

UAB

Universitat Autònoma de Barcelona
Departament de Ciència Animal i dels Aliments

EVALUACIÓN DE UN ADSORBENTE DE MICOTOXINAS DE NUEVA GENERACIÓN COMO ADITIVO EN EL PIENSO DE ANIMALES DE RENTA

MEMÒRIA PRESENTADA PER JUAN CARLOS BLANDON
MARTÍNEZ PER ACCEDIR AL GRAU DE DOCTOR DINS DEL
PROGRAMA DE DOCTORAT DE PRODUCCIÓ ANIMAL DEL
DEPARTAMENT DE CIÈNCIA ANIMAL I DELS ALIMENTS

BELLATERRA, 2011



FACULTAT DE VETERINÀRIA DE BARCELONA

José Francisco Pérez Hernández, professor titular del departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona i **Muzaffer Denli**, professor del Animal Science Department (Dicle University)

Certifican:

Que la memòria titulada "Evaluación de un adsorbente de micotoxinas de nueva generación como aditivo en el pienso de animales de renta", presentada per Juan Carlos Blandon Martínez per optar al grau de Doctor en Veterinària, ha estat realitzada sota la seva direcció i, considerant-la acabada, autoritza la seva presentació per que sigui jutjada per la comissió corresponent.

I per que consti als efectes oportuns, signen la present a Bellaterra, 26 de gener de 2011.

Dr. José Francisco Pérez Hernández

Dr Muzaffer Denli

La realització de la present tesi doctoral ha estat possible gràcies al finançament del projecte Europeu MONALISA EUREKA Project Σ3025! i que va comptar amb el suport de PROFIT FIT-0300-2003-335, CDTI 20050012, Torres Quevedo PTQ2004-0869 i ADIVETER SL, Reus, Tarragona.

Después de un largo receso, retomar todos los datos de los experimentos y volver a discutir según las nuevas revisiones de literatura, es un trabajo arduo casi igual de dispendioso como el mismo proceso de formación desde el principio del doctorado. Este último envión no hubiese sido posible sin la ayuda de muchas personas que siempre estuvieron a mi lado (físicamente o no), motivándome, impulsándome, facilitándome recursos para terminar mi doctorado y siempre recordándome que debía culminar una etapa de mi vida que varios años atrás, me había trazado como proyecto de vida.

Ha llegado el momento de culminar esa fase y anexarla como un gran valor agregado a la nueva etapa que estoy viviendo y que seguramente generará nuevos proyectos en los que estaré inmerso siempre con el propósito de aprehender el conocimiento.

Por lo anterior, y porque ha sido artífice fundamental de este proyecto, quiero agradecerle de todo corazón al Dr. José Francisco Pérez Hernández, director general de mi tesis, por confianza siempre le he llamado Francisco, y que por su sabiduría, bondad, paciencia y diligencia siempre le he profesado un inmenso respeto.

Al Dr. Muzaffer Denli, quien se anexo al proyecto como codirector de mi tesis y que depositó todo su trabajo, su disposición y conocimiento para colaborar en esta ardua tarea, muchas gracias...teşekkürler arkadaşım...!!quedan censuradas otras palabras que aprendí de tu idioma!!.

Al Dr. Josep Gasa, su presencia inspira respeto y cuando habla fluye conocimiento y amistad, muchas gracias por haberme permitido estar "al seu costat".

A la Dra. AnaCris, gracias por haberme soportado durante todo el tiempo "en el seu despatx i ensenyar-me indirectament moltes coses de la seva àrea de coneixement".

Igualmente, mis agradecimientos a la Dra. Roser por sus aportes precisos y oportunos a mi formación.

Mis mejores votos y mucha energía para la Dra. Baucells, muchas gracias por su compañía y amistad.

A la Dra. Susana, muchas gracias por su disposición para ayudar.

A todos los "Profes" de los otros Departamentos que me ayudaron y me ofrecieron su amistad, siempre les recuerdo con mucha alegría.

A los Doctores (as) Edgar y Ceci, Arantza, Montse, Pedro Fontecha, Achille, Cristóbal Flores.....muchas gracias por ser mis amigos, les aprecio un montón.

A todos los becarios de mi "camada", que ahora les debo llamar doctores: Eva, Alba, José y Walkiria, Marisol, Gabri, Sandra, Marta, Francesc, Rafa, Joseane....mi gratitud por dejarme pasar momentos tan maravillosos. A mis amigos "los Italianos", Leo y Mauro.... Les recuerdo con mucho cariño.

Un gran abrazo para Olga, por su ayuda en todos los procesos de laboratorio, a Rosa por su amistad. A todo el personal de las granjas experimentales por su ayuda incondicional. A las secretarias del Departamento, en especial a Julia, mil gracias por su labor y ayuda.

Definitivamente , el ser humano no es nadie sin su familia y como tal, quiero expresar mi más grande sentimiento por mi familia que me enseñó que no hay nada en este mundo que valga más que el amor. A mi madre por su gran amor y dedicación hacia todos nosotros, a mis hermanas y hermanos por esa gran "amistad" que nos une, a mis sobrinos y sobrinas, cuñadas y cuñados,a todos siempre los llevo en mi corazón!!.

A mis dos "luces" que guían mi nuevo rumbo

Luz y Samantha:

***"Nunca pensé que mi corazón pudiera
albergar algo tan inmenso!..... y maravilloso"***

RESUMEN

El presente trabajo de tesis hace parte de un proyecto empresarial EUREKA para el desarrollo de nuevos adsorbentes de micotoxinas derivados de la tierra de diatomeas. El trabajo conjunto entre la empresa privada y la Universidad ha sido determinante para llevar a cabo los objetivos propios de la empresa, como era el estudio y modificación de las propiedades superficiales de la tierra de diatomeas, y de la Universidad, para constatar los efectos tóxicos de las diferentes micotoxinas y evaluar el potencial secuestrante de la tierra de diatomeas modificada para las respectivas micotoxinas en diferentes modelos animales.

Para lograr estos objetivos, se diseñaron cinco pruebas experimentales (capítulos 4 a 8).

En la **primera prueba experimental** (Capítulo 4), queríamos confirmar el efecto tóxico de la aflatoxina B1 en aves, como especie más susceptible. A su vez, queríamos evaluar la capacidad adsorbente de la tierra de diatomeas sin modificar en su estructura, para secuestrar aflatoxina B1. La evaluación se realizó sobre parámetros de crecimiento, digestibilidad de alimento y algunas constantes fisiológicas. Los resultados mostraron que la ganancia de peso corporal y el consumo disminuyó de manera significativa, y la conversión alimenticia fue alterada por la micotoxina. La adición del adsorbente de micotoxina (tierra de diatomeas), en las dietas contaminadas con la toxina, disminuyó el efecto inhibitorio de ella sobre el crecimiento de los animales, sin diferencias con el grupo control. Las dietas con toxina disminuyeron la concentración de proteína sérica, incrementaron la actividad sérica de la fosfatasa alcalina (ALP) y aumentaron los pesos relativos del hígado en los animales. Se concluye que la toxina afecta los parámetros analizados y que la adición del adsorbente puede reducir los efectos adversos por la presencia de la toxina en las dietas de pollos de engorde.

En el **segundo experimento** (Capítulo 5), se quería probar la eficacia del adsorbente modificado, para capturar Ocratoxina A (OTA) en dietas para aves de puesta. Se evaluó parámetros productivos, bioquímica sérica, residuos de la toxina en hígado y huevos, y calidad de huevo. Los resultados mostraron que las dietas con el adsorbente no difirieron del grupo control y que la toxina redujo significativamente el consumo diario, la producción de huevo y la concentración sérica de triglicéridos, incrementó el peso relativo del hígado, la actividad de ALP y la concentración sérica de ácido úrico.

La adición del adsorbente, redujo los efectos negativos de la OTA, alcanzando valores sin diferencia con el grupo control, para la mayoría de los parámetros evaluados. Se concluye que la adición del adsorbente modificado puede contrarrestar los efectos perjudiciales de la OTA en las gallinas de puesta.

La **tercera prueba experimental** (Capítulo 6), fue diseñada para evaluar el efecto tóxico de la ZEA en modelo murino. Se evaluaron diferentes niveles de la toxina, para ver la respuesta en parámetros de crecimiento, consumo, parámetros anatómicos y fisiológicos. Los resultados mostraron la reducción del consumo diario de alimento en los animales con dietas contaminadas con la toxina, y la disminución de la ganancia de peso corporal. En contraste, con dosis de 1.8 ppm de toxina en la dieta se aumentó significativamente la ganancia de peso y mejoró la conversión alimenticia. Los dos niveles más altos de la toxina (1.8 y 3.6 ppm) aumentaron el peso del útero en los animales, pero no modificaron el peso de ovarios, la actividad de FSH, ALT, ALP ni el tiempo de apertura vaginal en el periodo estral. Se concluye que la ZEA en dosis de 1.8 ppm aumenta la ganancia de peso y el tamaño del útero en ratas hembras recién destetadas.

El **cuarto experimento** (Capítulo 7), se diseñó después de comprobar el efecto de la toxina ZEA en los animales. Constó de dos pruebas para probar la eficacia del adsorbente modificado para reducir los efectos de la ZEA en modelo murino y en lechones. En la primera prueba se evaluaron dos niveles de la toxina y tres niveles del adsorbente en ratas hembras recién destetadas. El nivel más alto de la toxina (6 ppm), incrementó significativamente el peso relativo de útero, ovarios y bazo y disminuyó la actividad sérica de ALP y AST. El adsorbente redujo los efectos tóxicos de la ZEA sobre el peso de útero y ovarios. En la segunda prueba experimental, se evaluaron dos niveles de la toxina y cuatro niveles del adsorbente en lechones hembra (14.9 ± 1.65 kg). La toxina incrementó el peso de útero y ovarios. Se encontraron cantidades significantes de ZEA y α -zearalenol en residuos biliares de los lechones alimentados con dietas contaminadas con ZEA. La adición del adsorbente redujo significativamente la toxina en la bilis. Se concluye que el consumo crónico de la ZEA, puede causar alteración en el tracto reproductivo de las ratas y de los lechones y que estos efectos pueden ser reducidos por la incorporación del adsorbente en la dieta.

Con el **quinto experimento** (Capítulo 8), se quería confirmar los efectos perjudiciales de otra toxina de importancia, como es la Fumonisina B1, sobre parámetros de crecimiento y fisiológicos en ratas en crecimiento, como modelo animal monogástrico. A su vez, se pretendía evaluar el poder detoxificante del adsorbente modificado, para captar la FB1 y así evitar sus efectos en los animales. Se evaluaron dos niveles de toxina y cuatro niveles del adsorbente. No se observaron diferencias en crecimiento de los animales. Se detectaron bajos niveles de esfingosina y esfinganina en hígado y la relación esfingosina/esfinganina en riñón fue más alta en los animales que recibieron la dieta con la toxina. La toxina redujo la actividad sérica de la AST y aumentó el peso relativo de hígado y la concentración sérica de colesterol. Al incorporar el adsorbente, se redujo significativamente el efecto tóxico de la FB1. Se observó la reducción de la relación esfingosina/esfinganina en riñón. Los resultados sugieren que la inclusión del adsorbente reduce los efectos perjudiciales de la toxina en las ratas.

Los resultados obtenidos en los diferentes experimentos expuestos en la presente tesis confirman la utilidad de aditivos tecnológicos (adsorbentes modificados) utilizados en la alimentación animal, para contrarrestar los efectos perjudiciales de los hongos y sus metabolitos. Estos resultados muestran los efectos perjudiciales de las diferentes toxinas analizadas y el beneficio significativo de incluir un adsorbente en las dietas para los diferentes modelos animales utilizados.

Por esta razón proponemos continuar con investigaciones de este tipo y considerar la adición en las dietas de un adsorbente dirigido a captar las micotoxinas más perjudiciales para las especies animales.

RESUM

El present treball de tesi fa part del macro projecte empresarial EUREKA per al desenvolupament de nous adsorbents de micotoxinas derivats de la terra de diatomeas. El treball conjunt entre l'empresa privada i la Universitat ha estat determinant per dur a terme els respectius objectius com l'eren per a l'empresa l'estudi i modificació de les propietats superficials de la terra de diatomeas i per a la Universitat, el constatar els efectes tòxics de les diferents micotoxinas i avaluar el potencial secuestrante de la terra de diatomeas modificada per a les respectives micotoxinas en diferents models animals.

Per aconseguir aquests objectius, es van dissenyar cinc proves experimentals (capítols 4 a 8).

En la **primera prova experimental** (Capítol 4), volíem confirmar l'efecte tòxic de la aflatoxina B1 en aus, com a espècie més susceptible a ella. Al seu torn, volíem avaluar la capacitat adsorbent de la terra de diatomeas sense modificar en la seva estructura, per segrestar aflatoxina B1. L'avaluació seria sobre paràmetres de creixement, digestibilitat d'aliment i algunes constants fisiològiques. Els resultats van mostrar que el guany de pes corporal i el consum van disminuir de manera significativa i la conversió alimentosa va ser alterada per la micotoxina. L'addició de l'adsorbent de micotoxina (terra de diatomeas), en les dietes contaminades amb la toxina, va disminuir l'efecte inhibitori d'ella, sobre el creixement dels animals, sense diferències amb el grup control. Les dietes amb toxina van disminuir la concentració de proteïna sérica, van incrementar l'activitat sérica de la fosfatasa alcalina (ALP) i van augmentar els pesos relatius del fetge en els animals. Es conclou que la toxina, evidentment afecta els paràmetres analitzats i que l'addició de l'adsorbent pot reduir els efectes adversos per la presència de la toxina en les dietes de pollastres d'engreixi.

En el **segon experiment** (Capítol 5), es volia provar l'eficàcia de l'adsorbent modificat, per capturar Ocratoxina A (OTA) en dietes per a aus de posada. Es va avaluar paràmetres productius, bioquímica sérica, residus de la toxina en fetge i ous i qualitat d'ou. Els resultats van mostrar que les dietes amb l'adsorbent no van diferir del grup control i que la toxina va reduir significativament el consum diari, la producció d'ou i la concentració sérica de triglicèrids i va incrementar el pes relatiu del fetge en els animals l'activitat de l'ALP i la concentració sérica d'àcid úric. L'addició de l'adsorbent, va reduir els efectes negatius de la OTA, aconseguint valors sense diferència amb el grup control, per a la majoria dels paràmetres avaluats. Es

conclou que l'addició de l'adsorbent modificat pot contrarestar els efectes perjudicials de la OTA en les gallines de posada.

La **tercera prova experimental** (Capítol 6), va ser dissenyada per avaluar l'efecte tòxic de la ZEA en model murino. Es van avaluar diferents nivells de la toxina, per veure la resposta en paràmetres de creixement, consum, paràmetres anatòmics i fisiològics. Els resultats van mostrar la reducció del consum diari d'aliment en els animals amb dietes contaminades amb la toxina i disminució del guany de pes corporal. En contrast, amb dosi d'1.8 ppm de toxina en la dieta es va augmentar significativament el guany de pes i va millorar la conversió alimentosa. Els dos nivells més alts de la toxina (1.8 i 3.6 ppm) van augmentar el pes de l'úter en els animals, però no van modificar el pes d'ovaris, l'activitat de FSH, ALT, ALP ni el temps d'obertura vaginal en el període estral. Es conclou que la ZEA en dosi d'1.8 ppm augmenta el guany de pes i la grandària de l'úter en rates femelles recentment deslletades.

El **quart experiment** (Capítol 7), es dissenya després de comprovar l'efecte de la toxina ZEA en els animals. Va constar de dues proves per provar l'eficàcia de l'adsorbent modificat per reduir els efectes de la ZEA en model murino i en garrins. En la primera prova es van avaluar dos nivells de la toxina i tres nivells de l'adsorbent en rates femelles recentment deslletades. El nivell més alt de la toxina (6 ppm), va incrementar significativament el pes relatiu d'úter, ovaris i melsa i va disminuir l'activitat sérica d'ALP i AST. L'adsorbent va reduir els efectes tòxics de la ZEA sobre el pes d'úter i ovaris. En la segona prova experimental, es van avaluar dos nivells de la toxina i quatre nivells de l'adsorbent en garrins femella (14.9 ± 1.65 kg). La toxina va incrementar el pes d'úter i ovaris. Es va trobar quantitats significants de ZEA i α -zearalenol en residus biliars dels garrins alimentats amb dietes contaminades amb ZEA. L'addició de l'adsorbent va reduir significativament la toxina en la bilis. Es conclou que el consum crònic de la ZEA, pot causar alteració en el tracte reproductiu de les rates i dels garrins i que aquests efectes poden ser reduïts per la incorporació de l'adsorbent en la dieta.

Amb el **cinquè experiment** (Capítol 8), es volia confirmar els efectes perjudicials d'una altra toxina d'importància, com l'és la Fumonisina B1, sobre paràmetres de creixement i fisiològics en rates en creixement, com modelo animal monogastric. Al seu torn, es pretenia avaluar el poder detoxificant de l'adsorbent modificat, per captar la FB1 i així evitar els seus efectes en els animals. Es van avaluar dos nivells de toxina i quatre nivells de l'adsorbent. No es van observar diferències en creixement dels animals. Es van detectar baixos nivells de esfingosina i esfinganina en fetge i la relació esfingosina/esfinganina en ronyó va ser més alta en els animals que

van rebre la dieta amb la toxina. La toxina va reduir l'activitat sérica de la AST i va augmentar el pes relatiu de fetge i la concentració sérica de colesterol. En incorporar l'adsorbent, es va reduir significativament l'efecte tòxic de la FB1. Es va observar la reducció de la relació esfingosina/esfinganina en ronyó. Els resultats suggereixen que la inclusió de l'adsorbent redueix els efectes perjudicials de la toxina en les rates.

Els resultats obtinguts en els diferents experiments exposats en la present tesi, ens parlen de la necessitat de l'ús d'additius tecnològics utilitzats en l'alimentació animal, per contrarestar els efectes perjudicials dels fongs i els seus metabòlits presents en les diferents matèries primeres destinades a l'elaboració de pinsos. Aquests resultats mostren els efectes perjudicials de les diferents toxines analitzades i el benefici significatiu d'incloure un adsorbent en les dietes per als diferents models animals utilitzats.

Per aquesta raó proposem continuar amb investigacions d'aquest tipus i considerar l'addició en les dietes d'un adsorbent modificat, per captar les micotoxines més perjudicials per als espècies animals.

ÍNDICE

Capítulo 1. Introducción General	p.1
Capítulo 2. Revisión de literatura	p.7
2.1. Las Micotoxinas: Un riesgo generalizado	p.9
2.2. Factores que intervienen en el crecimiento de hongos y su Producción de toxinas	p.11
2.2.1. Factores Biológicos	p.12
2.2.2. Factores Físicos	p.12
2.2.3. Factores Químicos	p.14
2.2.4. Composición del Sustrato	p.15
2.3. Las Micotoxinas más importante: breve descripción y mecanismos de acción	p.16
2.3.1. Aflatoxinas	p.17
2.3.2. Ocratoxina A	p.18
2.3.3. Zearalenona	p.19
2.3.4. Tricotecenos	p.21
2.3.5. Fumonisinias	p.22
2.4. Otras Micotoxinas	p.24
2.5. Efecto de las Micotoxinas sobre la salud y la productividad de los Animales de renta	p.26
2.6. Normatividad y Regulación de la Micotoxinas	p.33
2.6.1. Medidas de Control y Prevención	p.36
2.6.1.1. Métodos Físicos	p.38

2.6.1.2. Métodos Biológicos	p.39
2.6.1.3. Métodos Químicos	p.40
2.6.1.4. Uso de adsorbentes de Micotoxinas en el Pienso	p.40
2.7. El papel de las arcillas en la alimentación animal	p.43
2.7.1. Las arcillas como adsorbentes de micotoxinas	p.45
2.8. Estudio y Valoración adecuada de un adsorbente	p.47
2.9. Las tierras de Diatomeas como potencial adsorbente de toxinas	p.48
Capítulo 3. Objetivos y Planteamiento experimental	p.51
Capítulo 4. Effects of Dietary AflaDetox on Performance, Serum Biochemistry, Histopathological Changes and Aflatoxin Residues in Broilers exposed to Aflatoxin B1	p.55
4.1. Introduction	p.58
4.2. Materials and Methods	p.59
4.2.1. animals and diets	p.59
4.2.2. Experimental procedures and sampling	p.61
4.2.2.1. Growth performance and Digestibility	p.61
4.2.2.2. Serum Biochemistry and Organ Weights	p.61

4.2.2.3. Analysis of AFB1 Residues in liver and Breast Muscles	p.62
4.2.2.4. Histopathological Examination	p.62
4.2.3. Statistical Analysis	p.63
4.3. Results	p.63
4.4 Discussion	p.68
4.5 Acknowledgements	p.72
4.6. References	p.72
Capítulo 5. Efficacy of a new ochratoxin binding agent (OcroTox) to counteract the deleterious effects of ochratoxin A in laying hens	p.77
5.1. Introduction	p.80
5.2. Materials and Methods	p.81
5.2.1. Animals and Diets	p.81
5.2.2. Performance and Egg Quality	p.83
5.2.3. Serum Biochemistry and Organ Weight	p.83
5.2.4. Analysis of OTA residue in liver and eggs	p.84
5.2.5 Statistical Analyses	p.85
5.3. Results	p.85
5.4. Discussion	p.90
5.5. References	p.92

Capítulo 6. Effect of dietary zearalenone on the performance, reproduction	
tract and serum biochemistry in young rats	p.95
6.1. Introduction	p.98
6.2. Materials and Methods	p.99
6.2.1. Chemicals and feed contamination.	p.99
6.2.2. Animals and Treatments	p.99
6.2.3. Experimental procedures	p.100
6.2.4. Biochemical Analysis	p.100
6.2.5. Statistical analysis	p.101
6.3 Results	p.101
6.4. Discussion	p.103
6.5. Conclusion	p.106
6.6 Acknowledgments	p.106
6.7. References	p.106
Capítulo 7. Efficacy of AdiDetox in Reducing the Toxicity of Zearalenone	
in Rats and Piglets	p.111
7.1 Introduction	p.114
7.2 Materials and methods	p.115
7.2.1. Chemicals and feed contamination	p.115
7.2.2. Animals and Experimental Procedures	p.116

7.2.3. Analytical procedures	p.118
7.2.4. Statistically analyses	p.119
7.3 Results	p.119
7.4. Discussion	p.125
7.5. References	p.128
Capítulo 8. Efficacy of the adsorbent FumTox to reduce the toxicity of Fumonisin B ₁ in growing rats	p.133
8.1 Introduction	p.136
8.2 Materials and methods	p.137
8.2.1. Chemicals and feed contamination	p.137
8.2.2. Animals and Experimental Procedures	p.137
8.2.3. Serum Biochemistry and Organ Weights	p.138
8.2.4. Quantification of sphinganine (Sa) and sphingosine (So) in liver and kidney tissue	p.138
8.3. Statistical Analysis	p.139
8.4. Results	p.140
8.5. Discussion	p.143
8.6. Conclusions	p.146
8.7. Acknowledgments	p.146
8.8. References	p.147

Capítulo 9. Discusión general	p.153
9.1 Efecto de las micotoxinas sobre la producción y la salud de los Animales	p.156
9.1.1 Efecto de las micotoxinas sobre el consumo de pienso, Crecimiento y producción	p.156
9.1.2 Efectos tóxicos metabólicos, morfológicos, histológicos	p.159
9.2 Uso de bloqueantes de micotoxinas en la digesta	p.162
9.3 Consideraciones generales y prácticas del uso de adsorbentes	p.168
Capítulo 10. Conclusiones	p.169
Capítulo 11. Bibliografía	p.173

Índice de figuras

Capítulo 2

Fig. 2.1. Estructura química de la Aflatoxina B1	p.17
Fig. 2.2 Estructura química de la Ocratoxina A	p. 18
Fig. 2.3 Estructura química de la Zearalenona	p. 20
Fig. 2.4 Estructura química de Tricotecenos: Deoxynivalenol	p. 21
Fig. 2.5 Estructura química de la Fumonisina B1	p. 23

Índice de Tablas

Capítulo 2

Tabla 2.1. Micotoxinas más comunes, según la zona geográfica	p.11
Tabla 2.2. Valores de aw necesarios para el desarrollo de algunos mohos y para la producción de algunas micotoxinas.	p.13
Tabla 2.3. Temperatura mínima necesaria para el desarrollo de algunos mohos y para la producción de algunas micotoxinas	p.14
Tabla 2.4. Especies de hongos toxigénicos y sus toxinas	p. 16
Tabla 2.5. Efectos de las micotoxinas sobre las distintas especies animales	p. 32
Tabla 2.6. Límites máximos permisibles para aflatoxina B ₁ , B ₂ , G ₁ y G ₂ a partir del año 1999	p. 34
Tabla 2.7. Niveles de micotoxinas, reglamentados en diferentes países	p. 35

Capítulo 4

Table 4.1. Composition and nutrient value of the experimental diets (g/kg, as fed basis)	p.60
Table 4.2. Effects of aflatoxin B ₁ (AFB ₁) and AflaDetox on growth performance, and digestive parameters of broilers at 42 days of age	p. 64
Table 4.3. Effects of aflatoxin B ₁ (AFB ₁) and AflaDetox on serum biochemical parameters of broilers at 42 days of age	p.65
Table 4.4. Effects of aflatoxin B ₁ (AFB ₁) and AflaDetox on the relative weight of liver and spleen and the concentration of AFB ₁ in liver of broilers at 42 days of age	p.67
Table 4.5. Effects of aflatoxin B ₁ (AFB ₁) and AflaDetox on the liver tissue score of broilers at 42 days of age	p.68

Capítulo 5

Table 5.1. Ingredients content and the calculated composition of the basal diet	p. 82
Table 5.2. Effects of dietary Ocratox and ochratoxin A on the daily feed intake, BW gain, egg production, egg mass, feed conversion rate (FCR), egg mass and egg weight changes in laying hens	p. 87
Table 5.3 Effects of dietary Ocratox and ochratoxin A on shell thickness, albumen height, shape index, haugh unit and yolk color in the eggs	p. 88
Table 5.4 Effects of dietary Ocratox and ochratoxin A on serum biochemistry of laying hens	p.89

Capítulo 6

Table 6.1. Growth performance parameters of weaning female rats receiving diets containing increasing amounts of ZEA toxin.	p.101
Table 6.2. The effects of increasing dietary ZEA concentrations on weight of reproductive tract and other internal organs	p102
Table 6.3. Serum biochemical variables of weaning female rats fed with diets containing increasing amounts of ZEA toxin	p.103

Capítulo 7

Table 7.1 Ingredients (g/kg) and analyzed chemical composition of the experimental piglet diet	p.117
Table 7.2 Effect of different levels of AdiDetox on relative weight of organs in weaned female rats exposed ZEA for 28 days	p.120

Table 7.3 Effect of different levels of AdiDetox on serum biochemistry in weaned female rats exposed ZEA for 28 days	p.121
Table 7.4 Effect of different levels of AdiDetox on relative weight of organs in weaned piglets exposed ZEA for 26 days	p.123
Table 7.5 Effect of different levels of AdiDetox on serum biochemistry and the concentration of ZEA and α -zearalenol in bile fluid in weaned piglets exposed ZEA for 26 days	p.124
Capítulo 8	
Table 8.1 Effects of dietary fumonisin B1 and FumTox on internal organ weight In growing rats	p.141
Table 8.2 Effects of dietary fumonisin B1 and FumTox on serum biochemistry In growing rats	p.142
Table 8.3 Effects of dietary fumonisin B1 and FumTox on the sphinganine (Sa) And sphingosine (So) content in individual kidney samples of rats	p.143
Capítulo 9	
Tabla 9.1 lotes de ingredientes con micotoxinas por encima de niveles recomendados	p.157
Tabla 9.2 Agentes detoxificantes probados en broilers. Ensayos in vivo	p.163

Tabla 9.3 Agentes detoxificantes probados en cerdos. Ensayos in vivo	p.164
Tabla 9.4 Valores medios de cambio de peso, IC, ALP, proteína sérica, peso de hígado y valores de EC50 para pollos broilers	p.165
Tabla 9.5 Valores medios de ingestión de pienso, producción de huevos, concentración sérica de ALP, peso relativo de hígado y OTA en yema de huevo	p.166
Tabla 9.6 Valores medios de peso de útero, ovarios, ALP, residuos ZEA y α -Zearalenol en bilis. EC50 para lechones	p.167
Tabla 9.7 Valores medios de peso relativo de hígado, Sa, So, Sa/So, y valores de EC50 para ratas alimentadas con dietas contaminadas con FB1 y adicionadas con adsorbente.	p.167

ABREVIATURAS UTILIZADAS

ACP: ácido ciclopiazónico	<i>F. roseum</i> : fusarium roseum
ADG: average daily gain	FSH : follicle stimulating hormone
ADN: ácido desoxirribonucleico	GGT: glutamil transferasa
ALB: albumin	GIT: gastrointestinal tract
ARN: ácido ribonucleico	HSCAS : aluminosilicatos
AFB1: aflatoxina B1	NRC: National Research Council
AFM1: aflatoxina M1	OcraTox: adsorbente modificado para OTA
AflaDetox: adsorbente (tierra de diatomeas)	OM: organic matter
AGV: ácidos grasos volátiles	OTA: ocratoxiina A
ALP: alkaline phosphatase	<i>P. expansum</i> : penicillium expansum
ALT : alanine aminotransferase	PEPCK: fosfoenol piruvato carboxiquinasa
<i>A. flavus</i> : aspergillus flavus	ppb: partes por billón
<i>A. parasiticus</i> : aspergillus parasiticus	PPE: edema pulmonar porcino
AST: aspartate aminotransferase	ppm: partes por millón
aw: actividad de agua	µg: microgramos
BW: body weight	TP: total protein
CP: crude protein	T2: toxina T2
DAS: diacetoxyscirpenol	UA: uric acid
DM: dry matter	ZEA, ZEN : zearalenona
DON: Deoxynivalenol	So: sphingosine
<i>E. coli</i> : <i>Escherichia coli</i>	Sa: sphinganine
ELEM: leucoencefalomalacia equina	FB1: fumonisina B1
ES : egg shape index	
FCR : feed conversion rate	

CAPITULO 1

Introducción General

Las *micosis* y *micotoxiosis* comprenden un conjunto de afecciones y trastornos en el hombre y los animales o vegetales originados por varias especies de hongos o sus toxinas. La incorporación de la micotoxina en la cadena trófica puede producirse en el campo o en las bodegas de almacenaje dependiendo de las condiciones de cultivo, cosecha y transporte. En los animales la severidad de la micotoxiosis depende de la toxicidad del hongo, de la edad, salud, estado nutricional del animal y de los efectos sinérgicos con otras toxinas y/o compuestos a los que está expuesto.

