola de caballo y el espino de fuego.



En consecuencia, en la presente investigación se confirmó lo reportado por los investigadores anteriores; por lo que, posterior a la extracción de las clorofilas de los bioadsorbentes, se realizó otro experimento de adsorción de AFB<sub>1</sub> con las condiciones de adsorción idénticas a las descritas en la sección 10.1, usando un contenido de bioadsorbentes de 0.1% (p/v) a un pH de 7. En la Figura 16, se observan los espectros de fluorescencia que corresponden a: la AFB<sub>1</sub> a una concentración de 190 ng/mL (color rojo), a la AFB<sub>1</sub> después de la adsorción con los bioadsorbentes sin clorofilas a un contenido de 0.1% p/v (color negro), y a la AFB<sub>1</sub> después de la adsorción con los bioadsorbentes con clorofilas a un contenido de 0.1% p/v (color verde), en un pH de 7. En los tres casos, se observa que la intensidad de fluorescencia de los espectros de la AFB<sub>1</sub> después de la adsorción con los tres bioadsorbentes sin clorofilas fue mayor, en comparación con los espectros de la AFB<sub>1</sub> después de la adsorción con los bioadsorbentes con clorofilas.

Por lo que, se puede interpretar que la adsorción de AFB<sub>1</sub> fue mayor cuando se usaron los bioadsorbentes con clorofilas. Lin et al. (2019) observaron que la lechuga es un vegetal que tiene alta eficacia para la reducción de las aflatoxinas. Considerando que la lechuga tiene altas cantidades de clorofila, los autores realizaron un estudio en un modelo de cultivo celular *in vitro* con una línea celular Caco-2 (una línea de células inmortalizadas de adenocarcinoma colorrectal humano), en el que evaluaron el efecto de la clorofila sobre el transporte intestinal. Los autores reportaron que la adición de clorofila redujo considerablemente el transporte intestinal de la AFB<sub>1</sub>, por lo que, estos hallazgos coinciden con los obtenidos en esta investigación.

Figura 16. Capacidad de adsorción de AFB<sub>1</sub> utilizando los bioadsorbentes con y sin clorofilas a un contenido de 0.1% p/v a un pH de 7.



Adicionalmente, los valores de los porcentajes de adsorción de los bioadsorbentes con y sin clorofilas a un pH de 7 a un contenido de 0.1% p/v, se muestran en la Tabla 9. El espino de fuego fue el bioadsorbente sin clorofilas que mejor adsorbió AFB<sub>1</sub> con un porcentaje de  $53 \pm 2\%$ , seguido por la lechuga con un  $51 \pm 1\%$  y finalmente por la cola de caballo con un  $37 \pm 2\%$ , la cual disminuyó significativamente su adsorción de AFB<sub>1</sub> con respecto a los otros dos bioadsorbentes. Contrastando los resultados de los valores de adsorción de AFB<sub>1</sub> entre los bioadsorbentes con clorofilas y los bioadsorbentes sin clorofilas, se puede inferir que la lechuga con clorofilas tuvo una adsorción 1.8 veces más que la lechuga sin clorofilas, la cola de caballo con clorofilas tuvo una adsorción 1.9 veces más que la cola de caballo sin clorofilas y el espino de fuego tuvo una adsorción 1.1 veces más que el espino de fuego sin clorofilas. Jubert et al. (2009) realizaron un estudio en humanos, a quienes se les administró una dosis única de AFB<sub>1</sub>, coadministrando clorofila y clorofilina, los resultados demostraron que la clorofilina redujo en un 28% los niveles de AFM<sub>1</sub> y la clorofila redujo un 41% los niveles de AFM<sub>1</sub> en la orina.

En consecuencia, nuestros resultados concuerdan con los reportados con los investigadores anteriores, quienes indicaron que el porcentaje de adsorción de AFB<sub>1</sub> por parte de los bioadsorbentes que contenían niveles altos de clorofila mejoraron significativamente. Este efecto se debe en gran manera a la formación de un complejo entre la clorofila y la molécula de AFB<sub>1</sub>, a través de interacciones electrostáticas, orbitales  $\pi - \pi$  y/o puentes de hidrógeno. En este trabajo, los estudios *in vitro* permitieron entender el comportamiento de los bioadsorbentes en medios acuosos que simulan las condiciones del TGI de las aves; sin embargo, es necesario realizar más estudios *in vitro* e *in vivo* para probar la eficacia de estos bioadsorbentes en la reducción AFB<sub>1</sub> sin comprometer la biodisponibilidad de ciertos micronutrientes para las aves.

Tabla 9. Porcentaje de adsorción de AFB<sub>1</sub> utilizando los bioadsorbentes de lechuga, cola de caballo y espino de fuego con y sin clorofilas a un contenido de 0.1% (p/v) a un pH 7.

Bioadsorbente	Con clorofilas	Sin clorofilas
Lechuga	$95 \pm 3$ a	$52 \pm 1$ b
Cola de caballo	$71 \pm 4$ a	$37 \pm 2$ b
Espino de fuego	$60 \pm 5$ a	$53 \pm 2$ a

Media  $\pm$  error estándar. Datos con la misma letra en el mismo renglón, no son significativamente diferentes, Tukey ( $p > 0.05$ ).

### 8.3 Caracterización de los bioadsorbentes y las interacciones con la molécula de AFB<sub>1</sub>

#### 8.3.1 Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier y reflexión total atenuada (FTIR-ATR)

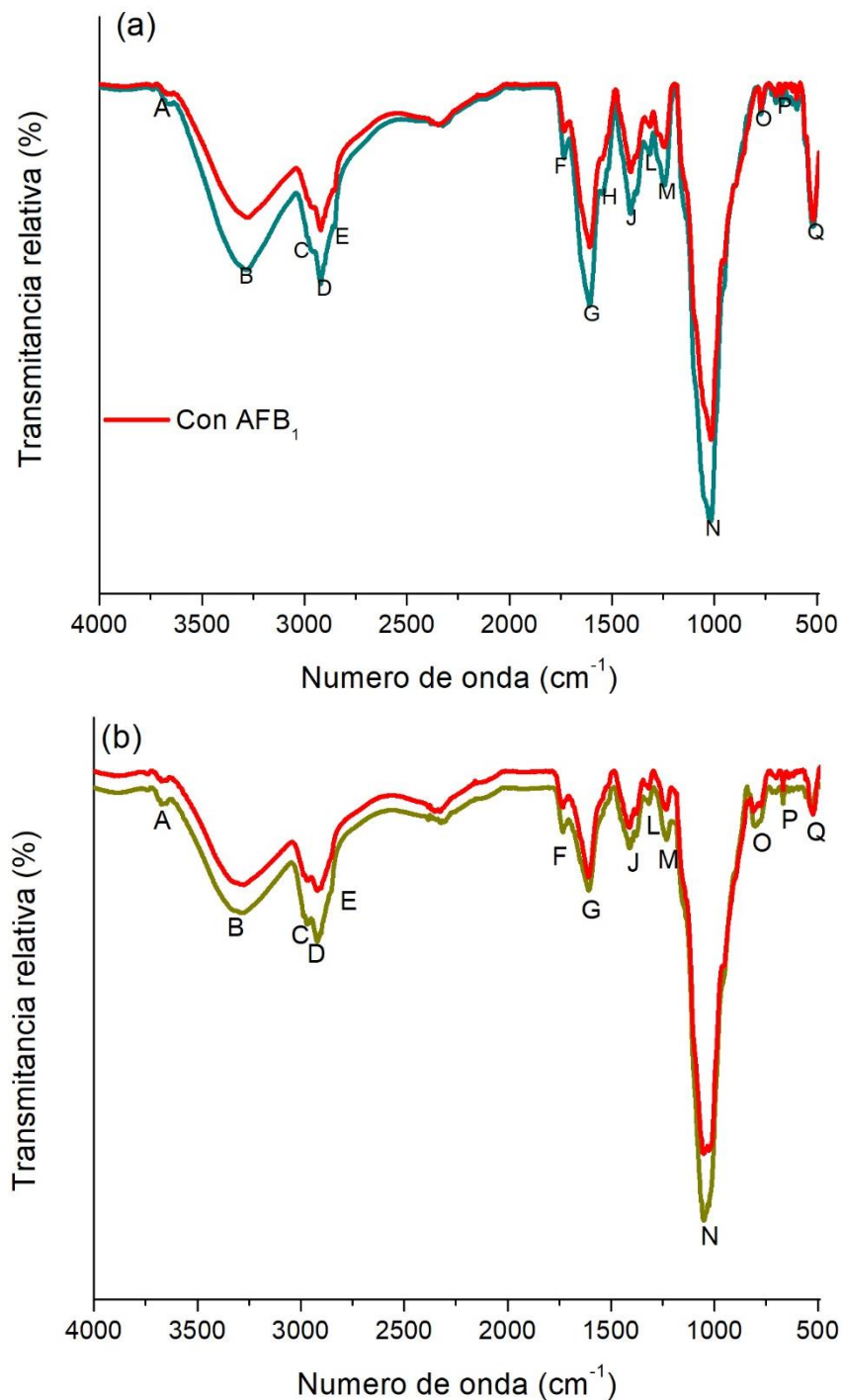
Esta técnica ha demostrado ser fundamental para estudiar y caracterizar diversos materiales, ya que es una técnica no invasiva, rápida, y versátil debido a que se adapta a cualquier tipo de presentación física de la muestra, sin alguna preparación previa y proporciona una gran cantidad de información con una cantidad mínima de muestra (Belfer et al., 2000; Cortez, 2020). En la Figura 17 se muestra la comparación entre los espectros de FTIR-ATR de los bioadsorbentes antes y después de la adsorción de AFB<sub>1</sub>, en donde los porcentajes más altos de transmitancia relativa, se interpretan como menores cantidades de grupos funcionales (Zavala-Franco et al., 2018).

Los espectros FTIR-ATR se recolectaron en un rango de número de onda de 4000-500 cm<sup>-1</sup>. Adicionalmente, en la Tabla 10 se muestran las asignaciones de las bandas de las vibraciones activas de los bioadsorbentes. En general, los tres bioadsorbentes mostraron un comportamiento similar en las vibraciones de sus grupos funcionales y las interacciones entre ellos y la molécula de AFB<sub>1</sub>. En la Figura 17, se observa que los espectros de FTIR-ATR de los tres bioadsorbentes (perfil a, lechuga; perfil b, cola de caballo; y perfil c, espino de fuego) después de la adsorción de AFB<sub>1</sub> presentaron un cambio en las vibraciones de sus grupos funcionales, corriéndose a un número de onda más bajo y disminuyendo significativamente su intensidad. La capacidad de los bioadsorbentes para adsorber AFB<sub>1</sub> estuvo influenciada por las modificaciones de sus espectros, las cuales se atribuyen a que existe una gran interacción entre los grupos funcionales de los bioadsorbentes y la molécula de AFB<sub>1</sub> (Daffalla et al., 2010). Rames-Valderrama et al. (2016) realizaron una investigación, la cual consistió en estudiar la adsorción de aflatoxinas con el bioadsorbente de *Pyracantha*, los autores observaron un cambio importante en la frecuencia espectral y en la intensidad de los espectros FTIR-ATR de la *Pyracantha* después de la interacción con la molécula de aflatoxina, resultados que corresponden con el presente estudio.

En general, se observaron cambios en los espectros de los tres bioadsorbentes en los intervalos de 3674 - 3282 cm<sup>-1</sup> (presencia de grupos OH y vibraciones de estiramiento de los grupos NH), 1733 - 1608 cm<sup>-1</sup> (estiramiento C=O y grupos carboxilato), 1315 cm<sup>-1</sup> (grupos amida) y 1242 - 1027 cm<sup>-1</sup> (estiramiento C-O-P). Zavala-Franco et al. (2018) reportaron que los bioadsorbentes de cáscara de plátano, polvo de aloe y *Pyracantha* contuvieron una alta cantidad de grupos funcionales (hidroxilo, carboxilo, amida, fosfato y

cetona), a los cuales se les atribuyó la efectiva adsorción de aflatoxinas, estos resultados concuerdan con la actual investigación.

Figura 17. Espectro FTIR-ATR de a) lechuga, b) cola de caballo y c) espino de fuego, antes y después de la adsorción de AFB<sub>1</sub>.



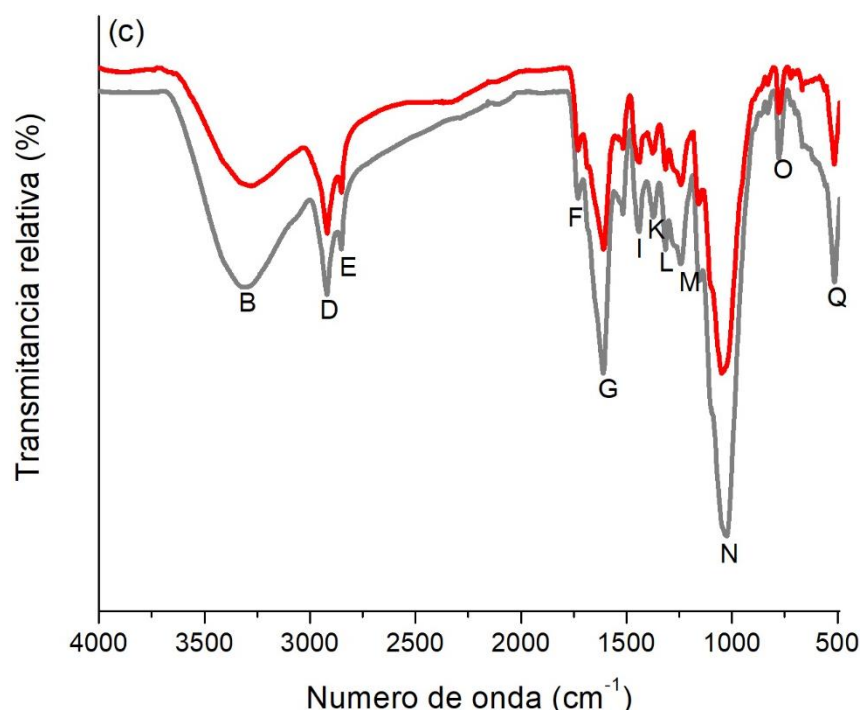


Tabla 10. Asignación de bandas de las vibraciones activas FTIR-ATR de la lechuga, la cola de caballo y el espino de fuego.

Banda	Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )			Grupo funcional y componente bioquímico comúnmente asignado
	Lechuga	Cola de caballo	Espino de fuego	
A	3674	3675	-	Estiramiento O-H
B	3282	3285	3288	Vibraciones de estiramiento N-H (péptido y proteína) estiramiento OH
C	2958	2969	-	Estiramiento asimétrico $\text{CH}_2$ (lípidos)
D	2921	2921	2919	Estiramiento antisimétrico $(\text{CH}_2)_n$ - (lípidos)
E	2850	2850	2851	Estiramiento simétrico C- $\text{CH}_3$ (lípidos)
F	1733	1733	1730	Estiramiento C=O (ésteres de fosfolípidos)

G	1608	1608	1609	COOR (grupo carboxilato)
H	1547	-	-	Deformación de $\text{NH}_3^+$ (aminoácido)
I	-	-	1441	Flexión antisimétrica de $\text{CH}_3$ (lípidos, proteínas) Flexión antisimétrica de $\text{CH}_2$
J	1408	1408	-	Deformación de $-\text{CH}_2$ (celulosa)
K	-	-	1373	$\text{C}-\text{CH}_3$ movimiento, torsión y balanceo simétrico (fosfolípido, ácidos grasos, triglicérido)
L	1315	1315	1315	Balanceo $\text{N}-\text{H}$ , estiramiento $\text{C}-\text{N}$ , balanceo $\text{C}=\text{O}$ , estiramiento, estiramiento $\text{C}-\text{C}$ y estiramiento $\text{CH}_3$ (amida III, péptido, proteína)
M	1242	1230	1243	Estiramiento antisimétrico $\text{PO}_2^-$ (DNA, RNA, fosfolípido, proteína fosforilada)
N	1027	1051	1027	Estiramiento $\text{C}-\text{O}$ (carbohidratos) Estiramiento $\text{C}-\text{O}-\text{P}$ (éster fosfato)
O	773	778	777	Deformación fuera del plano $\text{CH}$
P	699	699	-	Movimiento $\text{NH}_2$ (aminas primarias)
Q	517	519	514	Deformaciones dentro y fuera del plano

Los espectros de FTIR-ATR que reportaron Adunphatcharaphon et al. (2020) de un bioadsorbente originario de la piel de la fruta de durian, concuerdan con los espectros FTIR-ATR obtenidos en el presente estudio. Los investigadores observaron una banda intensa en la región de  $3330 \text{ cm}^{-1}$ , correspondiente al estiramiento  $\text{O}-\text{H}$ , una segunda



banda en la región de  $2917\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente a las vibraciones de estiramiento C – H de los grupos metilo y metileno, otras bandas en las regiones de  $1730\text{ cm}^{-1}$  y  $1622\text{ cm}^{-1}$ , correspondientes al estiramiento C=O y los grupos amida, respectivamente. El rango de las bandas que van desde  $1500\text{ cm}^{-1}$  a  $1200\text{ cm}^{-1}$ , correspondieron a los grupos carboxílicos asimétricos, grupos metilo, aminas aromáticas y estiramiento C – O de los ácidos carboxílicos. Daffalla et al. (2010) realizaron un experimento con un adsorbente desarrollado a partir de la cáscara de arroz, los autores reportaron sus espectros FTIR, en los cuales, ciertas bandas concuerdan con nuestros hallazgos, teniendo que en la región de  $1641\text{ cm}^{-1} - 1737\text{ cm}^{-1}$ , corresponden al estiramiento C=O que pueden atribuirse a las hemicelulosas y ligninas.

Los principales componentes de los materiales vegetales son proteínas, aminoácidos, amidas, aminas, nitritos, nitratos, carbohidratos (almidón, azúcar, celulosa, hemicelulosas y lignina), lípidos y muchos más compuestos como los fitoquímicos (terpenoides, fenólicos y alcaloides) (Ramales-Valderrama et al., 2016). Estos grupos funcionales, la mayoría de carga negativa, suelen estar presentes en los bioadsorbentes a base lechuga, cola de caballo y espino de fuego, por lo que son considerados como los principales responsables del proceso de adsorción de AFB<sub>1</sub>.

### 8.3.2 Espectroscopia UV-Vis de reflectancia difusa

La técnica de espectroscopia UV-Vis de reflectancia difusa es utilizada con frecuencia para la caracterización de los materiales debido a que es una herramienta rentable y rápida para conocer la cantidad de pigmentos existentes en los biomateriales (Duppeti et al., 2017). Los bioadsorbentes son ricos en pigmentos como la clorofila, los carotenoides y las antocianinas, los cuales son fácilmente detectados con esta prueba, la cual da un espectro con las bandas de absorbancia correspondientes a los pigmentos.

En las Figuras 18, 19 y 20 se observan los espectros de la lechuga, la cola de caballo y el espino de fuego, respectivamente, después de emplear la función de Kubelka-Munk, esto con el objetivo de mejorar la absorción y la dispersión de la luz por parte de las partículas sólidas. Los espectros se colectaron en un rango de número de onda de 200-800 nm. Las regiones de 677 nm y 650 nm, corresponden a la clorofila *a* y la clorofila *b*, respectivamente; la región de 425 a 485 nm, corresponde a los carotenoides y la región de 350 a 730 nm corresponde a las antocianinas (Zavala-Franco et al., 2018).

En general, en los adsorbentes de cola de caballo y espino de fuego se observó un pico de absorción intenso en los 677 nm (clorofila *a*) y un pico de absorción poco observable en

los 650 nm (clorofila *b*); sin embargo, en el espectro de la lechuga, el pico de absorción correspondiente a la clorofila *a* fue difícilmente observable y el pico correspondiente a la clorofila *b*, no se observó. Además, en la región azul de 425 nm a 485 nm se observó un pico ligeramente visible en los tres bioadsorbentes, el cual corresponde a los carotenoides. Dado a que la reflectancia espectral varía inversamente con el contenido del pigmento (Duppeti et al., 2017), el bioadsorbente que contiene mayor cantidad de clorofila es la lechuga, seguida por el espino de fuego y finalmente, por la cola de caballo. Estos hallazgos concuerdan con lo reportado por Merzlyak et al. (2003) quienes investigaron las propiedades espectrales de reflectancia de cinco cultivares de manzana. En los espectros se observó que, conforme existía un aumento en el contenido de clorofila, la reflectancia a 678 nm (clorofila *a*) y a 650 (clorofila *b*) se redujo significativamente. En la región azul, donde absorben tanto las clorofilas como los carotenoides, la reflectancia de la manzana fue baja, especialmente aquellas con un contenido alto de clorofilas.

Figura 18. Espectro de reflectancia difusa UV-Vis de bioadsorbente a base de lechuga.

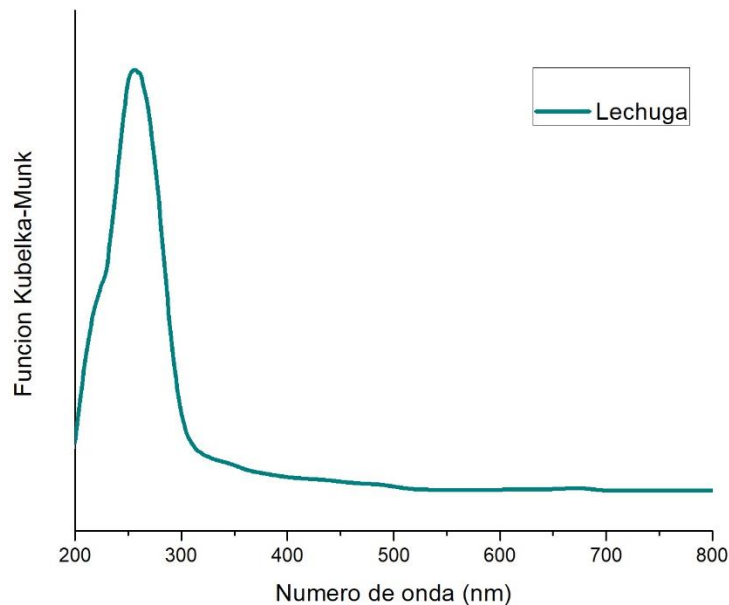


Figura 19. Espectro de reflectancia difusa UV-Vis de bioadsorbente a base de cola de caballo.

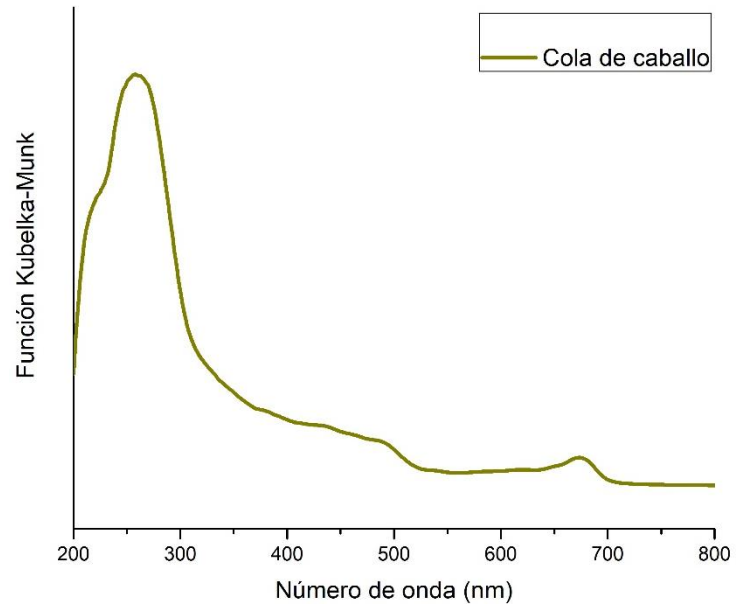
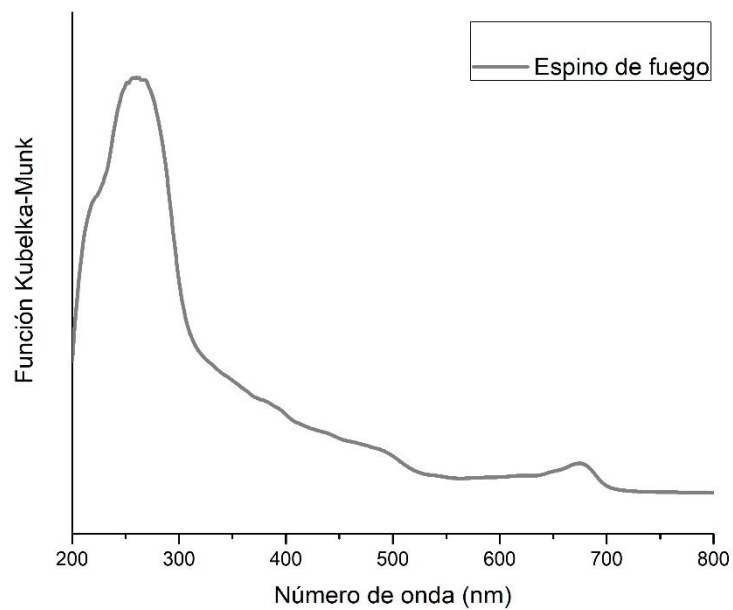


Figura 20. Espectro de reflectancia difusa UV-Vis de bioadsorbente a base de espino de fuego.

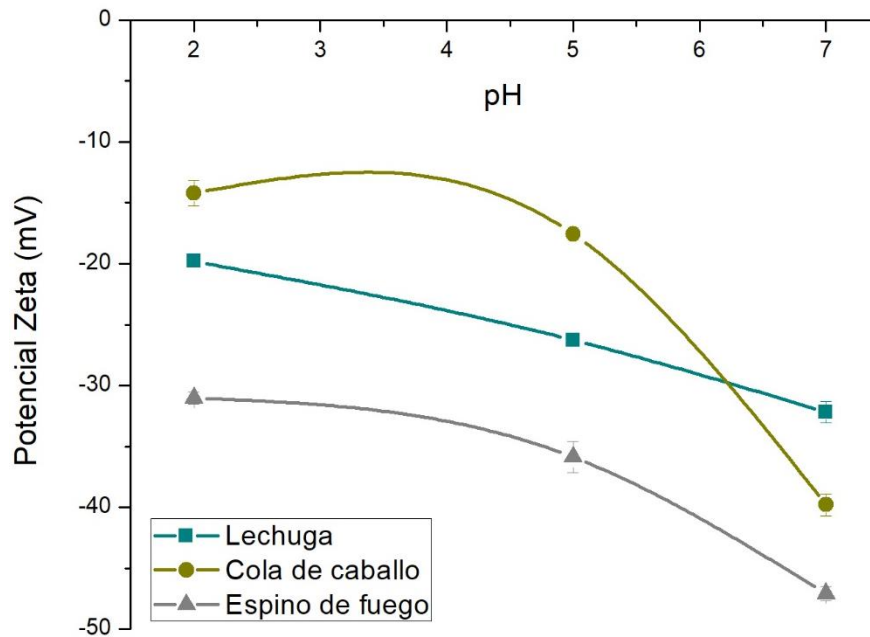


### 8.3.3 Potencial zeta ( $\zeta$ ) y movilidad electroforética

El potencial zeta es una técnica que se utiliza para la medición del potencial electrostático en la doble capa eléctrica que rodea una partícula en suspensión. Las partículas con potenciales zeta entre los -10 mV y +10 mV son consideradas neutras, las de más de +30 mV se consideran fuertemente catiónicas y las de menos de -30 mV se consideran fuertemente aniónicas (Clogston and Patri, 2011).

En la Figura 21 se puede observar el comportamiento del potencial zeta de los tres bioadsorbentes a los tres diferentes valores de pH (2, 5 y 7). Conforme el valor del pH aumentó, los valores del potencial zeta se fueron haciendo más negativos. Se ha reportado que, tanto la carga superficial como las condiciones ambientales, influyen significativamente en el potencial zeta (Zavala-Franco et al., 2018).

Figura 21. Relación entre el potencial zeta y el pH de los bioadsorbentes de lechuga, cola de caballo y espino de fuego.

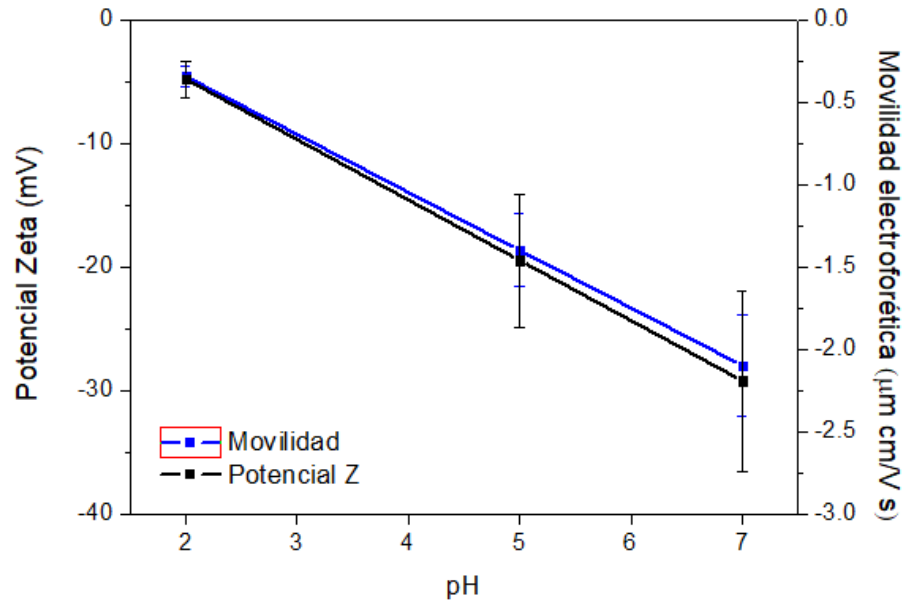


En general, cuando los bioadsorbentes se encontraron en un pH de 2, su potencial zeta fue de  $-14 \pm 1.8$  mV,  $-20 \pm 0.7$  mV y  $-31 \pm 0.9$  mV para la cola de caballo, la lechuga y el espino de fuego, respectivamente. Cuando los bioadsorbentes se encontraron en un pH de 5, su potencial zeta se recorrió a un valor más negativo, en comparación con el pH 2. Finalmente, cuando los bioadsorbente se encontraron en un pH de 7, su potencial zeta fue de  $-32 \pm 1.5$  mV para la cola de caballo,  $-40 \pm 1.5$  mV para la lechuga y  $-47 \pm 1$  mV para el espino de fuego. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Zavala-Franco et al. (2018), quienes informaron que el potencial zeta de la cáscara de plátano, el espino de fuego y el aloe aumentaron significativamente su valor al aumentar el pH de la solución, alcanzando el valor máximo de potencial zeta en un pH de 6.7 de  $-17$  mV aproximadamente para el aloe,  $-12.7$  mV para la cáscara de plátano y  $-20.9$  mV para el espino de fuego. Adicionalmente, Akar et al. (2010) reportaron un fenómeno idéntico, en el cual, observaron que el potencial zeta de la biomasa de *Pyracantha coccinea* se modificó al aumentar el pH, dando como resultado los valores de potencial zeta de  $-16.30$  mV a  $-20.80$  mV cuando el pH cambió de 4 a 9.

Bajo estas circunstancias, la superficie de los bioadsorbentes a pH 7 es altamente negativa, por lo que, al ser la AFB<sub>1</sub> una molécula polar, su adsorción en este valor de pH resulta ser la más eficaz debido a las fuerzas electrostáticas entre la AFB<sub>1</sub> y el bioadsorbente, en comparación con los otros dos pHs evaluados.

Las partículas tienen una carga externa, cuando éstas se exponen a un campo eléctrico externo, éstas migrarán hacia el electrodo de carga opuesta a una cierta velocidad llamada movilidad electroforética (Ramales-Valderrama et al., 2016). En este trabajo, se llevó a cabo un experimento de potencial zeta y movilidad electroforética con la molécula de AFB<sub>1</sub> a los tres valores de pH (2, 5 y 7). Se observó que la movilidad electroforética depende fuertemente de la acidez de la fase acuosa, además de que su magnitud es significativamente mayor para las moléculas de AFB<sub>1</sub> a pH 7 ( $-28 \pm 4$  mV) (Figura 22). Estos hallazgos son similares con los reportados por Adunphatcharaphon et al. (2020), quienes reportaron que el potencial zeta del bioadsorbente de la piel de durian a pH 3 tuvo un valor de  $-2.55$  mV, mientras que, el bioadsorbente de la piel de durian tratado con ácido, obtuvo un potencial zeta más negativo ( $-23.2$  mV). Por lo que, en la presente investigación se puede afirmar que alrededor de la superficie de la AFB<sub>1</sub> hay una capa de iones que tienen una carga opuesta (negativa) a su superficie, por ende, considerando que la AFB<sub>1</sub> tiene una densidad de carga positiva en la superficie a pH 7, las adsorciones más altas de esta molécula, se registraron en este valor.

Figura 22. Movilidad electroforética y el potencial zeta de la molécula de AFB<sub>1</sub> en función del pH.



### 8.3.4 Punto de carga cero (pH<sub>pzc</sub>)

El pH del medio puede afectar la carga superficial de los adsorbentes, así como el grado de ionización de las toxinas (Greco et al., 2019). El punto de carga cero (pH<sub>pzc</sub>), es una técnica que permite caracterizar la superficie de un material – en este caso los bioadsorbentes – para establecer su capacidad adsorbente (Villa, 2013).

La determinación del punto de carga cero (pH<sub>pzc</sub>) se realizó desarrollando dos tipos de metodologías: la primera consistió en utilizar agua destilada, la cual se ajustó al pH requerido en un rango que fue desde 1.5 hasta 11.5 con la adición de HCl (0.1 M) o NaOH (0.1 M), y la segunda consistió en la utilización de los buffers (pH 2, 5 y 7). El pH<sub>pzc</sub> resultante de ambas metodologías, se calculó graficando el ΔpH contra el valor del pH inicial (pH<sub>i</sub>) de cada solución. El punto donde la línea cruza el eje x representó el pH<sub>pzc</sub> del bioadsorbente, por lo tanto, los bioadsorbentes en ese pH presentan un equilibrio en sus cargas, es decir, el mismo número de sitios positivos que negativos en su superficie. Cuando los bioadsorbentes están en un pH menor al de su pH<sub>pzc</sub>, su carga superficial es positiva, por el contrario, si los bioadsorbentes están en un pH mayor al de su pH<sub>pzc</sub>, su carga superficial es negativa (Shar et al., 2016).

En la Figura 23 se observa el  $pH_{pzc}$  de los tres bioadsorbentes con el experimento del pH ajustado en agua destilada; en el caso de la lechuga, la curva cruza el eje x en un valor de pH de 5.61, en el caso de cola de caballo, el valor de  $pH_{pzc}$  fue de 5.81 y finalmente, 5.50 para el espino de fuego. En la Figura 24 se observa el  $pH_{pzc}$  de los tres bioadsorbentes con el experimento de los buffers; las curvas de la lechuga, la cola de caballo y el espino de fuego cruzaron el eje x en los valores de pH de 5.65, 5.69 y 5.62, respectivamente. Zavala-Franco et al. (2018) reportaron que el punto de carga cero de los bioadsorbentes del aloe, las hojas del espino de fuego y la cáscara de plátano fueron en los valores de pH de 4.1, 4.5 y 6.7, respectivamente. Por lo que los autores concluyeron que la carga superficial de los bioadsorbentes a estos valores de pH está en equilibrio.

En general, los tres bioadsorbentes presentaron una carga positiva cuando se encontraron en un pH menor a 5.6 y una carga negativa cuando éstos se encontraron en un pH mayor a 5.7. En consecuencia, en este estudio, los bioadsorbentes tuvieron una carga positiva alta en el valor de pH del buche (5) y del proventrículo (2), y una carga negativa alta en el valor de pH del intestino (7); por lo tanto, tomando en cuenta que la molécula de  $AFB_1$  es de carga positiva, se espera que los bioadsorbentes tengan una adsorción mínima en las primeras dos secciones del TGI y una adsorción significativa en la sección del intestino.

Figura 23. Punto de carga cero ( $pH_{pzc}$ ) de la lechuga, la cola de caballo y el espino de fuego en agua destilada.

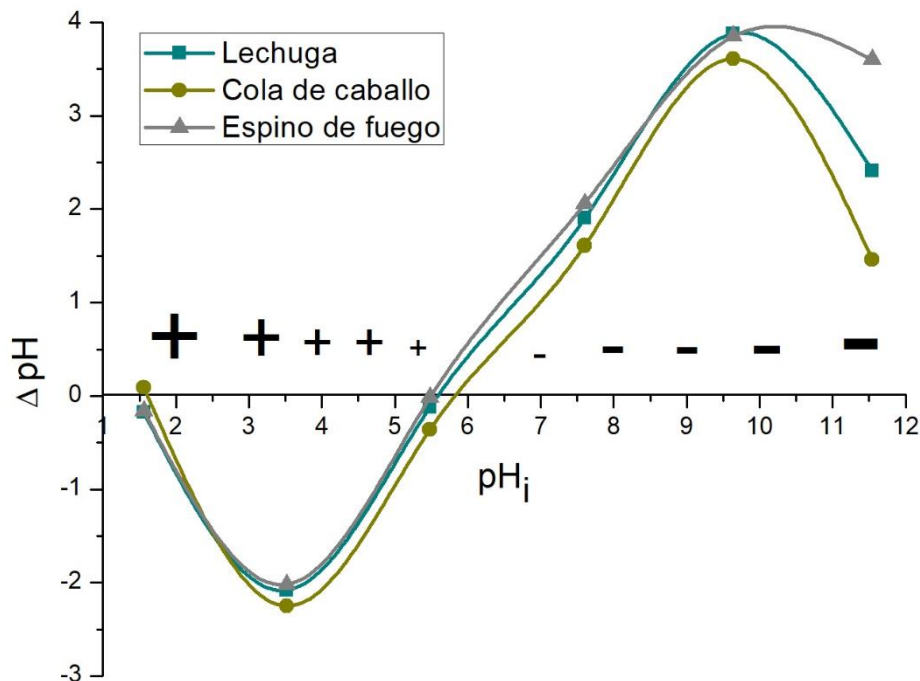
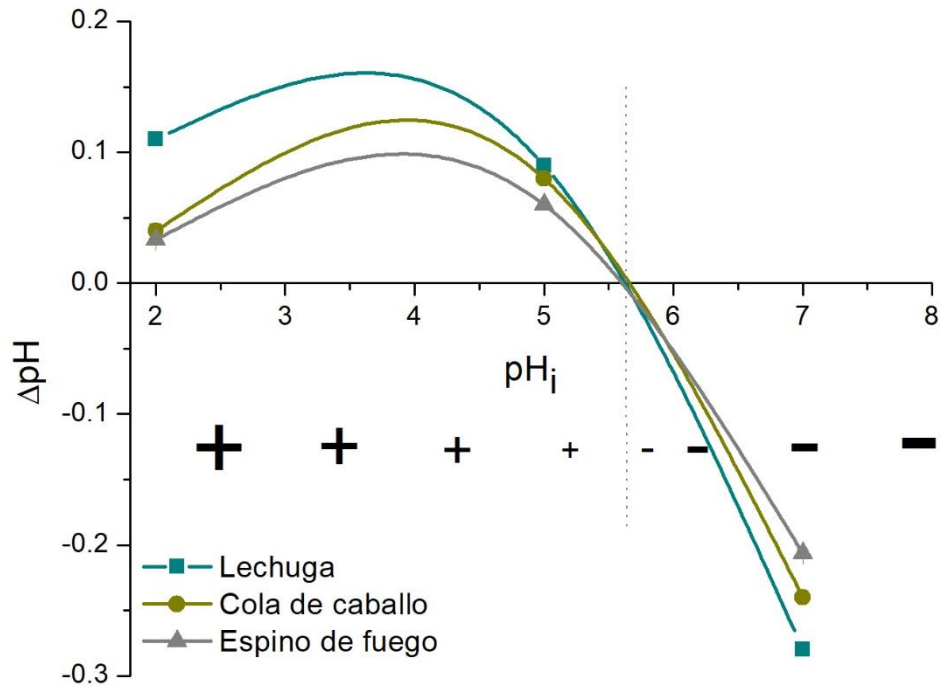


Figura 24. Punto de carga cero ( $\text{pH}_{\text{pzc}}$ ) de la lechuga, la cola de caballo y el espino de fuego en buffers con valores de pH de 2, 5 y 7.





## 9. Conclusiones

La capacidad máxima de adsorción de AFB<sub>1</sub> fue con la utilización de los tres bioadsorbentes a un contenido de 0.5% (p/v), en comparación con el contenido más bajo (0.1%, p/v). Además, se pudo observar que, con ambos porcentajes de inclusión, a un pH de 7, la adsorción de AFB<sub>1</sub> fue mejor en comparación con el obtenido a valores de pH de 2 y 5, respectivamente. Se demostró que la lechuga es un biomaterial muy eficaz contra la adsorción de AFB<sub>1</sub> en contenidos bajos (0.1% p/v) a un pH de 7 (sección intestinal). Complementariamente, los resultados de los experimentos de adsorción con los bioadsorbentes sin clorofilas, demostraron que la clorofila juega un papel importante en la adsorción de la AFB<sub>1</sub>. La lechuga presentó los contenidos más altos de clorofila, en comparación con la cola de caballo y el espino de fuego. Esta determinación se realizó mediante las técnicas de espectroscopía UV-Vis de reflectancia difusa y la extracción de las mismas mediante el uso de etanol al 96%. En todos los casos, la adsorción de AFB<sub>1</sub> fue significativamente menor con los bioadsorbentes sin clorofilas, en comparación con los bioadsorbentes con clorofilas en un pH de 7 y con un contenido de bioadsorbentes de 0.1% (p/v). Estos hallazgos soportan la idea de que la adsorción también surge por el atrapamiento de la molécula de AFB<sub>1</sub> por las clorofilas a través de la formación del complejo clorofila-AFB<sub>1</sub> mediante interacciones electrostáticas y/o puentes de hidrógeno.

La caracterización de los bioadsorbentes permitió conocer el tipo de interacciones entre ellos y la molécula de AFB<sub>1</sub>. En cuanto a los resultados obtenidos por la espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier con reflexión total atenuada (FTIR-ATR), se concluyó que cualquier cambio en las vibraciones y en la intensidad de la transmitancia de los grupos funcionales, se suele correlacionar con una interacción entre la molécula de AFB<sub>1</sub> y los grupos funcionales de los bioadsorbentes, esto se debe a que los grupos funcionales, principalmente los grupos hidroxilo, carboxilo y carboxilato, amida y fosfato están cargados electronegativamente, por lo que, esto les da la capacidad de atraer a la molécula de AFB<sub>1</sub> debido a la interacción entre sus cargas eléctricas.

Se observó que el potencial zeta es afectado directamente por el pH, por lo que se concluyó que a un pH mayor, los bioadsorbentes tendrán una carga superficial negativa; aunado a esto, se pudo concluir con la técnica de movilidad electroforética que, la molécula de AFB<sub>1</sub> tiene una densidad de carga altamente positiva a un valor de pH de 7, por ende, se determinó que la adsorción de AFB<sub>1</sub> resulta ser más eficaz a pH neutro. Adicionalmente, mientras menor fue el pH<sub>pzc</sub> de los bioadsorbentes, la adsorción de AFB<sub>1</sub> fue más eficaz, esto debido a que en valores de pHs mayores al pH<sub>pzc</sub> la superficie de los bioadsorbentes estuvieron cargadas negativamente por lo que, en este caso, se observó que la adsorción de AFB<sub>1</sub> fue mejor en los valores de pH mayores a 5.6, como es el caso de

la sección intestinal de las aves (pH 7). Estos resultados permiten esclarecer la idea de que existe otro tipo interacciones entre los bioadsorbentes y la molécula de AFB<sub>1</sub>, principalmente de naturaleza electrostática. Señalando que la AFB<sub>1</sub> es una molécula polar positiva, su interacción electrostática con los bioadsorbentes es mejor cuando la superficie de estos está cargada negativamente.

Por lo que se dilucidó que la sobresaliente adsorción de AFB<sub>1</sub> por parte del bioadsorbente de lechuga se basa en un conjunto de interacciones entre la molécula de AFB<sub>1</sub> y el bioadsorbente por medio de interacciones fisicoquímicas como las electrostáticas, los enlaces  $\pi - \pi$  entre los orbitales, los puentes de hidrógeno y la formación del complejo clorofila-AFB<sub>1</sub>.