Impacto Sanitario.

Los primeros indicios de la importancia que pueden tener las micotoxinas en la producción animal datan de los inicios de los años sesenta, cuando ocurrió la muerte masiva de aves de corral en Inglaterra. Allí se comprobó que la causa de la muerte eran metabolitos producidos por el hongo *Aspergillus Flavus* que contaminó la torta de cacahuete utilizada en la ración. Desde entonces, se usa la palabra *Aflatoxina* para describir el metabolito tóxico producido por este hongo. Progresivamente se han descrito otras micotoxinas del género *Aspergillus* (aflatoxinas B₁, M₁, B₂, G₁, G₂, Patulina, Ocratoxina A), del género *Fusarium* (Zearalenona, Fumonisina, T₂, DON) y del género *Penicillium* (citrinina, patulina, penitrem A, ocratoxina), con gran impacto sobre la salud y la productividad animal.

Si bien, todas las micotoxinas representan un riesgo concreto para la salud del animal, la combinación de dos o más toxinas puede potenciar la toxicidad de una o de todas ellas, agravando el cuadro patológico. Generalmente se han estudiado los efectos de las toxinas de mayor impacto sanitario a nivel mundial, centrando la atención en algunos tipos de toxinas como las aflatoxinas, zearalenona, ocratoxina y fumonisinas. Así, la aflatoxina B₁ es considerada la más agresiva de las toxinas por sus efectos teratogénicos, mutagénicos y carcinogénicos. El consumo de aflatoxina provoca también disminución de apetito, crecimiento retardado, daño hepático, ictericia y depresión del sistema inmune (Burns et al., 1986; Hamilton et al., 1982; Kuiper-Goodman y Scott, 1989).

En las aves, la aflatoxina B₁ provoca daño hepático con necrosis, hiperplasia de conductos biliares, petequias y hemorragias a nivel de órganos internos, y con frecuencia el desarrollo paralelo de otras patologías como salmonelosis, coccidiosis o bursitis infecciosa (Denli et al., 2005; Jand et al., 1995; Smith et al., 1992). En los rumiantes, los microorganismos del rumen metabolizan una gran parte de las toxinas ingeridas, actuando como protector natural. Sin embargo, tras la absorción en el intestino, las aflatoxinas pueden incidir negativamente en el sistema inmune y en la producción láctea (Helferich et al., 1986), y una fracción apreciable de aflatoxina M₁, metabolito secundario de la aflatoxina B₁, es secretada con la leche (Polan et al., 1974; Díaz et al., 2004).

En el caso de la zearalenona, su ingestión por lechones deja secuelas graves durante toda la vida reproductiva, principalmente en las hembras, ya que su principal efecto es estrogénico. La ingestión de la toxina por la madre durante la gestación, con niveles superiores a 200 ppb, puede determinar su paso trasplacentario y la manifestación de los efectos reproductivos sobre los lechones en su vida posterior (Hussein y Brasel, 2001). En vacuno lechero se han descrito problemas productivos y reproductivos con dosis superiores a 250 ppb (Gimeno y Martins, 2003); mientras que las aves presentan una mayor resistencia.

La ocratoxina A, toxina producida por algunas especies de los géneros de hongos *Aspergillus* y *Penicillium* presenta un elevado poder nefrotóxico hepatotóxico, inmunosupresor o carcinógeno (Burns et al., 1986; Hamilton et al., 1982; Kuiper-Goodman y Scott, 1989).

Podríamos citar muchos más trabajos que describen los efectos patógenos de diferentes micotoxinas sobre las especies animales. En general, los factores patogénicos más relevantes son el tipo de toxina evaluada, la cantidad y el periodo de exposición a que se ha sometido el animal, la especie a la que se ha expuesto, la condición sanitaria y su estado nutricional.

De acuerdo con la Organización de Agricultura y Alimentos de las Naciones Unidas (FAO, 1995), hasta un 25% de las cosechas de alimentos a nivel mundial están contaminadas con algún tipo de toxina de origen fúngico. Aunque resulta difícil de

cuantificar, las pérdidas económicas causadas por las micotoxinas representan una carga enorme tanto a nivel de salud pública como de productividad animal. En los EE.UU. se ha estimado que las pérdidas directas causadas sólo por tres micotoxinas (aflatoxina B1, fumonisina y deoxivalenol-DON) sobrepasan los 900 millones de dólares anuales.

Ante esta situación resulta prioritario desarrollar procedimientos rápidos y específicos para detectar, prevenir y eliminar la contaminación de las cosechas. Dentro de las estrategias preventivas, cabe destacar el establecimiento de sistemas de análisis y de control de puntos críticos (HACCP) en la cadena alimentaria. A nivel de campo, las medidas deberían ir dirigidas a evitar al máximo la proliferación de los hongos productores de toxinas durante y tras la cosecha. Sin embargo, en condiciones prácticas, el ganadero o fabricante de piensos generalmente desconoce la presencia de micotoxinas en los ingredientes por lo que cobra una especial importancia establecer protocolos de prevención y bloqueo de la micotoxina. Recientemente ha cobrado interés el uso de *adsorbentes* en el pienso. Su finalidad es bloquear la micotoxina en el tracto digestivo y como consecuencia, limitar su absorción y efectos metabólicos en el organismo. Con este objetivo, en la actualidad se está investigando la posibilidad de modificar arcillas y tierras de diatomeas en su estructura y polaridad para incrementar su capacidad de adsorción sobre determinadas micotoxinas y facilitar su posterior eliminación con las heces.

El presente trabajo se enmarca en un proyecto de desarrollo de uno de estos tipos de adsorbentes en colaboración con la empresa promotora de este producto y de los centros de investigación responsables de la modificación y evaluación *in vitro* del adsorbente. Nuestro proyecto se sitúa en el eslabón final de esta cadena, con el objetivo de evaluar *in vivo* los adsorbentes propuestos frente a diferentes micotoxinas. La variedad de micotoxinas evaluadas y de sus mecanismos de acción, así como de las especies de destino, genera la necesidad de realizar un número elevado de pruebas experimentales y de parámetros de estudio.

CAPÍTULO 2

Revisión de Literatura

2.1. Las micotoxinas: un riesgo generalizado

La presencia de hongos en la naturaleza es enorme, pudiéndose encontrar sobre cualquier superficie orgánica, como las plantas, insectos y vertebrados. En las condiciones adecuadas, los hongos son capaces de producir micotoxinas. Las micotoxinas son metabolitos secundarios de los hongos, producidos en la reducción de cuerpos cetónicos para la síntesis de los ácidos grasos que posteriormente utiliza como fuente de energía (Gimeno y Martins, 2003).

La ubicuidad, característica típica de diferentes especies de hongos determina que las micotoxinas puedan encontrarse en una gran variedad de productos alimenticios (D'Mello y Macdonald, 1997). Sin embargo, la presencia de un hongo en el alimento no indica necesariamente la presencia de micotoxinas, sino un riesgo potencial de contaminación. Por otra parte, la ausencia de hongos toxigénicos no garantiza que el alimento este exento de micotoxinas, ya que éstas persisten aún cuando el hongo haya muerto.

La contaminación de los alimentos por los llamados hongos de campo o de pre-cosecha (géneros más comunes como *Fusarium ssp*, y *Alternaria ssp*) puede ocurrir durante el periodo de crecimiento, y maduración de la planta, especialmente en las semillas. Después de la cosecha el riesgo proviene de otros hongos de géneros como *Aspergillus ssp*, *Penicillium ssp* y *Rhizopus ssp* bajo condiciones inadecuadas de humedad y temperatura en el almacenaje (Smith, 2005). Aunque se controlen las condiciones en el almacenaje, la contaminación que proviene del campo no puede eliminarse y la presencia de diferentes micotoxinas en los diferentes puntos intermedios de la cadena alimentaria es casi inevitable (Bennett y Klich, 2003).

Según la recopilación hecha por diferentes autores (D'Mello y MacDonal, 1997; Sweeney y Dobson, 1998; Santín, 2005), la distribución de las micotoxinas, aunque generalizada, sigue patrones definidos por la variación de los factores climáticos (temperatura y humedad), el pH y la preferencia de los hongos por el sustrato en diferentes zonas geográficas. Es así como la presencia de aflatoxinas en cereales y otros ingredientes de origen vegetal es generalizada en zonas cálidas y húmedas como en Brasil, Uganda, India, Nigeria, sur de Estados Unidos y ciertas partes de Australia.

Para que nos hagamos una idea del impacto de la aflatoxina en alguna de estas zonas, en Estados Unidos el 20% del maíz producido en el sur en condiciones ambientales no extremas contiene alguno de los tipos de aflatoxina; mientras que en periodos con condiciones extremas la presencia de toxinas puede sobrepasar el 70% de las muestras analizadas.

En la zona templada del norte de Europa crecen con mayor facilidad los hongos del género *Fusarium* (Bottalico y Perrone, 2002; Santín, 2005) productores de un gran rango de micotoxinas. Entre ellas destacan los tricotecenos (toxina T-2, diacetoxiscirpenol, deoxynivalenol y nivalenol), moniliformina, fumonisinas y zearalenona por sus efectos sobre la productividad y la salud animal. Las diferentes condiciones climáticas entre la parte norte, media y sur de Europa, favorece el desarrollo de distintas especies de hongos. Podemos encontrar cosechas de maíz en Suecia, Austria y Hungría contaminados con deoxinivalenol, zearalenona y toxina T2; mientras que la ocratoxina A hace lo propio en países como Dinamarca y Polonia.

El *Acremonium lolli* (*Noetyphodium lolli*) productor de un complejo grupo de terpenoides, de los cuales el lolitrem es considerado el metabolito más tóxico, ha sido encontrado en zonas endémicas de Nueva Zelanda y Australia, y también en Suramérica y Europa (Plumlee y Galey, 1994). En la tabla 2.1, adaptada de diferentes autores (Devegowda y Murthy, 2005; Jorgensen et al., 1996; Sweeney and Dobson,

1998; Barug et al., 2004), se presenta las principales micotoxinas más comunes en las diferentes zonas geográficas.

Tabla 2.1. Micotoxinas más comunes, según la zona geográfica.

Localización	Micotoxina
Europa (Oeste)	Ocratoxina, Vomitoxina, Zearalenona
Europa (Este)	Zearalenona, Vomitoxina
América del Norte	Ocratoxina, Vomitoxina, Zearalenona, Aflatoxina
América del Sur	Aflatoxina, Fumonisina, Ocratoxina, Vomitoxina, Toxina T2
África	Aflatoxina, Fumonisina, Zearalenona
Asia	Aflatoxina
Australia	Aflatoxina, Fumonisina, lolitrem alcaloide

(Devegowda y Murthy, 2005; Jorgensen et al., 1996; Sweeney and Dobson, 1998; Barug et al., 2004; Placinta et al., 1999)

2.2 Factores que intervienen en el crecimiento de los hongos y la producción de micotoxinas

Tradicionalmente los hongos se han dividido en especies de campo o de almacenaje, por su presencia mayoritaria en el campo o en las bodegas. Los de campo requieren altas condiciones de humedad (20-21%) e incluyen los géneros *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Diplodia* y *Gibberella* entre otros. Los de bodega requieren menos humedad (13-18%) y normalmente no representan problema antes de la cosecha. Este grupo lo forman principalmente los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* (Santin, 2005).

Por lo tanto, las micotoxinas pueden entrar en la cadena alimentaria desde el mismo cultivo, en el almacenamiento de los alimentos y materias primas y en otros puntos intermedios del proceso, como manipulación, embalaje y transporte (Bennett y Klich, 2003).

La producción de micotoxinas depende de diferentes factores:

2.2.1 Factores Biológicos.

Muchos de los hongos toxigénicos son también patógenos de las plantas. Por ejemplo, la putrefacción del maíz se atribuye principalmente al *Aspergillus Flavus* y se ha observado una estrecha correlación entre el grado de crecimiento del hongo y la producción de micotoxina. El cultivo de genotipos de maíz susceptibles al hongo produce semillas con altos niveles de contaminación con toxina.

Como ya se ha planteado anteriormente, la colonización puede ocurrir por una o más especies de hongos y la producción de micotoxinas puede estar influenciada por la interacción entre estos. También hay diferencia en la producción de toxina según sea la cepa o estirpe del hongo; por ejemplo, hay una cepa de *Aspergillus flavus* que no produce aflatoxina, mientras que la gran mayoría de cepas sí son productoras (Sanchís et al, 2000).

La presencia de organismos invertebrados en los cultivos, se convierte en un factor diseminador del hongo y por lo tanto contribuye a su crecimiento y multiplicación. El propio metabolismo del insecto, aporta humedad al sustrato que posteriormente el hongo aprovechará para su crecimiento y desarrollo.

2.2.2 Factores Físicos.

Una gran variedad de interacciones físicas pueden afectar la producción de las micotoxinas, tanto en el campo como en el almacenaje de los productos. Dentro de estos factores se encuentran la temperatura y la humedad.

La cantidad de agua en el ambiente y en los sustratos es un factor importante para el desarrollo de los hongos y su producción de toxinas. Sin embargo, la forma en que se presenta esta humedad, también es determinante para el desarrollo de los hongos. Así, el agua libre que se encuentra dentro y en la periferia de las células y tejidos, es la que utiliza el hongo para la germinación de sus esporas, mientras que el agua combinada que forma parte de las células y se encuentra unida a proteínas y glúcidos, es menos disponible para éstos.

El agua disponible, llamada también actividad de agua (a_w), expresa la relación entre el agua libre de los alimentos y la capacidad de proliferar de los microorganismos. En otras palabras, indica la cantidad de agua disponible para el desarrollo de los microorganismos, una vez se ha alcanzado el equilibrio hídrico del sistema sustrato-medio ambiente. El valor de a_w que los diversos grupos de hongos necesita varía de acuerdo al sustrato y la temperatura (Gimeno y Martins, 2003). En la tabla 2.2 se muestra algunos valores de a_w necesarios para el desarrollo de los hongos más importantes y su producción de micotoxinas.

Tabla 2.2.- Valores de a_w necesarios para el desarrollo de algunos mohos y para la producción de algunas micotoxinas.

Mohos	A_w	Micotoxinas	a_w
<i>Aspergillus flavus</i>	0,78	Aflatoxinas	0,83
<i>Aspergillus parasiticus</i>	0,70	Aflatoxinas	0,80
<i>Penicillium expansum</i>	0,85	Patulina	0,99
<i>Penicillium patulum</i>	0,83	Patulina	0,95
<i>Aspergillus clavatus</i>	0,85	Patulina	0,99
<i>Aspergillus ochraceus</i>	0,77	Ocratoxinas	0,88
<i>Aspergillus ochraceus</i>	0,77	Acido penicílico	0,90
<i>Penicillium cyclopium</i>	0,82	Ocratoxinas	0,90
<i>Penicillium viridicatum</i>	0,83	Ocratoxinas	0,90
<i>Penicillium citrinum</i>	0,80	Citrinina	0,88
<i>Penicillium martensii</i>	0,79	Acido penicílico	0,99

(Gimeno y Martins, 2003; santin, 2005; Sweeney and dobson, 1998; Samapundo et al 2005)

Como podemos apreciar, la mayoría de hongos se desarrollan a partir de valores de a_w de 0.70. Sin embargo, cada género presenta condiciones particulares muy definidas (Samapundo et al 2005).

La presencia de agua en las cosechas depende estrechamente de la estacionalidad y los microclimas que se crean en los campos o a nivel del almacenaje. Por ejemplo, en verano o en zonas cálidas, el aire de la periferia tiene una temperatura más elevada que la del interior, creando el fenómeno de convección, condensando humedad y actuando de manera directa en el desarrollo fúngico y en la producción de toxina.

Cuando la humedad lo facilita, los hongos productores de micotoxinas pueden crecer de forma natural entre un rango de temperatura que va de -3 a 40° C. La

temperatura óptima para su desarrollo, se encuentra entre los 25 y 30°C, con un límite máximo de 45°C. Sin embargo, se ha identificado crecimiento de hongos *Aspergillus* a 55° C (Gimeno, 1999).

En la siguiente tabla se muestra la temperatura mínima necesaria para el desarrollo de algunos hongos y su producción de micotoxinas.

Tabla 2.3.- Temperatura mínima necesaria para el desarrollo de algunos mohos y para la producción de algunas micotoxinas.

Mohos	°C	Micotoxinas	°C
<i>Aspergillus flavus</i>	10°	Aflatoxinas	10°
<i>Aspergillus clavatus</i>	10°	Patulina	12°
<i>Aspergillus ochraceus</i>	10 - 12°	Ocratoxina	12°
<i>Penicillium expansum</i>	0°	Patulina	0 -24°
<i>Penicillium cyclopium</i>	0°	Ocratoxina	0 -24°
<i>Penicillium cyclopium</i>	0°	Acido penicílico	4°
<i>Fusarium roseum</i>	15°	Zearalenona	10°

(Gimeno y Martins, 2003; D’Mello and Macdonald, 1997;)

En consecuencia, el desarrollo de los hongos depende de la estrecha interacción entre los dos factores, humedad y temperatura. A título de ejemplo, con un valor de a_w de 0.85 y a 20° C (equivalente aprox. a 15-16% de humedad del sustrato), las esporas fúngicas germinan en un periodo de 5 a 12 días; mientras que con una a_w de 0.75 (aprox. 13-14% de humedad del sustrato) y a la misma temperatura (20° C), las esporas tardan en germinar de 4 a 12 semanas (Gimeno y Martins, 2003).

2.2.3 Factores químicos.

Por regla general se sabe que la utilización de fungicidas en los cultivos y en los productos almacenados reduce considerablemente su carga de hongos, y por consiguiente la posibilidad de encontrar en ellos altas cantidades de toxinas. Lo que no se ha tenido en cuenta, como menciona D’Mello y MacDonal (1997), es que cuando se aplica el fungicida en concentraciones no letales, puede actuar en beneficio de la producción de toxina por parte del hongo. También las mezclas de diferentes fungicidas pueden inhibir la producción de una toxina específica, pero a la vez pueden estimular la producción de otra.

Los hongos tienen la capacidad de tolerar un gran rango de pH que va desde 2,5 a 7,5 y tienden a soportar más los medios ácidos que los básicos. Tienen la capacidad de modificar el pH del sustrato para su propio beneficio, utilizando los ácidos orgánicos de los propios sustratos o los producidos por otros microorganismos presentes durante el deterioro del alimento, asegurándose la viabilidad y posterior producción de toxinas.

2.2.4 Composición del sustrato.

Los hongos no son exigentes desde el punto de vista nutricional y se pueden nutrir de un amplio grupo de principios nutritivos. Sin embargo, la composición del sustrato donde se instala va a determinar drásticamente la producción de toxinas. Si el sustrato es amiláceo u oleaginoso condiciona la producción de micotoxinas. Por ejemplo, en condiciones óptimas de temperatura y humedad, se ha descrito un crecimiento del hongo muy alto y la producción de toxina baja en productos oleaginosos como la soja, comparada con cultivos amiláceos como el maíz y el trigo (Gimeno, 1999).

La composición mineral también juega un papel importante en la producción de toxina por parte del hongo. El zinc y el cobre son esenciales en este proceso. A nivel de laboratorio se evidenció que con la disminución de estos dos elementos, la producción de ocratoxina era casi nula, mientras que la producción de aflatoxina B1 se triplicaba con la incorporación de iones de Zn, Cu y Fe (Jones et al., 1994 ;Cuero and Ouellet, 2005).

Como sabemos los hongos son organismos aerobios y por lo tanto necesitan del oxígeno para sus reacciones metabólicas. La presencia de un ambiente con una baja presión de oxígeno reduce el crecimiento del hongo, y por lo tanto la producción de toxina. Según Gimeno (1999) una atmósfera con 20-40% de CO₂ combinada con una temperatura y humedad reducida (17° C), previenen la formación de aflatoxina en el cacahuete.

2.3 Las micotoxinas más importantes: breve descripción de la composición y mecanismos de acción.

En la actualidad, hay descritos más de 300 tipos de éstos metabolitos secundarios (Hussein y Brasel, 2001). Entre ellos, sólo unos cuantos reciben una atención especial por su gran poder toxigénico sobre los animales y el hombre. Los géneros de hongos más importantes por su producción de moléculas potencialmente tóxicas, son el *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. En la tabla 2.4, podemos observar las diferentes especies de hongos productores de las toxinas más importantes.

Tabla 2.4. Especies de hongos toxigénicos y sus toxinas.

Especie fúngica	Micotoxina
<i>Aspergillus flavus</i> ; <i>A. parasiticus</i>	Aflatoxinas
<i>A. flavus</i>	Ac. ciclopiazónico
<i>A. ochraceus</i> ; <i>Penicillium verrucosum</i> ; <i>P. cyclopium</i>	Ocratoxina A
<i>P. expansum</i>	Patulina
<i>Fusarium culmorum</i> ; <i>F. gramineatum</i> ; <i>F. sporomchioides</i>	Deoxinivalenol
<i>F. sporotrichioides</i> ; <i>F. poae</i>	Toxina T2
<i>F. sporotrichioides</i> ; <i>F. graminearum</i> ; <i>F. poae</i>	Diacetoxiscirpenol
<i>F. culmorum</i> ; <i>F. graminearum</i> ; <i>F. sporotrichioides</i>	Zearalenona
<i>F. moniliforme</i>	Fumonisin
<i>Acremonium coenophialum</i>	Ergopectinas
<i>A. lolii</i>	Lolitrems Alcaloides
<i>Phomopsis leptostromiformis</i>	Fomopsinas
<i>Pithomyces chartarum</i>	Esporidesminas

(D' Mello y MacDonal, 1997).

Es interesante resaltar que una sola especie de hongos puede producir una o más clases de micotoxinas. Así por ejemplo, *Aspergillus Flavus* es considerado el principal productor de aflatoxinas, pero también tiene la capacidad de producir ácido ciclopiazónico.

De las micotoxinas hasta ahora identificadas, pasaremos a destacar las que presentan una mayor incidencia o impacto sobre los animales.

2.3.1 AFLATOXINAS.

Son producidas principalmente por *A. flavus* y *A. parasiticus*. Existen por lo menos 18 tipos de estas moléculas, de las cuales las más importantes son la B1, M1 (derivado metabólico de la B1), la G1, M2(derivado metabólico de la B2), B2 y G2 . (denominaciones debidas a las reacciones de fluorescencia bajo luz ultravioleta de cada molécula , Blue y Green) (Bennett y Klich, 2003).

Químicamente son mitades de dihidrofuranos o tetrahidrofuranos unidos a un anillo cumarínico (Hussein y Brasel, 2001).

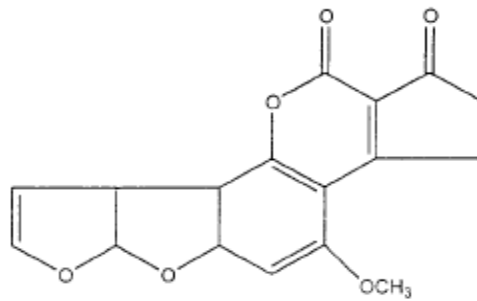


Figura 2.1. Estructura química de la Aflatoxina B1

Son estructuras altamente estables (Figura 1) en el medio ácido del tracto digestivo, hasta ser absorbidas en el intestino y encontrar los receptores adecuados para su posterior metabolismo.

Su absorción, distribución y eliminación es relativamente rápida; y una vez absorbida, se acumula en el hígado y otros tejidos donde es metabolizada. Los metabolitos resultantes de esta primera fase se unen a macromoléculas (proteínas y ácidos nucleicos) y los restantes son excretados en orina y heces, o almacenados en glándulas mamarias de mamíferos en forma de aflatoxina M1 (Díaz et al., 2004; Polan et al., 1974). El metabolismo y acción de la aflatoxina B1 en el hígado y otros tejidos se ha descrito en numerosos trabajos. Su principal acción es hepatotóxica. A nivel microsomal se metaboliza a diferentes formas denominadas aflatoxina P1, M1, Q1 y el metabolito 8-9-epóxido. En el hígado, los enzimas citocromo P450 son responsables de

la activación de diferentes xenobióticos, entre ellos las aflatoxinas (Gonzales and Yu, 2006).

El mecanismo de acción de las aflatoxinas incluye sus metabolitos intermedios que pueden reaccionar o unirse a otras moléculas del ADN con la consecuente interrupción de los procesos de transcripción y translación, provocando desordenes genéticos (mutación) para desencadenar en procesos cancerígenos (Coulombe, 1993; Bennett and Klich, 2003).

2.3.2 OCRATOXINA A (OTA)

Es producida principalmente por *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium Verrucosum*, *P. Nordicum* y *Penicillium Cyclopium*. Aunque hay descritos por lo menos 7 tipos de ocratoxinas, la más representativa es la OTA por su actividad nefrotóxica (Bennett y Klich, 2003; Riley y Pestka, 2005), hepatotóxica e inmunosupresora (Surai y Dvorska, 2005; Sharma, 1993). La ocratoxina A (Figura 2) es una molécula derivada de los compuestos 3,4-dihidrometilisocumarínicos, y formada por una mitad de isocumarina unida por una amida al aminoácido L-β-fenilalanina. (Hussein y Breasel, 2001; Leeson et al., 1995).

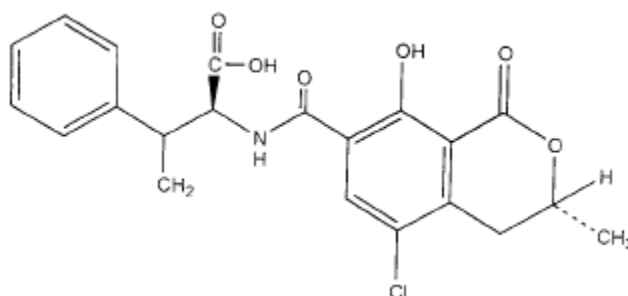


Figura 2.2. Estructura de la Ocratoxina A. Derivados de la isocumarina a la derecha de la molécula y el aminoácido a la izquierda, unidos por una amida

Por sus propiedades físico-químicas, se absorbe fácilmente en el tracto gastrointestinal, siendo su biodisponibilidad superior al 50% en la mayoría de especies estudiadas. El mecanismo de acción de la ocratoxina aún no es muy claro, pero la

similitud de su estructura con la fenilalanina y el hecho de inhibir enzimas y procesos que dependen de este aminoácido, hace pensar que la OTA actúa interrumpiendo el metabolismo del aminoácido (Riley y Pestka, 2005). La OTA también presenta alta afinidad por las proteínas plasmáticas, lo que supondría una larga persistencia en el organismo hasta su eliminación vía renal y hepatobiliar (Lopez de Cerain et al., 2000; Marquardt y Frohlich, 1992; Bennett and Klich, 2003; Hussein and Brasel, 2001). Se ha demostrado que la OTA influye sobre el metabolismo de la glucosa, provocando una acumulación de glucógeno en el hígado al inhibir la activación por parte del AMP-cíclico de la fosforilasa quinasa, responsable de la transformación del glucógeno en glucosa 1-P (Marquardt y Frohlich, 1992). Además causa un aumento de glucosa en sangre, por la inhibición de la actividad fosfoenol piruvato carboxiquinasa (PEPCK), enzima clave en la gluconeogénesis renal (Marquardt and Frohlich, 1992).

2.3.3 ZEARALENONA (ZEA).

Es un metabolito con efectos estrogénicos, no esteroidal, producido por el género de hongos *Fusarium*, principalmente *F. graminearum*, *F. roseum*, *F. moniliforme* y *F. tricinctum*, entre otros.

La ZEA es una estructura consistente en un resorcinol unido a un grupo lactona macrocíclico de 14 carbonos (Figura 3). Químicamente es el ácido 6-(10-hidroxi-6-oxo-trans-1-undecenil)-beta-resorcinol lactónico (Malekinejad et al., 2005). Esta estructura es lo suficientemente flexible para adaptarse y ser capaz de unirse a los receptores estrogénicos de los mamíferos, aunque la afinidad sea menor que la de los estrógenos naturales como el 17-beta estradiol, el estriol y la estrona (Shier et al, 2001).

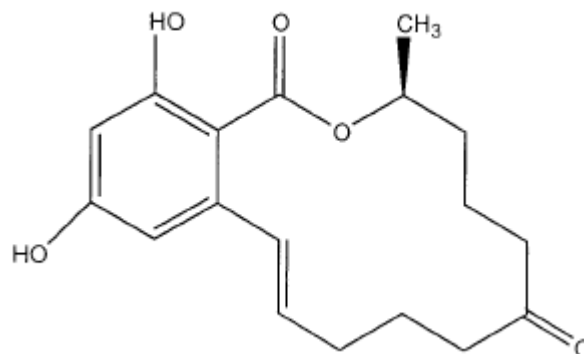


Figura 2.3. Estructura química de la Zearalenona

A pesar de la estructura no esteroidea de la ZEA y sus metabolitos, su similitud con la estructura del estradiol (Riley y Pestka, 2005), hace que se unan a los receptores estrogénicos de la membrana, activándolos y provocando el síndrome hiperestrogénico. Una vez en el citosol y otros organelos de los hepatocitos, empieza a ocurrir la biotransformación (Hussein y Brasel, 2001; Malekinejad et al., 2005) por dos vías: la primera es por hidroxilación de la ZEA para producir alfa y beta-zearalenol. Se ha demostrado que la ZEA y sus metabolitos (alfa-zearalenol y beta-zearalenol) tienen diferente grado de poder estrogénico. La alfa y la beta-zearalenol son catalizadas por el enzima 3α y la 3β -hidroxiesteroide dehidrogenasa respectivamente y su actividad determina el grado de toxicidad que sufre la especie animal involucrada.

La segunda vía de biotransformación corresponde a la conjugación de la ZEA y sus metabolitos reducidos con ácido glucurónico, y catalizados por la enzima uridina difosfato glucuronil transferasa (Olsen y Kiessling, 1983).

La glucuronidación facilita la pre-eliminación sistémica de la toxina a la vez que prolonga la limpieza total del sistema por medio de la recirculación entero-hepática. En un estudio de Biehl y colaboradores (1993) se evidenció las diferencias de perfiles de metabolitos tóxicos entre la bilis y el plasma analizado, sugiriendo que la mucosa intestinal se activa para reducir ZEA a zearalenol y conjugar posteriormente estos metabolitos con el ácido glucurónico.