## 10. Perspectivas

Se considera necesario ampliar la caracterización de los bioadsorbentes mediante técnicas complementarias como: la microscopía electrónica de barrido (MEB) con la cual se es posible analizar la microestructura y morfología de la superficie de los biomateriales, el análisis de espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS) técnica de microanálisis químico que permite conocer los principales elementos contenidos en un biomaterial, el análisis de difracción de rayos X (DRX) técnica que permite conocer el índice de cristalinidad de diversos materiales. Además del análisis del tamaño de partícula técnica en la que se ha observado que, generalmente los bioadsorbentes con tamaño de partícula menores, son los más eficaces en la adsorción de AFB<sub>1</sub>, y finalmente la realización de isotermas de adsorción, la cual nos permite conocer con más precisión la tasa de adsorción de la AFB<sub>1</sub> en un periodo de tiempo y una temperatura determinados.

Es importante que, además de realizar estudios *in vitro* que simulen algunas condiciones del TGI de las aves (pH, temperatura y velocidad de tránsito intestinal), se evalúe el efecto de los bioadsorbentes en un modelo de digestión *in vitro* dinámico debido a que esta metodología es aplicable directamente en las aves, ya que utiliza actividades enzimáticas y condiciones fisiológicas similares al del modelo *in vivo*.

Es necesario que los bioadsorbentes sean probados con bajos niveles de inclusión (hasta 0.5%, p/v) en un modelo *in vivo* para demostrar su idoneidad para aliviar los efectos tóxicos de la AFB<sub>1</sub>, sin comprometer la biodisponibilidad de los micronutrientes de la dieta, mediante la determinación de los parámetros productivos, la bioquímica sanguínea, la histología, y la integridad intestinal.

Por último, es imprescindible continuar con el estudio de diversos subproductos agrícolas que se caractericen por tener una estructura porosa, con mayores cantidades de clorofilas y una amplia variedad de grupos funcionales (hidroxilo, carboxilo y carboxilato, amida y fosfato), debido a que se demostró que los bioadsorbentes con mayor cantidad de clorofilas y numerosos grupos funcionales con carga negativa son los más eficaces para la adsorción de AFB<sub>1</sub>.

## 11. Referencias

- ABBAS, H., WILKINSON, J., ZABLOTOWICZ, R., ACCINELLI, C., ABEL, C., BRUNS, H. & WEAVER, M. 2009. Ecology of *Aspergillus flavus*, regulation of aflatoxin production, and management strategies to reduce aflatoxin contamination of corn. *Toxin Reviews*, 28, 142-153.
- ABBAS, H. K., ACCINELLI, C., ZABLOTOWICZ, R. M., ABEL, C. A., BRUNS, H. A., DONG, Y. & SHIER, W. T. 2008. Dynamics of mycotoxin and *Aspergillus flavus* levels in aging Bt and non-Bt corn residues under Mississippi no-till conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 7578-7585.
- ADAMS, C. A. Nutricines in poultry production: focus on bioactive feed ingredients. *Nutrition Abstracts and Reviews. Series B, Livestock Feeds and Feeding*, 2004. Vol. 74. No. 6. CAB International.
- ADUNPHATCHARAPHON, S., PETCHKONGKAEW, A., GRECO, D., D'ASCANIO, V., VISESSANGUAN, W. & AVANTAGGIATO, G. 2020. The Effectiveness of Durian Peel as a Multi-Mycotoxin Adsorbent. *Toxins*, 12, 108.
- AGÜERO, M., BARG, M., YOMMI, A., CAMELO, A. & ROURA, S. 2008. Postharvest changes in water status and chlorophyll content of lettuce (*Lactuca sativa* L.) and their relationship with overall visual quality. *Journal of Food Science*, 73, S47-S55.
- AKAR, T., ANILAN, B., GORGULU, A. & AKAR, S. T. 2009. Assessment of cationic dye biosorption characteristics of untreated and non-conventional biomass: *Pyracantha coccinea* berries. *Journal of Hazardous Materials*, 168, 1302-1309.
- AKAR, T., CELIK, S. & AKAR, S. T. 2010. Biosorption performance of surface modified biomass obtained from *Pyracantha coccinea* for the decolorization of dye contaminated solutions. *Chemical Engineering Journal*, 160, 466-472.
- AL-SNAFI, A. E. 2017. The pharmacology of *Equisetum arvense*-A review. *IOSR Journal of Pharmacy*, 7, 31-42.
- ANDRADE, P. & CALDAS, E. 2015. Aflatoxins in cereals: worldwide occurrence and dietary risk assessment. *World Mycotoxin Journal*, 8, 415-431.
- ARI, A. G. & CELIK, S. 2013. Biosorption potential of Orange G dye by modified *Pyracantha coccinea*: Batch and dynamic flow system applications. *Chemical Engineering Journal*, 226, 263-270.
- ARIMOTO, S., FUKUOKA, S., ITOME, C., NAKANO, H., RAI, H. & HAYATSU, H. 1993. Binding of polycyclic planar mutagens to chlorophyllin resulting in inhibition of the mutagenic activity. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 287, 293-305.
- AVANTAGGIATO, G., GRECO, D., DAMASCELLI, A., SOLFRIZZO, M. & VISCONTI, A. 2014. Assessment of multi-mycotoxin adsorption efficacy of grape pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 497-507.
- BBOSA, G. S., KITYA, D., ODDA, J. & OGWAL-OKENG, J. 2013. Aflatoxins metabolism, effects on epigenetic mechanisms and their role in carcinogenesis. *Health*, 2013.
- BEJARANO RODRÍGUEZ, R. J. & CENTENO BRICEÑO, S. J. 2009. Extracto de Citrus limon para el control de aflatoxinas y hongos aflatoxigénicos en alimentos concentrados para pollos de engorde producidos en Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29, 57-61.

- BELFER, S., FAINCHTAIN, R., PURINSON, Y. & KEDEM, O. 2000. Surface characterization by FTIR-ATR spectroscopy of polyethersulfone membranes-unmodified, modified and protein fouled. *Journal of Membrane Science*, 172, 113-124.
- BHAT, R., RAI, R. V. & KARIM, A. A. 2010. Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 57-81.
- BHATNAGAR, D., RAJASEKARAN, K., GILBERT, M., CARY, J. & MAGAN, N. 2018. Advances in molecular and genomic research to safeguard food and feed supply from aflatoxin contamination. *World Mycotoxin Journal*, 11, 47-72.
- BOČAROV-STANČIĆ, A., LOPIČIĆ, Z. R., BODROŽA-SOLAROV, M. I., STANKOVIĆ, S., JANKOVIĆ, S., MILOJKOVIĆ, J. V. & KRULJ, J. A. 2018. In vitro removing of mycotoxins by using different inorganic adsorbents and organic waste materials from Serbia. *Food and Feed Research*, 45, 87-96.
- BOUDERGUE, C., BUREL, C., DRAGACCI, S., FAVROT, M. C., FREMY, J. M., MASSIMI, C., PRIGENT, P., DEBONGNIE, P., PUSSEMIER, L. & BOUDRA, H. 2009. Review of mycotoxin-detoxifying agents used as feed additives: mode of action, efficacy and feed/food safety. *EFSA Supporting Publications*, 6, 22E.
- BRINDA, R., VIJAYANANDRAJ, S., UMA, D., MALATHI, D., PARANIDHARAN, V. & VELAZHAHAN, R. 2013. Role of *Adhatoda vasica* (L.) Nees leaf extract in the prevention of aflatoxin-induced toxicity in Wistar rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 2743-2748.
- BRYDEN, W. L. 2012. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Animal Feed Science and Technology*, 173, 134-158.
- BUENO, D. J., SALVANO, M., SILVA, J. O., GONZÁLEZ, S. N. & OLIVER, G. 2001. Micotoxinas: diagnóstico y prevención en aves de corral. *Boletín Micológico*, 16.
- CAMPAGNOLLO, F. B., GANEV, K. C., KHANEGHAH, A. M., PORTELA, J. B., CRUZ, A. G., GRANATO, D., CORASSIN, C. H., OLIVEIRA, C. A. F. & SANT'ANA, A. S. 2016. The occurrence and effect of unit operations for dairy products processing on the fate of aflatoxin M<sub>1</sub>: A review. *Food Control*, 68, 310-329.
- CARVAJAL, M. 2013. Transformación de la aflatoxina B<sub>1</sub> de alimentos, en el cancerígeno humano, aducto AFB<sub>1</sub>-ADN. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 16, 109-120.
- CASTEGNARO, M., FRIESEN, M., MICHELON, J. & WALKER, E. A. 1981. Problems related to the use of sodium hypochlorite in the detoxification of aflatoxin B<sub>1</sub>. *American Industrial Hygiene Association Journal*, 42, 398-401.
- CASTILLO URUETA, P. & DURÁN DE BAZÚA, C. 2005. Las micotoxinas Metabolitos secundarios de los hongos filamentosos. *Educación Química*, 17, 122-129.
- CHU, Y.-F., SUN, J., WU, X. & LIU, R. H. 2002. Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6910-6916.
- CLOGSTON, J. D. & PATRI, A. K. 2011. Zeta potential measurement. *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery*. Springer.
- CORTÉS-SÁNCHEZ, A. D. J. & MOSQUEDA-OLIVARES, T. 2013. Una mirada a los organismos fúngicos: Fábricas versátiles de diversos metabolitos secundarios de interés biotecnológico. *Química Viva*, 12, 64-90.
- DAFFALLA, S. B., MUKHTAR, H. & SHAHARUN, M. S. 2010. Characterization of adsorbent developed from rice husk: effect of surface functional group on phenol adsorption. *Journal of Applied Sciences*. 10, 50-58.
- DE VRIES, I. 1997. Origin and domestication of *Lactuca sativa* L. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 44, 165-174.

- DENLI, M. & PÉREZ, J. F. 2006. Contaminación por micotoxinas en los piensos: efectos, tratamiento y prevención. *XXII Curso de Especialización FEDNA*, 1-18.
- DHAKAL, A. & SBAR, E. 2020. Aflatoxin Toxicity. *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.
- DI GREGORIO, M. C., NEEFF, D. V. D., JAGER, A. V., CORASSIN, C. H., CARÃO, Á. C. D. P., ALBUQUERQUE, R. D., AZEVEDO, A. C. D. & OLIVEIRA, C. A. F. 2014. Mineral adsorbents for prevention of mycotoxins in animal feeds. *Toxin Reviews*, 33, 125-135.
- DIAZ, D. E. 2008. A review on the use of mycotoxin sequestering agents in agricultural livestock production. *Food Contaminants*. 125-150.
- DO, J. H. & CHOI, D.-K. 2007. Aflatoxins: detection, toxicity, and biosynthesis. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 12, 585-593.
- DUPPETI, H., CHAKRABORTY, S., DAS, B. S., MALLICK, N. & KOTAMREDDY, J. 2017. Rapid assessment of algal biomass and pigment contents using diffuse reflectance spectroscopy and chemometrics. *Algal Research*, 27, 274-285.
- ESTRADA-URBINA, J., CRUZ-ALONSO, A., SANTANDER-GONZÁLEZ, M., MÉNDEZ-ALBORES, A. & VÁZQUEZ-DURÁN, A. 2018. Nanoscale zinc oxide particles for improving the physiological and sanitary quality of a Mexican landrace of red maize. *Nanomaterials*, 8, 247.
- FERNANDES, J.-M., CALADO, T., GUIMARÃES, A., RODRIGUES, M. A. M. & ABRUNHOSA, L. 2019. In vitro adsorption of aflatoxin B<sub>1</sub>, ochratoxin A, and zearalenone by micronized grape stems and olive pomace in buffer solutions. *Mycotoxin Research*, 35, 243-252.
- FERNANDEZ, A., VERDE, M., GOMEZ, J., GASCON, M. & RAMOS, J. 1995. Changes in the prothrombin time, haematology and serum proteins during experimental aflatoxicosis in hens and broiler chickens. *Research in Veterinary Science*, 58, 119-122.
- FRISVAD, J. C., HUBKA, V., EZEKIEL, C., HONG, S.-B., NOVÁKOVÁ, A., CHEN, A., ARZANLOU, M., LARSEN, T., SKLENÁŘ, F. & MAHAKARNCHANAKUL, W. 2019. Taxonomy of Aspergillus section Flavi and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. *Studies in Mycology*, 93, 1-63.
- GALLO, A., GIUBERTI, G., FRISVAD, J. C., BERTUZZI, T. & NIELSEN, K. F. 2015. Review on mycotoxin issues in ruminants: Occurrence in forages, effects of mycotoxin ingestion on health status and animal performance and practical strategies to counteract their negative effects. *Toxins*, 7, 3057-3111.
- GALVANO, F., PIVA, A., RITIENI, A. & GALVANO, G. 2001. Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins: a review. *Journal of Food Protection*, 64, 120-131.
- GRECO, D., D'ASCANIO, V., SANTOVITO, E., LOGRIECO, A. F. & AVANTAGGIATO, G. 2019. Comparative efficacy of agricultural by-products in sequestering mycotoxins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99, 1623-1634.
- GHAHRI, H., HABIBIAN, R. & FAM, M. A. 2010. Evaluation of the efficacy of esterified glucomannan, sodium bentonite, and humic acid to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broilers. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 34, 385-391.
- GIL-SERNA, J., VÁZQUEZ, C. & PATIÑO, B. 2019. Genetic regulation of aflatoxin, ochratoxin A, trichothecene, and fumonisin biosynthesis: A review. *International Microbiology*, 1-8.
- GIMENO, A. & MARTINS, M. L. 2011. Micotoxinas y micotoxicosis en animales y humanos. *Special Nutrients, Florida*, 50-53.
- GÓMEZ-ESPINOSA, D., CERVANTES-AGUILAR, F. J., RÍO-GARCÍA, D., CARLOS, J., VILLARREAL-BARAJAS, T., VÁZQUEZ-DURÁN, A. & MÉNDEZ-ALBORES, A. 2017. Ameliorative effects of neutral electrolyzed water on growth performance, biochemical constituents, and histopathological changes in turkey poults during aflatoxicosis. *Toxins*, 9, 104.

- GOWDA, N., SUGANTHI, R., MALATHI, V. & RAGHAVENDRA, A. 2007. Utilization of dietary minerals and blood biochemical values in lambs fed hydrated sodium calcium aluminosilicate sorbent material at supplementary level. *Small Ruminant Research*, 69, 17-22.
- GRECO, D., D'ASCANIO, V., SANTOVITO, E., LOGRIECO, A. F. & AVANTAGGIATO, G. 2019. Comparative efficacy of agricultural by-products in sequestering mycotoxins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99, 1623-1634.
- GRENIER, B. & OSWALD, I. 2011. Mycotoxin co-contamination of food and feed: meta-analysis of publications describing toxicological interactions. *World Mycotoxin Journal*, 4, 285-313.
- HAJARE, S. S., HAJARE, S. N. & SHARMA, A. 2005. Aflatoxin inactivation using aqueous extract of ajowan (*Trachyspermum ammi*) seeds. *Journal of Food Science*, 70, C29-C34.
- HE, J., ZHOU, T., YOUNG, J. C., BOLAND, G. J. & SCOTT, P. M. 2010. Chemical and biological transformations for detoxification of trichothecene mycotoxins in human and animal food chains: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21, 67-76.
- HOLZHÜTER, G., NARAYANAN, K. & GERBER, T. 2003. Structure of silica in *Equisetum arvense*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 376, 512-517.
- HUSSAIN, Z., KHAN, M. Z., KHAN, A., JAVED, I., SALEEMI, M. K., MAHMOOD, S. & ASI, M. R. 2010. Residues of aflatoxin B<sub>1</sub> in broiler meat: Effect of age and dietary aflatoxin B<sub>1</sub> levels. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 3304-3307.
- HUWIG, A., FREIMUND, S., KÄPPELI, O. & DUTLER, H. 2001. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicology Letters*, 122, 179-188.
- IARC 1995. IARC activities in mycotoxin research. *Natural Toxins*, 3, 327-331.
- JARD, G., LIBOZ, T., MATHIEU, F., GUYONVARCH, A. & LEBRIHI, A. 2011. Review of mycotoxin reduction in food and feed: from prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 28, 1590-1609.
- JARDON-XICOTENCATL, S., DÍAZ-TORRES, R., MARROQUÍN-CARDONA, A., VILLARREAL-BARAJAS, T. & MÉNDEZ-ALBORES, A. 2015. Detoxification of aflatoxin-contaminated maize by neutral electrolyzed oxidizing water. *Toxins*, 7, 4294-4314.
- JAYNES, W., ZARTMAN, R. & HUDNALL, W. 2007. Aflatoxin B<sub>1</sub> adsorption by clays from water and corn meal. *Applied Clay Science*, 36, 197-205.
- JOCOUCO, A. I. 2020. Typification of *Cotoneaster koidzumii* (Maleae, Rosaceae) and two associated names. *Phytotaxa*, 470, 203-209.
- JOCOUCO, A. I. & GANDULLO, R. 2019. Sinopsis de las especies de *Pyracantha* (Rosaceae, Maloideae) naturalizadas en la Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 54: 599-616.
- JOUANY, J. P. 2007. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 137, 342-362.
- JUBERT, C., MATA, J., BENCH, G., DASHWOOD, R., PEREIRA, C., TRACEWELL, W., TURTELTAUB, K., WILLIAMS, D. & BAILEY, G. 2009. Effects of chlorophyll and chlorophyllin on low-dose aflatoxin B<sub>1</sub> pharmacokinetics in human volunteers. *Cancer Prevention Research*, 2, 1015-1022.
- KARMANOV, A. P., KANARSKY, A. V., KANARSKAYA, Z. A., KOICHEVA, L. S., SEMENOV, E. I., BOGDANOVICH, N. I. & BELYY, V. A. 2020. In vitro adsorption-desorption of aflatoxin B<sub>1</sub> on Pepper's lignins isolated from grassy plants. *International Journal of Biological Macromolecules*, 144, 111-117.
- KOLOSOVA, A. & STROKA, J. 2011. Substances for reduction of the contamination of feed by mycotoxins: a review. *World Mycotoxin Journal*, 4, 225-256.

- KUMAR, P., MAHATO, D. K., KAMLE, M., MOHANTA, T. K. & KANG, S. G. 2017. Aflatoxins: a global concern for food safety, human health and their management. *Frontiers in Microbiology*, 7, 2170.
- LIN, X., HU, X., ZHANG, Y., XIA, Y. & ZHANG, M. 2019. Bioaccessibility in daily diet and bioavailability in vitro of aflatoxins from maize after cooking. *World Mycotoxin Journal*, 12, 173-181.
- LIZÁRRAGA-PAULÍN, E. G., MORENO-MARTÍNEZ, E. & MIRANDA-CASTRO, S. P. 2011. Aflatoxins and their impact on human and animal health: an emerging problem. *Aflatoxins-Biochemistry and Molecular Biology*, 13, 255-282.
- MAGNOLI, A., MONGE, M., MIAZZO, R., CAVAGLIERI, L., MAGNOLI, C., MERKIS, C., CRISTOFOLINI, A., DALCERO, A. & CHIACCHIERA, S. 2011. Effect of low levels of aflatoxin B<sub>1</sub> on performance, biochemical parameters, and aflatoxin B<sub>1</sub> in broiler liver tissues in the presence of monensin and sodium bentonite. *Poultry Science*, 90, 48-58.
- MAHATO, D. K., LEE, K. E., KAMLE, M., DEVI, S., DEWANGAN, K., KUMAR, P. & KANG, S. G. 2019. Aflatoxins in food and feed: An overview on prevalence, detection and control strategies. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2266.
- MAKARSKA-BIALOKOZ, M. & KACZOR, A. A. 2014. Computational analysis of chlorophyll structure and UV-Vis spectra: a student research project on the spectroscopy of natural complexes. *Spectroscopy Letters*, 47, 147-152.
- MARIN, S., RAMOS, A., CANO-SANCHO, G. & SANCHIS, V. 2013. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 60, 218-237.
- MARTINEZ-MIRANDA, M. M., ROSERO-MOREANO, M. & TABORDA-OCAMPO, G. 2019. Occurrence, dietary exposure and risk assessment of aflatoxins in arepa, bread and rice. *Food Control*, 98, 359-366.
- MARTÍNEZ, E. M. 1988. *Manual para la identificación de hongos en granos y sus derivados*, UNAM.
- MEDINA, A., RODRÍGUEZ, A., SULTAN, Y. & MAGAN, N. 2015. Climate change factors and *Aspergillus flavus*: effects on gene expression, growth and aflatoxin production. *World Mycotoxin Journal*, 8, 171-179.
- MÉNDEZ-ALBORES, A., ESCOBEDO-GONZÁLEZ, R., ACEVES-HERNÁNDEZ, J. M., GARCÍA-CASILLAS, P., NICOLÁS-VÁZQUEZ, M. I. & MIRANDA-RUVALCABA, R. 2020. A Theoretical Study of the Adsorption Process of B-aflatoxins Using *Pyracantha koidzumii* (Hayata) Rehder Biomasses. *Toxins*, 12, 283.
- MÉNDEZ, A. & MORENO, E. 2009. Las micotoxinas: contaminantes naturales de los alimentos. *Revista Ciencia*, 61, 1-7.
- MENDIETA, C. R., GÓMEZ, G. V., DEL RÍO, J. C. G., CUEVAS, A. C., ARCE, J. M. & ÁVILA, E. G. 2017. Effect of the addition of *Saccharomyces cerevisiae* yeast cell walls to diets with mycotoxins on the performance and immune responses of broilers. *The Journal of Poultry Science*, 0170019.
- MERZLYAK, M. N., SOLOVCHENKO, A. E. & GITELSON, A. A. 2003. Reflectance spectral features and non-destructive estimation of chlorophyll, carotenoid and anthocyanin content in apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 27, 197-211.
- MÉZES, M., BALOGH, K. & TÓTH, K. 2010. Preventive and therapeutic methods against the toxic effects of mycotoxins—a review. *Acta Veterinaria Hungarica*, 58, 1-17.
- MIMICA-DUKIC, N., SIMIN, N., CVEJIC, J., JOVIN, E., ORCIC, D. & BOZIN, B. 2008. Phenolic compounds in field horsetail (*Equisetum arvense* L.) as natural antioxidants. *Molecules*, 13, 1455-1464.



- MIRANDA, M. M. M., DEL RÍO, L. M. V. & QUINTERO, V. M. G. 2013. Aflatoxinas: incidencia, impactos en la salud, control y prevención. *NORMAS EDITORIALES*, 89.
- MOREAU, M., LESCURE, G., AGOULON, A., SVINAREFF, P., ORANGE, N. & FEUILLOLEY, M. 2013. Application of the pulsed light technology to mycotoxin degradation and inactivation. *Journal of Applied Toxicology*, 33, 357-363.
- MURUGESAN, G., LEDOUX, D., NAEHRER, K., BERTHILLER, F., APPLGATE, T., GRENIER, B., PHILLIPS, T. & SCHATZMAYR, G. 2015. Prevalence and effects of mycotoxins on poultry health and performance, and recent development in mycotoxin counteracting strategies. *Poultry Science*, 94, 1298-1315.
- NAGINI, S., PALITTI, F. & NATARAJAN, A. T. 2015. Chemopreventive potential of chlorophyllin: a review of the mechanisms of action and molecular targets. *Nutrition and Cancer*, 67, 203-211.
- NAVA-RAMÍREZ, M., SALAZAR AM, SORDO M, LÓPEZ-COELLO C, TÉLLEZ-ISAÍAS G, MÉNDEZ-ALBORES A & VÁZQUEZ-DURÁN A. (2021). Ability of low contents of biosorbents to bind the food carcinogen aflatoxin B<sub>1</sub> *in vitro*. *Food Chemistry*, 128863.
- NDAGIJIMANA, R., SHAHBAZ, U. & SUN, X. 2020. Aflatoxin B<sub>1</sub> in Food and Feed: An Overview on Prevalence, Determination and Control Tactics. *Journal of Academia and Industrial Research (JAIR)*, 8, 144.
- NEEFF, D., LEDOUX, D., ROTTINGHAUS, G., BERMUDEZ, A., DAKOVIC, A., MURAROLLI, R. & OLIVEIRA, C. 2013. 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 B<sub>1</sub>. *Poultry Science*, 92, 131-137.
- NOM-188-SSA1 2010. Productos y Servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones sanitarias. NOM-188-SSA1-2002. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom>
- OH, H., KIM, D.-H., CHO, J.-H. & KIM, Y.-C. 2004. Hepatoprotective and free radical scavenging activities of phenolic petrosins and flavonoids isolated from *Equisetum arvense*. *Journal of Ethnopharmacology*, 95, 421-424.
- PALLAG, A., BUNGAU, S., TIT, D. M., JURCA, T., SIRBU, V., HONIGES, A. & HORHOGEA, C. 2016. Comparative study of polyphenols, flavonoids and chlorophylls in *Equisetum arvense* L. populations. *Revista de Chimie*, 67, 530-533.
- PARK, B. J., TAKATORI, K., SUGITA-KONISHI, Y., KIM, I.-H., LEE, M.-H., HAN, D.-W., CHUNG, K.-H., HYUN, S. O. & PARK, J.-C. 2007. Degradation of mycotoxins using microwave-induced argon plasma at atmospheric pressure. *Surface and Coatings Technology*, 201, 5733-5737.
- PONZILACQUA, B., ROTTINGHAUS, G. E., LANDERS, B. R. & OLIVEIRA, C. A. F. D. 2019. Effects of medicinal herb and Brazilian traditional plant extracts on in vitro mycotoxin decontamination. *Food Control*, 100, 24-27.
- PRADO RODRÍGUEZ, R. E. 2018. Revisión sobre las aflatoxinas en avicultura. Tesis de licenciatura. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales.
- PRIETO, C., DEL PILAR, A. & MILDENBERG ORTIZ, S. 2009. Detección de aflatoxina M<sub>1</sub> en leches frescas comercializadas en la zona del Valle del Cauca (Colombia) mediante la técnica de ELISA. Bogotá, Colombia: Universidad Pontificia Bolivariana.
- QUIST, C., BOUNOUS, D., KILBURN, J., NETTLES, V. & WYATT, R. 2000. The effect of dietary aflatoxin on wild turkey poults. *Journal of Wildlife Diseases*, 36, 436-444.
- RADULOVIĆ, N., STOJANOVIĆ, G. & PALIĆ, R. 2006. Composition and antimicrobial activity of *Equisetum arvense* L. essential oil. *Phytotherapy Research: An International Journal*

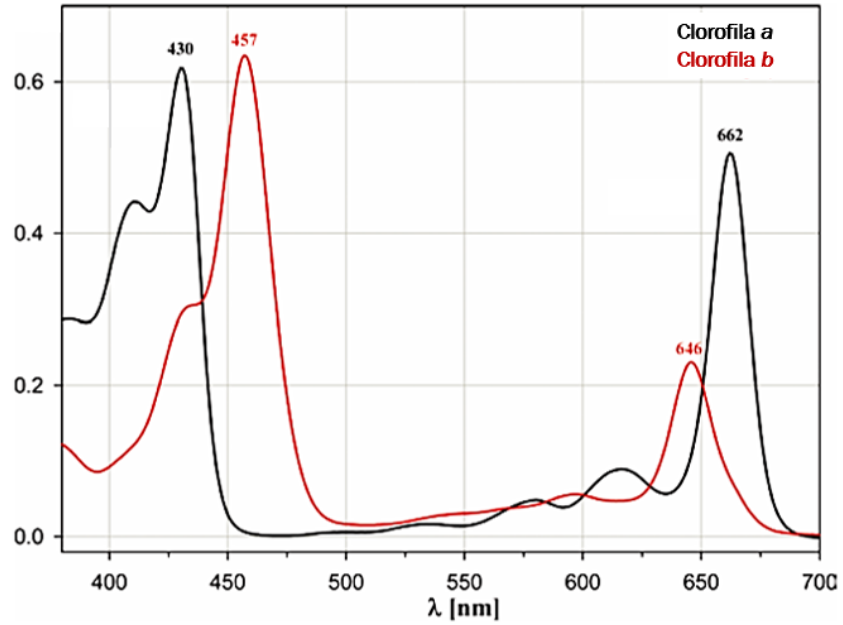
- Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 20, 85-88.
- RAMALES-VALDERRAMA, R. A., VÁZQUEZ-DURÁN, A. & MÉNDEZ-ALBORES, A. 2016. Biosorption of B-aflatoxins using biomasses obtained from formosa firethorn [*Pyracantha koidzumii* (Hayata) Rehder]. *Toxins*, 8, 218.
- RASHEED, U., AIN, Q. U., YASEEN, M., SANTRA, S., YAO, X. & LIU, B. 2020. Assessing the Aflatoxins Mitigation Efficacy of Blueberry Pomace Biosorbent in Buffer, Gastrointestinal Fluids and Model Wine. *Toxins*, 12, 466.
- RAWAL, S., KIM, J. E. & COULOMBE JR, R. 2010. Aflatoxin B<sub>1</sub> in poultry: Toxicology, metabolism and prevention. *Research in Veterinary Science*, 89, 325-331.
- RINGOT, D., LERZY, B., CHAPLAIN, K., BONHOURE, J.-P., AUCLAIR, E. & LARONDELLE, Y. 2007. In vitro biosorption of ochratoxin A on the yeast industry by-products: Comparison of isotherm models. *Bioresource Technology*, 98, 1812-1821.
- RIOS, G., ZAKHIA-ROZIS, N., CHAURAND, M., RICHARD-FORGET, F., SAMSON, M.-F., ABECASSIS, J. & LULLIEN-PELLERIN, V. 2009. Impact of durum wheat milling on deoxynivalenol distribution in the outcoming fractions. *Food Additives and Contaminants*, 26, 487-495.
- RODRÍGUEZ, H. W. M. 2010. Micotoxinas y Aflatoxina B<sub>1</sub>, un problema en salud animal. *Teoría y Praxis Investigativa*, 5, 71-78.
- RUSHING, B. R. & SELIM, M. I. 2019. Aflatoxin B<sub>1</sub>: A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods. *Food and Chemical Toxicology*, 124, 81-100.
- SÁNCHEZ, R. C., MARTORELL, J. C. & BALDOVÍ, E. C. 2012. Neutralización de micotoxinas por sustancias adsorbentes. *Nereis. Interdisciplinary Ibero-American Journal of Methods, Modelling and Simulation*, 77-88.
- SANDOSSKUMAR, R., KARTHIKEYAN, M., MATHIYAZHAGAN, S., MOHANKUMAR, M., CHANDRASEKAR, G. & VELAZHAHAN, R. 2007. Inhibition of *Aspergillus flavus* growth and detoxification of aflatoxin B<sub>1</sub> by the medicinal plant zimmu (*Allium sativum* L. × *Allium cepa* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23, 1007-1014.
- SARROCCO, S., MAURO, A. & BATTILANI, P. 2019. Use of Competitive Filamentous Fungi as an Alternative Approach for Mycotoxin Risk Reduction in Staple Cereals: State of Art and Future Perspectives. *Toxins*, 11, 701.
- SAS 2002. Statistics, Version 9.1 Cary (NC): SAS Inst. Inc.
- SAYYAH, M., HADIDI, N. & KAMALINEJAD, M. 2004. Analgesic and anti-inflammatory activity of *Lactuca sativa* seed extract in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 92, 325-329.
- SERRANO-COLL, H. A. & CARDONA-CASTRO, N. 2015. Micotoxosis y micotoxinas: generalidades y aspectos básicos. *Ces Medicina*, 29, 143-151.
- SHAR, Z. H., FLETCHER, M. T., SUMBAL, G. A., SHERAZI, S. T. H., GILES, C., BHANGER, M. I. & NIZAMANI, S. M. 2016. Banana peel: an effective biosorbent for aflatoxins. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 33, 849-860.
- SIEGEL, D. & BABUSCIO, T. 2011. Mycotoxin management in the European cereal trading sector. *Food Control*, 22, 1145-1153.
- SIMONICH, M. T., EGNER, P. A., ROEBUCK, B. D., ORNER, G. A., JUBERT, C., PEREIRA, C., GROOPMAN, J. D., KENSLER, T. W., DASHWOOD, R. H. & WILLIAMS, D. E. 2007. Natural chlorophyll inhibits aflatoxin B<sub>1</sub>-induced multi-organ carcinogenesis in the rat. *Carcinogenesis*, 28, 1294-1302.

- ŠTAJNER, D., POPOVIĆ, B. M., ČANADANOVIĆ-BRUNET, J. & ANAČKOV, G. 2009. Exploring *Equisetum arvense* L., *Equisetum ramosissimum* L. and *Equisetum telmateia* L. as sources of natural antioxidants. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 23, 546-550.
- STREIT, E., NAEHRER, K., RODRIGUES, I. & SCHATZMAYR, G. 2013. Mycotoxin occurrence in feed and feed raw materials worldwide: long-term analysis with special focus on Europe and Asia. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 2892-2899.
- THURN, M., LAMB, E. & ESHENAUER, B. 2018. Disease and Insect Resistant Ornamental Plants: *Pyracantha*. New York State Integrated Pest Management Program, Cornell University.
- TOSO, R. E., TORIBIO, M. S., DIESSER, M., BORELLO, A. B. & ARDOINO, S. M. 2018. Afecciones en animales y humanos por ingesta o exposición a las Aflatoxinas. Medidas preventivas para evitar los efectos tóxicos/Affections in animals and humans due to ingestion or exposure to aflatoxins. Preventive measures to avoid toxic effects. *Ciencia Veterinaria*, 20, 51-67.
- TREVIÑO ESPINOSA, R. S. 2019. Caracterización y efectividad de adsorbentes de aflatoxinas para inclusión en dietas animales. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- VAN RENSBURG, C. J., VAN RENSBURG, C., VAN RYSSSEN, J., CASEY, N. & ROTTINGHAUS, G. 2006. In vitro and in vivo assessment of humic acid as an aflatoxin binder in broiler chickens. *Poultry Science*, 85, 1576-1583.
- VARGAS, A. Y. V. & RAMÍREZ, J. O. H. Efectos de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* sobre pollos de engorda suplementados con alimento contaminado con aflatoxina B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>. Congreso aviespecialistas de México. 2016. 88-101.
- VERDUZCO, G. G., CUEVAS, A. C., COELLO, C. L., MENOCA, J. A., PELAEZ, C. V. & GONZÁLEZ, E. A. 2009. Comportamiento productivo y respuesta inmune de pollos alimentados con dietas sorgo-soya con y sin aflatoxina y paredes celulares de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*). *Técnica Pecuaria en México*, 47, 285-297.
- VIJAYANANDRAJ, S., BRINDA, R., KANNAN, K., ADHITHYA, R., VINOTHINI, S., SENTHIL, K., CHINTA, R. R., PARANIDHARAN, V. & VELAZHAHAN, R. 2014. Detoxification of aflatoxin B<sub>1</sub> by an aqueous extract from leaves of *Adhatoda vasica* Nees. *Microbiological Research*, 169, 294-300.
- VILA-DONAT, P., MARÍN, S., SANCHIS, V. & RAMOS, A. 2018. A review of the mycotoxin adsorbing agents, with an emphasis on their multi-binding capacity, for animal feed decontamination. *Food and Chemical Toxicology*, 114, 246-259.
- VILLA, F. A. A. 2013. Determinación del punto de carga cero y punto isoeléctrico de dos residuos agrícolas y su aplicación en la remoción de colorantes. *RIAA*, 4, 27-36.
- VILLERS, P. 2014. Aflatoxins and safe storage. *Frontiers in Microbiology*, 5, 158.
- WANG, Q., YANG, Q. & WU, W. 2020. Progress on Structured Biosensors for Monitoring Aflatoxin B<sub>1</sub> From Biofilms: A Review. *Frontiers in Microbiology*, 11, 408.
- WIELOGÓRSKA, E., MACDONALD, S. & ELLIOTT, C. 2016. A review of the efficacy of mycotoxin detoxifying agents used in feed in light of changing global environment and legislation. *World Mycotoxin Journal*, 9, 419-433.
- WINTERMANS, J. & DE MOTS, A. 1965. Spectrophotometric characteristics of chlorophylls *a* and *b* and their phenophytins in ethanol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biophysics Including Photosynthesis*, 109, 448-453.
- ZAIN, M. E. 2011. Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15, 129-144.

ZAVALA-FRANCO, A., HERNÁNDEZ-PATLÁN, D., SOLÍS-CRUZ, B., LÓPEZ-ARELLANO, R., TELLEZ-ISAIAS, G., VÁZQUEZ-DURÁN, A. & MÉNDEZ-ALBORES, A. 2018. Assessing the aflatoxin B<sub>1</sub> adsorption capacity between biosorbents using an in vitro multicompartamental model simulating the dynamic conditions in the gastrointestinal tract of poultry. *Toxins*, 10, 484.

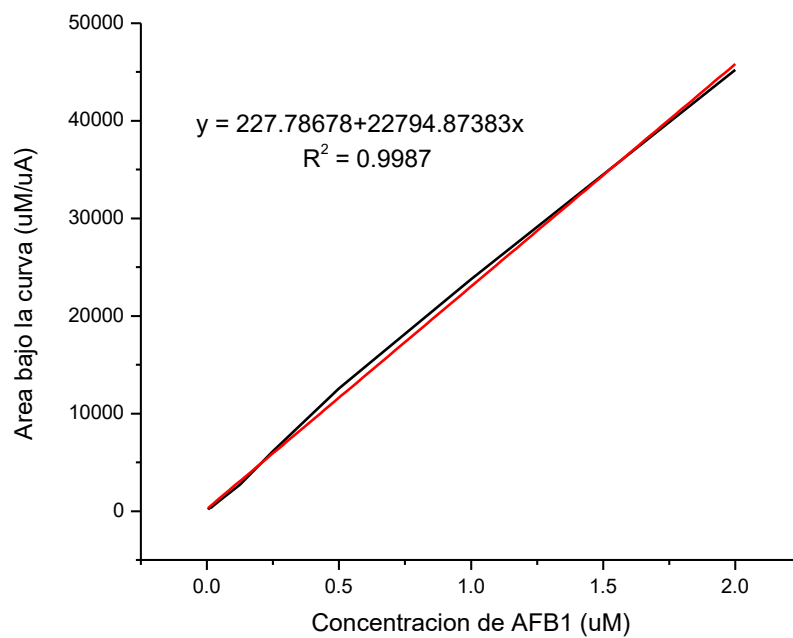
12. Apéndice

Figura A1. Espectro de absorción de las clorofilas *a* y *b*.



Modificado de Makarska-Bialokoz y Kaczor, (2014).

Figura A2. Relación entre la concentración de aflatoxina y el área bajo la curva.





# The effect of moderate-dose aflatoxin B<sub>1</sub> and *Salmonella* Enteritidis infection on intestinal permeability in broiler chickens

J. O. Hernández-Ramírez<sup>1</sup> · M. J. Nava-Ramírez<sup>1</sup> · R. Merino-Guzmán<sup>2</sup> · G. Téllez-Isaías<sup>3</sup> · A. Vázquez-Durán<sup>1</sup> · A. Méndez-Albores<sup>1</sup>

Received: 28 February 2019 / Revised: 25 June 2019 / Accepted: 4 July 2019

© Society for Mycotoxin (Research Gesellschaft für Mykotoxinforschung e.V.) and Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

## Abstract

The effect of dietary aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) and *Salmonella* Enteritidis infection on intestinal permeability was investigated. Two hundred 1-day-old male Ross 308 broiler chickens were randomly divided into 4 treatments of 5 replicates each (10 birds per replicate), which were fed ad libitum for 3 weeks with the following treatments: control, chickens fed an AFB<sub>1</sub>-free diet; AF, chickens fed an AFB<sub>1</sub>-contaminated diet at 470 ng/g; SE, chickens fed an AFB<sub>1</sub>-free diet and challenged with 10<sup>8</sup> cfu of *S. Enteritidis* per bird at 18 days old; AF + SE, chickens fed an AFB<sub>1</sub>-contaminated diet and challenged with 10<sup>8</sup> cfu of *S. Enteritidis* per bird at 18 days old. At day 21 of age, chicks received an oral gavage dose of fluorescein isothiocyanate dextran (FITC-dextran) to evaluate gastrointestinal leakage. Blood and intestinal samples were collected to evaluate serum biochemistry and total intestinal IgA secretion, respectively. Liver tissues were aseptically collected to assess bacterial invasiveness and for histomorphological studies. The results showed that chickens receiving AFB<sub>1</sub> presented a significant increment (up to 2.4-fold) in serum FITC-dextran concentration ( $p < 0.05$ ). Nevertheless, *S. Enteritidis* infection had no additional effect on gastrointestinal leakage. Furthermore, the ingestion of AFB<sub>1</sub> had no impact on the invasive potential of *S. Enteritidis*. These results suggest that moderate-dose AFB<sub>1</sub> adversely affects intestinal barrier function resulting in increased gut permeability in broiler chickens.

**Keywords** Broilers · B-Aflatoxins · *Salmonella* Enteritidis · Intestinal permeability · Intestinal IgA

## Introduction

Aflatoxins (AFs) are the most investigated assemblage of mycotoxins (del Pilar Monge et al. 2012); these toxins are synthesized by toxigenic species of fungi of the *Aspergillus* genus, among them *A. flavus* Link, *A. parasiticus* Speare, and *A. nomius* Kurtzman et al. (Asao et al. 1963; Feibelman et al. 1998). Four major toxins are produced by these fungi: aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), aflatoxin B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>), aflatoxin G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>),

and aflatoxin G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>). AFB<sub>1</sub> is by far the most powerful hepatotoxic, carcinogenic, teratogenic, and mutagenic compound from natural origin; consequently, it has been classified the International Agency of Research on Cancer as a human Group 1 carcinogen (Ostry et al. 2017).

Mexican regulations established the maximum levels of AFs allowed in cereals intended for human and animal consumption. For total AFs, action levels are set to 20 ng/g, and when this content is exceeded, the cereal can only be utilized for animal feed. In this case, the maximum limit for poultry is 100 ng/g (NOM-188-SSA1-2002 n.d.). It is well known that AFB<sub>1</sub> is toxic to a wide range of animal species. In poultry, AFs cause extensive toxic effects resulting in millions of dollars in annual losses due to poor performance, immunosuppression, and many other adverse effects (Rawal et al. 2010). AFs are also able to compromise fundamental functions of the gastrointestinal tract, including loss of barrier function (Gratz et al. 2007; Chen et al. 2016). Disruption of the intestinal epithelial barrier results in a leaky gut, which contributes to bacterial translocation (Ilan 2012; Grenier and Applegate 2013). Similarly, several studies have proven that *Salmonella*

✉ A. Méndez-Albores  
albores@unam.mx

<sup>1</sup> Unidad de Investigación Multidisciplinaria L14 (Alimentos, Micotoxinas, y Micotoxicosis), Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, 54714 Mexico City, State of Mexico, Mexico

<sup>2</sup> Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Mexico City, Mexico

<sup>3</sup> Department of Poultry Science, University of Arkansas, Fayetteville, AR 72701, USA

spp. induce disruption of tight junctions and leaky gut (Awad et al. 2017). Reports on the effects of AFB<sub>1</sub> on gut health in broiler chickens are very limited and contradictory (Tejada-Castaneda et al. 2008; Chen et al. 2016; Galarza-Seeber et al. 2016). Many of the discrepancies among the findings may be attributable to differences in avian species, gender, and age, as well as dose and time of aflatoxin exposure. Furthermore, in the abovementioned studies, animal responses were evaluated using higher doses of AFs, from 1000 to 2000 ng/g (up to 20 times of the upper legal limit in Mexico). So far, there have been no investigations focusing on intestinal permeability in broiler chickens fed moderate doses of AFB<sub>1</sub> and subsequently challenged with *S. Enteritidis*. Consequently, this research aimed to evaluate the effect of dietary AFB<sub>1</sub> and *S. Enteritidis* infection on intestinal permeability in broiler chickens.

## Materials and methods

### Animal ethics

Birds were managed as prescribed by the Internal Committee for Care and Use of Experimental Animals (CICUAЕ, from its abbreviation in Spanish) of the Postgraduate Program in Animal Production and Health Sciences of the National Autonomous University of Mexico. Ethical approval code: CICUAЕ-C17\_2.