2.3.4 TRICOTECENOS.

Los tricótesenos son otro grupo de toxinas producidas por el género *Fusarium* con efectos perjudiciales sobre la salud y la productividad animal. Este grupo incluye más de 40 compuestos derivados, de donde se destacan la toxina T2, el deoxynivalenol (DON, llamada también vomitoxina por sus efectos eméticos), nivalenol, mono y diacetoxyscirpenol. Este grupo recibe esta denominación por poseer en su estructura química (Figura 5), un esqueleto tetracíclico conocido como 12,13-epoxitricotec-9-eno. El principal suceso asociado a su ingestión por los animales es la irritación de los tejidos y en especial de la mucosa intestinal, con manifestación de lesiones orales y dermatitis. Los tricotecenos son, después de la aflatoxina, las toxinas más inmunomoduladoras de las producidas por los hongos (Devegowda y Murthy, 2005). El principal mecanismo de acción es afectar la respuesta inmune celular por incidencia directa sobre la médula ósea, bazo, tejido linfoide, timo y mucosa intestinal, donde las células que se dividen activamente son inmediatamente dañadas. La citotoxicidad se le atribuye a este grupo, por su potente inhibición de síntesis de proteínas, ARN y ADN (Hussein y Brasel, 2001).

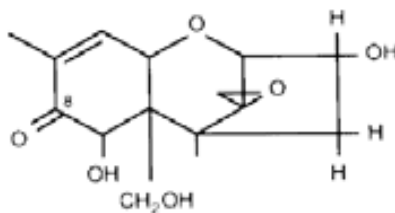


Figura 2.4. Estructura química general de los Tricotecenos. Deoxynivalenol

Químicamente los tricotecenos se dividen en dos grupos llamados macrocíclicos y no macrocíclicos, dependiendo de la presencia del anillo macrocíclico entre los carbonos 4 y 15. Los no macrocíclicos a su vez, se dividen en tipo A y B. El tipo A comprende las toxinas diacetoxyscirpenol, Toxina T2 y sus derivados. En el tipo

B podemos encontrar la deoxynivalenol, nivalenol y otros metabolitos menos estudiados.

Los tricotecenos son metabolizados en dos fases. En la primera fase se presentan reacciones de hidrólisis, oxidación y reducción. La hidrólisis de ésteres parece ser la principal vía en el metabolismo de los tricotecenos que contienen estos grupos químicos. Sin embargo, la hidrólisis inicial produce metabolitos con igual toxicidad al de los compuestos iniciales u otros derivados, por lo que este paso no se considera como un proceso de detoxificación importante, hasta donde ocurre la hidrólisis por esterasas donde se producen alcoholes menos tóxicos. En la segunda fase, ocurren reacciones de biotransformación, como por ejemplo la conjugación con glucurónico, principalmente de las toxinas diacetoxyscirpenol (DAS), Toxina T2 y deoxynivalenol (DON) y los correspondientes metabolitos. Los compuestos modificados se excretan principalmente vía bilis al tracto gastrointestinal. Una vez en el tracto digestivo puede ocurrir una nueva ruptura del complejo por la microflora intestinal y quedar libre la toxina para ser de nuevo absorbida. Así, el proceso de recirculación enterohepática puede retrasar la excreción y aumentar la toxicidad (Leeson et al., 1995).

2.3.5 FUMONISINAS.

Las fumonisinas incluyen los tipos FB1, FB2 y FB3, constituyendo parte del grupo de micotoxinas producidas por el hongo *Fusarium moniliforme*. Se componen de una larga cadena hidrocarbonada, altamente polar (Figura 4), que le confiere sus propiedades toxigénicas (Hussein y Brasel, 2001).

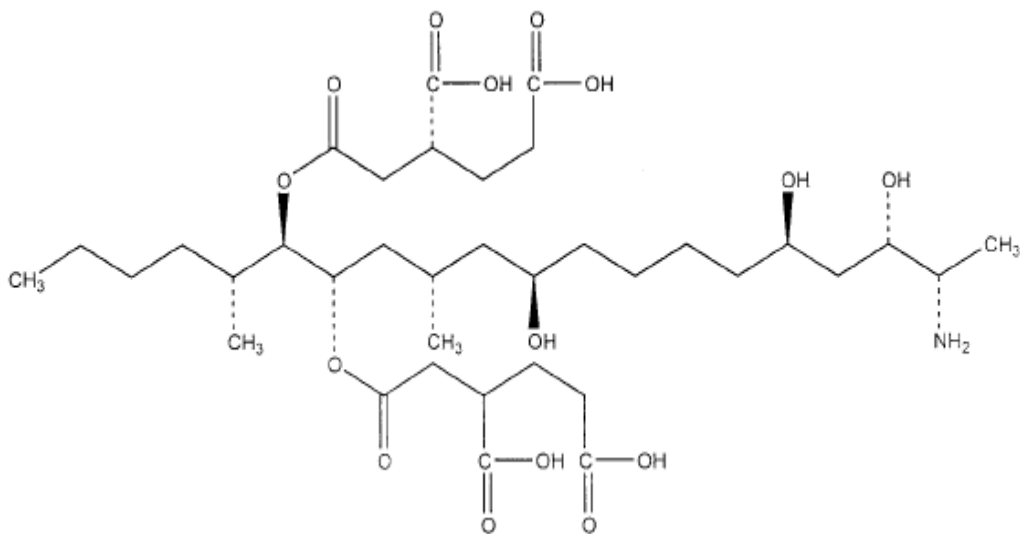


Figura 2.5. Estructura química de la fumonisina B1

La fumonisina B1 es la más tóxica de su grupo y se ha demostrado que también puede tener propiedades teratogénicas (Gelderblom et al., 1988). Se cree que pueden existir otros compuestos secundarios igualmente tóxicos, que aún no han sido descubiertos debido a la naturaleza hidrofílica de las fumonisinas.

En diferentes estudios, se ha manifestado el poder tóxico de esta molécula, particularmente en modelo murino. En estas especies se ha encontrado que la toxina produce un descenso en la ganancia de peso y en el consumo de alimento con dosis de 50 a 250 mg/kg en periodos cortos de tiempo; mientras que en periodos largos, dosis de 10 mg/kg manifiesta efectos tóxicos y dosis de 1 mg/kg no lo hacen (Gelderblom et al., 1997). En otro estudio en ratones, suministrando por sonda diferentes niveles de toxina, se observó que con dosis de 35 y 75 mg/kg de FB1, el peso y el consumo decrecieron; con dosis de 5 a 35 mg/kg ya se observaba cambios morfológicos y con dosis de 15 mg/kg ya se presentaba hepatotoxicidad (Bondy et al., 1997).

Se ha evidenciado que las fumonisinas, mediante un mecanismo de acción subyacente, producen su toxicidad por interrupción del metabolismo lipídico, inhibiendo la ceramida sintetasa, enzima clave en la formación de ceramida y otros complejos

esfingolípidos (Riley y Pestka, 2005; Bennett y Klich, 2003; Wang et al., 1991). La fumonisina B1 induce apoptosis de los hepatocitos y células tubulares del riñón (nefrotóxica) y puede producir necrosis secundaria. Se ha sugerido que la apoptosis es consecuencia de la inhibición e interrupción del metabolismo de lipoproteínas o esfingolípidos (Surai y Dvorska, 2005). Estructuralmente, las fumonisinas se asemejan a la esfingosina y a la esfingonina y quizá ello sea un factor clave para que se produzca el bloqueo de la síntesis de los esfingolípidos y actúen como factor mitogénico por la acumulación de bases esfingoides, alterando así la transformación celular (Schroeder et al., 1994). La formación de ceramida, que posteriormente se convertirá en otros esfingolípidos más complejos como por ejemplo la esfingomielina, se cataliza por la esfingonina *N*-acil transferasa, enzima que es inhibida por la micotoxina Fumonisin B1 (FB1) (Desai et al., 2002). En la revisión de Merrill y colaboradores (1993), se encontró que la fumonisina bloqueó la formación de esfingolípidos en células neuronales, que se presentaba acumulación de esfingonina en todas las células tratadas con la toxina y que la síntesis de esfingomielina se afecta diferencialmente con las concentraciones de fumonisina. Es por ello que se les atribuye el síndrome a estas toxinas de neurotóxico y es asociado a la leucoencefalomalacia. Las fumonisinas, además del cerebro, también actúan directamente sobre órganos vitales como, pulmón, hígado, riñones y corazón.

2.4 OTRAS MICOTOXINAS

A continuación se menciona otro grupo de micotoxinas, que si bien no son tan comunes ni persistentes como las descritas anteriormente, si pueden determinar drásticamente los efectos deletéreos de estas moléculas en los animales y más aún cuando se encuentran acompañadas por otras, potenciando los diferentes efectos.

La Patulina es una micotoxina producida por diferentes especies de *Penicillium* principalmente por *P. expansum* y algunas especies de *Aspergillus*. Se encuentra fácilmente en los ensilados y por ello se asocia a las intoxicaciones en las especies rumiantes. Ejerce su acción tóxica atacando los enlaces covalentes en los grupos tioles de las proteínas y del glutatión, antioxidante natural protector de las células contra los

radicales libres (Riley y showker, 1991). La patulina produce efectos dosis-dependiente negativos sobre la producción de ácidos grasos volátiles (AGV) y la síntesis de proteína microbiana (Jouany y Díaz, 2005). Los principales síndromes que causa la patulina son neurotóxico, hepatotóxico, y nefrotóxico, con evolución de carcinomas y compromiso del sistema inmune.

El ácido ciclopiazónico (ACP), químicamente es un ácido indol tetrámico. Es producido por *Aspergillus flavus* y varias especies de *Penicillium*. Estudios toxicológicos en diferentes especies animales indican que los órganos diana de esta toxina son el hígado, riñones y tracto gastrointestinal (Leeson et al., 1995). Entre los efectos tóxicos citados por diferentes autores destaca el descenso en la ganancia de peso, diarrea, deshidratación, convulsiones y muerte. Los efectos se hacen evidentes con concentraciones elevadas de la micotoxina, actuando como un fuerte inhibidor de la respuesta del Ca^{2+} y de la actividad de la ATP-asa dependiente del Ca^{2+} en el retículo sarco y endoplasmático (Riley y Pestka, 2005).

La esterigmatocistina, es un intermediario en la síntesis de aflatoxina B1. Entre los *Aspergillus* productores se encuentran *A. ustus*, *A. nidulans*, *A. versicolor*, *A. sydowii*, *A. caespitosus*, *A. multicolor*, *Emericella nidulans*, *Em. quadrilineata*, *Em. rugulosa*, *Em. varicolor*, *Em unguis* y otras especies, *Eurotium amstelodami*, *Eu. chevalieri*, *Eu. repens* y *Eu. rubrum* (Klich et al., 2001).

Es mutagénica y potencialmente cancerígena. Sus efectos están estrechamente relacionados con los que produce la aflatoxina B1

La Citrinina es producida especialmente por el hongo *Penicillium citrinum*, aunque se ha podido aislar de otras especies de *Penicillium* como el *P. expansum*, *P. lanosum*, *P. verrucosum* y especies de *Aspergillus* como el *A. candidus* y *A. terreu*. En los años 30, cuando fue aislada, llamó la atención por su efecto antibacteriano, pero luego su potente efecto nefrotóxico, descartó su uso como antibiótico. Ha sido relacionada con nefropatía porcina y aviar en diferentes países europeos (EMAN, 2010).

Los alcaloides Ergóticos, representan una serie de moléculas tóxicas producidas por las especies de hongos *Claviceps*, especialmente *C. purpurea*. Las principales toxinas de este grupo son la ergotamina, ergosina, ergonina, ergocristina, ergocriptina, ergovalina, ergometrina, ergoptina, agroclavina y ergocornina, entre otras. Causan la enfermedad llamada ergotismo con dos formas de manifestación; una caracterizada por isquemia, inflamación, necrosis y gangrena de miembros y otra con signos convulsivos, descoordinación y ataxia (Leeson et al., 1995).

Como ya se ha planteado anteriormente, diferentes toxinas pueden ser producidas por una misma cepa de hongos y éstas pueden interactuar sinérgicamente, potenciando los efectos de una o de todas ellas. Es así como se puede encontrar otros tipos de moléculas no tan reconocidas como las anteriores, pero con importantes efectos sobre las diferentes especies animales. Es el caso de toxinas como el ácido fusárico, moniliformina (*F. moniliforme*), Oosporeina (*Oospora colorans*, *Chaetomium trilaterale*), fusarocromanona (*F. equiseti*), ácido penicílico (*P. olivino-viriall*, *P. mortersii*, *P. ochraceus*, *P. cyclopium*, *P. fenelliae*, *P. pulitans*, *P. pubersulum*), fumigotina (*Aspergillus fumigatus*) y otras tantas molécula tóxicas reconocidas por sus efectos nocivos y/o sinérgicos con otras moléculas más potentes.

2.5 EFECTO SOBRE LA SALUD Y LA PRODUCTIVIDAD DE LOS ANIMALES DE RENTA.

Como se ha citado anteriormente, las micotoxinas pueden causar diferentes enfermedades llamadas *micotoxicosis*, y su toxicidad puede ser aguda, crónica o subcrónica. Entre sus efectos destacan los efectos teratogénicos, mutagénicos y carcinogénicos de algunas de ellas sobre animales y humanos. Ciertamente, la micotoxicosis crónica es difícil de reconocer y aún hay mucha incertidumbre en cuanto a la evaluación del grado de exposición (Galvano et al., 2005).

Las manifestaciones de toxicidad en los animales son tan diversas como los diferentes tipos de hongos que sintetizan estos metabolitos secundarios. La respuesta toxica se produce cuando son ingeridas por los animales y la expresión de enfermedad varía y depende del órgano afectado, del tipo de toxina (diferente estructura química),

del tiempo de exposición, de la dosis, del estado fisiológico y sanitario del animal y/o de la combinación de toxinas.

La continua ingestión y dosis elevadas de micotoxinas puede provocar un grave deterioro en la salud de los animales. Los monogástricos y los animales más jóvenes son más sensibles a las micotoxinas que los animales rumiantes o de mayor edad. Las micotoxinas en concentraciones bajas pueden causar pérdidas subclínicas en la producción, e incrementar el riesgo e incidencia de las llamadas “enfermedades oportunistas”.

Así por ejemplo, en cerdos que es la especie más sensible a las micotoxinas, se ha comprobado el efecto negativo de la toxina T2, Deoxynivalenol (DON), zearalenona (ZEA) y aflatoxina (AFB1). En general los tricotecenos son inmunosupresores, y su consumo se relaciona con rechazo del alimento, pérdida de peso, vómitos, hemorragias, diarrea, anemia y lesiones cutáneas. Los más representativos de este grupo, la toxina T-2 y el DON pueden inhibir la síntesis proteica y causar daño y muerte celular en diferentes tejidos y órganos importantes. La toxina DON es con frecuencia denominada vomitoxina o factor de rechazo del alimento como reflejo de su sintomatología más característica. Los efectos de la toxina deoxinivalenol (DON) en cerdos en crecimiento se estudió con dosis por encima de 4 mg/kg, donde se observó que la dosis más alta redujo la ganancia diaria, el consumo de alimento, la eficiencia de utilización del pienso, la concentración sérica de proteína y albúmina y aumentaron el peso del hígado (Smith et al., 2005).

La zearalenona (ZEA) puede alterar la funcionalidad reproductiva de los animales de laboratorio y de renta. La zearalenona y algunos de sus derivados (α -zearalenol and β -zearalenol) actúan por adhesión competitiva sobre los receptores estrogénicos. Los cerdos son la especie más sensible, especialmente en su etapa prepúber. La exposición de las hembras a ZEA (>600 ppb) durante este periodo fisiológico, se ha relacionado con la aparición de signos de hiperestrogenismo manifestado por vulvovaginitis tanto en primerizas como en cerdas gestantes y lactantes. El conjunto de efectos estrogénicos incluyen el descenso en la fertilidad, el incremento en la mortalidad de embriones, y la reducción del tamaño de las camadas y

del peso fetal, provocando malformaciones y reabsorción fetal (Chang et al., 1979) y abortos (Smith et al., 2005). En lechones lactantes se presenta edema y enrojecimiento vulvar y lesiones congénitas de los genitales externos. Döll y colaboradores (2003) evidenciaron el aumento de peso de úteros en lechones prepúberes que recibían ZEN y DON en la ración (0.42 mg/kg ZEN y 3.9 mg/kg de DON). En cerdos reproductores, también se encontró que la ZEA deprimía la concentración de testosterona sérica, la espermatogénesis y la libido.

Las aves también son afectadas desfavorablemente tanto por la T2 como por DON, pero resisten más la ZEA. No obstante, se ha descrito que con altas concentraciones de ZEA en la dieta se puede observar alteraciones en las características sexuales secundarias en pavos y pollos (Devegowda y Murthy, 2005). A este efecto se suma el riesgo de que los residuos en la yema del huevo puedan tener implicaciones en la salud humana debido a las propiedades estrogénicas y genotóxicas de la ZEA.

En los rumiantes, la DON siempre se ha relacionado con bajo consumo y baja producción de leche, además del descenso en el porcentaje de producción de grasa en la leche. El ganado de engorde y las ovejas parecen ser más resistentes a la DON. Varios estudios de intoxicación con dosis altas (8.5 ppm en ovejas y 1 ppm en ganado) no han encontrado diferencias en consumo, ganancia y eficiencia, aún con dosis de 18 ppm en terneros alimentados con pienso contaminado durante 166 días (Jouany y Díaz, 2005). La diferencia en la susceptibilidad entre el ganado lechero y el de engorde para esta toxina puede estar sustentada por el nivel de producción a que se somete el primero. Así por ejemplo, en el periodo temprano de lactación, es donde el animal se encuentra en una etapa más crítica y por lo tanto más inmunosuprimido. La ingestión de las toxinas tricotecenos se caracteriza por provocar inmunosupresión por lo que pueden ser especialmente dañinas en esta etapa.

El efecto del consumo de ZEA puede afectar negativamente el comportamiento reproductivo, la fertilidad, la tasa de ovulación y descensos en la tasa de concepción en vacas de 87 a 62% (Weaver et al., 1986). En el mismo estudio se observó la reducción del cuerpo lúteo de las vacas tratadas con dosis de 250 mg/día de ZEA.

Con dietas que contenían entre 750 y 1500 ppb de ZEN y de 500 a 1000 ppb de DON se presentó fallo reproductivo en todos los animales tratados (Coppock et al., 1990), disfunción ovárica (D'Mello et al., 1999), vaginitis y secreciones vaginales, abortos y agrandamiento de la glándula mamaria de vaquillas de reemplazo (Jouany y Díaz, 2005).

La aflatoxina B1 afecta fundamentalmente a las aves, cerdos y otros monogástricos. La AFB₁ parece ser la que más daño produce en las aves, ya que varios investigadores citan como efecto el daño hepático, con necrosis, hiperplasia de conductos biliares, petequias y hemorragias a nivel de órganos internos. El consumo de aflatoxina B1 puede propiciar el desarrollo paralelo de otras patologías como salmonelosis, coccidiosis y la bursitis infecciosa (Denli et al., 2005; Jand et al., 1995; Smith et al., 1992).

En cerdos alimentados con pienso contaminado con aflatoxina B1 (500 a 800 ug/kg), se redujo la ganancia de peso y la eficiencia de utilización del pienso, la digestión lipídica y la función renal (Smith et al., 2005).

En cerdos de más edad la resistencia es mayor. Con niveles de aflatoxina B1 de 385 µg/kg de alimento se redujo la ganancia y la eficiencia en cerdos de acabado, pero sólo se encontró daño hepático con niveles más altos (Smith et al., 2005).

Los rumiantes son menos vulnerables a la ingestión de aflatoxina. En los animales monogástricos la sintomatología clínica puede producirse tras el consumo de piensos contaminados con concentraciones por encima de 50 ppb, mientras que en el rumiante la sintomatología sobreviene con concentraciones por encima de 1,5-2,23 mg/kg (Miller y Wilson, 1994). Sin embargo, la presencia de otros factores simultáneos y la respuesta individual puede causar que pequeñas cantidades de AFB₁ (>20 ppb) pueden provocar efectos tóxicos. En estas condiciones un nivel de aflatoxina por encima de 100 ppb puede resultar también tóxico en rumiantes. Los síntomas de aflatoxicosis aguda se manifiestan por depresión, anorexia, pérdida de peso, afección gastrointestinal, hemorragias, lesiones hepáticas (hígado graso, necrosis, y apoptosis) y edema pulmonar (Jouany and Diaz, 2005; Devegowda and Murthy, 2005; Raju and Devegowda, 2000). Las aflatoxinas pueden causar la acumulación de ácidos grasos en

hígado, riñones y corazón, encefalopatías y edemas. La ganancia diaria y el consumo en ganado vacuno, se afectaron con dosis de 700 ppb de AFB₁. Con dosis de 100 ppb se evidenció aumento de peso del hígado. En otro estudio se observó la disminución de la eficiencia reproductiva y cuando se suspendió la dosis, se mejoró la producción láctea en un 25% (Jouany y Diaz, 2005). Polan y colaboradores (1974), describieron que la AFB₁ se absorbe rápidamente en el tracto digestivo de las vacas y que ello puede explicar el rápido traspaso de la toxina a la leche en forma de AFM₁, aproximadamente después de 12 horas de la administración oral de la AFB₁ (Días et al., 2004). La relación entre la AFB₁ consumida y la cantidad de AFM₁ encontrada en la leche es bastante variable; como media se estima un depósito entre un 0.3-6.2 % de la AFB₁ en forma de AFM₁ en la leche (Creppy, 2002). Otro efecto de la aflatoxina B₁ en rumiantes es su efecto depresor de la degradabilidad ruminal (Jouany y Diaz, 2005).

La ocratoxina es nefrotóxica para todas las especies animales. Se ha descrito sintomatologías que incluyen la anorexia, debilidad, incoordinación de movimientos y aumento del consumo de agua, hasta la neuropatía tóxica. El consumo de alimentos contaminados con OTA a niveles de 1,0 mg/kg puede causar también una reducción en la digestión de la proteína y la energía (Verma et al., 2002)

En general, las dosis elevadas de OTA en las aves y cerdos se asocian con daño renal, anorexia, debilidad, pérdida de peso e incremento de la mortalidad tras el consumo de la toxina (Marquardt and Frohlich, 1992). La exposición crónica a la toxina induce un descenso en los consumos de pienso, incremento en los consumos de agua, deshidratación y por consiguiente descensos productivos.

Las fumonisinas, además de reducir la ganancia de peso en broilers y causar diarreas en gallinas de puesta (Javed et al., 1993), también ejercen su efecto negativo en los équidos, siendo la especie más sensible a esta micotoxina. Su acción sobre esta especie se ha relacionado con la aparición de diferentes síndromes, como son la Leucoencefalomalacia Equina (ELEM), además de perjudicar la función inmune, puede causar daño hepático y renal, y disminuir el normal desarrollo del animal hasta provocar su muerte (Newman and Raymond, 2005). En cerdos se relaciona con el edema

Pulmonar Porcino (PPE) (Harrison et al., 1990) y daño hepático y renal en la mayoría de especies. Así, la Fumonisina B₁ se presenta como hepatotóxica en casi todas las especies estudiadas, incluida las ratas, caballos, ratones, conejos y cerdos. Es de gran importancia en la producción porcícola, ya que además de manifestar el PEP, los animales expuestos a la toxina presentan cuadros de edema pulmonar y disfunción cardiaca y respiratoria, deprimiendo su productividad (Friend et al, 1992; Galvano et al., 2001; Diaz y Boermans, 1994). En lechones recién destetados produce hiperplasia nodular hepática, lesiones esofágicas y ulceración gástrica (Casteel et al., 1993). En la etapa de crecimiento de los cerdos, sobresale el descenso de la ganancia de peso, el consumo de alimento y aumenta los índices de colesterol. Oswald y colaboradores (2003) describen que dosis orales de fumonisina B1 en lechones recién destetados puede determinar enfermedades infecciosas y facilitar la colonización de *E. coli* como oportunista a nivel intestinal y extraintestinal. La fumonisina en el rumiante aparentemente es poco agresiva. Su metabolismo en el rumen no es muy eficiente y no parece afectar la digestión ruminal ni la calidad y cantidad de ácidos grasos volátiles (Jouany y Díaz, 2005). En un estudio en terneros se observó un incremento de los niveles enzimáticos en suero y resultó afectada la linfocitogénesis. También se evidenciaron lesiones microscópicas a nivel de hígado (Osweiler et al., 1993). Por su parte Edrington y colaboradores (1995), suministrando fumonisina a dosis diarias de 11.1 mg/kg de peso, observaron síntomas de toxicidad manifestados en el incremento de la actividad de AST y GGT en ovejas de 32 kg de peso.

A manera de resumen podemos ver en la tabla 2.6, un compendio de efectos de las diferentes micotoxinas sobre las especies animales más importantes en la producción ganadera.

Tabla 2.5. Efectos de las micotoxinas sobre las distintas especies animales.

Micotoxina	Especie Animal	Efectos productivos	Lesión	Niveles de toxina	Fuente
Aflatoxina B ₁	Aves	Descenso en crecimiento y producción, peso y calidad de huevos, incluida su incubabilidad. Presencia de residuos de aflatoxina B ₁ y M ₁ en huevos y carne. Reducción de función inmune e incremento en la mortalidad	hepatica	2.5-5 ppm	(1)
	Cerdos	Descenso en crecimiento, consumo y eficiencia alimenticia. Inmunosupresión, incremento en incidencia de otras enfermedades, diarrea, desórdenes reproductivos y mortalidad.	hepatica. anemia	230 ppb	(2)
	Vacuno, ovino y caprino lechero	Reducción en producción láctea y crecimiento. Presencia de residuos de aflatoxina M ₁ en leche	hepatica Mastitis. reproduct.	5,5 ppm 120 ppb	(2) (3) (8)
	Otros rumiantes	Reducción en consumo, crecimiento y respuesta inmune.			
Ocratoxina A	Aves	Descenso en crecimiento y producción de huevos, consumo y eficiencia alimenticia. Descenso en utilización de energía y proteína. Inmunosupresión, incremento en mortalidad.	edema nefritis enteritis. hepatica	0.2-1.6 ppm 140 ppb 0.5-4ppm	(2) (4) (2)
	Vacuno, ovino y caprino lechero	Residuos de OTA y derivados en leche	acumulación en tejidos	28.5 ppb	(5)
	Cerdos	descenso en crecimiento	Renal inmune	0.2-4ppm 2.5 ppm	(2) (7) (6) (16)
Zearalenona	Cerdos	Infertilidad, hiperestrogenismo, anoestro, y reducción de camadas.			Doll et al, 2005
	Rumiantes	Hiperestrogenismo y reducción de la producción lechera.	Reprodu. c. luteo	750 ppb 250 mg/dia	(9) (10)
Deoxivalenol	Todas las especies	Descenso en el consumo de alimento y ganancia de peso. Descenso plasmático y síntesis de proteína.	Ulceras, actividad ALT	2-4 ppm	(11) (12)
Fumonisinás	Todas las especies	Lesiones hepáticas en cerdos y vacas. Leucoencefalomalacia equina (ELEM), Edema porcino pulmonar (PPE).	desmielinización	1-5 ppm	(13)(14) (9)
Diacetoxycirpenol y toxina T-2	Aves y cerdos	Pérdida de peso, lesiones cutáneas, hemorragias.	hepat. dermica	500 ppb	(8)
Ergotina y otros alcaloides	Varias, especial en equinos	Reducción en el crecimiento. Descenso en la producción lechera. Abortos, distocias	Varias.	1500 ppb	(17) (18)
Patulina	Todas especies	Descenso en la producción de AGV y síntesis de proteína ruminal. Neuro, hepato y nefrotoxica.	Hepática Daño de ADN	700 ppb	(15)(9)
Ácido ciclopiazónico	Varias especies	Descenso en ganancia de peso; afecta hígado, riñones y tracto gastrointestinal.	varias	1-6 ppm 25-50 ppb Aves	(19)
Esterigmatocistina	Varias especies	Mutagénica, carcinogénica. Similar a AFB ₁ .	hepatica	2 ppm	(5)(9)
Citrinina	Varias especies	Principalmente nefrotoxica.	Renal, daño de ADN	1-2 ppm	(15)(16)

FUENTES:(1)Fernández et al,1994; (2) Gimeno y Martins 2003; (3) Brown et al 1995; (4) Abramson et al 1983; (5) Blank et al 2003; (6) Harvey et al 1992; (7) Stoev et al 2002; (8) Guthrie, L.1979; (9)Coppock et al 1990; (10) Weaver et al 1986; (11) Mikami et al 2004; (12) Faixova et al 2007; (13) Sagaram et al 2006; (14) Nelson et al 1993; (15) Liu et al 2003; (16) Braunberg et al 1992; (17) Fayrer-Hosken et al 2008; (18) Burke et al 2010; (19) Malekinejad et al 2010

2.6 NORMATIVIDAD Y REGULACIÓN DE LAS MICOTOXINAS.

Considerando el riesgo asociado al consumo de alimentos contaminados, prácticamente, todos los países, que, tienen una economía de mercado bien desarrollada, tienen reglamentaciones en lo que respecta a las micotoxinas. Los fundamentos sobre los que se ha diseñado la reglamentación de las micotoxinas están sujetos a varios factores, de los que sobresalen: i/ la disponibilidad de datos toxicológicos y su incidencia en los diferentes alimentos, ii/ la disponibilidad de métodos analíticos y de control, iii/ la legislación en otros países con los que hay contactos comerciales y iv/ la demanda de algunos países para ser abastecidos suficientemente en alimentos y /o materias primas. Organismos internacionales como la FAO (1995) y la OMS han establecido límites permitidos de micotoxinas en los alimentos, basados en los riesgos que estas representan a la salud humana.

Aunque todavía no hay un consenso o postura unánime sobre los límites máximos permisibles, podemos recoger la información disponible en cuanto a la AFB1, cuyos límites se empezaron a establecer a partir de los años 60, no sólo por el riesgo que corrían los animales expuestos a ella sino también por el inminente peligro cancerígeno que representa al humano. Los diferentes países fueron adaptando la normatividad a sus propias necesidades y exigencias y empezaron a generar algunas reglamentaciones que tenían rango de ley, mientras que otras sólo un carácter consultivo.

En la tabla 2.6, podemos observar el cambio de los límites permisibles de la aflatoxina B1 y algunos de sus metabolitos por los diferentes países miembros de la Unión Europea a partir de una fecha fijada.