### Fungal isolate and aflatoxin analysis

Aflatoxins were produced in maize according to the technique suggested by Méndez-Albores et al. (2005) using a highly toxigenic strain of *Aspergillus flavus* Link (UNIGRAS-1231, Culture Collection of the Grain and Seed Research Unit of the National Autonomous University of Mexico). This fungus has a high ability to synthesize AFB<sub>1</sub> (Hernández-Meléndez et al. 2018). AFs were analyzed following the recommendations of Jardon-Xicotencatl et al. (2015) using Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) with a Waters ACQUITY H-Class System which included a quaternary solvent manager, an ACQUITY UPLC BEH C18 phase reverse column (2.1 × 100 mm, 1.7 μm), and an UPLC-optimized fluorescence detector (Waters, MA, USA). The limits of detection were 2.01 and 0.58 ng/kg for AFB<sub>1</sub> and AFB<sub>2</sub>, respectively. The mean recovery for this methodology was 92% with a standard error of 1.2 and a coefficient variation value of 4.7%.

### Preparation of the aflatoxin-contaminated diet

The aflatoxin-contaminated maize was milled (Molinos Pulvex, Mexico City, Mexico) using a hammer head and a 0.5-mm mesh screen to provide ground material. The ground

maize was mixed in a starter feed formulated to approximate the nutritional requirements of broiler chickens (Table 1) as recommended by the National Research Council (NRC 1994). Levels of AFs (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>), T-2 toxin/HT-2 toxin, total fumonisins (FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub>, and FB<sub>3</sub>), and deoxynivalenol (DON) were determined in the feed using monoclonal antibody-based affinity columns and subsequent analysis by UPLC with fluorescence or photodiode array detection. No antibiotic nor anticoccidial drugs, or even growth promoters, were added to the diet. Feed batches (15 kg) were artificially contaminated with AFB<sub>1</sub> (470 ng/g) using 36 g of the aflatoxin-contaminated milled maize per kilogram of feed. In order to assure the proper distribution of the AFs, feed was mixed for 15 min in a Ribbon Blender Mixer model MH-7050 (Molinos Pulvex, Mexico City, Mexico). The control feed was also conditioned with 3.6% of aflatoxin-free maize.

### Experimental birds and housing

Two hundred 1-day-old male Ross 308 broiler chicks (obtained from a commercial hatchery) were individually weighted and randomly distributed in four pens at the Poultry Research Station of the National Autonomous University of Mexico. Five replicates of 10 birds ( $n = 50$  per treatment) were grouped

**Table 1** Ingredient composition of the experimental diet

Ingredient	g/kg
Maize	574.5
Soybean meal	346.6
Vegetable oil	34.5
Dicalcium phosphate	18.6
Calcium carbonate	9.9
Salt	3.8
DL-Methionine	3.3
L-Lysine HCl	3.1
Threonine	1.2
Choline chloride 60%	2.0
Vitamin premix <sup>1</sup>	1.0
Mineral premix <sup>2</sup>	1.0
Antioxidant <sup>3</sup>	0.5
Metabolizable energy (MJ/kg)	12.7
Crude protein	221.5

<sup>1</sup> Vitamin premix supplied the following per kg: vitamin A, 20,000,000 IU; vitamin D3, 6,000,000 IU; vitamin E, 75,000 IU; vitamin K3, 9 mg; thiamine, 3 mg; riboflavin, 8 mg; pantothenic acid, 18 mg; niacin, 60 mg; pyridoxine, 5 mg; folic acid, 2 mg; biotin, 0.2 mg; cyanocobalamin, 16 mg; and ascorbic acid, 200 mg

<sup>2</sup> Mineral premix supplied the following per kg: manganese, 120 mg; zinc, 100 mg; iron, 120 mg; copper, 10–15 mg; iodine, 0.7 mg; selenium, 0.4 mg; and cobalt, 0.2 mg

<sup>3</sup> Ethoxyquin

based on the following four dietary treatments: control, chickens fed an AFB<sub>1</sub>-free diet; AF, chickens fed an AFB<sub>1</sub>-contaminated diet; SE, chickens fed an AFB<sub>1</sub>-free diet challenged with 10<sup>8</sup> cfu of *S. Enteritidis* per bird at 18 days old; AF + SE, chickens fed an AFB<sub>1</sub>-contaminated diet challenged with 10<sup>8</sup> cfu of *S. Enteritidis* per bird at 18 days old. The temperature, lighting, and ventilation programs were followed according to standard recommendations of the supplier. Feed and water were provided ad libitum during the whole period of the experiment (21 days).

### Bacterial challenge strain and experimental infection

The *Salmonella enterica* serovar Enteritidis strain kindly supplied by the USDA National Veterinary Services Laboratory (Ames, IA, USA) was used. A spontaneous nalidixic acid (20 µg/mL) and novobiocin (25 µg/mL)-resistant mutant of this strain was used for challenge purposes. Briefly, 100 µL of *S. Enteritidis* from a frozen aliquot was added to 10 mL of tryptic soy broth, incubated at 37 °C for 8 h, and passed 3 consecutive times every 8 h to ensure that all of the bacteria were in log phase. Subsequently, bacterial cells were washed 3 times with sterile 0.9% saline by centrifugation at 1864×g for 10 min, reconstituted in saline, quantified spectrophotometrically, and diluted to 1 × 10<sup>8</sup> cfu/mL. Chickens were orally challenged with 10<sup>8</sup> cfu of *S. Enteritidis* per bird at 18 days old.

### Collection of samples and measurements

Broilers were weighed individually on a weekly basis, feed consumption for each replicate was also measured weekly, and mortality was recorded as it occurred. Feed intake and feed conversion ratio were adjusted for mortalities when necessary. At 21 days of age, blood was drawn by cardiac puncture under anesthesia (chicks were exposed for 1 min to 40% carbon dioxide, 30% oxygen, and 30% nitrogen) from 15 randomly selected birds from each treatment (3 chickens per replicate), and serum prepared. The following analyses were performed spectrophotometrically using commercially available kits (BioSystems, Barcelona, Spain): total protein, albumin, glucose, and cholesterol. The serum aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) activities were also determined spectrophotometrically. The bled chickens were then exposed to 80% carbon dioxide, 5% oxygen, and 15% nitrogen for euthanasia (Coenen et al. 2000). Liver, kidney, spleen, and bursa of Fabricius were excised and washed in cold saline and their relative weight (mg/100 g body weight) determined. For histopathological studies, liver specimens were fixed in 10% neutral-buffered formalin for 48 h, routinely embedded in paraffin, cut into 4-µm thick sections, and processed for hematoxylin and eosin (H&E) staining. Histopathological evaluation was accomplished in a

double-blind study and the severity of lesions were scored from 0 (no lesions) to 3 (most severe). Additionally, the Gram staining technique was used to study bacterial invasion. For this purpose, the red-stained bacteria (Gram-) were computed from digital images taken with a × 100 objective using ImageJ 1.52 version software (U. S. National Institutes of Health). A minimum of 25 digital images per treatment were considered.

### Total intestinal immunoglobulin A levels

Total intestinal immunoglobulin A (IgA) levels were determined in gut rinse samples as described by Merino-Guzmán et al. (2017). Briefly, an intestinal section of 5 cm distal to Meckel's diverticulum was collected and rinsed 3 times with 5 mL (0.9%) saline; then, the rinse was centrifuged at 1864×g at 4 °C for 10 min and the supernatant collected. A commercial indirect ELISA kit was used to quantify IgA according to the manufacturer's instructions (Bethyl Laboratories Inc., TX, USA). Samples were measured at 450 nm using an ELISA plate reader (BioTek Instruments Inc., VT, USA).

### Serum determination of fluorescein isothiocyanate dextran leakage

Fluorescein isothiocyanate dextran with molecular weight of 3–5 kDa (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) was used as a marker of paracellular transport and mucosal barrier dysfunction (Vicuña et al. 2015). Following the recommendation of Baxter et al. (2017), 1 h before the chicks were euthanized, 15 chicks of each group (3 per replicate) were given an oral gavage dose of 8.32 mg fluorescein isothiocyanate dextran (FITC-dextran) per kilogram. The concentration of FITC-dextran was determined using a fluorescence LS-55 spectrophotometer (Perkin Elmer, MA, USA). Spectra were acquired in the 350–600-nm range using a 96-well plate reader accessory. The fluorescence emission spectra were collected at an excitation wavelength of 365 nm. FITC-dextran concentration was calculated using a standard reference with a calibration curve.

### Experimental design and statistical analysis

Data were subjected to analysis of variance (ANOVA) as a 2 × 2 factorial using the general linear model (GLM) procedure in Statistical Analysis System software version 8.0 (SAS 2002), and means were separated by the Dunnett procedure and judged to be significantly different if  $p < 0.05$ . The Kruskal–Wallis nonparametric test was performed to assess the histopathological analysis with a level of significance set at  $p < 0.05$ .



## Results

### Analysis of dietary aflatoxins

The analysis of the artificially contaminated feed by UPLC indicates the presence of AFB<sub>1</sub> ( $470 \pm 27$  ng/g) and AFB<sub>2</sub> ( $30 \pm 4$  ng/g). In this work, the presence of AFB<sub>2</sub> was considered to be negligible, since this toxin is approximately 200-fold less toxic than AFB<sub>1</sub> (Méndez-Albores et al. 2005). The control diet had no detectable levels of AFs, T-2 toxin/HT-2 toxin, and total fumonisins. Assayed contents of these toxins were below the detection limits of the immunoaffinity column techniques employed (AFs < 1 ng/g, T-2 toxin/HT-2 toxin < 100 ng/g, total fumonisins < 0.016 mg/kg). DON was present at a level of 0.05 mg/kg.

### Performance parameters

Data on performance parameters are summarized in Table 2. At the end of week 1 (7 days old), there were no significant differences in weight gain (WG) among the four treatment groups. However, by the end of week 2 (14 days old), WG was significantly reduced ( $p < 0.05$ ) in chickens of the AF and AF + SE groups when compared with the control and SE groups, respectively. By the end of week 3, chickens receiving the AFB<sub>1</sub>-contaminated diets have 31.4% and 29.6% reductions in WG, respectively. Similarly, by the end of weeks 2 and 3, feed conversion (FC) was significantly affected in the aflatoxin treatments. The observed mortality during the 21-day period was as follows: 8 chickens in the AF group, 10 chickens in the AF + SE group, and 0 mortalities in the control and SE groups, respectively. Although there was no statistically significant effect on performance parameters in chickens challenged with *S. Enteritidis*, a slight reduction (2.5%) in WG was observed during the last week (Table 2). It is important to note that *S. Enteritidis* infection had the only effect during 3 days of the last treatment week.

### Plasma biochemistry and intestinal IgA levels

The results of the effects of dietary aflatoxins and *S. Enteritidis* infection on plasma biochemistry and total intestinal IgA levels in broiler chickens at 21 days are summarized in Table 3. Significant differences in plasma concentrations of total protein, albumin, globulin, glucose, and cholesterol were observed between birds fed control and AFB<sub>1</sub>-contaminated diets. In general, AFs caused a significant decrease in plasma biochemistry profiles among the different dietary groups. Clear indications of aflatoxin toxicity were detected in chickens of the AF and AF + SE groups by the serum aspartate aminotransferase (AST) activity level, which increased by 1.8-fold in comparison with the control group. Furthermore, the ratio of AST:ALT increased 1.7 times in chickens fed with

the AFB<sub>1</sub>-contaminated feed as compared with the control group. Infection by *S. Enteritidis* did not cause alterations in the plasma biochemistry profile of the SE and AF + SE groups. Moreover, no significant differences in the total intestinal IgA levels were observed among the AF, AF + SE, and control groups. However, a significant increment in the total intestinal IgA level was detected in the SE group, showing values up to 9394 ng/mL (Table 3).

### Relative organ weight

Table 4 shows the effects of dietary aflatoxins and *S. Enteritidis* infection on relative organ weight (mg/100 g body weight) in broiler chickens at 21 days. When compared with the control group, relative weights of the liver and kidney increased significantly in chickens fed with the AFB<sub>1</sub>-contaminated diets. Moreover, no significant differences were noted among all treatments in the spleen relative weight. However, when compared with the control group, the relative weight of the bursa of Fabricius increased up to 2.3-fold, in chickens of the AF, SE, and AF + SE groups. Table 4 also shows the bursa of Fabricius:spleen ratio; the AF and AF + SE groups reached the highest values. Chickens challenged with *S. Enteritidis* also showed a slightly larger bursa of Fabricius:spleen ratio (but not significantly) when compared with the control group (Table 4).

### Macroscopic findings, histopathology, and bacterial invasiveness

At the end of the trial, the major gross lesions were observed in the liver of chickens fed with the AFB<sub>1</sub>-contaminated diets. In general, livers of the AF and AF + SE groups were yellowish, friable, and appeared much larger in size compared with those of the control and SE groups, respectively. These lesions were also accompanied by hemorrhagic streaks. Furthermore, histopathological studies confirmed extensive liver damage; lesions observed were hepatic steatosis, massive bile duct proliferation, congestion, hemorrhage, inflammation, and fibrosis (Fig. 1, profiles b and d). In contrast, only a minimal degree of hepatic degeneration and minimal inflammation was seen in the livers of the SE group (Fig. 1, profile c). Infection by *S. Enteritidis* did not cause additional alterations in liver histology of the AF + SE group (Fig. 1, profile d). Primary lesions in the liver that showed significant differences at 21 days are summarized in Table 5. Furthermore, no bacteria were seen in the Gram-stained liver tissue sections of the control and AF groups (Fig. 2, profiles a and b). However, chickens challenged with *S. Enteritidis* presented a significant increment in bacterial invasion of the liver, showing values up to  $2381 \pm 364$  relative counts (Fig. 2, profile c). No increase in bacterial invasion related to AFB<sub>1</sub> intake was observed ( $2548 \pm 308$  relative counts).

**Table 2** Effects of dietary aflatoxins and *Salmonella* Enteritidis infection on weight gain, feed conversion, and mortality rate in broiler chickens at 21 days

Item	Treatments			
	Control	AF	SE	AF + SE
Weight gain (g)				
1 to 7 days old	104.5 ± 1.7 <sup>a</sup>	94.7 ± 1.7 <sup>a</sup>	103.0 ± 4.8 <sup>a</sup>	96.0 ± 2.3 <sup>a</sup>
7 to 14 days old	206.6 ± 5.0 <sup>a</sup>	129.1 ± 5.3 <sup>b</sup>	216.7 ± 4.8 <sup>a</sup>	126.3 ± 7.0 <sup>b</sup>
14 to 21 days old	257.0 ± 12.2 <sup>a</sup>	178.1 ± 11.6 <sup>b</sup>	251.9 ± 7.7 <sup>a</sup>	190.3 ± 12.5 <sup>b</sup>
1 to 21 days old	568.1 <sup>a</sup>	401.9 <sup>b</sup>	571.6 <sup>a</sup>	412.6 <sup>b</sup>
Deviation from control (%)	0	-31.4	-2.5	-29.6
FC (feed:gain)				
1 to 7 days old	1.12 <sup>a</sup>	1.10 <sup>a</sup>	1.18 <sup>a</sup>	1.15 <sup>a</sup>
7 to 14 days old	1.23 <sup>a</sup>	1.64 <sup>b</sup>	1.26 <sup>a</sup>	1.60 <sup>b</sup>
14 to 21 days old	1.28 <sup>a</sup>	1.80 <sup>b</sup>	1.31 <sup>a</sup>	1.81 <sup>b</sup>
MR (%)	0 <sup>a</sup>	8 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	10 <sup>b</sup>

Mean of five replicates of ten chicks each per treatment (minus mortality) ± standard error

Means, within the same row, not sharing a common superscript differ significantly (Dunnett test  $p < 0.05$ )

FC feed conversion, MR mortality rate

### FITC-dextran leakage

There were no differences in serum levels of FITC-dextran between control and *S. Enteritidis*-challenged chickens ( $0.17 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$  serum vs.  $0.15 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$  serum). However, a significant increment (2.4-fold) in serum FITC-dextran concentration was detected in chickens fed the AFB<sub>1</sub>-contaminated diets. In those birds, the serum FITC-dextran concentration reached values up to  $0.49 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$  serum. *S. Enteritidis* infection had no additional effect on gastrointestinal leakage ( $0.47 \pm 0.03 \mu\text{g/mL}$  serum).

### Discussion

The starter feed was mixed with the aflatoxin-contaminated maize to produce significant toxicity to broiler chickens. The

feed also contained T-2 toxin/HT-2 toxin, fumonisins, and DON at levels that were not as toxic as the AFB<sub>1</sub> content ( $470 \pm 27 \text{ ng/g}$ ); consequently, these mycotoxins should have a negligible effect on chicks. Several previous reports have indicated that contents  $> 75 \text{ mg FB}_1/\text{kg}$ ,  $> 4 \text{ mg T-2 toxin/kg}$ , and  $> 16 \text{ mg DON/kg}$  are necessary to induce significant toxicity in young broiler chickens (Weibking et al. 1993; Kubena et al. 1989).

During the 21-day period, significant alterations in body weight gain, feed conversion, mortality, blood biochemistry, relative weights of the liver, kidney, bursa of Fabricius, and liver histology were observed due to the addition of AFB<sub>1</sub> to the diet. These findings are in close agreement with the results found by Raju et al. (2005) and Sapkota et al. (2006), who reported that an experimental diet containing  $300 \text{ ng AFB}_1/\text{g}$  feed produced adverse effects on body weight gain, feed intake, and serum concentrations of proteins and cholesterol in

**Table 3** Effects of dietary aflatoxins and *Salmonella* Enteritidis infection on plasma biochemistry and total intestinal IgA levels in broiler chickens at 21 days

Constituent	Treatment			
	Control	AF	SE	AF + SE
Total protein (g/L)	29.4 ± 0.4 <sup>a</sup>	18.8 ± 0.3 <sup>b</sup>	28.0 ± 0.9 <sup>a</sup>	19.1 ± 0.4 <sup>b</sup>
Albumin (g/L)	11.7 ± 0.6 <sup>a</sup>	8.6 ± 0.2 <sup>b</sup>	11.9 ± 0.4 <sup>a</sup>	8.2 ± 0.3 <sup>b</sup>
Globulin (g/L)	17.7 ± 0.3 <sup>a</sup>	10.2 ± 1.0 <sup>b</sup>	16.1 ± 0.5 <sup>a</sup>	10.9 ± 0.4 <sup>b</sup>
Glucose (mg/dL)	418.8 ± 5.5 <sup>a</sup>	318.1 ± 7.1 <sup>b</sup>	408.5 ± 3.1 <sup>a</sup>	317.7 ± 8.8 <sup>b</sup>
Cholesterol (mg/dL)	147.1 ± 2.5 <sup>a</sup>	87.0 ± 1.3 <sup>b</sup>	135.6 ± 1.1 <sup>a</sup>	86.6 ± 1.9 <sup>b</sup>
AST (U/L)	128.7 ± 3.0 <sup>a</sup>	225.8 ± 1.3 <sup>b</sup>	115.7 ± 1.9 <sup>a</sup>	233.4 ± 5.0 <sup>b</sup>
ALT (U/L)	18.2 ± 0.9 <sup>a</sup>	18.3 ± 0.5 <sup>a</sup>	18.3 ± 0.5 <sup>a</sup>	18.6 ± 0.4 <sup>a</sup>
AST:ALT ratio	7.1 <sup>a</sup>	12.3 <sup>b</sup>	6.3 <sup>a</sup>	12.5 <sup>b</sup>
Intestinal IgA (ng/mL)	5770 ± 799 <sup>a</sup>	6623 ± 866 <sup>a</sup>	9394 ± 616 <sup>b</sup>	7857 ± 291 <sup>a</sup>

Mean of five replicates of three chicks each per treatment ( $n = 15$ ) ± standard error

Means, within the same row, not sharing a common superscript differ significantly (Dunnett test  $p < 0.05$ )

**Table 4** Effects of dietary aflatoxins and *Salmonella* Enteritidis infection on relative organ weights (mg/100 g body weight) in broiler chickens at 21 days

Organ	(mg/100 g body weight)			
	Control	AF	SE	AF + SE
Liver	3154 ± 160 <sup>a</sup>	6123 ± 254 <sup>b</sup>	3333 ± 136 <sup>a</sup>	5318 ± 286 <sup>b</sup>
Kidney	889 ± 58 <sup>a</sup>	1546 ± 134 <sup>b</sup>	858 ± 44 <sup>a</sup>	1654 ± 149 <sup>b</sup>
Spleen (S)	154 ± 19 <sup>a</sup>	153 ± 24 <sup>a</sup>	164 ± 20 <sup>a</sup>	185 ± 37 <sup>a</sup>
Bursa of Fabricius (B)	86 ± 18 <sup>a</sup>	163 ± 29 <sup>b</sup>	139 ± 43 <sup>b</sup>	199 ± 38 <sup>b</sup>
B:S ratio	0.6 <sup>a</sup>	1.1 <sup>b</sup>	0.8 <sup>a</sup>	1.1 <sup>b</sup>

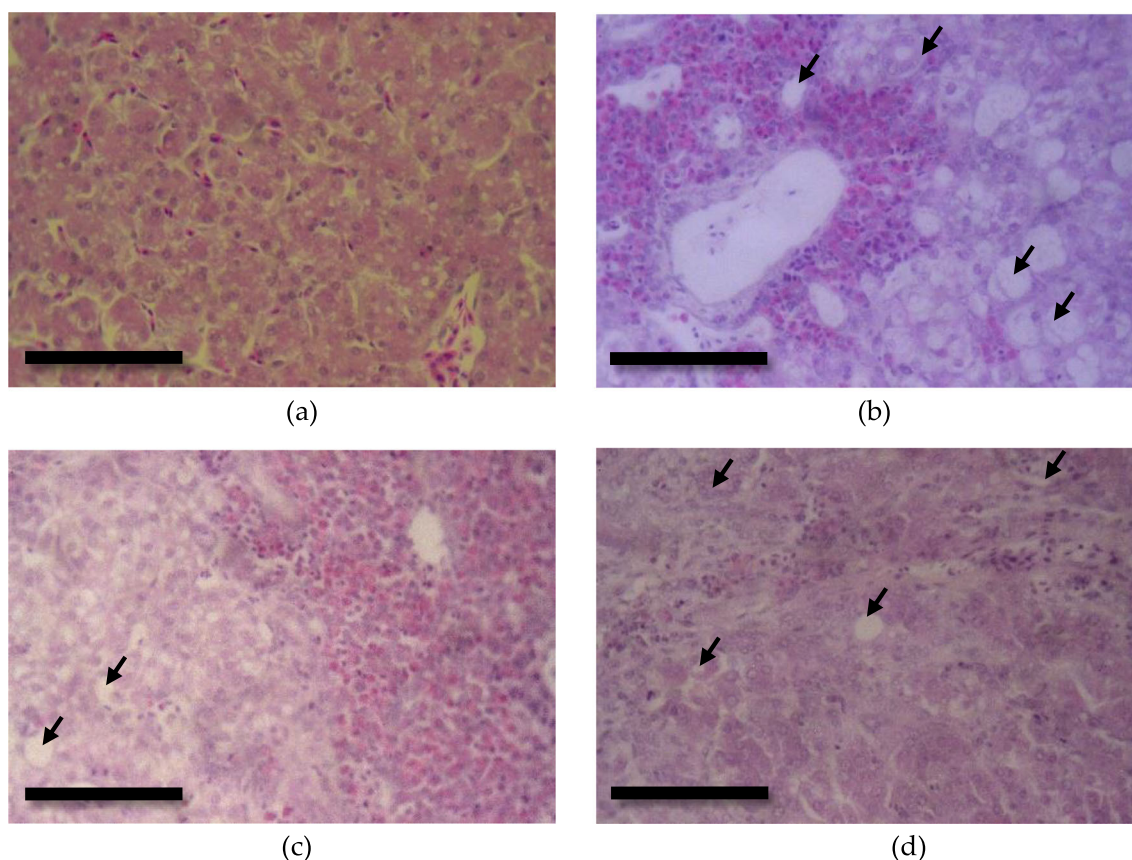
Mean of five replicates of three chicks each per treatment ( $n = 15$ ) ± standard error

Means, within the same row, not sharing a common superscript differ significantly (Dunnett test  $p < 0.05$ )

broiler chickens. In general, the results obtained in this research in relation to performance (Table 2), serologic analysis (Table 3), relative organ weight (Table 4), and histopathology (Fig. 1, Table 5) indicate that these deleterious effects were caused by dietary AFB<sub>1</sub>.