Tabla 2.6. Límites máximos permisibles para aflatoxina B1, B2, G1 y G2 a partir del año 1999

PAÍS	Antes 01/01/99		Después 01/01/99	
	B1 (ppb)	B1-B2-G1-G2 ppb	B1 (ppb)	B1-B2-G1-G2 ppb
Alemania	2	4	2	4
Dinamarca	2	4	2	4
Francia	1	-	2	4
Grecia	5	10	2	4
Italia	5	10	2	4
Luxemburgo	5	-	2	4
Irlanda	5	30	2	4
Portugal	25	-	2	4
Reino Unido	4	-	2	4
Suecia	5	-	2	4
Finlandia	-	5	2	4
Países Bajos	4	-	2	4
España	5	10	2	4

(fuente: Martins et al., 2007; Official European Commission, 2003).

Una encuesta encargada por la F.A.O. entre los años 1994-95, puso de manifiesto que al menos 77 países poseían alguna legislación específica para las micotoxinas, mientras que al menos 13 países no habían promulgado ningún tipo de legislación al respecto. De otros 40 países, principalmente del continente africano, no se tenía información alguna. Todos los países con legislación específica para alguna micotoxina tenían regulado, por lo menos el nivel máximo permisible de aflatoxinas en alimentos y piensos (Sanchis et al., 2000).

A finales del 2003, unos 100 países habían establecido regulaciones específicas para otras micotoxinas, como el DON, DAS, fumonisinas, OTA, patulina, toxinas T-2 y HT-2, y ZEA en los alimentos e ingredientes para la alimentación animal.

En la tabla 2.7, se resume la reglamentación existente sobre las principales micotoxinas a nivel mundial.

Tabla 2.7. Niveles de micotoxinas, reglamentados en diferentes países.

Micotoxinas	Nivel limite (µg/kg)	Tipo de alimentos	Países
Aflatoxinas B ₁	0-50	Alimentos consumo humano	77
B ₂ , G ₁ , G ₂	5-1000	Alimentos consumo animal	77
M ₁	0-1	Leche y derivados	17
DON	5-10.000	Trigo y piensos	5 ^a
Fumonisinias	1000	Maíz	Suiza
OTA	1-300	Cereales, café, piensos, Alimentos y riñones	11 ^B
Patulina	20-50	Zumo de manzana y derivados	12 ^c
Toxina HT-2	25-100	Piensos	Canadá
Toxina T-2	100	Cereales y harinas	Rusia e Israel
ZEA	30-1000	Alimentos (nueces, cereales y leguminosas)	6 ^d

a: Austria, Canadá, Rumania, Rusia y EEUU; b: Austria, Brasil, Chequia, Dinamarca, Francia, Grecia, Israel, Rumania, Suecia, Suiza y Uruguay; c: Austria, Chequia, Finlandia, Francia, Grecia, Israel, Noruega, Rumania, Rusia, Suecia, Suiza y Uruguay; d: Austria, Brasil, Francia, Rumania, Rusia y Uruguay.

En la Unión Europea, el nivel máximo admisible de aflatoxina B₁ en los alimentos para consumo humano está situado en 5 µg/kg, mientras que para la suma de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂, este nivel asciende a 10 µg/kg. El contenido máximo de aflatoxina B₁ en los piensos está situado entre 10 y 50 µg/kg, según su destino, y para los ingredientes para piensos no se pueden superar los 200 µg/kg (Sanchis et al., 2000).

En Estados Unidos, la FDA ha establecido una serie de guías de actuación en cuanto a los niveles de aflatoxinas y fumonisina, en la que se destaca un nivel de 0.5 ppb de AFM1 en la leche para consumo humano y niveles de 100 a 300 ppb de los distintos tipos de aflatoxinas en maíz y semillas de algodón destinados al consumo

animal. Así mismo, propone niveles máximos de fumonisinas de 1 a 50 ppm, dependiendo de la especie y su sensibilidad a esta toxina.

Europa cuenta con una de las regulaciones más extensas y detalladas para micotoxinas en los alimentos. Sin embargo, su legislación es más detallada sobre alimentos para el consumo humano, que sobre los ingredientes destinados a la fabricación de piensos. Entre los límites impuestos por la UE y países candidatos a entrar en la UE destaca un límite máximo de 0,05 ppb de AFM₁ en la leche. Los límites para OTA en cereales y otros ingredientes varía entre 3 y 5 ppb (European Commission, 2002). Un gran número de países han establecido un límite de ZEA en cereales entre 50 y 1000 ppb y los límites de regulación para DON en el maíz oscila entre 1 y 3 ppm.

Actualmente sólo se contemplan límites para la aflatoxina B₁ en materias primas para la elaboración de piensos (hasta 50 ppb), en alimentos completos y complementarios para animales (de 5 a 50 ppb) (Anton et al., 2001).

Es claro que los esfuerzos en cuanto a las normativas sobre micotoxinas, se deben continuar para establecer las pautas para el control de estas. Actualmente, la FAO trabaja con países en vías de desarrollo para mitigar la contaminación por micotoxinas en alimentos y piensos. Estos programas incluyen asesoramiento, ayuda técnica y la implementación de niveles de tolerancia para las micotoxinas.

2.6.1 Medidas de Control y Prevención

Como se ha comentado en los anteriores apartados, el riesgo de contaminación de los alimentos es enorme. La contaminación puede ocurrir en el campo, en el almacenaje, en la fabricación del alimento o en la misma granja al ofrecer el alimento a los animales. En la mayoría de los casos, más de un tipo de micotoxinas puede contaminar un cargamento, un lote o una partida de alimento; especialmente cuando las condiciones de temperatura, humedad, presencia de insectos, etc., lo favorecen.

Excluir el crecimiento de hongos es la mejor manera de prevenir las micotoxinas y ello se puede lograr a través de la reducción de la colonización fúngica en las cosechas, secando y ensilando rápidamente y tratando los ingredientes con inhibidores efectivos como es el ácido propiónico (Raju y Devegowda, 2000).

Las estrategias primeras que se pueden aplicar a nivel práctico para controlar la aparición de hongos, incluyen: i/ la selección de variedades de cultivos resistentes a la colonización fúngica (Brown et al., 1995), ii/ la realización de buenas prácticas agronómicas para contrarrestar el crecimiento de los hongos, iii/ hacer una cosecha cuidadosa para evitar el daño de los granos, y su correcto secado, iv/ impermeabilización y eliminación de roedores e insectos en el lugar de almacenaje, v/ limpieza en comederos para evitar fermentaciones y medios propicios para los hongos y vi/ análisis frecuente de los alimentos para detectar micotoxinas. Durante la formulación destaca también la oportunidad de incorporar inhibidores fúngicos en la formulación de los piensos, utilizar enzimas como aditivos que funcionan como detoxificantes a nivel del tracto digestivo (Raju y Devegowda, 2000; Smith, 2005), extractos de plantas como la clorofilina con propiedades quimioprotectoras (Breinholt et al., 1999; Atroshi et al., 2002) y antioxidantes tales como la vitamina E, C y A (D'Mello et al., 1999; Hoehler y Marquardt, 1996)

Otra estrategia preventiva que se ha descrito como recurso prometedor para reducir la contaminación de las cosechas por las micotoxinas, es la inclusión de cepas de hongos atoxigénicas o no productoras de toxinas y que por biocompetencia pueden desplazar a las cepas toxigénicas. Mediante la incorporación de esta estrategia se han conseguido niveles de reducción de contaminación por aflatoxina de hasta el 90% en cultivos de algodón (Cotty et al., 1994).

Por su parte Hinton y Bacon (1995) describieron que un tipo de bacteria (*Enterobacter cloacae*) en simbiosis con las raíces del maíz, evita que las plantas se contaminen con cualquier tipo de hongo.

Sin embargo, una vez las micotoxinas han alcanzado a contaminar un ingrediente o un alimento, resulta difícil lograr su eliminación. En estas situaciones se hace necesario recurrir a diferentes medios para neutralizarlas o por lo menos minimizar su concentración. La detoxificación de las micotoxinas se refiere al conjunto de tratamientos posteriores a la cosecha dirigidos a eliminar o reducir los efectos tóxicos de estas moléculas sobre los animales. Para realizar el control y eliminación de las micotoxinas es necesario saber cuál o cuáles son las toxinas de mayor incidencia, conocer su estructura y su capacidad de reacción frente a otras moléculas, que las pueda hacer menos tóxicas o completamente inocuas.

Díaz y Smith (2005) afirman que cualquier método de descontaminación, ya sea físico, químico, biológico o enzimático debería cumplir los siguientes requisitos:

- a). Que sea efectivo en la extracción, destrucción e inactivación de las micotoxinas.
- b). Que no produzca residuos tóxicos, carcinogénicos o mutagénicos en los productos tratados ni en los productos alimenticios derivados de los animales que consumen el pienso tratado.
- c). Que no altere las propiedades nutritivas del alimento o que alteren su aceptabilidad y
- d). Que sea económica y tecnológicamente factible; no alterando el costo final del producto.

Los métodos de detoxificación de micotoxinas que se vienen empleando se pueden dividir como hemos dicho, en físicos, químicos y biológicos. La mayor parte de ellos pueden reducir, destruir o inactivar diferentes micotoxinas pero pocas veces consiguen eliminar simultáneamente otras toxinas igualmente importantes (Galvano et al., 2001). Los métodos más conocidos se describen a continuación.

2.6.1.1 *Métodos físicos.*

Dentro de esta categoría entran las radiaciones (radiaciones X) que pueden producir una emisión de alta energía capaz de romper la estructura de moléculas estables como

las micotoxinas. Según Borrel y Gimeno, 2003, las aflatoxinas B1 y G1 son las más sensibles a los rayos X.

El calor es otro método utilizado para la destrucción de micotoxinas, pero con el inconveniente que cuando se utiliza en materias primas, las vitaminas y proteínas se ven afectadas por la temperatura óptima de detoxificación.

La molienda del grano ha mostrado ser efectiva contra la toxina deoxinivalenol y por segregación de la densidad, también ha mostrado buenos resultados al reducir los niveles de tricotecenos y ZEN (D'Mello et al., 1999).

2.6.1.2 Métodos biológicos.

El ejemplo más representativo de este caso, es la acción que tienen los microorganismos del rumen sobre las micotoxinas. En el caso específico de la Ocratoxina A, la microflora ruminal es capaz de transformarla hasta ocratoxina C que es menos tóxica para el animal. A esta misma toxina también es factible atacarla con enzimas proteasas a nivel del grupo peptídico de la toxina (Borrell y Gimeno, 2003).

También se ha comprobado la acción de ciertos hongos y bacterias, como el *Corynebacterium Rubrum* y *Aspergillus Niger* capaces de modificar la estructura de la aflatoxina B1. King y colaboradores (1984) observaron *in vitro* que el alimento contaminado hasta 10 ppm con DON, era fácilmente transformado por los microorganismos del rumen. A su vez, Seeling y colaboradores (2006) describieron que la microflora del rumen transformaba la DON a una forma no tóxica por medio de reacciones de *deepoxidación*.

Un estudio *in vivo* en ganado vacuno, demostró que la ZEN también fue degradada por los microorganismos del rumen, a otros metabolitos como el zeranol (Kennedy et al., 1998).

La descontaminación biológica mediante la utilización directa de microorganismos o parte de estos, es otra de las estrategias utilizadas. Un ejemplo es el de algunas bacterias lácticas o levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) que se utilizan ampliamente en la fermentación de los alimentos (Shetty y Jespersen, 2007) y que poseen estructuras en la pared celular con capacidad para adherir micotoxinas.

2.6.1.3 *Métodos químicos.*

La mayoría de micotoxinas son liposolubles, por lo que un método utilizado para la eliminación de las micotoxinas es el uso de solventes orgánicos. Combinaciones tales como hexano-acetona-agua o isopropanol-agua, han demostrado eficacia al arrastrar las micotoxinas (Borrel y Gimeno, 2003).

En cuanto al uso de agentes químicos reactivos, se vienen utilizando aquellos que son capaces de reaccionar a nivel estructural con las toxinas, como el ácido sulfúrico, ácido clorhídrico y sus derivados. El ácido reacciona con los grupos lactona de las aflatoxinas B1 y G1, la patulina y la ZEN y con los dobles enlaces no aromáticos de éstos y de los tricotecenos, para producir sustancias polares que son fácilmente eliminadas por la orina.

De igual forma, los álcalis como los hidróxidos de calcio, de sodio, de amonio y algunos cloruros y carbonatos, reaccionan con los grupos lactona de las toxinas.

Los agentes reductores como el formol, son otro medio probado como reactivo para los grupos carbonilo de las aflatoxinas B1 y B2, sterigmatocistina, ZEN, nivalenol y deoxinivalenol, dando lugar a grupos hidroxilo que luego formarán puentes de hidrógeno. Los agentes oxidantes como el ozono, peróxidos y algunos permanganatos en solución alcalina, tienen afinidad por los dobles enlaces no conjugados de las aflatoxinas y de la patulina.

Los métodos químicos utilizados como la amonización, nixtamalización, el uso de agentes oxidantes (peróxido de hidrógeno, ozono) o algunos ácidos y álcalis (Scott, 1996), sólo logran una reducción poco eficiente de la carga tóxica, además de ser procedimientos altamente costosos (Coker, 1998).

2.6.1.4 Utilización de adsorbentes de micotoxinas en el pienso.

Según Devegowda y Murthy (2005), el método más efectivo de neutralizar las micotoxinas en el pienso es por medio de la inclusión de adsorbentes inertes en la dieta que previenen la absorción de la toxina en el intestino. El mecanismo por el que estas sustancias actúan se debe a un fenómeno de superficie llamado adsorción. Los autores

enumeran una serie de características ideales que debe tener el agente, para una buena acción adsorbente:

- a) deben tener la capacidad de adsorber un gran rango de micotoxinas,
- b) su mezcla con el pienso debe ser de fácil dispersión y uniformidad,
- c) deben ser estables a la temperatura y presión durante procesos como peletización, extrusión o almacenaje,
- d) el porcentaje de inclusión en la dieta debe ser práctico (en general, se recomienda una dosificación de 1 a 10 Kg de adsorbente por toneladas (0,1-1%) en el alimento),
- e) no presentar afinidad a las vitaminas, minerales u otros nutrientes, ya que lo más probable es que los atrape y se eliminen juntos en las heces;
- f) estabilidad dentro de un amplio rango de pH, biodegradabilidad al ser excretados y
- g) deben ser inocuos a animales y humanos y también deben ser palatables para que puedan ser consumidos por los animales sin que el alimento sea rechazado.

Dentro del grupo de los adsorbentes, debemos mencionar los aluminosilicatos (zeolitas y bentonitas naturales), y diferentes tipos de polímeros con propiedades adsorbentes (Huwig et al., 2001) como es el caso de los polímeros de pirrolidona (Borrell y Gimeno, 2003). También se debe mencionar el carbón activado, ya que cuenta con una gran superficie de contacto y es utilizado en muchos casos de toxicosis. Sin embargo no hay muchas referencias concluyentes que prueben su eficacia en el amplio campo de las micotoxinas (Edrington et al., 1997; Kubena et al., 1990).

Los silicatos aluminicos o aluminosilicatos (HSCAS) forman parte del grupo de las arcillas que se vienen utilizando como adsorbentes de micotoxinas. Dentro de este grupo se encuentran dos importantes subclases: los filosilicatos donde se ubica la bentonita, y los tecto-silicatos. Las bentonitas se componen básicamente de montmorillonita, que por su capacidad de intercambio catiónico pueden formar geles que son los que actúan como secuestrantes de las micotoxinas (Díaz y Smith, 2005; Abdel-Wahhab et al., 1998 y 2002). La bentonita es eficaz contra la toxina T2 en dosis no practicas en alimentación animal (Smith, T., 2005). También se ha encontrado que la

bentonita puede capturar bien AFB₁, pero no actúa sobre ZEN o el nivalenol (Ramos et al., 1996).

En los tectosilicatos, la otra gran subclase, se encuentran la sepiolita y la zeolita (Díaz y Smith, 2005). Estas arcillas son compuestos con una estructura tridimensional, con características básicas, formadas por la unión de tetraedros de óxido de silicio (SiO₄) y de aluminio (AlO₄) entre los cuales se intercalan otros iones como por ejemplo el aluminio, calcio y sodio. Cuando convergen estos tres iones en la estructura del tetraedro, se forma el silicato sódico-alumínico-cálcico hidratado (HSCAS) que posee una mayor capacidad de adsorción, ya que los iones anexos hacen que la molécula se expanda conforme aumenta la distancia entre los iones silicio, a la vez que se aumentan los puntos de enlace y el área de contacto (Abo-Norag, M., 1995). Sin embargo, Smith (2005), Patterson y Yong (1993) plantean que los HSCAS tienen capacidad de reducir los efectos negativos de la AFB₁, pero no son efectivos frente a las toxinas del género *Fusarium*. Kubena y colaboradores (1990) confirman este dato al no observar reducción de toxina T-2 y diacetoxiscirpenol (DAS) con HSCAS en pollos de engorde. Del mismo modo Danicke y colaboradores (2004) concluyeron que la incorporación de HSCAS no fue eficiente en la adsorción de deoxinivalenol (DON) ni redujo la absorción de ésta a nivel intestinal en cerdos en crecimiento, pero sugieren que podría ser eficaz en la adsorción de otro tipo de micotoxinas. Por lo tanto, la eficacia de los adsorbentes de micotoxinas depende principalmente de la estructura química del adsorbente y de la misma toxina. Así, muchos de estos adsorbentes tienen capacidad de adsorción para un pequeño grupo de micotoxinas pero no para todas.

En el mercado hay muchos productos adsorbentes que no son necesariamente eficientes para todas las micotoxinas. Döll y colaboradores (2004), evaluaron *in vitro* algunos productos comerciales, carbón activado y un aluminosilicato modificado, simulando las condiciones de pH, temperatura y tiempo de tránsito en tracto gastrointestinal de cerdos. En estos resultados observaron que era más eficiente el carbón activado para capturar ZEN, DON y colestiramina; los productos comerciales no fueron eficientes para ZEN y DON y el aluminosilicato mostró buena capacidad de adsorber la ZEN.

En otro estudio, al utilizar el aluminosilicato modificado en dietas con maíz contaminado con toxinas del género *Fusarium* para lechones, Döll y colaboradores (2005) demostraron la ineficiencia para prevenir la absorción de la toxina en el tracto gastrointestinal, con lo cual los autores plantean la necesidad de una verificación crítica en cuanto a la eficacia de los diferentes agentes detoxificantes utilizados *in vivo*.

2.7 EL PAPEL DE LAS ARCILLAS EN LA ALIMENTACIÓN ANIMAL.

Las arcillas son minerales sedimentarios de origen detrítico, filosilicatos en su mayor parte, con estructuras laminares o tubulares definidas y tamaño menor a 2 micras, que le dan unas características físico-químicas especiales. Las arcillas son constituyentes esenciales de gran parte de los suelos y sedimentos debido a que son productos finales de la meteorización de los silicatos. Se clasifican según los minerales dominantes que las componen (aluminio, magnesio, silicio) y cómo estén organizados dentro de cada capa.

Como consecuencia de estos factores, las arcillas presentan, por una parte, un valor elevado del área superficial y, a la vez, la presencia de una gran cantidad de superficie activa, con enlaces no saturados. Por ello pueden interactuar con muy diversas sustancias, en especial compuestos polares. Por este motivo tienen comportamiento plástico en mezclas arcilla-agua con elevada proporción sólido/líquido, y la capacidad de expandirse gracias a las propiedades reológicas en suspensiones acuosas (Castaing, 1998).

Por otra parte, la existencia de carga en las láminas se compensa con la entrada en el espacio interlaminar de cationes débilmente ligados y con diferentes grados de hidratación. Los cationes pueden ser intercambiados fácilmente por contacto de la arcilla con una solución saturada de otros cationes. A esta propiedad se la conoce como capacidad de intercambio catiónico y es también la base de multitud de aplicaciones prácticas, entre las que se encuentra la de ser adsorbente de diferentes moléculas.

En la industria de la alimentación animal el uso de arcillas es habitual como agentes antiapelmazantes, lubricantes, aglomerantes y como adsorbentes de compuestos no deseados en los piensos.

Para tal fin, la tecnología alimentaria se vale de la modificación de las propiedades físico-químicas más importantes (Castaing, 1998) de estos elementos como son:

- *La superficie específica*, definida como el área superficial de las partículas constituyentes, por unidad de masa (m^2/g); muy importante en la interacción sólido-fluido.
- *Capacidad de intercambio catiónico*; que describe el cambio que puede producirse de iones fijados en la superficie exterior de sus cristales, en los espacios interlaminares o en otros espacios interiores de las estructuras, por otros existentes en las soluciones acuosas con las que interviene.
- *Capacidad de absorción/adsorción*; esta capacidad está directamente relacionada con las características de textura (superficie específica y porosidad) y se puede hablar de dos tipos de procesos que normalmente se dan de forma conjunta: absorción (cuando se trata de procesos físicos como la retención por capilaridad) y adsorción (cuando existe una interacción de tipo químico entre el adsorbente, en este caso la arcilla, y el líquido, gas o molécula adsorbida, denominado adsorbato).
- *Hidratación e hinchamiento*; el grado de hidratación depende de la naturaleza del catión intercambiable y de la carga total de la lámina. Así por ejemplo si el catión interlaminares es sodio, la capacidad de hinchamiento se incrementa por la absorción de agua en los espacios interlaminares, separando las láminas y obteniendo como resultado un alto grado de dispersión y un máximo desarrollo de las propiedades coloidales. Si por el contrario, los cationes son Ca o Mg, esta capacidad se verá reducida.
- *Capacidad reológica o plasticidad*. Esta propiedad consiste en el efecto lubricante que produce el agua que envuelve las partículas laminares, y que

permite el deslizamiento de unas partículas sobre otras, cuando se ejerce determinada fuerza sobre ellas.

La diferenciación de estas características entre los distintos tipos de arcillas, hace que se prefiera ciertos grupos determinados como son los filosilicatos y los silicatos pseudo-laminares. En el primer grupo se encuentran el talco, el caolín y las esmectitas (bentonitas); mientras que el segundo grupo lo componen las sepiolitas y atapulgitas (Castaing, 1998). Si bien, ambos grupos de arcillas son ampliamente utilizados en alimentación animal, también se ha echado mano de otro grupo mineral como es el de las zeolitas. Aunque no son arcillas, sino un complejo mineral cristalino poroso, las zeolitas cumplen con ciertas propiedades físico-químicas que lo hacen apto como adsorbente y en cierta forma como tamiz molecular. Harvey y colaboradores (1993) probaron varios tipos de zeolitas contra aflatoxicosis en pollos broilers en crecimiento. Dos de las zeolitas evaluadas redujeron la toxicidad de la aflatoxina en un 41% en parámetros como ganancia de peso, peso del hígado y bioquímica sanguínea.

Además de las múltiples aplicaciones de las arcillas como son su alto poder aglomerante y antiapelmazante, destacan otros efectos a nivel digestivo de los animales: pueden reducir la velocidad de tránsito intestinal y aumentar la digestibilidad de los nutrientes, actuar como protectores gástricos e intestinales y prevenir las diarreas aumentando la consistencia de las heces. Recientemente se ha incrementado el interés por ampliar la utilidad de sus propiedades como adsorbente, fundamentalmente como secuestrante de moléculas de micotoxinas, altamente perjudiciales para la salud y producción animal.

2.7.1 Las arcillas como adsorbentes de micotoxinas.

La eficacia de los adsorbentes puede evaluarse *in vitro* o *in vivo*, siendo los resultados *in vivo* los que resultan concluyentes en relación a su posible aplicación práctica.

En la revisión hecha por Gómez y colaboradores (2003), se destaca la eficacia de la combinación de dos tipos de arcillas (bentonita y sepiolita) *in vitro* con niveles del 0.3% para la prevención de intoxicación por aflatoxina y zearalenona. Estos y otros autores (Avantaggiato et al., 2004) justifican su eficacia a la reunión de propiedades óptimas de capacidad de intercambio catiónico y superficie específica, aportadas por cada tipo de arcilla. Ramos y Hernández (1997), en un estudio *in vitro* probando diferentes niveles de adsorbente (montmorillonita, silicato de origen natural) con 4 tipos de aflatoxinas en diferentes condiciones de pH y temperatura, comprobaron que con la concentración más baja de arcilla (0.05%) obtenían un porcentaje de adsorción elevado (78%) y con un nivel de adsorbente de 5%, se obtenía porcentajes de adsorción superiores al 98%. Winfree y Allred (1992) ya habían ensayado la bentonita como adsorbente de aflatoxina B1 y encontraron que *in vitro* y con niveles del 10%, podía adsorber hasta el 70% de la toxina.

De igual modo Avantaggiato y colaboradores (2003), simulando la adsorción de micotoxinas en un modelo gastrointestinal *in vitro*, probaron diferentes materiales adsorbentes mezclados con el pienso con el fin de evaluar la efectividad de éstos al reducir la absorción intestinal de las micotoxinas. Los resultados mostraron que el 30% de la toxina se absorbía en las secciones que correspondían al yeyuno e ileon y que se reducía con la inclusión de los materiales adsorbentes, recomendando la inclusión de éstos en los piensos como potencial secuestrante de micotoxinas.

Sin embargo, los resultados obtenidos *in vitro* no siempre son reflejo de lo que puede ocurrir *in vivo*. Es el caso del ensayo realizado por Lemke y colaboradores (2001), en el que un complejo de arcillas en solución acuosa resultó bastante eficaz para adsorber zearalenona; mientras al ser probado en un bioensayo, las arcillas no protegieron a los animales de los efectos estrogénicos de la zearalenona incorporada en el alimento (35 mg/kg). Por el contrario, el tratamiento aumentó los efectos tóxicos con respecto al grupo que contenía la toxina sola. Ello es debido según los autores, a que el complejo de arcillas puede ayudar al transporte y/o a la respuesta de la toxina, aumentando su toxicidad.

En general, las pruebas de detoxificación de los diferentes tipos de adsorbentes deben evaluar los factores inherentes tanto a la toxina y al mismo adsorbente como a la relación de estos con el organismo sobre el cuál se evalúan. Doll y colaboradores (2004), al evaluar la capacidad detoxificante (toxinas DON y ZEA) de varios agentes comerciales en un modelo *in vitro* que simulaba el tracto gastrointestinal de cerdos, hicieron énfasis sobre el pH, temperatura y tiempo de tránsito intestinal; además del tiempo de incubación y su efecto sobre la detoxificación. Los autores encontraron diferencias notables en la capacidad de adsorción de los agentes e incluso algunos de ellos no mostraron actividad secuestrante frente a la toxina DON, contradiciendo sus atributos comerciales. Por su parte, como la ZEA se absorbe más rápido que otras toxinas en el sistema gastrointestinal de los cerdos (Biehl et al., 1993), para una correcta adsorción de ésta es necesario que la captura ocurra antes de la entrada al intestino.

Todo esto nos lleva a pensar que la adsorción *in vitro* de las micotoxinas depende entre varios factores, del tipo de molécula que se quiera eliminar; mientras que en ensayos *in vivo* la situación es más compleja, y depende de la confluencia de variables tales como la matriz alimenticia, pH, tiempo de retención en el sistema digestivo, enzimas digestivas y otras sustancias del tracto gastrointestinal.

2.8 CONDICIONES DE ESTUDIO PARA LA VALORACIÓN ADECUADA DE UN ADSORBENTE.

Es de resaltar que al ritmo que aumenta el interés por las micotoxinas, también se lanza al mercado un número cada vez mayor de productos comerciales como secuestrantes de éstas. Lo que se busca en estos productos es su alta eficiencia a bajos niveles de inclusión para optimizar el resultado y evitar el efecto de dilución del valor nutricional de las materias primas contaminadas.

En primer lugar los adsorbentes se han evaluado *in vitro*. En algunos de estos estudios ya se puede demostrar si el adsorbente no bloquea la toxina. Si el producto no se une a

la micotoxina *in vitro*, probablemente no tenga mucha actividad *in vivo*. Por lo tanto, la evaluación *in vitro* es de enorme valor tanto al desarrollar un producto como para evaluar y monitorizar la calidad lote por lote.

El problema más común hallado en la mayoría de evaluaciones hechas a adsorbentes de toxinas es la falta de respaldo científico para confirmarlas. Cuando se menciona que se evaluó la capacidad de adsorción de un secuestrante contra determinada toxina, rara vez se dice bajo qué condiciones fue evaluado, los parámetros que se midieron, cómo se midieron, el número de animales que se utilizaron o cómo se midió su inocuidad. Es decir no ha habido un protocolo científico que respalde esos resultados. A veces sólo se menciona los efectos sobre la ganancia de peso y conversión alimenticia, pero estos parámetros por si solo, no son concluyentes.

El consenso de la mayoría de autores consultados en cuanto a la evaluación de los diferentes tipos de adsorbentes y sus características, es que éstos además de cumplir con las condiciones necesarias anteriormente descritas (efectivo, sin residuos, inocuo, sin afinidad a principios nutritivos), también se les debe evaluar: i/ su capacidad de adsorción para la o las micotoxinas en cuestión, es decir, evaluar su especificidad, ii/ analizar su nivel de desorción, ya que algunos materiales no atrapan definitivamente las moléculas y las vuelven a liberar con el tiempo, iii/ su capacidad para cubrir el mayor número de micotoxinas posible, así como iv/ su granulometría homogénea, alta capacidad de mezcla, baja capacidad higroscópica y por supuesto, el bajo costo.

2.9 LAS TIERRAS DE DIATOMEAS COMO POTENCIAL ADSORBENTES DE MICOTOXINAS.

Las tierras de diatomeas o diatomitas son silicatos no arcillosos que se componen de 87 a 91% de dióxido de silicio (SiO_2) y cantidades no despreciables de óxido de aluminio (Al_2O_3) y férrico (Fe_2O_3). Por sus propiedades específicas como el alto contenido de sílica, baja densidad y conductividad y su estructura porosa, ha tenido diferentes usos de los que se destacan: el poder insecticida (por su actividad

desecante), como quelante de metales pesados y contaminantes orgánicos en diferentes sustratos (Al-Degs et al., 2001), como material aislante y como absorbente/adsorbente. Sin embargo, su poder de adsorción es débil con respecto a la absorción, por lo que se hace necesario realizar tratamientos químicos para modificar su estructura porosa o su superficie y así mejorar la capacidad adsorbente. Al-Ghouti y colaboradores (2003) atribuyen la característica de absorción/adsorción de las tierras de diatomeas, al hecho que en su superficie se encuentran unos grupos radicales con gran poder activo llamados grupos silanol, que pueden reaccionar fácilmente con gran cantidad de compuestos orgánicos polares y grupos funcionales de diferentes compuestos químicos.

No ha habido evidencias de algún efecto toxico crónico o agudo que haya producido la tierra de diatomeas al ser ofrecida a animales mamíferos (Korunic, 1998). Así, ratas que recibieron 5 % de tierra de diatomeas en la dieta, durante 90 días, no presentaron ninguna anormalidad en los diferentes tejidos analizados (Bertke, 1964). De igual forma Allen (1972) al ofrecer el producto del 1-2 % a ganado vacuno como un posible antiparasitario, tampoco observó efectos secundarios del producto y si un efecto positivo sobre gusanos y parásitos internos. Por otro lado, Bertolotto (2004), al ofrecer 5% de una mezcla de diatomita y otra arcilla volcánica a terneros de engorde, observó mejoras en la ganancia de peso, atribuyendo este hecho a la posible formación de un gel a nivel del tracto digestivo que facilitaba la absorción de los nutrientes.

Si bien hay poca literatura respecto a las tierras de diatomeas como secuestrantes de micotoxinas, los antecedentes del producto en cuanto a los beneficios directos sobre el animal y sus propias características como absorbente/adsorbente, hacen de ellas un excelente candidato para ser estudiadas en el campo de la detoxificación fúngica.

CAPÍTULO 3

Objetivos y Planteamiento Experimental

Como hemos citado previamente, tanto los hongos como sus productos metabólicos (micotoxinas) representan un riesgo elevado para el sector pecuario y la salud pública. Entre los múltiples problemas que generan, destaca el deterioro que causan sobre los diferentes alimentos destinados al consumo humano y animal, y el riesgo oculto que puede representar para ellos el consumo de micotoxinas.

Ante esta situación, los organismos internacionales y entes reguladores han establecido restricciones al consumo de ingredientes contaminados con niveles elevados de estas micotoxinas. Sin embargo, la presencia de éstas en niveles incluso inferiores puede ser generalizada en numerosos alimentos consumidos actualmente por los animales. Una posible estrategia a seguir es la incorporación en las raciones de los animales de materiales inertes con capacidad de capturar toxinas en el tracto gastrointestinal de los animales. Con ello, podría evitarse o reducirse la micotoxicosis en los animales así como la posible presencia de residuos en los alimentos derivados de su producción (carne, huevos, leche, etc).

El presente trabajo se integra en un proyecto empresarial EUREKA de mayores dimensiones, destinado al diseño y elaboración de nuevos productos adsorbentes de micotoxinas derivados de la tierra de diatomeas. El proyecto integra la colaboración de la empresa con grupos de investigación en química orgánica e inorgánica, que han tenido como objetivo modificar las propiedades superficiales de la tierra de diatomeas para incrementar la capacidad adsorbente de las micotoxinas in vitro. Nuestra participación en el proyecto tiene un carácter finalista de evaluación de los productos modificados frente a diferentes micotoxinas in vivo. El resultado de esta colaboración nos permitirá constatar los efectos de las micotoxinas sobre las producciones animales mediante diferentes modelos experimentales; así como constatar el potencial de estos nuevos adsorbentes para corregir los efectos negativos.

El desarrollo de este objetivo, se llevará a cabo por medio de los siguientes objetivos parciales:

1. Valorar la eficacia de la tierra de diatomeas, como adsorbente de aflatoxina B1 (AFB1), mediante la evaluación productiva y parámetros fisiológicos en pollos broiler.

2. Determinar la eficacia de la tierra de diatomeas modificada para captar Ocratoxina A (OTA) y evitar toxicidad en gallinas de puesta, mediante evaluación de parámetros productivos y fisiológicos.
3. Valorar la capacidad tóxica de la Zearalenona (ZEA) y la capacidad adsorbente de la tierra de diatomeas modificada, para capturar ZEA y evitar toxicidad en cerdos y ratas como modelo animal monogástrico, mediante evaluación de parámetros de crecimiento y fisiológicos.
4. Valorar la capacidad adsorbente de la tierra de diatomeas modificada, para secuestrar Fumonisina B1 (FB1) y evitar los efectos deletéreos en ratas como modelo de animal monogástrico, evaluando parámetros de crecimiento y fisiológicos.

Para desarrollar estos objetivos se plantearon cinco experimentos:

En el **primer experimento** (Capítulo 4) se utilizaron las aves como modelo animal más susceptible a las aflatoxinas, para ver los efectos de estas toxinas y la posible acción detoxificante del adsorbente. En el **segundo experimento** (Capítulo 5), también en aves, se determinó la eficacia del adsorbente para secuestrar OTA en gallinas de puesta y reducir la toxicidad, evaluando parámetros productivos, calidad del producto, crecimiento y constantes fisiológicas. Con el **tercer experimento** (Capítulo 6) se evaluó el efecto tóxico de la ZEA en modelo murino, como modelo animal monogástrico. Se evaluaron diferentes niveles de la toxina para ver la dosis que presentaba respuesta tóxica medida en parámetros de consumo, crecimiento y parámetros anatómicos y fisiológicos. En el **cuarto experimento** (Capítulo 7) se realizaron dos ensayos para evaluar la eficacia del adsorbente modificado para reducir los efectos tóxicos de la ZEA en dietas para ratas y lechones. Se evaluaron varios niveles del adsorbente con un nivel alto de la toxina, sobre los mismos parámetros analizados en el tercer experimento.

En el **quinto experimento** (Capítulo 8), se determinó la eficacia del adsorbente modificado, para captar Fumonisina B1 (FB1) en ratas. Se evaluaron cuatro niveles del adsorbente y dos niveles de la toxina, sobre parámetros de crecimiento y constantes fisiológicas.

CAPÍTULO 4

“Effects of Dietary AflaDetox on Performance, Serum Biochemistry, Histopathological Changes and Aflatoxin Residues in Broilers Exposed to Aflatoxin B₁”

2009 Poultry Science 88:1444–1451

Abstract

The aim of this study was to evaluate the ability of AflaDetox in counteracting the deleterious effects of aflatoxin B₁ (AFB₁) in broiler chicks. One hundred and twenty Ross 308 one-day-old male broiler chicks were assigned to 8 treatments for 42 days. The experiment had a 2 x 4 factorial arrangement of treatments involving 0 and 1 mg of AFB₁/kg feed and 0, 1, 2, and 5 g of AflaDetox/kg feed. Chicks were fed on the ground during the first 7 days, and in cages (3 chicks/cage; 5 cages/treatment) from 7 to 42 days. Growth performance was measured from day 7 to 42 and whole-tract digestibility of gross energy, and protein on day 40-41. Serum biochemical parameters, organs weight, histopathological examination of liver, and AFB₁ residues in liver and breast muscle tissues were determined on day 42. AFB₁ significantly decreased the body weight gain, feed intake and impaired feed conversion rate ($P<0.05$). The addition of AflaDetox in the contaminated diets significantly diminished the inhibitory effects of dietary AFB₁ ($P<0.05$) on the growth performance with no differences compare to control diet. Feeding AFB₁ alone decreased serum protein concentration, increased the serum activity of alkaline phosphatase (ALP) and caused significant increases in the relative weights of livers. Treatment with AflaDetox significantly alleviated the negative effects of AFB₁ on these parameters ($P<0.05$) with no effect on uncontaminated diets. Liver tissue of broilers receiving AFB₁ alone had perilobular inflammation and vacuolar degeneration of hepatocytes as compared to the tissue from the control group ($P<0.05$). Residues of AFB₁ were detected in the liver tissues of broilers fed on the AFB₁ diet (0.166 µg/kg). Supplementation of AflaDetox reduced the incidence and severity of the hepatic histopathology changes associated with aflatoxicosis, and the amount of AFB₁ residue in liver.

In conclusion, our results showed that addition of AflaDetox may reduce the adverse effects produced by presence of AFB₁ in broiler chickens diets.

4.1 Introduction

Aflatoxins are secondary toxic metabolites produced by certain strains of fungi, e.g. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* species. Among main aflatoxins (AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂), aflatoxin B₁ (AFB₁) is known to be the most toxic metabolite, especially on sensitive species such as poultry (Hussein and Brasel, 2001). Their toxicity depends on different factors including its concentration, the duration of exposure, the species, gender, age and health status of animals (Jewers, 1990). Aflatoxicosis, poisoning which occurs from ingesting aflatoxins, is characterized, in broiler chickens, by decreased feed intake and growth rate, poor feed utilization and mortality (Tedesco et al., 2004; Bailey et al.; 2006 and Shi et al. 2006). The productive deterioration is also associated with changes in biochemical and hematological parameters (Denli et al., 2004; Basmacioglu et al., 2005; Bintvihok and Kositcharoenkul, 2006), liver and kidney abnormalities and impaired immunity, which is able to enhance susceptibility to infectious diseases (Shashidhara and Devegowda, 2003). Thus, aflatoxicosis causes severe economic losses in the poultry industry (Kubena et al., 1998). Furthermore, the transmission of AFB₁ and its metabolites from feed to animal edible tissues and products, such as liver and eggs (Micco et al., 1988; Oliveira et al., 2000; Binthivok et al., 2002; Rizzi et al. 2003), become particularly important as a potential hazard for human health.

Several approaches have been investigated to prevent or reduce the toxicity of AFB₁ in broilers. For this aim, many commercial adsorbents are widely used in feed to bind the aflatoxins and prevent its absorption in animal gastrointestinal tract (Schell et al., 1993; Ramos and Hernandez, 1997). Numerous studies have shown the effectiveness of these agents to bind aflatoxins *in vitro* (Phillips et al., 1988; Huff et al., 1992; Diaz et al., 2002). However, these results often do not correlate well with their potential *in vivo* (Watts et al., 2003, Miazzo et al., 2005).

AflaDetox is a natural product obtained from diatomaceous earth extracted from a quarry, with more than 60 % of silicium dioxide (organic origin). AflaDetox presents a

highly porous surface with high cationic interchange capacity that yields a high *in vitro* adsorption capacity against AFB₁.

The aim of this study was to investigate the efficacy of different dietary levels of AflaDetox against AFB₁ toxicity in growing broilers by observing their effects on growth performance, digestibility, organs weight, serum biochemistry, liver histopathology and on the presence of AFB₁ residues in liver and breast muscle tissues.

4.2. Materials and Methods

This experiment was performed at the Animal Facility Research Center of the Universitat Autònoma of Barcelona and received prior approval from the Animal Protocol Review Committee of this institution. The treatment, management, housing and slaughtering conditions conformed to the European Union Guidelines.

4.2.1. Animals and diets

A total of 120, one-day-old male Ross-308 broiler chicks from a commercial hatchery were used in this study. Chicks were individually weighed (47 ± 1 g) and divided into 8 treatments. The eight treatments, arranged according to a 2 x 4 factorial experimental design, consisted of two levels of AFB₁: 0, and 1 mg/kg feed and four levels of AflaDetox: 0, 1, 2, and 5 g/kg feed. Chicks were placed on the ground during the first week of the experiment. On day 7th, all the chicks were transferred into cages (with 5 replicate per treatment and 3 chicks per replicate). Two diets were formulated according to the NRC (1994) recommendations to meet the nutrient requirements of broilers from d 1 to 21 (grower diet), and from d 22 to 42 (finishing diet). The composition of the basal diets is presented in Table 1. Pure crystalline AFB₁ (ACROS ORGANICS; Gell, Belgium) was incorporated into the diets by dissolving AFB₁ in chloroform (1 mg/10 mL) followed by mixing the solution with appropriate quantities of ground feed. The contaminated premix feed was left overnight at room temperature for the solvent to evaporate and was then mixed into the basal diet to provide the desired

level of AFB₁/kg of diet (1 mg AFB₁/kg of feed). After preparing the diet, two samples of feeds from the control group and AFB₁-contaminated diet were analyzed by HPLC and fluorescence detector (Sharma and Marquez, 2001) to ensure the AFB₁ concentrations in the experimental diets. AFB₁ content was 1.03, and 1.05 mg/kg in the growing and finishing contaminated diets, and <0.001 mg/kg in control diets. Feeds and water were provided *ad libitum* throughout the experiment. The chicks were reared under a conventional temperature regime, i.e. starting at 33 °C, and reduced by 3 °C/week to 21°C. The birds were exposed to 23 h light and 1 h dark. The experiment lasted 42 days; including 21 days on the grower diet and from day 22 to 42 on the finishing diet.

Table 4.1. Composition and nutrient value of the experimental diets (g/kg, as fed basis)

Ingredients	Diet	
	Grower	Finisher
Maize	522	540.5
Soybean meal (44 % CP)	218	193
Extruded Soya	200	200
Soy oil	21.4	31.8
Salt	3.5	3.5
CaCO ₃	9.0	8.2
PO ₄ HCa	19.7	17.5
DL-Methionine	2.4	1.5
Vit and mineral mixture ^a	4.0	4.0
Calculated analysis ^b		
AMEn, kcal/kg	3,100	3,200
Total Lysine, g/kg	12.1	11.5
Sulfur amino acids, g/kg	9.0	7.7
Determined analysis		
DM	880	885
GE, kcal/kg	4710	4750
Crude protein, g/kg	212	201
Crude ash, g/kg	70	65
Ca, g/kg	10.2	9.1
P, g/kg	7.8	7.3

^a Providing per kg of complete diet: vitamin A: 12,000 IU; vitamin D3: 2,400 IU; vitamin E: 30 mg; vitamin K₃: 3 mg; vitamin B₁: 2.2 mg; vitamin B₂: 8 mg; vitamin B₆: 5 mg; vitamin B₁₂: 11 mg; folic acid: 1.5 mg; biotin: 150 mg; calcium pantothenate: 25 mg; nicotinic acid: 65 mg; Mn: 60 mg; Zn: 40 mg; I: 0.33 mg; Fe: 80 mg; Cu: 8 mg; Se: 0.15 mg; Ethoxyquin: 150 mg. ^b FEDNA (2003).

4.2.2. Experimental procedures and sampling

4.2.2.1. Growth performance and Digestibility

Body weight gain, feed intake and feed conversion rate per cage were recorded weekly from day 7 to 42 (N=5). On d 40 and 41, feed intake was recorded and total excreta were collected and weighted. Feed and excreta samples were dried in a forced-air oven and stored until analysis of organic matter (OM), crude protein (CP) and gross energy. Dry matter content was determined by drying the samples at 103°C to constant weight, and ash content was determined by incinerating the samples in a muffle oven at 525°C for 7h (method 923.03; chapter 32, AOAC, 1995). Crude protein was determined as Kjeldahl N x 6.25 by method 984.13 (chapter 4, AOAC, 1995). Gross energy was determined by the use of an adiabatic bomb calorimeter C4000 (Janke & Kunkel, IKA Analysentechnik, Heitersheim, Germany).

4.2.2.2. Serum Biochemistry and Organ Weights

At the end of the experiment, blood samples (2 mL per bird) were collected from 10 chickens per treatment for serum biochemical determination. Within one hour, the serum was obtained by centrifugation (2500 x g for 15 minutes) and stored at -80°C until further analysis. Serum biochemical parameters were measured by using OSR reagents (Olympus System Reagents, Olympus, Irlanda) and an automatic clinical chemistry analyzer (Olympus AU 400, Hamburg, Germany). The concentration of total protein (TP) was measured by following the Biuret method; albumin (ALB), the bromocresol green method; uric acid (UA), the uricase method; cholesterol, the cholesterol esterase/peroxidase method; Ca and P, the arsenazo III and molibdat method, respectively; triglyceride, the glycerol phosphate oxidase method; and the enzymatic activities of alkaline phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (AST, without pyridoxal phosphate addition) and γ -glutamyltransferase (GGT) by using the recommended IFCC reference methods. After taking blood samples, chickens were euthanized under CO₂ exposure, and immediately liver and spleen were removed and

weighed (data expressed as relative organ weight; grams of organ per 100 g of body weight).

4.2.2.3. Analysis of AFB₁ Residues in liver and Breast Muscles

Five liver and breast muscle samples from each treatment were kept at – 20 °C for analyzing the residue of AFB₁. Analysis of AFB₁ residues were performed according to Tavcar-Kalcher et al, (2007). Briefly, one ground sample was mixed thoroughly with an aqueous solution of citric acid and diatomaceous earth. The mixture was extracted with dichloromethane. The filtered extract was dried, filtered again and an aliquot was evaporated to dryness. The residue was dissolved in methanol and mixed with buffer and applied into an immunoaffinity column. Aflatoxin B₁ was eluted from the column and the concentration of Aflatoxin B₁ in the final solution was determined by an HPLC method with fluorescence detection after derivatization with bromine in the Kobra cell.

4.2.2.4. Histopathological Examination

Liver samples from animals fed on the control and contaminated diets were obtained to evaluate lesions and other abnormalities. Samples were obtained from the animals with intermediate weight in each cage (five chickens from each group) and were fixed in 10 % neutral buffered formalin solution, dehydrated in graded alcohol and embedded in paraffin. Sections of 3-5 µm were obtained and stained with hematoxylin-eosin. Two sections of liver tissue from each chick were examined by light microscopy for previously described lesions: vacuolar degeneration of hepatocytes, inter and perilobular inflammations, bile duct hyperplasia and/or hypertrophy, and necrosis (Pandey and Chauhan, 2007). Sections with no, slight, moderate or intense presence of lesion was given a score of 0, 1, 2, and 3, respectively.

4.2.3. Statistical Analysis

Data were analysed by using the GLIMMIX Procedure of SAS software (SAS Institute, 1996). Tukey's test was used for multiple comparisons when a significant interaction was detected. All statements of significance were based on probability $P < 0.05$.

4.3 Results

Growth performance and digestibility parameters

The effects of dietary AflaDetox and AFB₁ on growth performance and digestive parameters are shown in Table 4.2. A significant interaction was observed between AFB₁ and AflaDetox on feed intake, body weight gain and feed conversion rate. Consumption of the AFB₁ diet (AFB₁: 1 mg/kg; AflaDetox: 0 g/kg) reduced feed intake, the body weight gain, and caused poor feed conversion rate compared with the control diet (AFB₁: 0 mg/kg; AflaDetox: 0 g/kg). The addition of AflaDetox to the contaminated diets significantly offset these effects reaching values not significantly different of the control diet, and showing no effects when supplemented to the uncontaminated diets.

No significant differences were observed on the crude protein and gross energy digestibility of diets associated to the presence of AFB₁ or the incorporation of AflaDetox.

Table 4.2. Effects of aflatoxin B₁ (AFB₁) and AflaDetox on growth performance, and digestive parameters of broilers at 42 days of age

Treatments		Growth Performance ¹			Digestibility ² (%)	
AFB ₁ (mg/kg)	AflaDetox (g/kg)	Body weight gain (g)	Feed intake (g)	Feed conversion rate	Crude Protein	Gross Energy
0	0	2308.0 ^a	3729.9 ^{ab}	1.62 ^c	64.0	78.6
0	1	2301.5 ^a	3722.3 ^{ab}	1.62 ^c	60.2	77.9
0	2	2268.3 ^a	3609.6 ^{ab}	1.59 ^c	69.4	80.4
0	5	2258.5 ^a	3737.0 ^{ab}	1.65 ^c	59.7	77.7
1	0	1951.8 ^c	3471.6 ^b	1.78 ^{ab}	60.2	77.0
1	1	1993.7 ^{bc}	3551.2 ^b	1.79 ^a	68.5	80.5
1	2	2319.5 ^a	3883.8 ^a	1.67 ^{abc}	61.3	76.7
1	5	2230.7 ^{bc}	3706.6 ^{ab}	1.66 ^{bc}	60.6	77.3
Sem		57.45	90.92	0.027	2.40	1.10
Main effect				Probability		
AFB ₁		**	NS	**	NS	NS
AflaDetox		*	NS	*	NS	NS
AFB ₁ *AflaDetox		**	*	**	NS	NS

^{a,b,c}Means within a column with common superscript differ statistically (P<0.05).

¹Results are reported as means for 5 replicates of 3 broilers each.

²Results are reported as means for 5 replicates each.

Sem; Standard error of the means *P<0.05, **P<0.01. NS; Not significant

Serum Biochemistry

The effects of dietary AflaDetox and AFB₁ on serum biochemical variables are shown in Table 4.3. A significant interaction was observed between AFB₁ and AflaDetox on serum TP, and ALP. Thus, the increase in ALP activity, and the decrease in serum TP observed in AFB₁ unsupplemented diet (AFB₁: 1mg/kg; AflaDetox: 0 g/kg), compared to control one, were counteracted by AflaDetox addition, whereas no effects

of AflaDetox supplementation was observed on uncontaminated diets. Furthermore, toxicity of AFB₁ was expressed through changes in other serum biochemical values; AFB₁ decreased the concentration of ALB, and increased the activities of AST, and the concentration of UA. However, no significant interaction was observed between AFB₁ and AflaDetox on these parameters.

Table 4.3. Effects of aflatoxin B₁ (AFB₁) and AflaDetox on serum biochemical parameters of broilers at 42 days of age¹

Treatments		ALP (U/L)	AST (U/L)	GGT (U/L)	TP (g/dL)	UA (mg/dL)	ALB (g/dL)	Chol (mg/dL)	Trg (mg/dL)
AFB ₁ (mg/kg)	AflaDetox (g/kg)								
0	0	2302 ^b	235	27.1	2.68 ^{ab}	2.01	1.12	107.4	22.8
0	1	2697 ^{ab}	234	23.3	2.62 ^{ab}	1.68	1.11	106.3	22.7
0	2	2492 ^{ab}	268	24.7	2.70 ^{ab}	2.42	1.10	104.0	26.4
0	5	2204 ^b	242	24.1	2.61 ^{ab}	1.94	1.10	106.1	22.7
1	0	3456 ^a	314	24.7	2.38 ^b	3.03	1.00	96.7	25.3
1	1	2102 ^b	257	22.7	2.62 ^{ab}	3.25	1.05	98.5	22.9
1	2	2365 ^b	278	24.7	2.64 ^{ab}	3.24	1.08	102.4	25.8
1	5	2239 ^b	258	24.1	2.76 ^a	2.82	1.11	106.7	24.6
Sem		217.6	14.6	1.58	0.08	0.39	0.02	3.79	1.24
Main effect		Probability							
AFB ₁		NS	**	NS	NS	**	**	NS	NS
AflaDetox		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
AFB ₁ *AflaDetox		**	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS

^{a,b,c}Means within a column with common superscript differ statistically (P<0.05).

¹Results are reported as means for 10 broilers each.

GGT= γ -glutamyl transferase; AST= aspartate amino transferase; ALP= alkaline phosphatase; ALB=Albumin; Ca= Calcium; P=Phosphor, UA= uric acid; Chol= cholesterol; TP= total protein; TRG= triglyceride.

Sem; Standard error of the means *P<0.05, **P<0.01. NS; Not significant

Organs weight and AFB₁ residues

The relative weights of liver and spleen and AFB₁ residues in the liver are given in Table 4.4. A significant interaction between AflaDetox and AFB₁ was observed in the relative weights of liver. Feeding AFB₁ contaminated diet without adsorbent caused significant increases in the relative weight of liver. Addition of AflaDetox (1, 2 and 5 g/kg) to the diet containing AFB₁ reduced the toxic effects of AFB₁ on the relative weights of liver showing no effect on the control diet.

AFB₁ residues in breast muscle were not detected in treatments (detection limit of analytical method: 0.05 µg/kg). There were no detectable residues of AFB₁ in the liver of diets consuming the uncontaminated diets (Control and three levels of AflaDetox 1, 2 and 5 g/kg of feed). A detectable amount of AFB₁ (0.166 µg/kg) was found in the liver of the chickens fed the AFB₁ alone in diet. The results showed that the feed to liver AFB₁ transmission ratio was approximately 6000:1. The supplementation of three levels of AflaDetox (1, 2 and 5 g/kg) to AFB₁ diets (1 mg/kg) resulted in an overall reduction of AFB₁ residue in liver, although without reaching significant differences.

Histopathological examination

Results of histological analysis showed that there was a significant damage in the liver tissues of broilers receiving AFB₁ alone (Table 4.5). Liver tissue from this treatment had vacuolar degeneration of hepatocytes, perilobular inflammation (mainly mononuclear cells), bile duct hyperplasia and hypertrophy, and as compared to the tissue of animals fed on the uncontaminated diet. AflaDetox-supplementation (1, 2 and 5 g/kg) to AFB₁ diets significantly avoided these lesions to values not significantly different from the Control.

Table 4.4. Effects of aflatoxin B₁ (AFB₁) and AflaDetox on the relative weight of liver and spleen and the concentration of AFB₁ in liver of broilers at 42 days of age

Treatments		Liver weight (g/100 g of BW) ¹	Spleen weight (g/100 g of BW) ¹	AFB ₁ residues in liver (µg/kg) ²
AFB ₁ (mg/kg)	AflaDetox (g/kg)			
0	0	2.09 ^b	0.17	ND
0	1	2.11 ^b	0.16	ND
0	2	2.19 ^b	0.18	ND
0	5	2.21 ^b	0.17	ND
1	0	2.70 ^a	0.21	0.166
1	1	2.32 ^b	0.20	0.068
1	2	2.30 ^b	0.16	0.094
1	5	2.20 ^b	0.17	0.122
Sem		0.08	0.011	0.018
Main effect		Probability		
AFB ₁		**	NS	**
AflaDetox		NS	NS	NS
AFB ₁ *AflaDetox		**	NS	NS

^{a,b,c}Means within a column with common superscript differ statistically (P<0.05).

¹Results are reported as means for 10 broilers each.

²Data represent the means from treatment detected (detection limit of analytical method: 0.05 µg/kg).

Values obtained using the aflatoxin B₁ positive samples

Results are reported as means for 5 liver samples each.

Sem; Standard error of the means

*P<0.05, **P<0.01. NS; Not significant ND; Not detected

Table 4.5. Effects of aflatoxin B₁ (AFB₁) and AflaDetox on the liver tissue score of broilers at 42 days of age¹

Treatments		Hepatocytic vacuolations	Perilobular inflammation	Interlobular inflammation	Bile duct hypertrophy
AFB ₁ (mg/kg)	AflaDetox (g/kg)				
0	0	0.0 ^b	1.0 ^b	0.4	0.0
1	0	0.6 ^a	2.0 ^a	1.0	0.6
1	1	0.0 ^b	1.6 ^{ab}	0.4	0.4
1	2	0.0 ^b	1.2 ^b	0.0	0.4
1	5	0.0 ^b	1.0 ^b	0.2	0.2
Sem		0.01	0.05	0.02	0.09
P		**	*	NS	NS

^{a,b}Means within a column with common superscript differ statistically ($P < 0.05$).

¹Results are reported as means for 5 broilers each. Sections with no, slight, moderate or intense presence of lesion were given a score of 0, 1, 2, and 3, respectively.

Sem; Standard error of the means * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. NS; Not significant

4.4 Discussion

Effects of AFB₁

The most economically significant effect of aflatoxicosis in poultry is reduced growth rate. The results of our experiment indicated that dietary AFB₁ (1 mg/kg) severely affected the productive performance. Our productive results agree with those presented by Denli et al., (2004) and Fernandez et al., (1994) with broiler chickens.

The adverse effects of AFB₁ on growth performance have been related with a decrease in the protein and energy utilization (Dalvi and Ademoyero, 1984; Verma et al., 2002), probably as a consequence of a deterioration of the digestive and metabolic efficiency of the animals. Facing the digestive deterioration, Osborne and Hamilton (1981) reported increased lipid excretion in feces of young broilers receiving diet supplemented with the AFB₁ at 2.5 mg /kg feed. In the present study, we did not

observe significant differences on the energy or crude protein digestibility associated with the feeding of diets contaminated with AFB₁ (1 mg /kg feed), which could be attributed to differences on the levels of AFB₁ in the diets. On the other hand, looking at metabolic effects, inhibition of protein synthesis, with its consequent reduction in the concentration of serum TP and ALB, and the increased serum GGT, AST and ALP activities have been reported to be sensitive serological indicators of liver and kidney toxicity (Huff et al., 1986, Shi et al., 2006). In fact, in our experiment serum AST, UA, and ALB were also significantly altered in animals fed on the AFB₁ treatments and agree with data reports of Raju and Devegowda, (2000), Denli et al., (2005) and Bintvihok and Kositcharoenkul, (2006).

Liver is considered the target organ for AFB₁ because it is the organ where most aflatoxins are bio-activated to the reactive 8,9-epoxide form, which is known to bind DNA and proteins, damaging the liver structures and increasing liver weight (Miazzo et al., 2005; Bailey et al., 2006 and Pasha et al., 2007). In our study, a pronounced increase in the liver weight and hepatic lesions were observed in chickens treated with AFB₁. Histopathological changes in the livers of chickens exposed to AFB₁ are comparable to those reported in the literature on avian aflatoxicosis (Denli et al., 2005 and Miazzo et al., 2005). Significant increases in the relative spleen weight of broilers exposed to aflatoxin contaminated diets have been also reported by Bailey et al., (2006) and Shi et al., (2006). In current study, the relative weight of spleen also increased from 0.17 to 0.21 g/100 g of BW with the AFB₁ contamination. However, these differences didn't reach a significant level. Differences between studies remain unclear but, it is important to note that purified AFB₁ was used in the current study whereas those previous studies were conducted using *Aspergillus parasiticus* contaminated material which contains all type of aflatoxins (AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂).

However, the most critical aspect of aflatoxins in animal production is the presence of aflatoxins in animal products. The residues of AFB₁ and its metabolites

have been found in eggs and poultry tissues following the consumption of diets contaminated with aflatoxins (Pandey and Chauhan, 2007). In our study, we observed low levels (0.166 µg/kg) of AFB₁ in the liver of animals fed on the contaminated diets. Chen et al., (1984) reported that after feeding the aflatoxin-contaminated diet (containing 2.06 mg AFB₁/kg) for 35 days, mean values for the combined aflatoxins were less than 3 µg AFB₁/kg of gizzard, liver and kidney tissues of broiler chickens. Residues of AFB₁ were also detected in the livers of laying hens given 2.5 mg AFB₁/kg feed, at levels that ranged from 1.92 to 4.13 µg/kg (Zaghini et al., 2005). We are not able to explain the causes of the large differences observed between studies. However differences on the length of the feeding period and concentrations of AFB₁ in diet should have an effect on the quantity of residues in animal samples. We did not observe AFB₁ residual in the breast muscle tissues when considering a detection limit of 0.05 µg/kg. The AFB₁ residue data in muscle tissues support the results of Arulmozhi et al., (2002) who reported that levels of AFB₁ in muscle are lower than those in livers.