In this experiment, AFs (470 ng AFB<sub>1</sub>/g feed) were able to induce significant effects on intestinal permeability, since birds receiving AFB<sub>1</sub> presented a substantial increment (up to 2.4-fold) in serum FITC-dextran concentration. Our results

are consistent with two previous in vivo studies using higher doses of AFB<sub>1</sub> (up to 1500 ng AFB<sub>1</sub>/g feed). Tejada-Castaneda et al. (2008) in a 3-week study, where Ross 308 broiler chickens were fed a diet with 1200 ng AFB<sub>1</sub>/g feed, reported that microvilli were uniformly affected by dietary AFs. Scanning electron microscopy investigations showed that microvilli were shorter and combined, the tight junction completely disappeared, and only irregular masses of denatured proteins were observed in the duodenum,



**Fig. 1** Histological findings in liver tissues ( $\times 40$ , H&E stain). Control, chickens fed an AFB<sub>1</sub>-free diet; AF, chickens fed an AFB<sub>1</sub>-contaminated diet; SE, chickens fed an AFB<sub>1</sub>-free diet challenged with  $10^8$  cfu of *S. Enteritidis* per bird at 18 days old; AF + SE, chickens fed an AFB<sub>1</sub>-contaminated diet challenged with  $10^8$  cfu of *S. Enteritidis* per bird at

18 days old. The normal structure in the control group (profile a). Severe hepatic steatosis, massive bile duct proliferation, and inflammation are clear in the AF (profile b) and AF + SE (profile d) groups. Minimal hepatic degeneration and minimal inflammation in the SE group (profile c). Scale bar = 100  $\mu$ m

**Table 5** Hepatic microscopic lesions associated with aflatoxin intoxication and *Salmonella* Enteritidis infection in broiler chickens at 21 days

Lesion	Treatment			
	Control	AF	SE	AF + SE
Hepatic steatosis	0.8 <sup>a</sup>	2.9 <sup>b</sup>	0.8 <sup>a</sup>	2.6 <sup>b</sup>
Bile duct proliferation	0.1 <sup>a</sup>	3.0 <sup>b</sup>	0.4 <sup>a</sup>	2.9 <sup>b</sup>
Congestion	0.5 <sup>a</sup>	2.9 <sup>a</sup>	0.7 <sup>a</sup>	2.6 <sup>a</sup>
Hemorrhage	0.6 <sup>a</sup>	2.8 <sup>b</sup>	0.4 <sup>a</sup>	2.8 <sup>b</sup>
Inflammation	0.6 <sup>a</sup>	2.9 <sup>b</sup>	0.9 <sup>a</sup>	2.9 <sup>b</sup>
Fibrosis	1.0 <sup>a</sup>	2.7 <sup>b</sup>	1.0 <sup>a</sup>	2.7 <sup>b</sup>

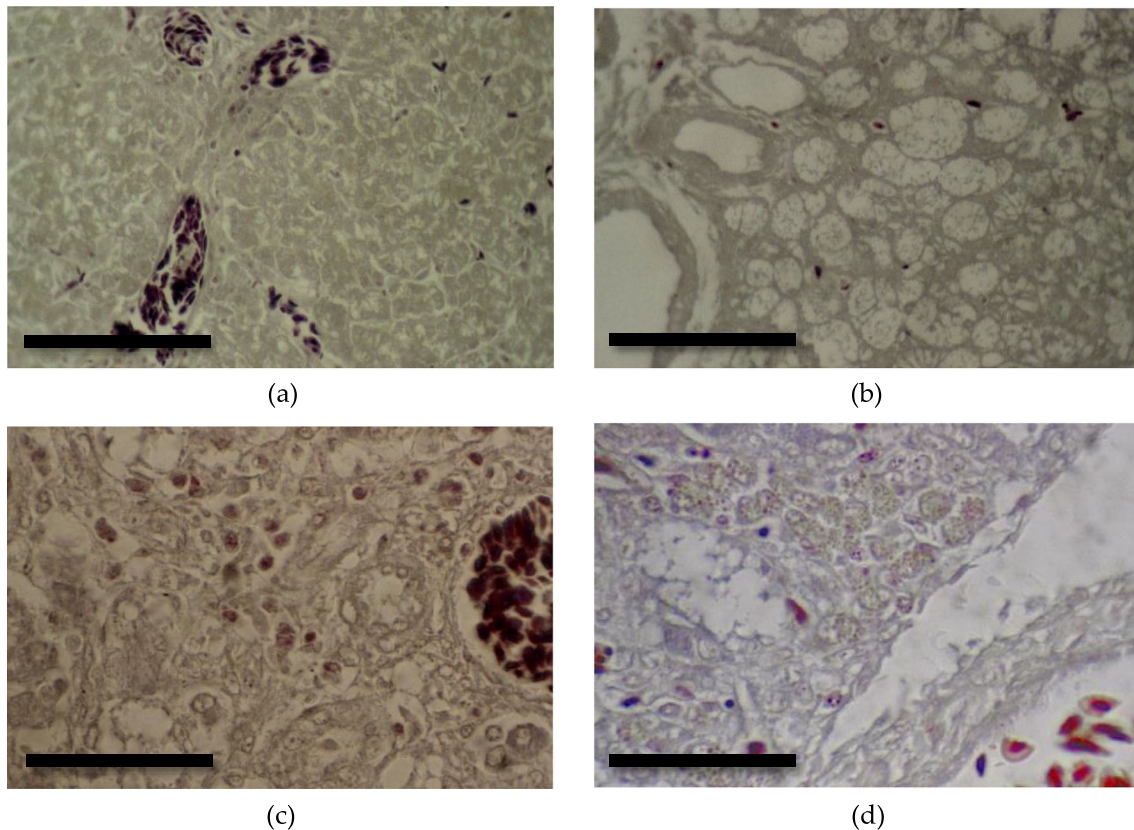
Mean of five replicates of two chicks each per treatment ( $n = 10$ )

Means, within the same row, not sharing a common superscript differ significantly (Kruskal-Wallis test  $p < 0.05$ )

jejunum, and ileum sections. The authors concluded that AFs induce loss of epithelial polarity. Chen et al. (2016) determined the impact of 1500 ng AFB<sub>1</sub>/g feed on gut health in Ross 708 broiler chickens. On day 20, using the dual-sugar gut permeability test, authors found significant increments in the serum lactulose:rhamnose ratio indicating impaired intestinal barrier of chickens that were fed AFB<sub>1</sub>-contaminated

diet. Conversely, Galarza-Seeber et al. (2016) evaluated the effect of 1000, 1500, and 2000 ng AFB<sub>1</sub>/g feed on gastrointestinal leakage in Cobb-Vantress broiler chickens. Authors reported that AFB<sub>1</sub> did not increase gut leakage as evidenced by the lack of increase in permeability of FITC-dextran in the serum. The researchers concluded that the integrity of gut epithelial barrier was not compromised after exposure to the three different AFB<sub>1</sub> contents.

Several in vitro studies also showed that exposure of human colon carcinoma cells (Caco-2) to mycotoxins such as AFB<sub>1</sub>, FB<sub>1</sub>, ochratoxin A (OTA), T2-toxin (T-2), and DON resulted in impaired intestinal barrier (Kasuga et al. 1998; McLaughlin et al. 2004; Sergent et al. 2006; Gratz et al. 2007; Pinton et al. 2009; Romero et al. 2016). Impaired gut epithelial integrity—due to alterations in tight junction proteins—may also be the pathological mechanism underlying bacterial translocation (Ilan 2012; Seki and Schnabl 2012). In this work, all of the liver sections from the SE and AF + SE groups were found to be positive for bacteria by the Gram staining technique (Fig. 2), confirming the invasive feature of the used bacterial strain. However, AFB<sub>1</sub> (470 ng/g feed) had no additional effect on the invasive potential of *S. Enteritidis*. Our results are in accordance with those of Burel et al. (2013), who reported that 8.6 mg FB<sub>1</sub>/kg feed had no



**Fig. 2** Chicken liver tissue treated with Gram's method of staining ( $\times 100$ ). Control, chickens fed an AFB<sub>1</sub>-free diet; AF, chickens fed an AFB<sub>1</sub>-contaminated diet; SE, chickens fed an AFB<sub>1</sub>-free diet challenged with

$10^8$  cfu of *S. Enteritidis* per bird at 18 days old; AF + SE, chickens fed an AFB<sub>1</sub>-contaminated diet challenged with  $10^8$  cfu of *S. Enteritidis* per bird at 18 days old. Scale bar = 50  $\mu\text{m}$

impact on *Salmonella* spp. translocation or seroconversion in inoculated pigs.

Studies have demonstrated that *Salmonella* spp. also induce disruption of tight junctions (Awad et al. 2017), and the expression of inflammatory cytokines (Overman et al. 2012). In this study, the total intestinal IgA levels were determined as a biomarker to evaluate intestinal inflammation, since this immunoglobulin has been previously used to evaluate local humoral immunity in broiler chickens challenged with this pathogen (Husáková et al. 2015). The results showed that IgA expression increased up to 9394 ng/mL in chickens challenged with *S. Enteritidis* in a short period of time after challenge, while control chickens had a basal level of 5770 ng/mL (Table 3). The higher total intestinal IgA levels may be directly related to the severity of *S. Enteritidis* infection (Hernandez-Patlan et al. 2019). For AF + SE group, intestinal IgA level did not differ significantly between AF and control groups, showing that AFB<sub>1</sub> has an immunosuppressive effect, probably attributed to a significant decrease in the number of IgA<sup>+</sup> cells in the duodenum, jejunum, and ileum, and a reduced expression of IgA, pIgR, IgM, and IgG mRNA in the small intestine (Jiang et al. 2015). Thus, the humoral local antibody response against *S. Enteritidis* was slightly reduced.

The intestinal absorption of AFB<sub>1</sub> may be accomplished by several possible routes: (i) a portion of the AFB<sub>1</sub> passes intact through the epithelial layer; (ii) AFB<sub>1</sub> penetrates the enterocyte by passive transport and molecules are converted to the active epoxide by the Cytochrome P450 forming an adduct with proteins, and subsequently, adducts arrive to the liver through the portal vein; (iii) due to their lipophilic nature, AFB<sub>1</sub> is absorbed via paracellular route damaging tight junctions, and consequently, AFB<sub>1</sub> has a direct impact on gut epithelium. Besides, leaky gut could be a result of an indirect effect of AFB<sub>1</sub> toxicity, since increased intestinal permeability has been also associated with the pathogenesis of both liver and kidney (Cesaro et al. 2011).

Taken together, these results suggest that AFB<sub>1</sub> exerts direct and indirect effects on the gut epithelium, and may be partially responsible for the physiological and metabolic disorders in poultry during aflatoxicosis. To the best of our knowledge, this is the first report on the effect of moderate-dose AFB<sub>1</sub> (470 ng/g feed) on gut barrier in broiler chickens. However, a more comprehensive knowledge of these effects will improve our understanding of the link between moderate intake of AFB<sub>1</sub>, gut barrier, and bacterial invasiveness in poultry. Further studies to evaluate gene expression of tight junction proteins are currently being evaluated.

**Acknowledgments** J.O. Hernández-Ramírez acknowledges CONACyT for the Ph.D. scholarship (245747).

**Funding information** This work was partially supported by Programa Interno de Apoyo para Proyectos de Investigación (PIAPI) Grant number PIAPI-1806.

## Compliance with ethical standards

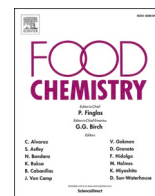
**Conflict of interest** None.

## References

- Asao T, Buchi G, Abdel-Kader M, Chang S, Wick EL, Wogan G (1963) Aflatoxins B and G. *J Am Chem Soc* 85:1706–1707
- Awad W, Hess C, Hess M (2017) Enteric pathogens and their toxin-induced disruption of the intestinal barrier through alteration of tight junctions in chickens. *Toxins* 9:60
- Baxter MF, Merino-Guzman R, Latorre JD, Mahaffey BD, Yang Y, Teague KD, Graham LE, Wolfenden AD, Hernandez-Velasco X, Bielke LR, Hargis BM, Tellez G (2017) Optimizing fluorescein isothiocyanate dextran measurement as a biomarker in a 24-h feed restriction model to induce gut permeability in broiler chickens. *Front Vet Sci* 4:56
- Burel C, Tanguy M, Guerre P, Boilletot E, Cariolet R, Queguiner M, Postolec G, Pinton P, Salvat G, Oswald IP, Fravallo P (2013) Effect of low dose of fumonisins on pig health: immune status, intestinal microbiota and sensitivity to *Salmonella*. *Toxins* 5:841–864
- Cesaro C, Tiso A, Del Prete A, Cariello R, Tuccillo C, Cotticelli G, del Vecchio Blanco C, Loguercio C (2011) Gut microbiota and probiotics in chronic liver diseases. *Dig Liver Dis* 43:431–438
- Chen X, Naehrer K, Applegate T (2016) Interactive effects of dietary protein concentration and aflatoxin B1 on performance, nutrient digestibility, and gut health in broiler chicks. *Poult Sci* 95:1312–1325
- Coenen A, Smit A, Zhonghua L, Van Luijckelaar G (2000) Gas mixtures for anaesthesia and euthanasia in broiler chickens. *Worlds Poult Sci J* 56:226–234
- del Pilar Monge M, Magnoli CE, Chiacchiera SM (2012) Survey of *Aspergillus* and *Fusarium* species and their mycotoxins in raw materials and poultry feeds from Córdoba, Argentina. *Mycotoxin Res* 28:111–122
- Feibelman TP, Cotty PJ, Doster M, Michailides T (1998) A morphologically distinct strain of *Aspergillus nomius*. *Mycologia* 90:618–623
- Galarza-Seeber R, Latorre JD, Bielke LR, Kuttappan VA, Wolfenden AD, Hernandez-Velasco X, Merino-Guzman R, Vicente JL, Donoghue A, Cross D, Hargis BM, Tellez G (2016) Leaky gut and mycotoxins: aflatoxin B1 does not increase gut permeability in broiler chickens. *Front Vet Sci* 3:10
- Gratz S, Wu Q, El-Nezami H, Juvonen R, Mykkänen H, Turner P (2007) *Lactobacillus rhamnosus* strain GG reduces aflatoxin B1 transport, metabolism, and toxicity in Caco-2 cells. *Appl Environ Microbiol* 73:3958–3964
- Grenier B, Applegate T (2013) Modulation of intestinal functions following mycotoxin ingestion: meta-analysis of published experiments in animals. *Toxins* 5:396–430
- Hernández-Meléndez D, Salas-Télez E, Zavala-Franco A, Télez G, Méndez-Albores A, Vázquez-Durán A (2018) Inhibitory effect of flower-shaped zinc oxide nanostructures on the growth and aflatoxin production of a highly toxigenic strain of *Aspergillus flavus* Link. *Materials* 11:1265
- Hernandez-Patlan D, Solis-Cruz B, Adhikari B, Pontin KP, Latorre JD, Baxter MF, Hernandez-Velasco X, Merino-Guzman R, Méndez-Albores A, Kwon YM, Hargis BM, Lopez-Arellano R, Arreguin-Nava MA, Tellez-Isaias G (2019) Evaluation of the antimicrobial and intestinal integrity properties of boric acid in broiler chickens infected with *Salmonella enteritidis*: proof of concept. *Res Vet Sci* 123:7–13
- Husáková E, Bobíková K, Stašová D (2015) Total IgA in spleen, bursa and intestine of chickens pretreated with *E. faecium* AL41 and

- challenged with Salmonella Enteritidis PT4. *Food Agric Immunol* 26:366–370
- Ilan Y (2012) Leaky gut and the liver: a role for bacterial translocation in nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* 18:2609
- Jardon-Xicotencatl S, Díaz-Torres R, Marroquín-Cardona A, Villarreal-Barajas T, Méndez-Albores A (2015) Detoxification of aflatoxin-contaminated maize by neutral electrolyzed oxidizing water. *Toxins* 7:4294–4314
- Jiang M, Fang J, Peng X, Cui H, Yu Z (2015) Effect of aflatoxin B1 on IgA<sup>+</sup> cell number and immunoglobulin mRNA expression in the intestine of broilers. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 37:450–457
- Kasuga F, Hara-Kudo Y, Saito N, Kumagai S, Sugita-Konishi Y (1998) In vitro effect of deoxynivalenol on the differentiation of human colonic cell lines Caco-2 and T84. *Mycopathologia* 142:161–167
- Kubena LF, Huff WE, Harvey RB, Phillips TD, Rottinghaus GE (1989) Individual and combined toxicity of deoxynivalenol and T-2 toxin in broiler chicks. *Poult Sci* 68:622–626
- McLaughlin J, Padfield PJ, Burt JP, O'Neill CA (2004) Ochratoxin A increases permeability through tight junctions by removal of specific claudin isoforms. *Am J Phys Cell Physiol* 287:C1412–C1417
- Méndez-Albores A, Arambula-Villa G, Loarca-Piña M, Castano-Tostado E, Moreno-Martínez E (2005) Safety and efficacy evaluation of aqueous citric acid to degrade B-aflatoxins in maize. *Food Chem Toxicol* 43:233–238
- Merino-Guzmán R, Latorre JD, Delgado R, Hernandez-Velasco X, Wolfenden AD, Teague KD, Graham LE, Mahaffey BD, Baxter MFA, Hargis BM, Tellez G (2017) Comparison of total immunoglobulin A levels in different samples in Leghorn and broiler chickens. *Asian Pac J Trop Biomed* 7:116–120
- Nacional Research Council, (NRC) (1994) Nutrient requirements of chickens. In: Nutrient requirements of poultry. 8th rev. National Academy Press, Washington DC, pp 11–15
- Norma Oficial Mexicana NOM-188-SSA1-2002 Productos y Servicios: Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal, especificaciones sanitarias. *Diario Oficial de la Federacion*. 2002:11 de Marzo de 1999.
- Ostry V, Malir F, Toman J, Grosse Y (2017) Mycotoxins as human carcinogens—the IARC monographs classification. *Mycotoxin Res* 33:65–73
- Overman EL, Rivier JE, Moeser AJ (2012) CRF induces intestinal epithelial barrier injury via the release of mast cell proteases and TNF- $\alpha$ . *PLoS One* 7:e33935
- Pinton P, Nougayrède JP, Del Rio JC, Moreno C, Marin DE, Ferrier L, Bracarense AP, Kolf-Clauw M, Oswald IP (2009) The food contaminant deoxynivalenol, decreases intestinal barrier permeability and reduces claudin expression. *Toxicol Appl Pharmacol* 237:41–48
- Raju M, Rao S, Radhika K, Chawak M (2005) Dietary supplementation of Spirulina and its effects on broiler chicken exposed to aflatoxicosis. *Indian J Poult Sci* 40:36–40
- Rawal S, Kim JE, Coulombe R Jr (2010) Aflatoxin B1 in poultry: toxicology, metabolism and prevention. *Res Vet Sci* 89:325–331
- Romero A, Ares I, Ramos E, Castellano V, Martínez M, Martínez-Larrañaga MR, Anadón A, Martínez MA (2016) Mycotoxins modify the barrier function of Caco-2 cells through differential gene expression of specific claudin isoforms: protective effect of illite mineral clay. *Toxicology* 353:21–33
- Sapkota D, Islam R, Upadhyaya T (2006) Dietary supplementation of *Embllica officinalis* for amelioration of experimental aflatoxicosis in commercial broilers. *Anim Nutr Feed Technol* 6:65–71
- SAS Institute (2002) SAS/STAT User's guide release 9.0 edition. SAS institute, Cary
- Seki E, Schnabl B (2012) Role of innate immunity and the microbiota in liver fibrosis: crosstalk between the liver and gut. *J Physiol* 590: 447–458
- Sergent T, Parys M, Garsou S, Pussemier L, Schneider YJ, Larondelle Y (2006) Deoxynivalenol transport across human intestinal Caco-2 cells and its effects on cellular metabolism at realistic intestinal concentrations. *Toxicol Lett* 164:167–176
- Tejada-Castaneda Z, Avila-Gonzalez E, Casaubon-Huguenin M, Cervantes-Olivares R, Vásquez-Peláez C, Hernandez-Baumgarten E, Moreno-Martínez E (2008) Biotoxification of aflatoxin-contaminated chick feed. *Poult Sci* 87:1569–1576
- Vicuña EA, Kuttappan VA, Tellez G, Hernandez-Velasco X, Seber-Galarza R, Latorre JD, Faulkner OB, Wolfenden AD, Hargis BM, Bielke LR (2015) Dose titration of FITC-D for optimal measurement of enteric inflammation in broiler chicks. *Poult Sci* 94:1353–1359
- Weibking TS, Ledoux DR, Bermudez AJ, Turk JR, Rottinghaus GE, Wang E, Merrill AH Jr (1993) Effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material, containing known levels of fumonisin B1, on the young broiler chick. *Poult Sci* 72:456–466

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



## Ability of low contents of biosorbents to bind the food carcinogen aflatoxin B<sub>1</sub> *in vitro*<sup>☆</sup>

María de Jesús Nava-Ramírez<sup>a,1</sup>, Ana María Salazar<sup>b,2</sup>, Monserrat Sordo<sup>b</sup>, Carlos López-Coello<sup>c</sup>, Guillermo Téllez-Isaías<sup>d,3</sup>, Abraham Méndez-Albores<sup>a,5,\*</sup>, Alma Vázquez-Durán<sup>a,4</sup>

<sup>a</sup> Unidad de Investigación Multidisciplinaria L14 (Alimentos, Micotoxinas, y Micotoxicosis), Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, State of Mexico 54714, Mexico

<sup>b</sup> Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, Mexico

<sup>c</sup> Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, Mexico

<sup>d</sup> Department of Poultry Science, University of Arkansas, Fayetteville, AR 72701, USA

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Aflatoxin B<sub>1</sub>

Adsorption

Biosorbents

*In vitro* model

### ABSTRACT

*In vitro* experiments were conducted to evaluate the effectiveness of two new biosorbents (lettuce and field horsetail) in removing aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>). Formosa firethorn was used as reference material. The adsorption of AFB<sub>1</sub> (190 ng/mL) was investigated at two sorbent contents (0.5% and 0.1% w/v) and three pHs (2, 5, and 7). Batch experiments were performed at 40 °C for 2 h. Several methodologies were used to characterize the nature of the biosorbent-AFB<sub>1</sub> interaction. In general, when using biosorbents at 0.5% w/v, AFB<sub>1</sub> was well adsorbed by the three tested biomaterials (70 to 100%). Furthermore, with the lowest biosorbent content (0.1% w/v), significant AFB<sub>1</sub> adsorption efficiencies were attained at pH 5 (33 to 50%). Nevertheless, at pH 7, lettuce showed the highest ability against AFB<sub>1</sub> removal (95%). Further characterization of the AFB<sub>1</sub>-loaded biosorbents demonstrated that chemical and physical mechanisms were involved in the adsorption process.