Effects of AflaDetox

The use of feed adsorbents is considered the most promising and economical approach for reducing mycotoxicosis in animals (Dakovic et al., 2005). A number of approaches indicated that several of adsorbents (a variety of clays, bentonites, zeolites, phyllosilicates, synthetic aluminosilicates) are capable of binding aflatoxins and to prevent or to reduce its detrimental effects on animals (Abdel-Vahhap et al., 1999). The basic mechanism seems to involve chemisorption of aflatoxins in the gastrointestinal tract resulting in a reduction in its bioavailability (Phillips et al., 1990; Abdel-Vahhap et al., 1999). In spite of its claims about protective effects the efficacy and safety of these products have not always been demonstrated.

AflaDetox is a binding agent extracted from diatomaceous earth which can be fed to animals in a safe way, as demonstrated by the results on performance, serological and relative weight of organs parameters. In this study, broilers fed on

uncontaminated diets supplemented with AflaDetox showed no differences compared to control.

Moreover, in our study, supplementation of AflaDetox significantly ameliorated the toxic effects of AFB₁ in the broilers. Thus, addition of AflaDetox to diets (1, 2, 5 g/kg feed containing AFB₁ significantly improved performance, counteracted the serum biochemical, and histopathological changes, reduced the relative weight of liver, and also appears to be effective in reducing the relative spleen weight. Our results were in agreement with Shi et al., (2006) who reported that a reduced growth rate and serum biochemical changes associated to AFB₁ contamination (0.1 mg/kg) could be ameliorated by the supplementation of a modified montmorillonite nanocomposite at doses of 3 g/kg. Similarly, Bailey et al., (2006) reported that montmorillonite clay (5 g/kg) in broiler diets provide protection on growth performance, serum biochemistry and the relative organ weights from over 4 mg AFB₁/kg diets. On the other hand, other authors have not observed protective effects on the biochemical parameters and histopathological changes in liver sections when sodium bentonite (5 g/kg feed and 3 g/kg feed) was included in the diet (Santurio et al., 1999, Rosa et al., 2001). Differences among studies could be explained by different levels of adsorbents or the AFB₁ exposure dose tested. Notwithstanding, it is necessary to point out that mycotoxins are complex organic compounds and each of them has different functional groups, thus the binding capacity of an adsorbent is depending on its chemical and physical properties and its relation with the physical structure of the target mycotoxins. Thus, the physico-chemical differences among the adsorbents used in the studies mentioned above could explain the higher or lower efficacy among them.

Besides, the incorporation of AflaDetox in the diet during the period of exposure to AFB₁ resulted in reduction of the residue of AFB₁ in the liver. This result confirms that the protective effects of AflaDetox might be due to its capability of specific chemisorption of AFB₁ in gastrointestinal tract which reduces AFB₁ bioavailability. Similarly, Bintvihok

and Kositcharoenkul (2006) reported that the AFB₁ residues in muscle and liver of broiler were decreased by addition of calcium propionate, using as detoxifying agent.

In conclusion, our study clearly indicated that AFB₁ in the diet at levels of 1 mg/kg resulted in a reduced growth performance, and an alteration of the serum biochemical, liver weight, AFB₁ liver residue, and histological parameters of the animals. The addition of AflaDetox prevented all the toxic effects of AFB₁ and reduced the accumulation of AFB₁ residues in the livers.

4.5 Acknowledgements

This research, part of MONALISA EUREKA Project Σ3025!, was supported by PROFIT FIT-0300-2003-335, CDTI 20050012 and Torres Quevedo PTQ2004-0869.

4.6. References

- Abdel-Vahhab, M.A., S.A. Nada, and H.A. Amra.1999. Effect of aluminosilicates and bentonite on aflatoxin-induced developmental toxicity in rat. *J. Appl. Toxicol.* 19 (3):199-204.
- AOAC International (1995). *Official methods of analysis* (16th ed., pp 31-32). Arlington, VA.
- Arulmozhi, A., P.K. Koshy Varghese Ismail, P.A. Peethambaran, and K.M. Ramachandran. 2002. Aflatoxin residues in tissues of broiler chicken. *Indian Vet. J.* 79: 901–903.
- Bailey, C.A., G.W. Latimer, A.C. Barr, W.L. Wigle, A.U. Haq, J.E. Balthrop, and L.F. Kubena. 2006. Efficacy of montmorillonite clay (NovaSil PLUS) for Protecting Full-Term Broilers from Aflatoxicosis. *J. Appl. Poult. Res.* 15:198–206.
- Basmacioglu, H., H. Oguz, M. Ergul, R. Col, and Y.O. Birdane. 2005. Effect of dietary esterified glucomannan on performance, serum biochemistry and haematology in broilers exposed to aflatoxin. *Czech J. Anim. Sci.* 50 (1): 31–39.
- Binthivok, A., S. Thiengnin, K. Doi, and S. Kumagai. 2002. Residues of aflatoxins in the liver, muscle and eggs of domestic fowls. *J. Vet. Med. Sci.* 64(11):1037-1039.

- Bintvihok, A., and S. Kositcharoenkul. 2006. Effect of dietary calcium propionate on performance, hepatic enzyme activities and aflatoxin residues in broilers fed a diet containing low levels of aflatoxin B1. *Toxicon* 47:41–46.
- Chen, C., A.M. Pearson, T.H. Coleman, J.I. Gray, J.J. Pestka, and S.D. Aust. 1984. Tissue deposition and clearance of aflatoxins from broiler chickens fed a contaminated diet. *Food Chem. Toxicol.* 22(6):447-455.
- Dakovic, A., M. Tomasevic-Canovic, V. Dondur, G.E. Rottinghaus, V. Medakovic and S. Zaric. 2005. Adsorption of mycotoxins by organozeolites. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces.* 46:20-25.
- Dalvi, R.R., and A.A. Ademoyero. 1984. Toxic effects of aflatoxin-B in chickens given feed contaminated with *Aspergillus flavus* and reduction of the toxicity by activated-charcoal and some chemical-agents. *Avian Dis.* 28: 61-69.
- Denli, M., F. Okan, and F. Doran. 2004. Effect of conjugated linoleic acid (CLA) on the performance and serum variables of broiler chickens intoxicated with aflatoxin B1. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 34: 97-103.
- Denli, M., F. Okan, F. Doran, and T.C. Inal. 2005. Effect of dietary conjugated linoleic acid (CLA) on carcass quality, serum lipid variables and histopathological changes of broiler chickens infected with aflatoxin B1. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 35: 109-116.
- Diaz, D.E., W.M. Hagler, B.A. Hopkins, L.M. Whitlow. 2002. Aflatoxin Binders I: In vitro binding assay for aflatoxin B1 by several potential sequestering agents. *Mycopathologia* 156: 223–226.
- Fedna (2003). *Tablas Fedna de composición y valor nutritivo de alimentos para la fabricación de piensos compuestos (2ª ed).* ISBN 84-607-8620-X, Edita: Fundación Española para el desarrollo de la Nutrición Animal.
- Fernandez, A., M.T. Verde, and M. Gascon. 1994. Aflatoxin and its metabolites in tissues from laying hens and broiler-chickens fed a contaminated diet. *J. Sci. Food Agric.* 65: 407-414.

- Huff, W.E., L.F. Kubena, R.B. Harvey, V.M. Hagler, S.P. Swanson, T.D. Phillips, and C.R. Creger. 1986. Individual and combined effects of aflatoxin and deoxynivalenol (DON, vomitoxin) in broiler chickens. *Poult. Sci.* 65:1291-1298.
- Huff, W.E., L.F. Kubena, R.B. Harvey, and T.D. Phillips. 1992. Efficacy of hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the individual and combined toxicity of aflatoxin and ochratoxin A. *Poult. Sci.* 71: 64-69.
- Hussein, H.S., and J.M. Brasel. 2001. Review: Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* 167:101-134.
- Jewers, K. 1990. Mycotoxins and their effect on poultry production. *Options Méditerranéennes, Sér. A/No. 7*: 195-202.
- Kubena, L.F., R.B. Harvey, R.H. Bailey, S.A. Buckley, and G.E. Rottinghaus. 1998. Effects of hydrated sodium calcium aluminosilicate (T-Bind™) on mycotoxicosis in young broiler chickens. *Poult. Sci.* 77:1502-1509.
- Miazza, R., M.F. Peralta, C. Magnoli, M. Salvano, S. Ferrero, S.M. Chiacchiera, E.C.Q. Carvalho, C.A.R. Rosa, and A. Dalcero. 2005. Efficacy of sodium bentonite as a detoxifier of broiler feed contaminated with aflatoxin and fumonisin. *Poult. Sci.* 84:1–8.
- Micco, C., M. Miraglia, R. Onori, C. Brera, A. Mantovani, A. Loppolo, and D. Stasolla, 1988. Long-term administration of low doses of mycotoxins to poultry. Residues of aflatoxin B1 and its metabolites in broilers and laying hens. *Food Addit. Contam.* 5:303-308.
- National Research Council, 1994. *Nutrient Requirements of Poultry*, ninth ed. National Academy Press, Washington, DC.
- Oliveira, C.A.F., E. Kobashigava, T.A. Reis, L. Mastieri, R. Albuquerque, and B. Correa. 2000. Aflatoxin B1 residues in eggs of laying hens fed a diet containing different levels of the mycotoxin. *Food Addit. Contam.* 17:459-462.
- Osborne, D.J., and P.B. Hamilton. 1981. Steatorrhea during aflatoxicosis in chickens. *Poult. Sci.* 60(7):1398-1404.

- Pandey, I., and S.S. Chauhan. 2007. Studies on production performance and toxin residues in tissues and eggs of layer chickens fed on diets with various concentrations of aflatoxin AFB1. *Br. Poult. Sci.* 48(6):713-723.
- Pasha, T.N., M.U. Farooq, F.M. Khattak, M.A. Jabbar, and A.D. Khan. 2007. Effectiveness of sodium bentonite and two commercial products as aflatoxin absorbents in diets for broiler chickens. *Anim. Feed Sci. and Technol.* 132:103–110.
- Phillips, T.D., L.F. Kubena, R.B. Harvey, D.R. Taylor, and N.D. Heidelbaugh. 1988. Hydrated calcium aluminosilicate: a high affinity sorbent for aflatoxin. *Poult. Sci.*, 67: 243-247.
- Phillips, T. D., B. A. Clement, L. F. Kubena, and R. B. Harvey, 1990. Detection and detoxification of aflatoxins: prevention of aflatoxicosis and aflatoxin residues with hydrated sodium calcium aluminosilicate. *Vet. Human Toxicol.* 32:15–19.
- Raju, M.V.L.N., and G. Devegowda. 2000. Influence of esterifiedglucomannan on performance and organ morphology, serum biochemistry and haematology in broilers exposed to individual and combined mycotoxicosis (aflatoxin, ochratoxin and T-2 toxin). *Br. Poult. Sci.* 41, 640–650.
- Ramos, A. J., and E. Hernandez. 1997. Prevention of aflatoxicosis in farm animals by means of hydrated sodium calcium aluminosilicate addition to feedstuffs: A review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 65:197–206.
- Rizzi, L., M. Simioli, P. Roncada, and A. Zaghini. 2003. Aflatoxin B1 and clinoptilolite in feed for laying hens: effects on egg quality, mycotoxin residues in livers, and hepatic mixed-function oxygenase activities. *J. Food. Prot.* 66 (5):860-865.
- Rosa, C.A.R., R. Miazzo, C. Magnoli, M. Salvano, S.M. Chiacchiera, S. Ferrero, M. Saenz, E.C.Q. Carvalho, and A. Dalcerro. 2001. Evaluation of the efficacy of bentonite from the south of Argentina to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broilers. *Poult. Sci.* 80 (2):139-144.
- Santurio, J.M., C.A. Mallmann, A.P. Rosa, G. Appel, A. Heer, S. Dageforde, M. Bottcher. 1999. Effect of sodium bentonite on the performance and blood

variables of broiler chickens intoxicated with aflatoxins. *Br. Poult. Sci.* 40 (1):115-119.

- SAS Institute, 1996. *SAS user's guide: statistics*. SAS institute, Cary, N.C.
- Schell, T.C., M.D. Lindemann, E.T. Kornegay, D.J. Blodgett, and J.A. Doem. 1993. Effectiveness of different types of clay for reducing the detrimental effects of aflatoxin-contaminated diets on performance and serum profiles of weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 71:1226-1231.
- Sharma, M., and C. Marquez. 2001. Determination of aflatoxins in domestic pet foods (dog and cat) using immunoaffinity column and HPLC. *Anim, Feed Sci. and Technol.* 93:109-114.
- Shashidhara, R.G., and G. Devegowda. 2003. Effect of mannan oligosaccharide on broiler breeder production traits and immunity. *Poult. Sci.* 82:1319-1325.
- Shi, Y.H., Z.R. Xu, J.L. Feng, and C.Z. Wang. 2006. Efficacy of modified montmorillonite nanocomposite to reduce the toxicity of aflatoxin in broiler chicks. *Anim. Feed Sci. and Technol.* 129: 138–148.
- Tavcar-Kalcher, G., K. Vrtac, U. Pestevsek, and A. Vengust, 2007. Validation of the procedure for the determination of aflatoxin B1 in animal liver using immunoaffinity columns and liquid chromatography with postcolumn derivatisation and fluorescence detection. *Food Control*, 18: 333-337.
- Tedesco, D., S. Steidler, S. Galletti, M. Taneni, O. Sonzogni, and L. Ravarotto. 2004. Efficacy of silymarin-phospholipid complex in reducing the toxicity of aflatoxin B1 in broiler chicks. *Poult. Sci.* 83:1839-1843.
- Verma, J., B.K. Swain, and T.S. Johri. 2002. Effect of various levels of aflatoxin and ochratoxin A and combinations thereof on protein and energy utilisation in broilers. *J. Sci. Food Agric.* 82, 1412-1417.
- Watts, C.M., Y.C. Chen, D.R. Ledoux, J.N. Broomhead, A.J. Bermudez, and G.E. Rottingaus. 2003. Effects of multiple mycotoxins and a hydrated sodium calcium aluminosilicate in poultry. *Int. J. Poult. Sci.* 2 (6): 372-378.
- Zaghini, A., G. Martelli, P. Roncada, M. Simioli, and L. Rizzi. 2005. Mannan oligosaccharides and Aflatoxin B1 and M1 residues in eggs and aflatoxin B1 levels in liver. *Poult. Sci.* 84:825-832.

CAPÍTULO 5

“Efficacy of a new ochratoxin binding agent (OcroTox) to counteract the deleterious effects of ochratoxin A in laying hens.”

2008, Poultry Science 87: 2266-2272

Abstract

An experiment was conducted to evaluate the efficacy of a new ochratoxin binding agent (OcraTox, 5g/kg feed) in offsetting the toxic effects of ochratoxin A (OTA, 2 mg/kg feed) in laying hens diets. Performance, serum biochemistry, OTA residues in liver and eggs, and egg quality parameters were evaluated. Twenty-eight HisexBrown laying hens, 47 wk of age, were allocated to four experimental treatments for 3 weeks: Control, OTA (containing 2 mg OTA/kg feed), OcraTox (containing 5g OcraTox /kg feed), and OTA + OcraTox (containing 2 mg OTA and 5 g OcraTox/kg feed). Laying hens fed OcraTox showed similar results to the control hens ($P>0.05$). OTA diet significantly ($P<0.05$) reduced the daily feed consumption, the egg mass production and the serum triglyceride concentrations, and increased the relative weight of liver, the serum activity of alkaline phosphatase (ALP), and the serum concentration of uric acid as compared to Control diet. Addition of OcraTox to the contaminated diet alleviated ($P<0.05$) the negative effects derived from OTA, reaching values not significantly different from the Control for most of the parameters, except the relative weight of the liver. Animals fed on the OTA treatment showed a higher content of OTA in the liver (15.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) than Control ($<0.05 \mu\text{g}/\text{kg}$). Supplementation with OcraTox in the contaminated diet (OTA+OcraTox) reduced the values to 12.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Residues of OTA were not detected above our detection limit (0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$) in any of the analyzed eggs.

In conclusion, our results indicated that addition of OcraTox can counteract the deleterious effects caused by OTA in laying hens.

5.1 Introduction

Ochratoxin A (OTA) is a secondary metabolite produced by some strains of *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium verrucosum*, which may be found in various feed ingredients. Ochratoxin A is considered a potent nephrotoxic, hepatotoxic and immunosuppressive (Stormer and Lea, 1995) compound in all mammalian species, and it is classified as a possible carcinogen (Group 2B) to humans by The International Agency for Research on Cancer (IARC, 1993). The mechanism of action of OTA is unclear. However, some authors have suggested that OTA may interfere in the synthesis of enzymes and other proteins by competitively inhibiting phenyl-alanine-tRNA (Ueno, 1991, CAST, 2003). In commercial birds, consumption of OTA contaminated diets has been related with clinical signs of intoxication, reduced feed intake, egg production and quality (Prior and Sisodia 1978, Haazele et al., 1993, Verma et al., 2003). Consumption of ochratoxin by birds may also be associated with the presence of the toxin and its derivatives in eggs (Piskorska-Pliszczynka & Juskiewicz, 1990).

Batches of cereal grains coming into the feed mill are routinely analyzed for mycotoxin content. However, some mycotoxins, which are located in isolated areas of the batch, are often not detected; and feed contamination may be identified when mycotoxicosis is detected in animals. A variety of dietary treatments has been employed for eliminating or reducing the toxic effects of OTA in animals, including the use of specific adsorbents to block mycotoxin in the digestive content, and antioxidant compounds (Bauer, 1994, Hoehler and Marquardt, 1996). Hydrated sodium calcium aluminosilicate (Huff et al., 1992, Santin et al., 2002), activated charcoal, bentonite and cholestyramine (Bauer, 1994) and esterified-glucomannan (Raju and Devegowda, 2000) have been used in animal feeds to diminish the adverse effects of OTA. However, many of these agents have failed to prevent ochratoxicosis in animals. The animal production takes place within a framework that establishes the fulfillment of legal requirements in food safety subjects. These requirements imply the Hazard Analysis and Critical Control

Points (HACCP) implementation, and the avoidance of the presence of aflatoxins, deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxins, T-2 y HT-2, and fumonisins in products for animal nutrition. In this way, mycotoxin binding agents are designed to be used as therapeutic, that is, just at the moment in which problem is a fact.

OcraTox (ADIVETER, S.L.Pol. Ind. Agro-Reus. Tarragona. Reus. Spain) is a new additive resulting from the modification and activation of diatomaceous earth, which is a natural material extracted from a quarry with a minimum of 70% silicium dioxide. OcraTox is physico-chemically inert, and presents a highly porous surface with high cationic interchange capacity. OcraTox was designed to comply with the demands listed above, it has a high efficacy to bind ochratoxin at a low dosage in feed, which allows its use as a preventive agent.

The main objective of this study was to determine the protective effects of using OcraTox in OTA contaminated diets on the egg production, egg quality characteristics, serum biochemistry and on the presence of OTA residues in laying hens.

5.2 Materials and Methods

The experiment was performed at the Animal Facility Research Center of the Universitat Autònoma of Barcelona and conducted according to the guidelines for animal experimentation of the same University.

5.2.1. Animals and Diets

A total of 40 Hisex-Brown laying hens were obtained from a commercial facility at 45 wk of age and placed in a light- (16L:8D) and temperature (22°C) controlled room. Hens were individually allocated in wire cages (41 x 41 cm), each equipped with a feeder and a nipple drinker. Hens were allowed to adapt to the basal diet, which was based on barley, wheat and soybean meal (Table 5.1) and formulated to meet NRC (1994) requirements, for two weeks. Twenty-eight hens (1.793 ± 18 g BW and 99 % egg

production) were selected and randomly divided into four experimental groups (7 animals per group). The four experimental treatments resulted from a 2 x 2 factorial arrangement, where the 2 variation factors were the level of ochratoxin (0 and 2 mg of OTA/kg feed) and the level of adsorbent Ocratox (0 and 5 g Ocratox /kg feed) in the basal diet. Experimental diets were named Control, Ocratox, OTA and OTA+Ocratox. Pure crystalline OTA (Sigma-Aldrich Chimie S.a.r.l France) was dissolved in absolute ethanol (1mg/ml) and the solution was sprayed out on 500 g of ground Control diet. The treated feed was left overnight at room temperature for the solvent to evaporate. After this time, it was mixed into the basal diet to obtain the desired level of 2 mg of OTA/kg of diet. OTA concentration in the diets was analyzed by HPLC (Monaci et al., 2005) to ensure the OTA concentrations in the experimentally contaminated diets. Feed and water were provided ad libitum for 3 wks.

Table 5.1. Ingredients content and the calculated composition of the basal diet

Ingredients	(g/kg)
Barley	359.7
Wheat	300.0
Fullfat soybean	109.2
Soybean meal (44 % CP)	95.0
Sunflower oil	30.0
Calcium carbonate	86.3
Dicalcium phosphate	12.8
Iodized salt	1.8
DL-Methionine (98%)	1.5
Premix ¹	2.5
Choline	0.1
Glucanase and Xylanase premix ²	0.5
Natural Pigments ³	0.6
Total	1000,0
Calculated nutrients and energy (as -is basis)	
Crude protein (g/kg)	157.7
ME (Kcal/kg)	2,750
Ca (g/kg)	38.7
Available P (g/kg)	3.9

¹ Provided per kg of diet: Vitamin A, 8000 IU; vitamin D3, 1200 IU; vitamin E, 10 IU; vitamin K3, 2 mg; thiamine, 2 mg; riboflavin, 5 mg; pyroxidine, 0.2 mg; vitamin B12, 0.03 mg; pantothenic acid, 10 mg; niacin, 50 mg; biotin, 0.1 mg; folic acid, 0.5 mg; Iron, 80 mg; zinc, 40 mg; manganese, 60 mg; iodine, 0.8 mg; copper, 8 mg; selenium, 0.2 mg; cobalt, 0.4 mg. ² Capsozyme C2 (ITPSA, Spain; β -glucanase (n°CE: 19, n° IUB: EC3.2.1.6): 48000 glucanase units/kg and xylanase (n° CE: 21, n°IUB: EC3.2.1.8): 112000 xylanase units/kg); ³ Capsantal TR (ITPSA, Spain, 30g total carotenoids/Kg).

5.2.2. Performance and Egg Quality

Eggs were collected daily for measurement of egg weight and calculation of egg mass production (egg production x egg weight). Body weights were recorded at the start and the end of the experiment. Feed consumption was also registered and the feed conversion rate calculated as the feed consumed per g of egg $\{(g \text{ feed/hen/day})/(g \text{ egg/hen/day})\}$.

During wk 3, the last three eggs collected from each animal were used for determination of the egg quality and OTA residues. The egg shape index (ES) was calculated using the formula $ES = L/B$, where L is the length and B the breadth of the egg. These eggs were kept at 4 °C and analyzed within 2 d after collection for determination of the: shell thickness, albumen height, Haugh unit score and yolk color. Eggs were broken on a flat surface, and then the height (H) of the albumen, and the egg shell thickness were measured by a micrometer (Ames S-6428; the nearest precision 0.1mm). Haugh unit was calculated by the following formula:

$$\text{Haugh unit} = 100 \log(H - 1.7G^{0.37} + 7.6)$$

where H is the height of the thick albumen in mm and G is the mass of the whole egg in g. Yolk color was measured using a Minolta Chroma Meter CR-200/08⁵ (Minolta Corporation, Ramsey, NJ) The Chroma Meter measures Hunter L^* , a^* , and b^* values, where L^* is a measure of dark to light, with a greater value indicating a lighter color; a^* is a measure of green to red, with a greater value indicating a redder color; and b^* is a measure of blue to yellow, with a greater value indicating a more yellow color. The yolk from each egg was placed in a petri dish, and the contents were spread evenly into a circle with a similar diameter as the light-projection tube on the color meter.

5.2.3. Serum Biochemistry and Organ Weight

At the end of the experiment, blood samples (2 mL) were collected from all birds for serum biochemical determination and the hens sacrificed by neck dislocation and

bleeding. The liver and spleen were removed, weighed and frozen until the analyses for OTA concentration. Data were expressed as relative organ weights (grams of organ per 100 g of body weight). Within one hour, the serum was obtained by centrifugation of the blood at 2500 x g at 4 °C for 15 minutes and stored at -80 °C until further analysis. Serum biochemical parameters were measured in order to evaluate the hepatobiliary and kidney toxicity and the mineral and protein metabolism. Different serum proteins and metabolites and the activity of certain enzymes were analyzed as sensitive indicators of ochratoxicosis (Marquardt and Frohlich, 1992). Concentration of total protein, uric acid, cholesterol, calcium, phosphorus, triglyceride, and alkaline phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (AST), γ - glutamyltransferase (GGT) and alanine aminotransferase (ALT) activities in serum were measured by using an automatic analyzer Olympus AU 400 (Mishima, Japan).

Moreover, the liver and spleen were removed, weighed (data expressed as relative organ weights-grams of organ per 100 g of body weight) and frozen until the analyses for OTA concentration.

5.2.4. Analysis of OTA residue in liver and eggs

Six egg samples per treatment consisting of the pool of the last 3 eggs produced by hen at the end of the study were analyzed for ochratoxin residues. The procedure followed was a modification of the method developed by Monaci et al. (2005). Protocol of analysis was validated according to ENAC Guidelines (norm UNE-EN-ISO/IEC 17025, ENAC 2005). Standards were prepared by adding an appropriate volume of methanol solution of the toxin to the homogenised egg and remaining liver samples for a least 1h at room temperature in order to allow equilibration. Ochratoxin A was determined by HPLC with fluorimetric detection. {Waters Spherisorb ODS2 (150 x 4.6mm x 5 μ m) chromatographic column}. Liquid chromatographic conditions were: mobile phase, acetonitrile:water:acetic acid (102:96:2); injection volume, 100 μ L; flow rate 1.0ml/min, run time for a cycle 10 min, fluorescent detection with a excitation at 333 nm and emission at 460 nm. The quantification of OTA was calculated automatically

according to the peak area of one set of standards of OTA (0.70-60.0 ng/ml). The recovery of overall procedure was satisfactorily high: $(92 \pm 9 \%)$. A calibration curve was obtained by spiking homogenised blank samples with OTA covering the range from 0.15 to 10.00 ng/g. The calibration curve was described by the following equation: peak area (a.u.) = $1.038 C - 0.3718$, $R = 0.992$ where peak area was in arbitrary units and C was expressed as ng/g of the homogenate. The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) calculated as 3- and 10-fold signal/noise ratio, were 0.05 and 0.15 ng/g, respectively.

5.2.5 Statistical Analyses

Statistical analyses were performed with SAS for Windows version 8 (SAS Institute Inc., Cary, NC). Results of the parameters were analyzed by ANOVA analysis with the GLM procedure of SAS following the next model:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk},$$

where Y_{ijk} is the dependent variable, μ is the overall mean, α_i is the effect of OTA, $i = 1, 2$; β_j is the effect of Ocratox, $j = 1, 2$; $(\alpha\beta)_{ij}$ is the interaction between OTA and Ocratox and $\varepsilon \sim N(0, \sigma^2_\varepsilon)$ represents the unexplained random error. The alpha level used for determination of significance for all the analysis was 0.05. Differences between means were tested by Tukey's least significant difference when an interaction between OTA and Ocratox was significant. Data are presented as means and SEM.

5.3 Results

Results of feed consumption, BW changes, egg production and feed conversion rate are shown in Table 5.2. OTA decreased daily feed consumption compared with the Control group, whereas not significant differences were observed in hens fed on the Ocratox diets. The lower feed intake with OTA decreased egg mass production and the

average egg weight. However, there were no differences between treatments regarding BW changes and feed-to-gain ratio. The incorporation of Ocratox to the OTA containing diets partially ameliorated the adverse effects of OTA on the daily feed consumption and the egg production (%/hen). The OTA treatment showed the lowest egg production.

The egg quality parameters are shown in Table 5.3. There were no effects of treatments on the shell thickness, shape index, Haugh Unit, and yolk brightness. Ocratox increased the albumen height and the yolk redness color compared to no supplemented treatments.

The effects of dietary treatments on the serum biochemistry are summarized in Table 5.4. The serum activities of ALT, AST and total protein concentration were not affected by treatments. Ochratoxin in diet increased significantly the serum activity of ALP and the concentration of uric acid, while it decreased the serum concentration of phosphorus. On the other hand, Ocratox feeding reduced the serum activity of GGT and increased the serum Ca concentration. A significant interaction between OTA and Ocratox was observed in the serum concentrations of uric acid, cholesterol and triglyceride, as a consequence of the change observed on the OTA treatment.

The relative weight of liver and spleen, and the content of OTA residues in liver are shown in Table 5.5. The contaminated diets increased the relative weight of the liver (2,90 vs. 2,36 %) but did not affect the relative weight of spleen. Significant amounts of OTA were detected in the liver of animals fed on the OTA treatment but not in the Control or the Ocratox diet (<0.05 µg/kg). Supplementation with Ocratox in the contaminated diet (OTA+Ocratox) significantly reduced the values from 15.1 and 12.0 µg/kg in the OTA and OTA+Ocratox diets, respectively. We did not detect residues of OTA in the eggs above our detection limit (0.05 µg/kg).

Table 5.2. Effects of dietary OcraTox and ochratoxin A on the daily feed intake, BW gain, egg production, egg mass, feed conversion rate (FCR), egg mass and egg weight changes in laying hens¹

Treatment group		Feed intake (g/hen/day)	BW gain (g)	Egg production (%/hen)	Egg mass (g/hen/day)	FCR {(g feed/hen/day)/ (g egg/hen/day)}	Egg weight (g)	Egg weight changes (g) ²
Ochratoxin A (mg/kg of feed)	OcraTox (g/kg of feed)							
0	0	147.3 ^a	39.2	99.2 ^a	62.0 ^a	2.22	67.3 ^a	1.72
0	5	141.9 ^a	39.0	96.2 ^{ab}	62.9 ^a	2.19	68.9 ^a	0.59
2	0	126.7 ^b	21.2	92.4 ^b	55.4 ^b	2.15	63.5 ^b	-1.47
2	5	136.7 ^{ab}	27.6	99.2 ^a	59.4 ^{ab}	2.00	65.6 ^{ab}	-0.40
SEM ³		4.18	23.77	2.18	1.90	0.820	1.59	1.01
<i>P-values for main effects</i>								
Ochratoxin A		0.005	0.544	0.397	0.014	0.097	0.033	0.050
OcraTox		0.594	0.893	0.397	0.220	0.311	0.261	0.974
Ochratoxin A*OcraTox		0.756	0.900	0.035	0.434	0.497	0.863	0.289

^{a,b}Means with different superscripts differ significantly (P<0.05)

¹ Each value represents the least square mean from 7 laying hens per each treatment.

² Difference between the egg weight at day 1 and the egg weight at the end of the experiment

³ Standard error of the mean

Table 5.3 Effects of dietary Ocratox and ochratoxin A on shell thickness, albumen height, shape index, haugh unit and yolk color in the eggs¹

Treatment group		Shell thickness (mm)	Albumen height (mm)	Shape index. length/height (%)	Haugh unit	Yolk color ³		
Ochratoxin A (mg/kg of feed)	OcraTox (g/kg of feed)					L	a	b
0	0	0.352	5.6 ^{ab}	76.7	76.2	65.7	20.1 ^{ab}	46.8
0	5	0.352	6.4 ^a	77.4	79.7	65.7	21.7 ^a	47.2
2	0	0.360	4.9 ^b	76.8	72.0	65.6	18.8 ^b	44.5
2	5	0.361	5.9 ^{ab}	77.1	75.3	65.4	21.0 ^{ab}	46.3
SEM ²		0.009	0.32	0.86	2.65	0.57	0.69	0.80
<i>P-values for main effects</i>								
Ochratoxin A		0.402	0.060	0.543	0.432	0.760	0.167	0.087
OcraTox		0.983	0.017	0.602	0.756	0.816	0.010	0.171
Ochratoxin A*OcraTox		0.960	0.798	0.704	0.776	0.893	0.668	0.418

^{a,b}Means within line with different superscripts differ significantly (P<0.05)

¹ Each value represents the least square mean from 7 laying hens per each treatment.

²Standard error of the mean

³L= brightness; a= redness and b= yellowness.

Table 5. 4. Effects of dietary Ocratox and ochratoxin A on serum biochemistry³ of laying hens¹

Treatment group		Measurements									
Ochratoxin A (mg/kg of feed)	Ocratox (g/kg of feed)	GGT (U/L)	AST (U/L)	ALT (U/L)	ALP (U/L)	UA (mg/dL)	TP (g/dL)	Chol (mg/dL)	Trg (mg/dL)	Ca (mg/dL)	P (mg/dL)
0	0	19.0 ^{ab}	170.6	1.1	474 ^b	2.6 ^c	5.2	103.4 ^a	1071 ^a	24.6 ^{ab}	5.7 ^a
0	5	18.0 ^{ab}	182.3	1.3	578 ^b	3.9 ^{bc}	5.1	96.4 ^{ab}	975 ^{ab}	26.4 ^a	5.9 ^a
2	0	26.0 ^a	213.3	1.0	1940 ^a	6.2 ^a	4.7	87.3 ^b	785 ^b	22.9 ^b	4.2 ^b
2	5	15.9 ^b	180.0	2.3	1430 ^a	5.1 ^{ab}	5.0	114.5 ^a	1110 ^a	26.3 ^a	4.7 ^{ab}
SEM ²		2.60	11.96	0.39	294.62	0.59	0.23	7.94	78.69	1.04	0.34
<i>P-values for main effects</i>											
Ochratoxin A		0.370	0.104	0.284	0.0005	0.0003	0.200	0.895	0.332	0.355	0.0005
Ocratox		0.041	0.376	0.080	0.479	0.849	0.797	0.211	0.146	0.014	0.262
Ochratoxin A*Ocratox		0.098	0.077	0.157	0.292	0.041	0.365	0.039	0.011	0.404	0.632

^{a,b,c}Means within line with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$)

¹ Each value represents the least square mean from 7 laying hens per each treatment.

² Standard error of the mean

³ GGT= γ -glutamyl transferase; AST= aspartate amino transferase; ALT= alanine amino transferase; ALP= alkaline phosphatase; Ca= calcium; P=Phosphorus. UA= uric acid; Chol= cholesterol; TP= total protein; TRG= triglycerid

Table 5.5. Effects of dietary Ocratox and ochratoxin A on the relative weights of liver and spleen and the concentration of ochratoxin A in the liver of laying hens¹

Treatment group		Liver weight (g/100 g BW)	Spleen weight (g/100 g of BW)	Liver OTA Content (µg/kg)
Ochratoxin A (mg/kg of feed)	Ocratox (g/kg of feed)			
0	0	2.36 ^b	0.12	ND ²
0	5	2.48 ^b	0.14	ND
2	0	2.90 ^a	0.15	15.1
2	5	2.90 ^a	0.12	12.0
SEM ²		0.009	0.14	0.20
<i>P-values for main effects</i>				
Ochratoxin A		0.002	0.564	0.0001
Ocratox		0.628	0.817	0.0001
Ochratoxin A*Ocratox		0.703	0.303	0.0001

^{a,b}Means within line with different superscripts differ significantly (P<0.05)

¹ Each value represents the least square mean from 7 laying hens per each treatment.

²Standard error of the mean

² ND: not detected

5.4. Discussion

Ochratoxin effects on laying hens

Animals from the OTA group presented clinical signs of intoxication. Differences were observed between intoxicated hens (OTA) and the Control group in the daily feed consumption, the egg production and quality, the relative liver weight, the hepatic function, and serum triglycerides and uric acid levels. Productive results are in agreement with Haazele et al. (1993), who observed a decreased feed consumption in laying hens fed 1.7 mg of OTA/kg feed for 2 wk, and Verma et al. (2003) who reported reductions in the egg mass production of laying hens at levels of 1, 2 and 4 mg OTA/kg of diet. The decrease observed in our experiment in the egg mass production was associated with a decrease in the daily feed consumption rather than with changes in the feed conversion rate. The lower energy and essential amino-acid intake of the OTA intoxicated hens could mainly explain the observed reductions on egg production. On the other hand, OTA did not cause significant changes in the body weight which is also in agreement with the findings of Verma et al. (2003).

Changes such as the serum concentrations of several proteins and metabolites and the activity of certain enzymes can be used as sensitive indicators of ochratoxicosis (Marquardt and Frohlich, 1992). Biochemical signs of ochratoxicosis reported in the bibliography in poultry include decreases in cholesterol, total protein, albumin, globulin, potassium and triglycerides levels, and increases in uric acid, creatine levels and in the activities of serum alkaline phosphatase and γ -glutamyltransferase (Huff et al. 1988). In our study, significant increases were observed in the activity of serum ALP, and the uric acid concentration in animals exposed to OTA in the diet ($P < 0.05$). Similar observations due to OTA intoxication have been reported by Kalorey et al. (2005) within these parameters. The increase observed in the activity of ALP is known to be indicative of hepatobiliary disease (Kaplan, 1987, Gentles et al., 1999). In fact, the reduction in serum cholesterol and triglyceride concentration during ochratoxicosis may confirm the impaired liver metabolism (Kalorey et al. 2005). Our data also showed an increase in the relative weight of liver in groups treated with OTA. Similar increases in the relative liver weight have also been observed in chickens exposed to OTA (Huff et al. 1992). An increase in the concentration of serum uric acid has also been observed in chickens fed OTA-contaminated diets (Hoehler and Marquardt, 1996; Huff et al., 1992). Feeding OTA contaminated diets significantly decreased

serum phosphorus levels. Similar results have been reported previously by Bailey et al (1989) and Gupta et al (2005), and Huff et al (1980) reported that feeding 2 ppm OTA to broiler chicks decreased bone breaking strength. Kidney disfunction has been hypothesized as the cause of the decrease in phosphorus concentration.

However, the most critical aspect of mycotoxins in animal production is the likely presence of mycotoxins in animal products. Ochratoxin A has been described as showing potential teratogenic (Fukui et al., 1987) and genotoxic (Creppy et al., 1985) effects, and has been classified as a possible carcinogen agent (Group 2B) to humans by The International Agency for Research on Cancer (IARC, 1993). There is a correlation between OTA concentration in feed and its residues in animal tissues (Krogh, 1976). Ochratoxin is accumulated mostly in the kidneys followed by the liver, and muscle (Malagutti et al., 2005) in pigs. In our study, we observed significant amounts of OTA in the liver of all animals fed on the contaminated diets. We did not observe OTA residual in eggs when considering a detection limit of 0.05 and 0.15 ng/g. Similarly, Krogh (1987) reported no detection of OTA in eggs of laying hens fed diets containing 0.3 and 1 mg of OTA/ kg. In contrast, Piskorska-Pliszczynka & Juskiewicz (1990) reported that OTA was detected in eggs of laying hens fed diets containing a higher level of OTA (10 mg/kg). Differences between studies may have been due to the concentrations of OTA in diet.

The efficacy of Ocratox

The most promising and economical approach for reducing mycotoxicosis in animal feeding is the utilization of adsorbents which bind mycotoxins efficiently in the gastro-intestinal tract and prevent their adsorption (Dakovic et al., 2005). In vivo studies have demonstrated that aluminosilicates, and many proposed adsorbents are capable of absorbing aflatoxins but do not prevent the toxicity of dietary OTA (Danicke, 2002) because they have different diverse chemical structures (Phillips, 1999). Ocratox is a new additive resulting from modification and activation of diatomaceous earth. Ocratox is physico-chemically inert, and presents a highly porous surface with high cationic interchange capacity that yield a high binding capacity for OTA

Our results show that Ocratox did not cause any adverse effects in hens. On the other hand, Ocratox increased the eggs albumen height, the redness color of the egg yolk, and the serum Ca concentration, which suggests likely effects of the product on the minerals and carotene absorption. Moreover, when Ocratox was incorporated in the OTA-contaminated diets,

the adsorbent increased the egg production to values not significantly different from Control, and it ameliorated the negative effects on some of the serum variables altered by OTA, such as the serum concentrations of uric acid, cholesterol and triglyceride content. These results and the lower content of OTA in the liver of animals fed on the OTA-OcraTox diet appear to support the suggestion that OcraTox may provide protection against the toxic effects of OTA.

In conclusion, results from our study confirmed the toxic effects in laying hens of a prolonged dietary intake of OTA. However, the use of new adsorbent products included in the diet, such as OcraTox, can ameliorate significantly many of its adverse effects.

5.5. References

- Bailey, C. A., R. M. Gibson, L. F. Kubena, W. E. Huff, R. B. Harvey, 1989. Ochratoxin A and dietary protein: 2. Effects on hematology and various clinical chemistry measurements. *Poult. Sci* 68 (12): 1664-1671.
- Bauer, J., 1994. Methods for detoxification of mycotoxins in feedstuffs. *Monatshefte Fur Veterinarmedizin* 49 (4): 175-181.
- Creppy, E. E., A. Kane, G. Dirheimer, C. Lafargefrayssinet, S. Mousset, and C. Frayssinet, 1985. Genotoxicity of ochratoxin a in mice: DNA single-strand break evaluation in spleen, liver and kidney. *Toxicol. Let.* 28 (1): 29-35.
- Council for Agricultural Science and Technology (CAST), 2003. *Mycotoxins: Risks in plant, animal and human systems. Task Force Report 139*, Ames, IA. 2003. Iowa, USA.
- Dakovic, A., M. Tomasevic-Canovic, V. S. Dondur, G. E. Rottinghaus, V. S. Medakovic, and S. Zaric, 2005. Adsorption of mycotoxins by organozeolites. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 46: 20–25.
- Danicke, S., 2002. Prevention and control of mycotoxins in the poultry production chain: a European view. *World Poultry Sci. J.* 58 (4): 451-474.
- Fukui, Y. K. Hoshino, Y. Kameyama, T. Yasui, C. Toda, and H. Nagano. 1987. Placental transfer of ochratoxin A and its cytotoxic effect on the mouse embryonic brain. *Food Chem. Toxicol.* 25: 17

- Gentles, A., E. E. Smith, L. F. Kubena, E. Duffus, P. Johnson, J. Thomson, R. B. Harvey, T. S. Edrington. 1999. Toxicological evaluations of cyclopiazonic acid and ochratoxin A in broilers. *Poult. Sci* 78(10): 1380-1384
- Gupta, S., M. Jindal, R. S. Khokhar, A. K. Gupta, D. R. Ledoux, G. E. Rottinghaus. 2005. Effect of ochratoxin A on broiler chicks challenged with *Salmonella gallinarum*. *Br. Poult. Sci.* 46(4): 443-450
- Haazele, F. M., W. Guenter, R. R. Marquardt and A.A. Frohlich, 1993. Beneficial effects of dietary ascorbic acid supplement on hens subjected to ochratoxin A toxicosis under normal and high ambient temperatures. *Can. J. Anim. Sci.*, 73:149-157.
- Hoehler, D. and R. R. Marquardt, 1996. Influence of vitamins E and C on the toxic effects of ochratoxin A and T-2 toxin in Chicks. *Poult. Sci.* 75: 1508-1515.
- Huff, W. E. J. A. Doerr, P. B. Hamilton, D. D. Hamann, R. E. Peterson, A. Ciegler 1980. Evaluation of bone strength during aflatoxicosis and ochratoxicosis. *Appl. & Environ. Microbiol.* 40: 102-107.
- Huff, W.E., L. F. Kubena, R.B. Harvey, T. D. Phillips, 1992. Efficacy of hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the individual and combined toxicity of aflatoxin and ochratoxin-A. *Poult. Sci.* 71 (1): 64-69.
- Huff, W. E., L. F. Kubena, and R. B. Harvey, 1988. Progression of ochratoxicosis in broiler chickens. *Poult. Sci.* 67:1139-1146.
- IARC, 1993. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks of Chemicals to Humans, International Agency For Cancer Research (IARC, 1993 Lyon), Volume 56 pp 245-395.
- Kalorey, D.R., N. V. S. Kurkure, J. S. Ramgaonkar, P. S. Sakhare, S. Warke, and N. K. Nigot, 2005. Effect of polyherbal feed supplement "Growell" during induced aflatoxicosis, ochratoxicosis and combined mycotoxicoses in broilers. *Asian. Austral. J. Anim.* 18 (3): 375-383.
- Kaplan, M. M., 1987. Laboratory tests. In: *Diseases of the Liver*. Ed. Schiff, L. & Schiff, E. R., J. B. Lippincott, Philadelphia. p. 219.
- Krogh, P. 1976. Epidemiology of mycotoxic porcine nephropathy. *Nord. Vet. Med.* 28: 452-458.
- Krogh, P., 1987. Ochratoxin in food. In: P. Krogh (Ed.) *Mycotoxins in Food*. P97. Academic Press. Harcourt Brace Javanovich London.
- Malagutti, L., M. Zannotti, A. Scampini, and F. Sciaraffia, 2005. Effects of ochratoxin A on heavy pig production *Animal Research* (3): 179-184

- Marquardt, R. R., and A. A. Frohlich, A. A., 1992. A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. *J. Anim. Sci.* 70: 3968-3988.
- Monaci, L., F. Palmisano, R. Matrella, G. Tantillo, 2005. Determination of ochratoxin A at part-per-trillion level in Italian salami by immunoaffinity clean-up and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* 1090(1-2): 184-187.
- NRC, 1994. Nutrient requirements of poultry. (9th ed.). National Academy Press, Washington, D.C., USA.
- Phillips, T. D., 1999. Dietary clay in the chemoprevention of aflatoxin-induced disease. *Toxicol. Sci.* 52(Suppl. 2):118-126.
- Piskorska-Pliszczynka, J & T. Juszkievicz, 1990. Tissue deposition and passage into eggs of ochratoxin A In Japanese quail. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 10 (1-2):8-10
- Prior, M. G. and C. S. Sisodia, 1978. Ochratoxicosis in white legorn hens. *Poultry Sci.*,57,169.
- Raju, M. VS. L. N., and G. Devegowda, 2000. Influence of esterified-glucomannan on performance and organ morphology, serum biochemistry and haematology in broilers exposed to individual and combined mycotoxicosis (aflatoxin, ochratoxin and T-2 toxin). *Brit. Poul. Sci.* 41: 640–650
- Santin, E., A. Maiorka, E. L. Krabbe, A. C. Paulillo, and A. C. Alessi, 2002. Effect of hydrated sodium calcium aluminosilicate on the prevention of the toxic effects of ochratoxin. *J. Appl. Poul. Res.* 11:22-28.
- Stormer, F.C., and T. Lea, 1995. Effects of ochratoxin A upon early and late events in human T-cell proliferation. *Toxicology* 95 (1-3): 45-50.
- Ueno, Y., 1991. Biochemical mode of action of mycotoxins. Pages 437-454 in *Mycotoxins and Animal Foods*. J. E. Smith, R. S. Henderson, ed. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Verma, J., T. S. Johri, and B. K. Swain, 2003. Effect of varying levels of aflatoxin, ochratoxin and their combinations on the performance and egg quality characteristics in laying hens. *Asian. Austral. J. Anim.* 16 (7): 1015-1019.

CAPÍTULO 6

Effect of dietary zearalenone on the performance, reproduction tract and serum
biochemistry in young rats

Abstract

The current study evaluated the toxic dose of dietary Zearalenone (ZEA) in weaned young rats. Sixty, 21-day-old, Sprague Dawley female rats were randomly allocated to five groups of 4 replicate cages, containing 3 rats. Rats were fed the following treatments for 4 weeks: 0, 0.5, 0.9, 1.8 and 3.6 mg ZEA /kg feed. Daily feed intake was significantly reduced by feeding the ZEA supplemented diets (0.9 and 3.6 mg/kg feed) ($P < 0.05$). In addition, at 1.8 mg of ZEA in diet significantly increased daily body weight gain and improved feed: gain ratio as compared to control group ($P < 0.05$). The two highest levels of dietary ZEA (1.8 and 3.6 mg/kg feed) significantly increased the weight of uterus ($P < 0.05$). Ovaries weight, timing of vaginal opening and the inter-oestrous-interval were not affected by increasing the dietary concentration of ZEA ($P > 0.05$). Similarly, serum concentrations of total protein, follicle stimulating hormone (FSH), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase and alkaline phosphates (ALP) activities were not altered by the ZEA treatments ($P > 0.05$). In conclusion, our results indicated that dietary ZEA at concentrations 1.8 mg increased the growth efficiency and the uterus weight of weaning female rats.

6.1. Introduction

Zearalenone (ZEA) is a non-steroidal estrogenic fusariotoxin which is produced by *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* in grains, mainly corn and wheat (Kuiper-Goodman et al. 1987). ZEA is one of the most concern for public health and important in relations to food and feed. It is mostly metabolized in liver and intestinal mucosa by 3 α , β -hydroxy-steroid dehydrogenase to α -zearalenol and β -zearalenol (Olsen 1989). Numerous animal studies in several species (rodents, pigs and monkeys) have indicated that ZEA and its derivatives have strong estrogenic and anabolic activities being able to cause alteration in the reproductive tract (Fitzpatrick et al. 1989). It has specifically been associated with field cases of hyperoestrogenism in pigs, which, presents a great problem in breeding and rearing of animals. (Zielonka et al. 2009). In addition, high concentration of ZEA in feeds of gilts have been associated with swelling of the vulva, vaginal prolapse, enlargement of the uterus, enlargement of the mammary gland, infertility, embryonic death and reduced litter size (Agag, 2004).

Swine are quite sensitive to ZEA toxicity; and anoestrus, nymphomania, and reduced litter size in sexually mature may be caused by the consumption of diet contaminated with this toxin (Diekman and Long 1986). Reproductive problems associated with dietary ZEA have also been observed in cattle and sheep (El-Nezami et al. 2002). Modern works showed that ZEA also has carcinogenic (Minervini et al. 2001), haematotoxic and hepatotoxic (Maaroufi et al. 1996, Conkova et al. 2001), mutagenic (Ghedira-Chekir et al. 1999) and genotoxic (Pfhol-Leszkowicz et al. 1995) properties. Clinical signs are dependent on factors such as type and concentration of ZEA, the duration of exposure, and the species, gender, age, and health status of the animal. ZEA has been administrated to animal models by pulse dose injection (i.v or i.p) in most of these studies. However, the oral dose is the most important and the knowledge about the chronic toxic dietary dose of ZEA is also important to improve new strategies to diminish the animal impact of mycotoxins in feed.

The aim of present study was to investigate the deleterious dose response of dietary ZEA on growth, reproductive tract and behaviour, internal organs weight, and serum biochemistry in weaning rats as an animal model.

6.2 Materials and Methods

6.2.1. Chemicals and feed contamination.

Pure crystalline Zearalenone (Sigma-Aldrich Chimie S.A.R.L France) was incorporated into the diets by dissolving ZEA in absolute ethanol (w/vol) followed by mixing the solution with appropriate quantities of ground commercial feed. The contaminated feed was left overnight at room temperature for the solvent to evaporate and was then mixed into basal diet to provide the desired levels of mg ZEA/kg feed. The diet containing ZEA was analyzed by HPLC to ensure the ZEA concentrations in the experimentally contaminated diets.

6.2.2. Animals and Treatments

The experiment was performed at the Animal Facility Research Centre of the Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) and it was conducted according to the guidelines for animal experimentation of UAB and approved by the Ethical Committee.

Sixty weaning (21 day-old) Sprague Dawley female rats (60 ± 1.3 g, initial body weight) were randomly allocated to five groups of 4 replicate cages, containing 3 rats. Rats were fed with the following treatments for 4 weeks: 0, 0.5, 0.9, 1.8 and 3.6 mg ZEA /kg feed. Rats were housed in wire cages with filter tops at 24 °C of temperature, 55-60 % of humidity and a 12 h light/12 h dark cycle. Throughout the studies rats were fed the Standard Certified Rodent Chow diets (SAFE-Scientific Animal Food Engineering-France) and water *ad libitum*.

6.2.3. Experimental procedures

Body weight gain individually, feed intake and feed: gain ratio per cage was recorded weekly. Timing of vaginal opening was recorded daily and in all animals, vaginal impedance was monitored daily from the day of vaginal opening to the end of experiment by examination of vaginal smears to determine the time of oestrus cycle. Electric impedance of the vaginal mucous membrane was measured following the method described by Bartas (1977). Animals were killed after 2 days of oestrus in the interval of 43-50 day of age to exclude the effects of oestrus on the weight of reproduction organs including uterus and ovaries and the concentration of follicle stimulating hormone (FSH). After ketamina-xilacina (80 mg/kg) anesthesia, the blood samples were collected from 8 animals from each treatment via heart for hematological and serum biochemical determination. Blood samples were placed on ice during collection. Within 1 h, the serum was obtained by centrifugation ($2,500 \times g$ for 15 min) and stored at -80°C until further analysis. Animals were euthanased by an overload of sodic pentobarbital. Liver, kidneys, spleen, gastro intestinal tract, small intestine and urinary bladder and the reproductive tract, including the uterus (cervix and corpus uteri) and the ovaries, were dissected and weighed.

6.2.4. Biochemical Analysis

Serum biochemical parameters were measured by using Olympus System Reagents (Olympus, Clare, Ireland) and an automatic clinical chemistry analyzer (Olympus AU 400, Hamburg, Germany). The concentration of total protein (TP) was measured by following the Biuret method; uric acid (UA) by following the uricase method; the enzymatic activities of alkaline phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (AST, without pyridoxal phosphate addition), and γ -glutamyltransferase by using the recommended International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine reference methods. The follicle stimulating hormone (FSH) concentration was performed by RIA.

6.2.5. Statistical analysis

Data were analysed by using the General Linear Models (GLM) Procedure of SAS software (SAS Institute, 1996). Tukey's test was used for multiple comparisons. All statements of significance were based on probability $P < 0.05$.

6.3 results

Data presented in Table 6.1 showed the average values of daily feed intake, body weight gain and feed: gain ratio of weaning rats. Daily feed intake was significantly reduced by feeding of two levels (0.9 and 3.6 mg/kg feed) of ZEA contamination ($P < 0.05$). In addition, at 1.8 mg of ZEA in diet significantly increased daily body weight gain and improved feed: gain ratio as compared to control group ($P < 0.05$).

Table 6.1 Growth performance parameters of weaning female rats receiving diets containing increasing amounts of ZEA toxin.

Measurements	ZEA treatment (mg/kg feed)					SE	P
	Control	0.5	0.9	1.8	3.6		
Age, day	48.4	48.1	48.2	48.4	48.7	0.36	0.81
Daily feed intake, g	15.23 ^a	15.04 ^{ab}	14.77 ^b	14.99 ^{ab}	14.82 ^b	0.09	0.0078
Daily weight gain, g	1.64 ^b	1.67 ^{ab}	1.66 ^{ab}	1.72 ^a	1.66 ^{ab}	0.01	0.018
Feed:gain ratio	9.30 ^a	9.02 ^{ab}	8.88 ^{ab}	8.73 ^b	8.91 ^{ab}	0.11	0.012

^{ab} Means in row with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$).

SE: Pooled standard error of the mean

The control rats exhibited a regular inter-oestrus interval of 3.6 days, while ZEA treated groups showed inter-oestrus intervals of 4.2, 5.9, 3.7 and 4.7 days for 0.5, 0.9, 1.8 and 3.6 mg ZEA/kg, respectively. Timing of vaginal opening (between 36.3 to 36.9 days) was not affected by increasing the dietary concentration of ZEA ($P > 0.05$).

The weights of liver, kidney, spleen, uterus, ovaries and intestinal tract are shown in Table 6.2. Liver, kidney, spleen and ovaries weights were not affected by treatments ($P < 0.05$). However, uterus weight was significantly increased by the

increasing levels of ZEA in diet ($P<0.001$), as well as intestinal tract weight was significantly higher in group fed at 3.6 mg ZEA/kg feed than control group ($P<0.05$).

Table 6.2. The effects of increasing dietary ZEA concentrations on weight of reproductive tract and other internal organs

Measurements	ZEA treatment (mg/kg feed)					SE	P
	Control	0.5	0.9	1.8	3.6		
Uterus weight, g	0.24 ^b	0.30 ^{ab}	0.29 ^{ab}	0.32 ^a	0.33 ^a	0.02	0.01
Ovaries weight, g	0.11	0.13	0.13	0.14	0.13	0.007	0.29
Intestinal weight, g	14.84 ^a	15.01 ^a	15.50 ^{ab}	16.08 ^{ab}	16.65 ^b	0.52	0.11
Liver weight, g	8.55	8.52	8.86	8.83	8.73	0.36	0.94
Kidney weight, g	1.65	1.82	1.65	1.67	1.64	0.10	0.66
Spleen weight, g	0.52	0.57	0.55	0.51	0.54	0.02	0.14

^{ab} Means in row with different superscripts differ significantly ($P<0.05$).
SE: Pooled standard error of the mean

Serum biochemical parameters are given Table 6.3. All ZEA levels in diet significantly increased the serum bilirubin concentration ($P<0.05$). In addition, serum uric acid concentration was significantly decreased in the group that received the highest level of ZEA (3.6 mg ZEA/kg feed) compared to control ($P<0.05$). However, serum ALP, AST and ALT activities, total protein and FSH concentrations were not affected by dietary treatments ($P>0.05$).

Table 6.3 Serum biochemical variables of weaning female rats fed with diets containing increasing amounts of ZEA toxin.

Measurements	ZEA Treatments (mg/kg feed)						SE	P
	Control	0.5	0.9	1.8	3.6			
AST (IU/L)	86.0	78.4	78.7	81.5	75.0	2.97	0.14	
ALT (IU/L)	37.3	34.7	34.1	37.1	38.5	2.4	0.64	
ALP (IU/L)	343.4	357.2	320.3	328.1	353.2	22.2	0.72	
Total protein (g/dL)	6.08	5.92	5.99	6.21	5.91	0.08	0.082	
Uric acid (mg/dL)	26.5 ^a	20.8 ^{ab}	21.7 ^{ab}	24.9 ^{ab}	20.5 ^b	1.49	0.0234	
Bilirubin (mg/dL)	0.10 ^b	0.13 ^a	0.13 ^a	0.14 ^a	0.13 ^a	0.006	0.0008	
FSH (ng/ml)	5.63	3.85	5.19	5.58	6.53	0.66	0.108	

^{ab} Means in row with different superscripts differ significantly (P<0.05). AST: aspartat aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase, ALP: alkaline phosphatase, FSH: follicle stimulating hormone
SE: Pooled standard error of the mean

6.4 Discussion

The administration of diets with increasing amounts of ZEA to growing rats promoted a significant reduction on feed intake, which could suggest an effect on the palatability of feed or on the digestive tract physiology. The relationship between dietary ZEA-concentration and depression in feed intake in rats has been previously reported (Kaliyamurthy et al. 1997). On the contrary, an increase on the daily body weight of the animals fed with increasing amounts of ZEA was also observed in our experiment. These results are in accordance with a study in mice (Nikaido et al. 2004) and could suggest an increase on the growth efficiency. Similar effects have been described on the feed intake and body weight gain in pigs fed on *Fusarium* toxins (Swamy et al. 2003). In humans, Massart et al (2008) have also suggested a relationship between environmental mycoestrogen exposure and the development of precocious puberty in females. The authors found that young girls who were mycotoxin-positive had a higher growth rate and bone age than patients who were mycotoxin-negative. It is known that

ZEA is mostly metabolized in liver and intestinal mucosa to α - and β -zearalenol and zearalanol (Olsen 1989). Both, ZEA metabolites have been referred limited or no-binding to carrier proteins, allowing their easier access to estrogen target sites and a higher estrogen activity (Leffers et al., 2001). Alpha-zearalanol, a resorcylic lactone derived from ZEA (Olsen, 1989), has been widely used as a growth promoter in the United States since 1969 to improve fattening rates in cattle (Apple et al., 1991). However, its application was banned in the European Union since 1985. Interestingly, our results showed that increasing the ZEA concentration in the diets resulted in a linear increase in the weight of intestinal tract, likely reflecting an increase on the empty intestinal weight or the amount of digesta retained in the gastrointestinal tract. It could be speculated if a change on the transit time of digesta in the gastrointestinal tract could have a role on the feed intake reduction.

The most remarkable effect of ZEA in the present study was the increase on the uterus weight, as previously described (Bursian et al. 1992, Ito and Ohtsubo 1994, Yamini et al. 1997). The fact that the low level of ZEA increased also uterus weight suggests that this organ may be more sensitive to the toxicity of ZEA than others organs including brain, liver and kidney (Turcotte et al. 2005). ZEA has been mainly characterized by their estrogenic properties in a number of species (Etienne and Dourmand 1994, Doll et al. 2005). Most of the effects have been observed on peripheral reproductive organs especially uterus and ovaries (Fitzpatrick et al. 1989). Although the effects of ZEA as well as for other mycotoxins are especially remarkable in pigs (Eriksen and Petterson 2004), the same estrogenic receptors for the toxin in male and female rats have been also referred (Powell-Jones et al. 1981). Our results on the present paper confirm the effects of ZEA on the reproductive organs of weaning rats, especially by promoting an estrogenic response (Kiessling 1982, Ito and Ohtsubo 1994,, Perez-Martinez et al. 1996, Yuri et al. 2004). In rats, the reproductive consequences of ZEA exposure include decreased fertility, resorption or deformities of foetuses, and abortion at high dietary concentrations (Kuiper-Goodman et al. 1987). Even at low concentrations, ZEA can elicit changes in the male reproductive system (Doll et al.