### 1. Introduction

Mycotoxins are fungal-generated secondary metabolites that are ubiquitous and unavoidable contaminants of food and feed, and their consumption by humans and animals results in diseases and death. Several species of the genus *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Fusarium* are capable of producing mycotoxins (Cole & Cox, 1981). For instance, *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, and *A. pseudotamarii* are responsible for the production of a series of highly toxic substances, the aflatoxins (Varga, Frisvad, & Samson, 2009; Ito, Peterson, Wicklow, & Goto, 2001).

Among the aflatoxins synthesized by these fungi, aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) is considered the most powerful hepatocarcinogenic, hepatotoxic, immunosuppressive, and mutagenic agent known (Busby & Wogan, 1984). Because of the adverse effects of AFB<sub>1</sub> on human and animal health, secure, practical, inexpensive, and effective decontamination strategies are highly desirable. Several approaches have been proposed to mitigate the impact of aflatoxins, the aim of these methods is either to remove, to inactivate, to transform, or to degrade the toxin and can be classified into physical, chemical, and biological (Rustom, 1997).

Currently, the most widely used physical decontamination strategy is adsorption of aflatoxins onto different materials. Inorganic binders such

<sup>☆</sup> Dedicated to the memory of Professor Ernesto Moreno-Martinez who passed away on October 16, 2020. Prof. Moreno-Martinez was the founder and chief scientist of the Grain and Seed Research Unit (UNIGRAS), and a recognized leader in molds and mycotoxins.

\* Corresponding author.

E-mail address: [albores@unam.mx](mailto:albores@unam.mx) (A. Méndez-Albores).

<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-5168-1684> (M.J. Nava-Ramírez)

<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0003-4277-7427> (A. Salazar-Martínez)

<sup>3</sup> <https://orcid.org/0000-0002-2416-2747> (G. Téllez-Isaías)

<sup>4</sup> <https://orcid.org/0000-0001-5978-2375> (A. Vázquez-Durán)

<sup>5</sup> <https://orcid.org/0000-0002-6403-5216> (A. Méndez-Albores)

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128863>

Received 18 August 2020; Received in revised form 5 December 2020; Accepted 7 December 2020

Available online 13 December 2020

0308-8146/© 2020 The Author(s).

Published by Elsevier Ltd.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

as phyllosilicates (bentonites, montmorillonites, smectites, kaolinites, and illites) and tectosilicates (zeolites); organic binders (yeast cell wall, lactic acid bacteria, micronized fibers, and activated carbon); and polymers (cholestyramine, divinylbenzene-styrene, polyvinylpyrrolidone, chitosan, hydroxypropyl methylcellulose, sodium carboxymethylcellulose, and microcrystalline cellulose) have been reported to remove AFB<sub>1</sub> (Solís-Cruz et al., 2017; Vila-Donat, Marín, Sanchis, & Ramos, 2018). However, the most practical limiting factor is the high cost of some of these binders. Another potential disadvantage of these materials is the possibility of adsorption of important micro-nutrients (vitamins and minerals), and the release of toxic components such as heavy metals or dioxins.

Recently, sorption with plant-derived materials has emerged as a potential alternative over the abovementioned AFB<sub>1</sub> binding agents. This technology is based on a set of chemical and/or physical mechanisms including: hydrogen bonding, electrostatic attraction, ion exchange, chelation, precipitation, and complexation (Ringot et al., 2007).

Several studies have been conducted to evaluate the AFB<sub>1</sub>-sorption capacity of different biomaterials such as grape pomaces (Avantaggiato, Greco, Damascelli, Solfrizzo, & Visconti, 2014; Greco, D'Ascanio, Santovito, Logrieco, & Avantaggiato, 2019), banana peel (Shar et al., 2016), *Pyracantha* leaves and berries (Ramales-Valderrama, Vázquez-Durán, & Méndez-Albores, 2016), aloe powder (Zavala-Franco et al., 2018), and lignins from grassy plants (Karmanov et al., 2020). These materials have been reported to be effective in removing aflatoxins determined by different *in vitro* methodologies or simulated gastrointestinal digestion procedures (using consecutive incubation at different pH values, temperature, and enzymatic activities). However, there is currently a lack of information regarding the use of lettuce (*Lactuca sativa* L.) and field horsetail (*Equisetum arvense* L.) as sorbent biomaterials for AFB<sub>1</sub> removal.

Based on the hypothesis that the biosorbents prepared from lettuce and field horsetail would exhibit both chemical and physical mechanisms to adsorb AFB<sub>1</sub>, the present research aims to: (i) assess the AFB<sub>1</sub>-sorption potential of two novel biomaterials – at low inclusion levels – when using an *in vitro* model simulating the pH conditions in the gastrointestinal tract of poultry, and (ii) evaluate the nature of the interaction between the biosorbents and the AFB<sub>1</sub> molecule using several characterization methodologies.

## 2. Experimental

### 2.1. Chemicals

All chemicals were of analytical-reagent grade and used as received without further purification. Aflatoxin B<sub>1</sub> from *Aspergillus flavus* (CAS number: 1162-65-8), dimethyl sulfoxide ( $\geq 99.9\%$  purity, CAS number 67-68-5), HPLC grade acetonitrile (CAS number 75-05-8), HPLC grade methanol (CAS number 67-56-1), ethanol 96% (CAS number 64-17-5), and sodium hypochlorite solution (CAS number 7681-52-9) were obtained from Merck KGaA (Darmstadt, Germany).

### 2.2. Safety precautions

Sodium hypochlorite solution (5% w/v, available chlorine) was utilized to decontaminate laboratory equipment, working areas, and laboratory wastes. All aflatoxin-contaminated glassware was immersed in the solution overnight and then exhaustively washed.

### 2.3. Plant material and preparation of biosorbents

Samples of lettuce (*Lactuca sativa* L.), field horsetail (*Equisetum arvense* L.) and Formosa firethorn [*Pyracantha koidzumii* (Hayata) Rehder] cultivated in the Botanic Garden of the Superior Studies Faculty at Cuautitlan (National Autonomous University of Mexico) were collected during the winter and summer period in 2019. The

methodology for biosorbent preparation has been previously described in detail by Ramales-Valderrama et al. (2016).

Briefly, the collected samples were washed repeatedly with distilled water to remove foreign materials. After cleaning, chopped materials were separately dried in an oven (Binder model RE-115, Tuttlingen, Germany) at 50 °C until no variation in the sample weight was recorded. Afterward, dried biosorbents were milled in an electric plate-style mill type C-11-1 (Glen Mills Inc., Clifton, NJ, USA) and sieved. Particles with an average size of < 250 µm (60 mesh) were used for biosorption.

### 2.4. Aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) preparation

A primary stock solution of AFB<sub>1</sub> (100 µg/mL) was prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO). Sorption experiments were carried out at different pH values using the following buffers: pH 2 (0.1 M KCl/HCl), pH 5 (0.15 M C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O), and pH 7 (0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O). Buffer solutions containing AFB<sub>1</sub> were prepared using the primary stock solution in DMSO to attain a final concentration of 190 ng AFB<sub>1</sub>/mL. This concentration was chosen to reflect possible field conditions, and to approximately represent the Mexican limit for total aflatoxins (AFB<sub>1</sub> + AFB<sub>2</sub> + AFG<sub>1</sub> + AFG<sub>2</sub>) in feed. The maximum limit for poultry is 100 ng/g and for swine up to 200 ng/g (NOM-188-SSA1-2002).

### 2.5. Batch experiments for AFB<sub>1</sub> removal

A standard biosorption methodology was utilized to evaluate the effectiveness of biosorbents in removing AFB<sub>1</sub> from buffer solutions. Samples of 25 mg (0.5% w/v) or 5 mg (0.1% w/v) of each biosorbent (lettuce, field horsetail, and Formosa firethorn) were weighed and dispersed in 5 mL of the buffer solution (at each particular pH) containing the AFB<sub>1</sub> (190 ng/mL). The flasks were incubated (Bellco Glass Inc. NJ, USA) at 40 °C for 2 h with rotary agitation (120 rpm). After AFB<sub>1</sub> adsorption, samples were centrifuged at 6300 × g (centrifuge 5810 R, Eppendorf, Germany) during 10 min, and the supernatant filtered through PTFE membrane syringe filter (pore size 0.22 µm) and subjected to UPLC-FLR analysis. The pH was determined using a pH combination glass electrode (Conductronic PC-45, Puebla, Mexico). All determinations were performed in quintuplicate. Control samples (without adsorbent) were used to verify the stability of the AFB<sub>1</sub> molecule in the different pH media under incubated conditions (40 °C for 2 h).

### 2.6. Aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) quantification

The AFB<sub>1</sub> concentration in the filtrate was estimated by Ultra Performance Liquid Chromatography with fluorescence detection (UPLC-FLR) using a Waters ACQUITY H-Class System according to the methodology suggested by Jardon-Xicotencatl, Díaz-Torres, Marroquín-Cardona, Villarreal-Barajas, and Méndez-Albores (2015). Briefly, an aliquot of the filtrate (10 µL) was separated in an ACQUITY UPLC BEH C18 column (2.1 × 100 mm, 1.7 µm) under isocratic conditions. The mobile phase consisted of HPLC grade water:methanol:acetonitrile (64:18:18) pumped with a flow rate of 0.4 mL/min by a quaternary solvent manager (QSM). Detection was achieved by an UPLC-optimized fluorescence detector (Waters, Milford, MA, USA) set at 365 nm excitation/429 nm emission wavelengths, respectively. Retention time was 3.92 min for AFB<sub>1</sub> and a total run time of 8.0 min allowed return to initials conditions (Fig. S1, Supplementary data). The limit of detection for AFB<sub>1</sub> was 2 ng/L. The mean recovery for this methodology was 92%, with a standard error of 1.2, and a coefficient variation value of 4.7%. The AFB<sub>1</sub> concentration was calculated using a standard reference with a calibration curve.



## 2.7. Bioisorbents characterization

The Fourier transform infrared (FTIR) spectra were acquired in a Frontier SP8000 spectrophotometer (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) accessorized with an in-compartment diamond Attenuated Total Reflectance (ATR) accessory (DuraSAMPLIR II, Smiths Detection, Warrington, UK). All spectra were collected in the range 4000–500  $\text{cm}^{-1}$  with a resolution of 4  $\text{cm}^{-1}$ . The point of zero charge (pHpzc) was determined following the recommendations of Zavala-Franco et al. (2018). The electrophoretic mobility measurements and conversion to Zeta potentials ( $\zeta$ ) were made using the ZetaSizer Pro (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) following the recommendations of Rames-Valderrama et al. (2016).

Photosynthetic pigments (chlorophylls) were determined by measuring the absorbance of biosorbent extracts in 96% ethanol, as described by Wintermans and De Mots (1965). UV-Vis spectral analysis was performed by using a Cary 8454 UV-Vis Diode Array System spectrophotometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Chlorophyll *a* (*Chl a*), chlorophyll *b* (*Chl b*), and total chlorophyll (*Chl a + b*) concentrations were calculated using the following equations:

$$\text{Chl } a = 13.70(A_{665}) - 5.76(A_{649}) \quad (1)$$

$$\text{Chl } b = 25.80(A_{649}) - 7.60(A_{665}) \quad (2)$$

$$\text{Chl } a + b = 6.10(A_{665}) + 20.04(A_{649}) \quad (3)$$

## 2.8. Experimental design and statistical analysis

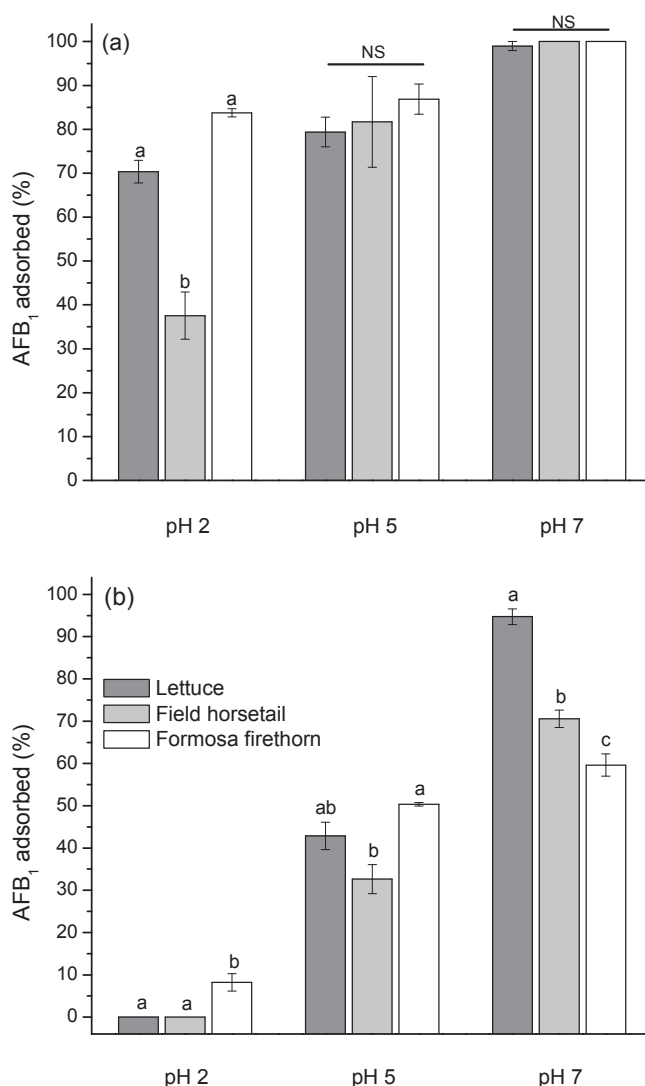
The experiment was conducted as a completely randomized  $3 \times 3 \times 2$  factorial design; eighteen experimental conditions were carried out with five replicates. The first factor corresponds to the biosorbent type (lettuce, field horsetail, and Formosa firethorn), the second factor corresponds to the pH values (2, 5, and 7), and the third factor corresponds to the sorbent content (0.5% and 0.1% *w/v*). Data were assessed by two-way analysis of variance (ANOVA), and means comparisons were performed according to the Tukey's multiple range test ( $p < 0.05$ ) using the Statistical Analysis System (SAS, 1990). A significance value of  $\alpha = 0.05$  was used to distinguish significant differences.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Adsorption experiments

The three biosorbents (lettuce, field horsetail, and Formosa firethorn) were evaluated in different buffer solutions that simulated the *in vivo* conditions of the poultry gastrointestinal tract (proventriculus, pH 2; crop, pH 5; and intestine, pH 7). Our research group has been previously shown that one of these biosorbents (Formosa firethorn) had higher adsorption capacity of AFB<sub>1</sub> (up to 86%) using an *in vitro* assay (Rames-Valderrama et al., 2016), and moderate AFB<sub>1</sub> biosorption uptake (up to 46%) using an *in vitro* multicompartimental model simulating the dynamic conditions in the gastrointestinal tract of poultry (Zavala-Franco et al., 2018). Consequently, in this research, Formosa firethorn was used as reference material.

The obtained results for AFB<sub>1</sub> adsorption capacities are presented in Fig. 1. In general, when the biosorbent dosage was increased (0.5% *w/v*), AFB<sub>1</sub> was well adsorbed by the three tested materials (Fig. 1, profile a); however, the adsorption of AFB<sub>1</sub> by field horsetail was significantly lower at pH 2 ( $38 \pm 9\%$ ). This effect could be due to changes in the charge of the adsorbent induced by the pH of the buffer solutions. Formosa firethorn (the reference material) yielded AFB<sub>1</sub> reductions of  $87 \pm 6\%$  at pH 5, which is in close agreement with our previous research (Rames-Valderrama et al., 2016). At pH 7, the three biosorbents showed AFB<sub>1</sub> reductions of almost 100% (Fig. 1, profile a). In this context, it is well known that the increase in the amount of the



**Fig. 1.** Effect of adsorbent dose (a = 0.5% *w/v*) and (b = 0.1% *w/v*) on the biosorption of AFB<sub>1</sub> by lettuce, field horsetail, and Formosa firethorn biosorbents at different pH values. (AFB<sub>1</sub> concentration: 190 ng/mL; temperature 40 °C, time: 2 h). Mean values  $\pm$  standard error. Means, within the same pH, not sharing a common superscript differ significantly (Tukey  $p < 0.05$ ). NS = not significant.

biosorbent increases the number of adsorptive sites responsible for the AFB<sub>1</sub> uptake.

Furthermore, when the biosorbent dosage was decreased (0.1% *w/v*), minimal adsorption of AFB<sub>1</sub> on the three tested biomaterials was observed at pH 2; however, significant AFB<sub>1</sub> adsorption efficiencies were attained at pH 5. Lettuce, field horsetail, and Formosa firethorn adsorbed  $43 \pm 6\%$ ,  $33 \pm 5\%$ , and  $50 \pm 1\%$ , respectively. Nevertheless, at neutral pH, lettuce and field horsetail biosorbents showed the highest efficiencies against AFB<sub>1</sub> removal, the biosorption percentages were  $95 \pm 3\%$  and  $71 \pm 4\%$ , respectively (Fig. 1, profile b). These results suggest that these two biosorbents show competitive adsorption capacities (at pH 7) for the removal of AFB<sub>1</sub>.

Table 1 presents the comparison of the AFB<sub>1</sub> sorption capacity of the three tested materials with that of various plant-derived biosorbents reported in the literature (Avantaggiato, Greco, Damascelli, Solfrizzo, & Visconti, 2014; Fernandes, Calado, Guimarães, Rodrigues, & Abrunhosa, 2019; Greco, D'Ascanio, Santovito, Logrieco, & Avantaggiato, 2019; Karmanov et al., 2020; Rames-Valderrama et al., 2016; Shar et al., 2016; Zavala-Franco et al., 2018).

**Table 1**

Comparison of the AFB<sub>1</sub>-adsorption capacity of lettuce, field horsetail, and Formosa firethorn biosorbents with that of different plant-derived materials reported in the literature.

Biosorbent	Inclusion (%)	AFB <sub>1</sub> (µg/mL)	Adsorption (%)	pH	Reference
Grape pomace	0.5	1	82	7	Avantaggiato, Greco, Damascelli, Solfrizzo, and Visconti (2014)
Banana peel	6	0.5	66	7	Shar et al., 2016
<i>Pyracantha</i> leaves	0.5	0.1	86	5.4	Ramales-Valderrama et al., 2016
<i>Pyracantha</i> (leaves + berries)			82		
Aloe powder	1.5	0.1	69		Zavala-Franco et al., 2018
<i>Pyracantha</i> leaves			46	1.7–6.7	
Banana peel			28		
Carobs	1	1	100		Greco, D'Ascanio, Santovito, Logrieco, and Avantaggiato, (2019)
Malvasia grape pomace			94	7	
Sangiovese grape pomace			94		
Micronized olive pomace	2	1	74	2–8	Fernandes, Calado, Guimarães, Rodrigues, and Abruñhosa (2019)
Micronized grape stems			96		Karmanov et al., 2020
Lignins from: <i>Rhododendron tomentosum</i>	0.1	1	80	2	
<i>Althaea officinalis</i>			80		
Lettuce	0.1	0.19	95		Present study
Field horsetail			71	7	
<i>Pyracantha</i> leaves			60		

As can be seen, the biosorption capacity of lettuce (0.1% w/v biosorbent dose) is significantly higher than that of the majority of the biosorbents, with the exception of lignins. However, the methodology proposed in this work to prepare the biosorbent, offers the possibility to reduce the cost of production, considering that the management of agro-wastes is an attractive option from the viewpoint of the waste recycle and minimization of contaminants such as AFB<sub>1</sub>. Therefore, lettuce biosorbent has significant potential for the removal of AFB<sub>1</sub> in some gastrointestinal tract compartments of poultry such as the crop and intestine.

### 3.2. Fourier transform infrared spectroscopy with attenuated total reflection (FTIR-ATR) studies

The different extents of AFB<sub>1</sub> adsorption onto the three tested materials suggested different sorption mechanisms according to their diverse composition. Therefore, biosorbents were further characterized to obtain information about the nature of the interaction between the functional groups present in the biomaterials and the AFB<sub>1</sub> molecule. The FTIR-ATR spectra of unloaded and AFB<sub>1</sub>-loaded biosorbents were collected in the spectral range 4000–500 cm<sup>-1</sup>. A representative FTIR spectra comparison is showed in Fig. S2 (Supplementary data). Additionally, the primary active FTIR vibrations and their functional group or commonly assigned compound are shown in Table S1 (Supplementary data).

In general, biosorbents exhibited higher quantities of functional groups associated with the hydroxyl (3674–3282 cm<sup>-1</sup>), carboxyl and carboxylate (1733–1608 cm<sup>-1</sup>), amide (1315 cm<sup>-1</sup>), and phosphate (1242–1027 cm<sup>-1</sup>) groups. These surface functional groups play essential roles in AFB<sub>1</sub> adsorption, which is in close agreement with previous works (Peng et al., 2016; Ramales-Valderrama et al., 2016; Zavala-Franco et al., 2018). As shown in Fig. S2 and Table S1 (Supplementary data), in the AFB<sub>1</sub>-loaded biosorbents, vibrations of these functional groups shifted at lower wavenumbers, and significantly reduced their intensity (relative transmittance), suggesting the participation of these functional groups on AFB<sub>1</sub> adsorption.

### 3.3. Point of zero charge (pHpzc)

Point of zero charge (pHpzc) is a procedure often used for measuring the biosorbent surface charge. All pHpzc values were computed by plotting ΔpH against the initial pH value of the three buffer solutions employed in the sorption experiments. Since similar results were obtained for both doses of biosorbents (0.5% w/v and 0.1% w/v) upon performing different characterization techniques such as pHpzc and zeta potential, most of the results presented herein are those obtained using 0.1% w/v. Lettuce, field horsetail, and Formosa firethorn curves cross the x-axis at average pH values of 5.65, 5.69, and 5.62, respectively. As a result, the surface charge of these biosorbents was zero at those pH values (Fig. 2).

It is well recognized that if pH < pHpzc, the surface of the biomaterial will be positively charged, and if pH > pHpzc, the surface will be negatively charged (Lim et al., 2017). Interestingly, the three tested biosorbents have a high negative-charged surface at the pH value of the intestinal section (pH 7); consequently, at higher doses (0.5% w/v), all of these materials have exceptional AFB<sub>1</sub> uptakes (100%) during sorption experiments (Fig. 1, profile a). However, at lower doses (0.1% w/v), lettuce biosorbent had the highest efficiency against AFB<sub>1</sub> removal; in these samples, the average biosorption uptake was 95 ± 3% (Fig. 1, profile b).

These results suggest that the interaction type between AFB<sub>1</sub> and the biosorbents would be primarily electrostatic in nature, since AFB<sub>1</sub> is a very polar molecule with an elevated net positive charge (Ramales-Valderrama et al., 2016). Furthermore, the extraordinary adsorption property of lettuce biosorbent could be based on a set of chemical and physical mechanisms involving physicochemical interactions and complexation, leading to immobilization of almost all AFB<sub>1</sub> molecules.

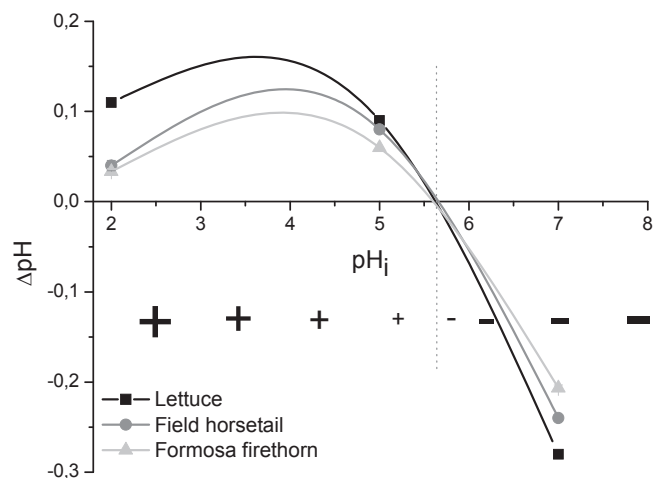


Fig. 2. Point of zero charge (pHpzc) of lettuce, field horsetail, and Formosa firethorn biosorbents. Mean values ± standard error.

### 3.4. Zeta potential ( $\zeta$ ) and electrophoretic mobility

Zeta potential is the electrostatic potential at the electrical double layer surrounding a particle in solution. Undoubtedly, the properties of any interface are significantly influenced by the presence of ionic charges. Fig. 3 (profile a) shows the relationship between zeta potential and pH of the three tested biosorbents. As the pH value increased (up to 7), more negative zeta potential values were recorded. A zeta potential value of  $-47 \pm 1$  mV was observed in Formosa firethorn; however, lettuce and field horsetail biosorbents presented zeta potential values of  $-32 \pm 1.5$  mV and  $-40 \pm 1.5$  mV, respectively. Consequently, the high negative-charged surface on these biosorbents – at this particular pH value – results in a high sorption uptake, because of the enhancement of attractive forces between the AFB<sub>1</sub> molecules and the biomaterial surface.

To further elucidate this mechanism, a set of experiments with the AFB<sub>1</sub> molecule at the different pH values (2, 5, and 7) were also conducted. A strong dependence of electrophoretic mobility on the acidity of the aqueous phase was observed (Fig. 3, profile b). Additionally, a considerable magnitude in the negative surface zeta potential was registered for AFB<sub>1</sub> molecules at pH 7 ( $-28 \pm 4$  mV). These results show that the presence of the negative surface charge at the water-non polar AFB<sub>1</sub> interface is caused by the hydroxyl ions released by the dissociation-association equilibrium of the water molecules (Marinova et al., 1996). It is well recognized that surrounding the surface of the particle is a layer of ions that have the opposite charge of the particles surface. Thus, in this research, a high positive charge density on the AFB<sub>1</sub> surface was observed at neutral pH (Fig. 3, profile b); consequently, higher adsorption uptakes were recorded.

Summarizing, the increase in AFB<sub>1</sub> adsorption with an increase in pH

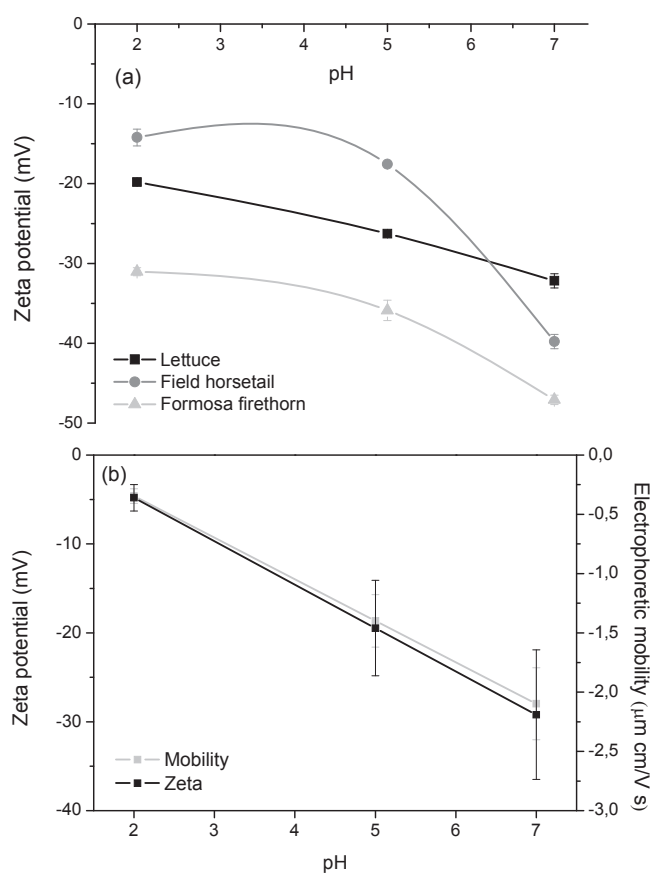


Fig. 3. The relationship between zeta potential and pH of the biosorbents (a), and electrophoretic mobility and zeta potential of the AFB<sub>1</sub> molecule as a function of pH (b). Mean values  $\pm$  standard error.

can be understood by looking at the charges and changes in the chemical interaction between the AFB<sub>1</sub> molecule and the biosorbents. From pHpzc studies, the surface of the three biosorbents was positively charged at pH < 5.6, and negatively charged at pH > 5.6. Thus, clearly at pH < 5.6, both the AFB<sub>1</sub> molecule and the biosorbents are positively charged; consequently, minimal absorption would be expected. Interestingly, significant adsorption uptakes occurred at pH 5 (Fig. 1, profile b); this observation suggests that adsorption could be accomplished not only through electrostatic interactions.

### 3.5. Chlorophylls content

The chlorophyll contents of the biosorbents are shown in Table 2. Lettuce had the highest total chlorophyll content (5.10 mg/g sorbent) when compared with field horsetail (1.32 mg/g sorbent) and Formosa firethorn (3.14 mg/g sorbent). Chlorophyll *a* (Chl *a*) and chlorophyll *b* (Chl *b*) contents were also significantly different among the biosorbents. Lettuce biosorbent has 1.6-fold and 3.8-fold total chlorophyll than Formosa firethorn and field horsetail, respectively (Table 2).

Various studies have shown that chlorophyll, as well as its water-soluble derivative sodium copper chlorophyllin, can form strong non-covalent complexes *in vitro* with AFB<sub>1</sub> and other polycyclic planar mutagens or carcinogens independent of temperature or pH (Arimoto et al., 1993; Breinholt, Schimerlik, Dashwood, & Bailey, 1995; Hayashi, Schimerlik, & Bailey, 1999; Jubert et al., 2009; Simonich et al., 2007). Consequently, in this research, the formation of a complex with the carcinogen (via electrostatic,  $\pi$ - $\pi$  orbital interactions and/or hydrogen bonding) may be expected to improve the rate of AFB<sub>1</sub> uptake by the biosorbents containing significant amounts of chlorophylls.

In an attempt to confirm these results, another set of laboratory experiments were performed using biosorbents with negligible quantities of chlorophylls. Chlorophylls were extracted from the biosorbents using 96% ethanol, and the chlorophyll-free biomaterials were rinsed three times with deionized water and dried in an oven at 50 °C to constant weight. Adsorption conditions were identical to those described in section 2.3 using 0.1% w/v biosorbent dose at pH 7. The results are shown in Fig. 4. In all cases, AFB<sub>1</sub> uptakes were lower than those obtained for pristine biosorbents (Fig. 1, profile b). Lettuce and Formosa firethorn showed moderate AFB<sub>1</sub> adsorption capacities, yielding 51% and 53%, respectively. Field horsetail had the lowest biosorption uptake value (37%). These findings support the idea that the adsorption arises by trapping of the AFB<sub>1</sub> molecule by chlorophylls through complex formation.

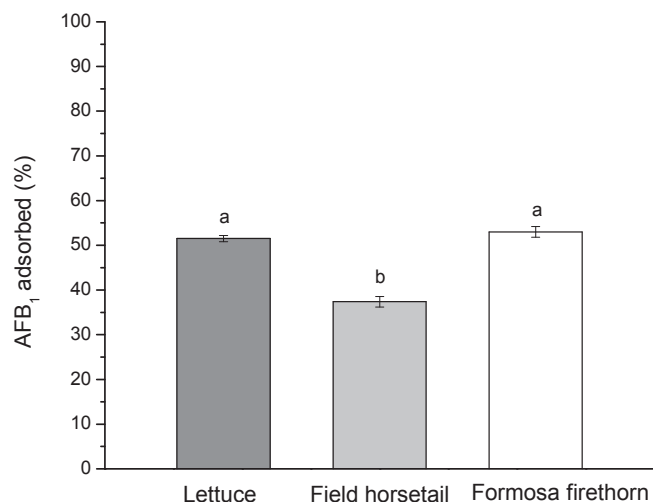
To the best of our knowledge, this is the first *in vitro* study conducted to evaluate the effectiveness of low contents of biosorbents in removing AFB<sub>1</sub> using an *in vitro* model simulating certain conditions in the gastrointestinal tract of poultry (pH values, temperature, and digestion time). This methodology may not be directly applicable to poultry (due to the fact that it does not use enzymatic activities similar to *in vivo* environments); however, further *in vitro* and *in vivo* studies need to be conducted to prove the effectiveness of these biosorbents in reducing AFB<sub>1</sub> without compromising micronutrient bioavailability for poultry, which is undoubtedly the fastest growing and most competitive of all livestock sectors. Research in this direction is in progress in our

Table 2

Chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, and total chlorophyll contents of lettuce, field horsetail, and Formosa firethorn biosorbents.

Biosorbent	Chlorophyll content (mg/g sorbent)		
	Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>	Chl <i>a</i> + <i>b</i>
Lettuce	3.48 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	1.62 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	5.1 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>
Field horsetail	0.92 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	0.4 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup>	1.32 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>
Formosa firethorn	2.16 $\pm$ 0.1 <sup>c</sup>	0.98 $\pm$ 0.3 <sup>c</sup>	3.14 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup>

Mean values  $\pm$  standard error. Means, within the same column, not sharing a common superscript differ significantly (Tukey  $p$  < 0.05).



**Fig. 4.** Sorption of AFB<sub>1</sub> by biomaterials containing negligible quantities of chlorophylls (AFB<sub>1</sub> concentration: 190 ng/mL; temperature 40 °C, time: 2 h, pH 7). Mean values ± standard error. Means not sharing a common superscript differ significantly (Tukey  $p < 0.05$ ).

laboratories.

#### 4. Conclusions

*In vitro* studies have shown that lettuce – an abundant, inexpensive, and renewable agro-waste material – can be successfully used for the biosorption of AFB<sub>1</sub> at low doses (0.1% w/v). Chemical and physical mechanisms including physicochemical interactions such as electrostatic,  $\pi$ - $\pi$  orbital, hydrogen bonding, and complexation with chlorophylls, are involved in the adsorption process. Therefore, it is expected that lettuce may effectively reduce the bioavailability of AFB<sub>1</sub> in *in vivo* trials.

#### CRediT authorship contribution statement

**María Jesús Nava-Ramírez:** Methodology, Investigation, Formal analysis. **Ana María Salazar:** Supervision, Writing - review & editing. **Montserrat Sordo:** Validation, Formal analysis. **Carlos López-Coello:** Supervision, Writing - review & editing. **Guillermo Téllez-Isaías:** Resources, Writing - review & editing. **Abraham Méndez-Albores:** Conceptualization, Writing - original draft, Funding acquisition, Project administration. **Alma Vázquez-Durán:** Visualization, Writing - original draft, Project administration.

#### Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Acknowledgments

This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) and UNAM-PAPIIT Grant numbers 299804 and IN207920. María de Jesús Nava-Ramírez also acknowledges CONACYT for the M. Sc. scholarship (866355).

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128863>.

#### References

- Arimoto, S., Fukuoka, S., Itome, C., Nakano, H., Rai, H., & Hayatsu, H. (1993). Binding of polycyclic planar mutagens to chlorophyllin resulting in inhibition of the mutagenic activity. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 287(2), 293–305.
- Avantaggiato, G., Greco, D., Damascelli, A., Solfrizzo, M., & Visconti, A. (2014). Assessment of multi-mycotoxin adsorption efficacy of grape pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(2), 497–507.
- Breinholt, V., Schimerlik, M., Dashwood, R., & Bailey, G. (1995). Mechanisms of chlorophyllin anticarcinogenesis against aflatoxin B1: complex formation with the carcinogen. *Chemical Research in Toxicology*, 8(4), 506–514.
- Busby, W., & Wogan, G. (1984). Aflatoxins. In C. E. Searle (Ed.), *Chemical carcinogens* (pp. 945–1136). Washington, DC: American Chemical Society.
- Cole, R. J., & Cox, R. H. (1981). *Handbook of toxic fungal metabolites*. New York: Academic Press (Chapter 1).
- Estrada-Urbina, J., Cruz-Alonso, A., Santander-González, M., Méndez-Albores, A., & Vázquez-Durán, A. (2018). Nanoscale zinc oxide particles for improving the physiological and sanitary quality of a Mexican landrace of red maize. *Nanomaterials*, 8(4), 247.
- Estrada Urbina, J., Villalobos Garcia, E. V., Mendez Albores, J. A., & Vázquez Durán, A. (2019). The effect of a relatively low dose of nano-ZnO particles on growth, chlorophyll content, grain yield, and yield components in a Mexican landrace of red maize. *Digest Journal of nanomaterials and Biostructures*, 14(4), 1169–1178.
- Fernandes, J.-M., Calado, T., Guimarães, A., Rodrigues, M. A. M., & Abrunhosa, L. (2019). In vitro adsorption of aflatoxin B 1, ochratoxin A, and zearalenone by micronized grape stems and olive pomace in buffer solutions. *Mycotoxin Research*, 35(3), 243–252.
- Greco, D., D'Ascanio, V., Santovito, E., Logrieco, A. F., & Avantaggiato, G. (2019). Comparative efficacy of agricultural by-products in sequestering mycotoxins: Multi-mycotoxin adsorption efficacy of agricultural by-products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(4), 1623–1634.
- Hayashi, T., Schimerlik, M., & Bailey, G. (1999). Mechanisms of chlorophyllin anticarcinogenesis: Dose-responsive inhibition of aflatoxin uptake and biodistribution following oral co-administration in rainbow trout. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 158(2), 132–140.
- Ito, Y., Peterson, S. W., Wicklow, D. T., & Goto, T. (2001). *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *Flavi*. *Mycological Research*, 105(2), 233–239.
- Jardon-Xicotencatl, S., Díaz-Torres, R., Marroquín-Cardona, A., Villarreal-Barajas, T., & Méndez-Albores, A. (2015). Detoxification of aflatoxin-contaminated maize by neutral electrolyzed oxidizing water. *Toxins*, 7(10), 4294–4314.
- Jubert, C., Mata, J., Bench, G., Dashwood, R., Pereira, C., Tracewell, W., Turteltaub, K., Williams, D., & Bailey, G. (2009). Effects of chlorophyll and chlorophyllin on low-dose aflatoxin B1 pharmacokinetics in human volunteers. *Cancer Prevention Research*, 2(12), 1015–1022.
- Karmanov, A. P., Kanarsky, A. V., Kanarskaya, Z. A., Kocheva, L. S., Semenov, E. I., Bogdanovich, N. I., & Bely, V. A. (2020). In vitro adsorption-desorption of aflatoxin B1 on Pepper's lignins isolated from grassy plants. *International Journal of Biological Macromolecules*, 144, 111–117.
- Lim, L. B. L., Priyantha, N., Tennakoon, D. T. B., Chieng, H. I., Dahri, M. K., & Suklueng, M. (2017). Breadnut peel as a highly effective low-cost biosorbent for methylene blue: Equilibrium, thermodynamic and kinetic studies. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S3216–S3228.
- Marinova, K. G., Alargova, R. G., Denkov, N. D., Velez, O. D., Petsev, D. N., Ivanov, I. B., & Borwankar, R. P. (1996). Charging of oil–water interfaces due to spontaneous adsorption of hydroxyl ions. *Langmuir*, 12(8), 2045–2051.
- Norma Oficial Mexicana NOM-188-SSA1-2002, Productos y Servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones sanitarias. Diario Oficial de la Federación. 15 de Octubre de 2002.
- Peng, X., Liu, B., Chen, W., Li, X., Wang, Q., Meng, X., & Wang, D. (2016). Effective biosorption of patulin from apple juice by cross-linked xanthated chitosan resin. *Food Control*, 63, 140–146.
- Ramales-Valderrama, R. A., Vázquez-Durán, A., & Méndez-Albores, A. (2016). Biosorption of B-aflatoxins using biomasses obtained from formosa firethorn [*Pyracantha koidzumii* (Hayata) Rehder]. *Toxins*, 8(7), 218.
- Ringot, D., Lerzy, B., Chaplain, K., Bonhoure, J., Auclair, E., & Landelle, Y. (2007). In vitro biosorption of ochratoxin A on the yeast industry by-products: Comparison of isotherm models. *Bioresource Technology*, 98(9), 1812–1821.
- Rustom, I. Y. (1997). Aflatoxin in food and feed: Occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chemistry*, 59(1), 57–67.
- SAS Institute, Inc. (1990). *SAS/STAT user's guide, Version 6* (fourth ed.). SAS Institute.
- Shar, Zahid Hussain, Fletcher, Mary T., Sumbal, Gul Amer, Sherazi, Syed Tufail Hussain, Giles, Cindy, Bhangar, Muhammad Iqbal, & Nizamani, Shafi Muhammad (2016). Banana peel: An effective biosorbent for aflatoxins. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 33(5), 849–860.
- Simonich, M. T., Egner, P. A., Roebuck, B. D., Orner, G. A., Jubert, C., Pereira, C., Groopman, J. D., Kensler, T. W., Dashwood, R. H., & Williams, D. E. (2007). Natural chlorophyll inhibits aflatoxin B 1-induced multi-organ carcinogenesis in the rat. *Carcinogenesis*, 28(6), 1294–1302.
- Solís-Cruz, B., Hernández-Patlán, D., Beyssac, E., Latorre, J. D., Hernandez-Velasco, X., Merino-Guzman, R., Tellez, G., & 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.

- Varga, J., Frisvad, J., & Samson, R. (2009). A reappraisal of fungi producing aflatoxins. *World Mycotoxin Journal*, 2(3), 263–277.
- Vila-Donat, P., Marín, S., Sanchis, V., & Ramos, A. J. (2018). A review of the mycotoxin adsorbing agents, with an emphasis on their multi-binding capacity, for animal feed decontamination. *Food and Chemical Toxicology*, 114, 246–259.
- Wintermans, J., & De Mots, A. (1965). Spectrophotometric characteristics of chlorophylls a and b and their phenophytins in ethanol. *Biochimica et Biophysica Acta*, 109(2), 448–453.
- Zavala-Franco, A., Hernández-Patlán, D., Solís-Cruz, B., López-Arellano, R., Tellez-Isaias, G., Vázquez-Durán, A., & Méndez-Albores, A. (2018). Assessing the aflatoxin B1 adsorption capacity between biosorbents using an in vitro multicompartamental model simulating the dynamic conditions in the gastrointestinal tract of poultry. *Toxins*, 10(11), 484.