2005). The mechanism proposed suggests a bind of ZEA to estrogens receptors in vitro with similar affinity for both forms of estrogen receptor, ER α and ER β (Kuiper et al. 1998).

Timing of vaginal opening is an external signal of sexual development in female rats and has been used as a biomarker of pubertal onset (Marty et al. 1999). Nikaido et al. (2004) referred an earlier vaginal opening and persistent oestrus simultaneous to structural changes on the ovary in neonatal prepuce rodents feed on dietary ZEA. In our study, supplementation with increasing amounts of ZEA up to 3.6 mg/kg feed did not promoted changes on the vaginal opening but enlarged the time of oestrus cycle. In other mice experiments, the effects of ZEA on the vaginal opening were dependent on the age and way of administration (Ito and Ohtsubo 1994). When ZEA (30 μ g/animal) were administered to neonatal (1 to 5 days) animals in daily pulse doses, a tendency to a delayed vaginal opening was observed; but a pulse dose at 10 days of age promoted an earlier opening. The reason could be related with the fate and kinetics of the toxin in the animals, and the competitive binding to the reproductive receptors (Powell-Jones et al. 1981). The way, time and the administrated dose of ZEA may be also reasons for such discrepancy (El-Makawy et al. 2001).

Results from our experiments observed that the enzyme activities of ALP, ALT and AST were not affected by dietary treatments. These findings are in contrast to those that reported a significant increase in the activities of these enzymes, as an index of oxidative stress on liver function after a single i.p. administration by ZEA (Maaroufi et al 1996). Similarly, Minervini et al. (2001) reported that a pulse dose of 1.5 and 6 mg ZEA/kg b.w. causes toxic effects on the reproductive tract and liver. As suggests above these differences between studies could be explained by the differences on the way of ZEA administration and the level of toxin and the age of the animals.

6.5 Conclusion

In conclusion, our results indicated that dietary ZEA at concentrations 1.8 mg/kg increased the weight gain of weaning rats, which were mainly explained by significant increases of the gastrointestinal and uterus weight. However, more research is required to confirm the results in other animal species more sensitive to ZEA, especially in pigs.

6.6 Acknowledgments

This work was supported by the financial support of ADIVETER SL, Reus, Tarragona. Spain.

6.7 References

- Agag, B. I., 2004. Mycotoxins in foods and feeds 3-zearalenone. Ass. Univ. Bull. Environ. Res. Vol:7 No:2. October 2004.
- Apple, J.K., Dikeman, M.E., Simms, D.D., Kuhl, G., 1991. Effects of synthetic hormone implants, singularly or in combinations, on performance, carcass traits, and longissimus muscle palatability of Holstein steers. J Anim Sci 69: 4437-4448.
- Bartas, L., 1977. Vaginal impedance measurement used for mating in the rat. Lab. Anim. 11: 53-55.
- Bursian, S.J., Aulerich, R.J., Cameron, J.K., 1992. Efficacy of hydrated sodium calcium aluminosilicate in reducing the toxicity of dietary zearalenone to mink. J. Appl. Toxicol. 12 (2): 85-90.
- Conkova, E., Laciakova, A., Pastorova, B., Seidel, H., Kovac, G., 2001. The effect of zearalenone on some enzymatic parameters in rabbits. Toxicol. Lett. 121 (3):145-149.

- Diekman, M.A., Long, G.G., 1986. Detrimental action of zearalenone on early-pregnancy in swine. *Journal of Toxicology-Toxin Reviews*. 5(2): 261.
- Doll, S., Gericke, S., Danicke, S., Raila, J., Ueberschar, K.H., Valenta, H., Schnurrbusch, U., Schweigert, F.J., Flachowsky, G., 2005. The efficacy of a modified aluminosilicate as a detoxifying agent in *Fusarium* toxin contaminated maize containing diets for piglets. *J. Anim. Phy. Anim. Nutr.* 89 (9-10): 342-58.
- El-Makawy, A., Hassanane, M.S., Abd-Alla, E.S.A., 2001. Genotoxic evaluation for the estrogenic mycotoxin zearalenone. *Reprod. Nutr. Dev.* 2001; (41): 79-89.
- El-Nezami, H., Polychronaki, N., Salminen, S., Mykkanen, H., 2002. Binding rather than metabolism may explain the interaction of two foodgrade *Lactobacillus* strains with zearalenone and its derivative α -zearalenol. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3545-49.
- Eriksen, G.S., Petterson, H., 2004. Toxicological evaluation of trichothecene in animal feed. *Anim. Feed Sci. Technol.* 114: 205-239.
- Etienne, M., Dourmand, J.Y., 1994. Effects of Zearalenone or glucosinolates in the diet on reproduction in sows: a review. *Livest. Prod. Sci.* 40: 99-113.
- Fitzpatrick, D.W., Picken, C.A., Murphy, L.C., Buhr, M.M., 1989. Measurement of the relative binding affinity of zearalenone α -zearalenol and β -zearalenol for uterine and oviduct estrogen receptors in swine, rats and chickens; an indicator of estrogenic potencies. *Comp. Biochem. Physiol.* 94: 691-94.
- Ghedira-Chekir, L., Maaroufi, K., Creppy, E.E., Bacha, H., 1999. Cytotoxicity and genotoxicity of zearalenone: prevention by vitamin E. *J. Toxicol. Toxin Rev.* 18: 355-68.
- Ito, Y., Ohtsubo, K., 1994. Effects of neonatal administration of zearalenone on the reproductive physiology of female mice. *J. Vet. Med. Sci.* 56: 1155-59.

- Kaliamurthy, J., Geraldine, P., Thomas. P.A., 1997. Effects of zearalenone on food consumption, growth rate, organ weight and serum testosterone level in male rats. *J. Environ. Biol* 2: 115-20.
- Kiessling, K.H., 1982. The effect of zearalenone on growth-rate, organ weight and muscle-fiber composition in growing-rats. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 51 (2): 154-158.
- Kuiper-Goodman, T., Scott, P.M., Watanabe, H., 1987. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regul. Toxicol Pharmacol.* 7: 253–306.
- Kuiper, G.G., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S.H., Vandersaag, P.T., VanderBurg, P., Gustafsson, J.A., 1998. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 139: 4252– 63.
- Leffers, H., Naesby, M., Vendelbo, B., Skakkebaek, N.E., Jorgensen, M., 2001. Oestrogenic potencies of Zeranone, oestradiol, diethylstilboestrol, Bisphenol-A and genistein: implications for exposure assessment of potential endocrine disrupters. *Hum Reprod* 16. 1037-1045.
- Maaroufi, K., Chekir, L., Creppy, E.E., 1996. Zearalenone induces modifications of haematological and biochemical parameters in rats. *Toxicol* 34 (5): 535-40.
- Marty, M.S., Crissman, J.W., Carney, E.W., 1999. Evaluation of the EDSTAC female pubertal assay in CD rats using 17 beta-estradiol, steroid biosynthesis inhibitors, and a thyroid inhibitor. *Toxicol. Sci.* 52 (2): 269-277.
- Massart, F., Meucci, V., Saggese, G., Soldani, G., 2008. High growth rate of girls with precocious puberty exposed to estrogenic mycotoxins. *J. Pediatr.* 152 (5): 690-695.
- Minervini, F., Dell'Aquila, M.E., Maritato, F., Minoia, P., Visconti, A., 2001. Toxic effects of the mycotoxin zearalenone and its derivatives on in vitro maturation of bovine

- oocytes and 17 beta-estradiol levels in mural granulosa cell cultures. *Toxicology in Vitro* 15 (4-5): 489-95.
- Nikaido, Y., Yoshizawa, K., Danbara, N., Tsujita-Kyutoku, M., Yuri, T., Uehara, N., Tsubara, A., 2004. Effects of maternal xenoestrogen exposure on development the reproductive tract and mammary gland in female CD-1 mouse offspring. *Reprod. Toxicol* 18: 803-811.
- Olsen M., 1989. Metabolism of zearalenone in farm animals. In: Chelkowski, J. (Ed.), *Fusarium: Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity*. Amsterdam, Elsevier 167–77.
- Perez-Martinez, C., Garcia-Iglesias, M.J., Ferreras-Estrada, M.C., Bravo-Moral, A.M., Espinosa-Alvarez, J., Escudero-Diez, A., 1996. Effects of in-utero exposure to zearanol or diethylstilboestrol on morphological development of the fetal testis in mice. *J. Comp. Path.* 114: 407-418.
- Pfhol-Leszkowicz, A., Chekir-Ghedira, L., Bacha, H., 1995. Genotoxicity of zearalenone, an estrogenic mycotoxin: DNA adduct formation in female mouse tissues. *Carcinogenesis*. 16: 2315–20.
- Powell-Jones, W., Raeford, S., Lucier, G.W., 1981. Binding properties of zearalenone mycotoxins to hepatic estrogen receptors. *Molecular Pharmacology*. 20: 35-42.
- Rainey, M.R., Tubbs, R.C., Hardin, D.K., Cox, N.M., Drawer, P.O., 1991. Clinical Manifestations of Prepubertal Exposure to Zearalenone in Gilts. *Agri-Practice*. 12 (1): 35-
- Swamy, H.V.L.N., Smith, T.K., MacDonald, E.J., Karrow, N.A., Woodward, B., Boermans, H.J., 2003. Effects of feeding a blend of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on growth and immunological measurements of starter pigs, and the efficacy of a polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent. *J. Anim.Sci.* 81 (11): 2792-2803.

- Turcotte, J.C., Hunt, P.J.D., Blaustein, J.D., 2005. Estrogenic effects of zearalenone on the expression of progesterin receptors and sexual behavior in female rats *Horm. Behav.* 47 (2): 178-84.
- Yamini, B., Bursian, S.J., Aulerich, R.J., 1997. Pathological effects of dietary zearalenone and/or tamoxifen on female mink. *Vet. Hum. Toxicol* 39 (2): 74-78.
- Yuri, T., Nikaido, Y., Shimano, N., Uehara, N., Shikata, N., Tsubura, A., 2004., Effects of prepubertal zearalenone exposure on estrogen target organs and N-Methyl-N-nitrosourea-induced mammary tumorigenesis in female sprague-Dawley rats. *In Vivo*. 18: 755-762.
- Zielonka, L., Grzegorz, G., Kazimierz, O., Magdalena, G., Ewa, J., and Maciej, G., 2009. Histopathology of selected organs of the reproductive tract of pigs supplied with feed containing zearalenone destroyer. *Bull Vet Inst Pulawy* 53, 411-414.

CAPITULO 7

Efficacy of AdiDetox in Reducing the Toxicity of Zearalenone in Rats and Piglets

Abstract

Two experiments were conducted to evaluate the efficacy of a new mycotoxin inactivator (AdiDetox) in reducing the toxic effects of Zearalenone (ZEA) in the diet of rats and piglets. In the first experiment, ninety Sprague Dawley female weanling rats (45 ± 1.0 g BW) were fed six experimental diets, containing either 0 or 6 mg ZEA/kg feed, and 0, 1 and 5 g AdiDetox /kg feed for 28 days. Zearalenone did not alter the growth of the animals, the relative weight of liver and kidneys, or the timing of vaginal opening ($P>0.05$). However, ZEA (6 mg/kg) increased significantly the relative weight of uterus, ovaries, and spleen, and decreased the serum activities of alkaline phosphatase (ALP) and aspartate aminotransferase (AST) as compared to the Control group ($P<0.05$). Supplementation of AdiDetox reduced the toxic effects of ZEA on the uterus and ovaries weight. In the second experiment, sixty-four female piglets [(Large White x Landrace) x Pietrain] with initial body weight of 14.9 ± 1.65 kg were fed 8 experimental diets containing either 0 or 0.8 mg ZEA/kg, and 0, 1, 2 and 5 g AdiDetox/kg feed for 26 days in a 2 x 4 factorial design. ZEA contamination increased ($P<0.05$) the relative weight of uterus and ovaries, but did not modify the serum biochemical variables, nor the relative weight of liver, spleen, and kidneys ($P>0.05$). The addition of 5 g AdiDetox/kg to the contaminated feed reduced the toxic effects of ZEA on the uterus and ovaries weight. Significant amounts of ZEA ($10.5 \mu\text{g}/\text{kg}$) and α -zearalenol ($5.6 \mu\text{g}/\text{kg}$) residues were detected in the bile of piglets fed the ZEA treatment. Supplementation of AdiDetox (2 g/kg) to the diet contaminated with ZEA significantly reduced the Zearalenone content in bile ($2.3 \mu\text{g}/\text{kg}$, $P<0.01$).

In conclusion, results of our studies indicated that chronic consumption of ZEA-contaminated diet may cause alteration in the reproductive tract in rats and piglets, and the presence of ZEA residue in bile in piglets. These effects may be diminished by the addition of AdiDetox in the diet.

7.1. Introduction

Zearalenone (ZEA) is a non-steroidal estrogenic mycotoxin, produced by *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* in cereals, mainly corn and wheat (Kuiper-Goodman et al., 1987; Abid-Essefi et al., 2003). After its consumption with the diet, ZEA is mostly metabolized to α -zearalenol and β -zearalenol in the liver and intestinal mucosa, and have a strong estrogenic and anabolic action in the reproductive tract (Fitzpatrick et al., 1989). Other works have also showed that ZEA has haematotoxic, hepatotoxic (Maaroufi et al., 1996, Conkova et al., 2001) and immunotoxicological effects (Zinedine et al., 2007), as well as carcinogenic, mutagenic and genotoxic properties (Minervini et al., 2001, Chekir et al., 1999, Pfohl-Leszkowicz et al., 1995). While rodents are considered the animals which are more resistant to mycotoxins, swine is considered one of the most sensitive species to ZEA-toxicity and the most frequently affected. Main described symptoms in swine are anoestrus and reduced litter size in sows (Diekman et al., 1986) and swine hyperoestrogenism (Rainey et al., 1991), oedema of the vagina, mammary gland enlargement, swelling and reddening of the vulva in gilts (Dacasto et al., 1995).

Legal requirements imply the avoidance of mycotoxins in the food productive chain, and for this purpose, mycotoxin are routinely analysed in the cereal batches coming into the feed mill. However, some mycotoxins, which are located in concrete areas of the batch, are usually not detected and feed contamination may be identified when mycotoxicosis is already detected in the animals. In the other hand, detoxification of ZEA contaminated grain is difficult and, at present, there are no practical commercial treatments that effectively destroy ZEA (Avantaggiato et al., 2003). The most realistic way to prevent mycotoxicosis in animals involves the addition to the diet of additives that inactivate the mycotoxin by binding it in the gastrointestinal tract, which decreases toxin bioavailability, and therefore, its associated toxicity (Ramos et al., 1996; Visconti and Pascale 1998). There are several products on the market that claims for unspecific mycotoxin or *Fusarium* toxins adsorbent properties (Doll et al., 2005). For this purpose,

alfalfa, activated charcoal, cholestyramine, bentonite, hydrated sodium calcium aluminosilicate, and yeast cultures have been tested regarding to the adsorption of ZEA in the gastrointestinal tract (Ramos et al., 1996; James and Smith, 1982; Bursian et al., 1992; Underhill et al., 1995; Afriyie-Gyawu et al., 2005). However, many of these products have not proven satisfactory results *in vivo* experiments (Avantaggiato et al., 2003).

Other products such as sodium carbonate have been proven to capture ZEA with satisfactory results *in vitro* and *in vivo* (Polak et al., 2009). Similarly, we can find studies on the effect of mixtures of adsorbents (Avantaggiato et al., 2007) at *in vitro* but not replicate in animals.

AdiDetox is a new adsorbent resulting from the modification and activation of a diatomaceous earth, which is a natural material extracted from a quarry with a maximum of 70% silicium dioxide. The objectives of the current studies were to investigate the *in vivo* efficacy of this mycotoxin inactivator (AdiDetox) in preventing the effects of chronic consumption ZEA-contaminated diets on the growth performance, organ weights, reproductive traits, residuals, and serum biochemistry in weaning rats and piglets.

7.2 Materials and methods

The experiments were performed at the Animal Facility Research Centre of the Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) and received prior approval from the Animal Protocol Review Committee of this institution. The treatment, management, housing, husbandry and slaughtering conditions conformed to the European Union Guidelines.

7.2.1. Chemicals and feed contamination

Pure crystalline ZEA (Sigma-Aldrich Chimie S.a.r.l France) was dissolved in absolute ethanol (1 mg/mL) and the solution was sprayed out on 100 g of the ground control diets. The treated feed was left overnight at room temperature for the solvent to

evaporate and was then mixed into the basal diet to provide the desired levels of ZEA/kg feed.

7.2.2. Animals and Experimental Procedures

7.2.2.1. Rat Experiment

Ninety, 21 days-old Sprague Dawley female rats (45 ± 1.0 g BW) were randomly divided into six experimental groups (5 cages per group, 3 rats per cage). The six experimental treatments resulted from a 2 x 3 factorial arrangement with two levels of ZEA (0 and 6 mg of ZEA/kg feed) and three levels of mycotoxin inactivator AdiDetox (0, 1 and 5 g AdiDetox/kg feed). Experimental diets were prepared with a Standard Certified Rodent Chow diet (SAFE-Scientific Animal Food Engineering- France) and offered *ad libitum*. Rats were housed for 28 days in wire cages with filter tops at 24 °C of temperature, 55-60 % of humidity and a 12 h light/12 h dark cycle. Individual average daily gain (ADG), and the daily feed intake (FI) and feed conversion rate per cage (FCR) were determined weekly. Timing of vaginal opening was daily registered from day 21 to the end of the experiment. Vaginal impedance was monitored daily to determine the time of oestrus cycle from the day of vaginal opening to the end of experiment. Electric impedance of the vaginal mucous membrane was measured following the method described by Bartas (1977). Animals were sacrificed after 2 days of oestrus in the interval of 46-52 day of age to exclude the effects of oestrus on the weight of the reproductive organs and the concentration of follicle stimulating hormone (FSH). After ketamine-xylacine (80 mg/kg) anesthesia, blood samples were collected from 8 animals in each treatment by heart puncture for the hematological and biochemical study. Within one hour from collection, serum samples were separated from blood by centrifugation at 2500 x g at 4°C for 15 minutes and, subsequently stored at -80°C until the biochemical analysis. Finally, animals were laid to death by an overload of sodic pentobarbital, and the organs (liver, kidneys, spleen, and the reproductive tract) were dissected and weighed. Data were expressed as relative organ weight (grams of organ per 100 g of body weight).

7.2.2.2. Piglet Experiment

A total of 64 female 50 days old piglets [(Large White x Landrace) x Pietrain] with an initial body weight of 14.9 ± 1.65 kg were randomly divided into 8 treatments (4 pens/treatment; 2 piglets/pen). The eight experimental treatments resulted from a 2 x 4 factorial arrangement with two levels of ZEA (0 and 0.8 mg of ZEA/kg feed) and four levels of AdiDetox (0, 1, 2 and 5 g AdiDetox/kg feed). Diets were isoenergetic and isonitrogenous (Table 7.1) and formulated to satisfy the nutrient requirement standards for pigs (BSAS, 2003). Each pen had a feeder and a water nipple to ensure *ad libitum* feeding and free water access for 26 days. ADG, FI and FCR were registered at the end of the experiment. On the last day of the experiment, blood samples were collected from all animals in each treatment. Within one hour from collection the serum was separated from blood by centrifugation at 2500 x g at 4 °C for 15 minutes and stored at -80°C until biochemical analysis. Finally, the animals were euthanized with an intravenous injection of sodium pentobarbital (200 mg/kg BW), bled, and the uterus, ovaries, kidney, liver, and spleen were dissected and weighed. Data were expressed as relative organ weight (grams of organ per 100 g of body weight). Samples of liver and bile fluid were also collected and stored at -20°C for the analysis of ZEA and α -zearalenol.

Table 7.1. Ingredients (g/kg) and analyzed chemical composition of the experimental piglet diet (as fed basis- BSAS,2003)

Ingredients	(%)
Corn	35.00
Wheat	32.50
Soybean meal 48	16.00
Whey	8.40
Whey superfatting	4.00
PO ₄ HCa	1.22
Ca carbonate	1.02
CLH-Lysine	0.45
L-Threonin	0.21

DL-Methionin	0.18
L-Tryptophan	0.04
CholineCl	0.10
Salt	0.38
Vitamin premix	0.50
Total	100
Calculated nutrients and energy (as -is basis)	
Crude protein (g/kg)	180
ME (Kcal/kg)	3300
Ca (g/kg)	7.5
Available P (g/kg)	3.6

7.2.3. Analytical procedures

Chemical analyses of the diets were performed according to the Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1995) standard procedures. Control and ZEA diets were analyzed by HPLC to ensure the ZEA concentration in the pig diets (0.05 and 0.8 mg ZEA/kg in the Control and ZEA diets). Serum biochemical parameters were measured by using OSR reagents (Olympus System Reagents, Olympus, Irlanda) and an automatic clinical chemistry analyzer (Olympus AU 400, Hamburg, Germany). The concentration of total protein (TP) was measured by following the Biuret method; uric acid (UA), the uricase method; and the enzymatic activities of alkaline phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (AST, without pyridoxal phosphate addition) and γ -glutamyltransferase (GGT) by using the recommended IFCC reference methods.. Serum FSH was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using a commercially available Rat FSH ELISA kit (# AE R004, BIOCOTE-HYCEL, 400 Liege, Belgium). The sensitivity of the applied assay was 0.5 ng/ml. The intra- and interassay coefficients of variation were 12.3 and 10.5 %, respectively.

Analysis of zearalenone and α -zearalenol residues were performed according liquid chromatography (LC) with fluorescence detection (Danicke et al., 2005).

7.2.4. Statistically analyses

Statistical analyses were performed with SAS for Windows version 8 (SAS Institute Inc., Cary, NC). Results of the parameters were analyzed by ANOVA analysis with the GLM procedure of SAS by using ZEA contamination, AdiDetox level and the interaction as factors. The alpha level used for determination of significance for all the analysis was 0.05. Differences between means were tested by Tukey's least significant difference when an interaction between ZEA and AdiDetox was significant. Data are presented as means and SEM.

7.3 RESULTS

7.3.1. Rat experiment

Daily feed intake (FI), weight gain (ADG), and feed conversion ratio (FCR) were not significantly affected by the ZEA contaminated or the AdiDetox diet ($P>0.05$), averaging 14.5 g/d for the FI, 1.83 g/d for the ADG and 7.98 for the FCR. The time of vaginal opening was not affected by treatments (Day 34.2, $P>0.05$).

The relative weight of uterus, ovaries, kidneys, spleen and liver are shown in Table 7.2. A significant interaction between ZEA and AdiDetox was observed in the relative weight of uterus and ovaries. Thus, rats fed on the ZEA treatment (6 mg of ZEA/kg feed; 0 g AdiDetox/kg feed) showed an increased relative weight of uterus, and ovaries ($P<0.05$). Moreover, 6 mg of ZEA/kg feed caused an increase in the relative weight of the spleen ($P<0.005$). The supplementation of AdiDetox (1 and 5 g/kg) to the ZEA-contaminated diets significantly counteracted this toxic effects.

Table 7.2 Effect of different levels of AdiDetox on relative weight of organs in weaned female rats exposed ZEA for 28 days¹

Treatments		Uterus (mg/kg BW)	Ovaries (mg/kg BW)	Spleen (g/kg BW)	Kidneys (g/kg BW)	Liver (g/kg BW)
ZEA (mg/kg)	AdiDetox (g/kg)					
0	0	0.111 ^{bc}	0.053 ^b	0.29	0.83	4.4
0	1	0.114 ^{bc}	0.056 ^b	0.30	0.85	4.5
0	5	0.105 ^c	0.052 ^b	0.30	0.83	4.5
6	0	0.172 ^a	0.077 ^a	0.36	0.91	4.6
6	1	0.137 ^b	0.062 ^b	0.34	0.91	4.6
6	5	0.135 ^b	0.056 ^b	0.33	0.88	4.5
SEM ²		0.006	0.002	0.012	0.026	0.90 3
<i>P-values for main effects</i>						
ZEA		**	**	**	NS	NS
AdiDetox		**	**	NS	NS	NS
Zea*AdiDetox		**	**	NS	NS	NS

^{a,b,c}Means within a column with common superscript differ statistically ($P < 0.05$).

¹Each value represents the least square mean from 15 rats per each treatment.

²Standard error of the means * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. NS; Not significant ($P > 0.05$)

The effects of dietary ZEA and AdiDetox on serum biochemistry are shown in Table 7.3. Serum concentrations of total protein, uric acid, total bilirubin and FSH, and the serum AST activity were not affected by dietary treatments ($P > 0.05$). Although not significantly, ZEA increased the mean FSH concentration in the serum from 5.64 to 6.63 ng/mL in the rats fed the Control and ZEA treatment (6 mg of ZEA/kg feed; 0 g AdiDetox/kg feed), respectively. The addition of AdiDetox to the contaminated diets tended to decrease the FSH concentration in the serum. Rats fed on the contaminated diets showed a decreased serum activities of ALP and ALT ($P < 0.05$). The supplementation of 5 g AdiDetox/kg feed to the contaminated diets significantly diminished the toxic effects of dietary ZEA on the activity of ALP.

Table 7.3 Effect of different levels of AdiDetox on serum biochemistry in weaned female rats exposed ZEA for 28 days¹

Treatments		AST (U/L)	ALP (U/L)	ALT (U/L)	Total protein (g/dL)	Uric acid (mg/dL)	Billirubin (mg/dL)	FSH (ng/mL)
ZEA (mg/kg)	AdiDetox (g/kg)							
0	0	76.0	509.1	42.8	5.8	21.8	0.14	5.64
0	1	78.0	522.6	42.0	5.7	23.2	0.14	5.67
0	5	82.8	512.9	47.0	5.7	25.3	0.13	5.15
6	0	68.4	413.8	32.4	5.6	18.5	0.14	6.63
6	1	76.2	421.4	42.0	5.7	20.5	0.14	4.65
6	5	77.6	508.4	38.2	5.7	19.7	0.14	5.34
SEM ²		6.828	38.33	2.624	0.066	1.756	0.005	0.464
<i>P-values for main effects</i>								
ZEA		NS	*	**	NS	NS	NS	NS
AdiDetox		NS	*	NS	NS	NS	NS	NS
Zea*AdiDetox		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

^{a,b}Means within a column with common superscript differ statistically ($P < 0.05$).

¹ Each value represents the least square mean from 8 rats per each treatment.

²Standard error of the means. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. NS; Not significant ($P > 0.05$).

7.3.2. Piglet experiment

Growth performance results were not significantly affected by the ZEA contamination or the AdiDetox incorporation ($P > 0.05$), averaging 1.26 kg/d for the daily feed intake, 0.69 kg/d for the ADG, and 1.83 kg feed/kg weight for the FCR.

The relative weight of uterus, ovaries, liver, spleen, and kidneys are presented in Table 7.4. The relative weight of liver, spleen, and kidneys were not significantly affected by the experimental treatments ($P > 0.05$). However, piglets fed on the ZEA contaminated diet significantly showed an increased relative weight of uterus and ovaries ($P < 0.05$). A significant interaction between ZEA and AdiDetox was observed in

the relative weight of uterus. The addition of AdiDetox (5 g/kg feed) to the contaminated diets significantly offset the toxic effects of ZEA in the relative weight of uterus to values not significantly different of the control diet. No significant changes were observed in the relative weight of uterus when AdiDetox was supplemented to the uncontaminated diets.

In Table 7.5, there are presented the serum biochemical parameters and the ZEA and α -zearalenol concentration in bile. Serum protein and bilirubin concentration and the activities of GLDH were not affected by dietary treatments ($P>0.05$). A significant interaction between ZEA and AdiDetox was observed in ALP activity ($P<0.05$). While consumption of ZEA-contaminated diet (0.8 mg ZEA/kg; 0 g AdiDetox /kg) increased the serum ALP activity, the AdiDetox supplementation to the ZEA contaminated diets at levels of 2 and 5g/kg feed restored its level to values no significant different of the Control group. Significant amounts of ZEA (10.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and α -zearalenol (5.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$) residues were detected in the bile of piglets fed the ZEA treatment, but not in those piglets fed the control or AdiDetox diets. Supplementation of AdiDetox to the diet contaminated with ZEA significantly reduced the Zearalenona content in bile (2.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, $P<0.01$). We didn't detect residues of zearalenona and α -zearalenol above our detection limit (20 and 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$) in the liver.

Table 7.4 Effect of different levels of AdiDetox on relative weight of organs in weaned piglets exposed ZEA for 26 days¹

Treatments		Uterus (mg/kg BW)	Ovaries (mg/kg BW)	Spleen (g/kg BW)	Kidneys (g/kg BW)	Liver (g/kg BW)
ZEA (mg/kg)	AdiDetox (g/kg)					
0	0	564.6 ^b	102.4	2.18	4.4	25.0
0	1	635.6 ^b	92.9	2.20	4.5	27.6
0	2	539.7 ^b	98.2	2.24	4.5	26.4
0	5	700.0 ^b	105.1	2.12	4.4	24.5
0.8	0	1230.4 ^a	155.9	2.36	4.3	25.8
0.8	1	1234.8 ^a	152.7	2.18	4.2	25.6
0.8	2	1261.4 ^a	167.6	2.36	4.3	24.6
0.8	5	898.5 ^{ab}	107.8	2.26	4.3	27.9
SEM ²		114.7	19.57	0.14	0.11	0.75
<i>P-values for main effects</i>						
ZEA		**	**	NS	NS	NS
AdiDetox		NS	NS	NS	NS	NS
Zea*AdiDetox		*	NS	NS	NS	NS

^{a,b}Means within line with different superscripts differ significantly (P<0.05)

¹Each value represents the least square mean from 8 piglets per each treatment.

²Standard error of the mean. *P<0.05, **P<0.0 . NS; Not significant (P>0.05)

Table 7.5. Effect of different levels of AdiDetox on serum biochemistry and the concentration of ZEA and α -zearalenol in bile fluid in weaned piglets exposed ZEA for 26 days¹

Treatments		TP (g/dL)	Total Billirubine (mg/dL)	GLDH (U/L)	ALP (U/L)	Zearalenona residues in bile (μ g/kg) ²	α -zearalenol residues in bile (μ g/kg) ³
ZEA (mg/kg)	AdiDetox (g/kg)						
0	0	6.27	0.11	0.98	217.3 ^b	ND	ND
0	1	6.01	0.12	0.73	204.7 ^b	ND	ND
0	2	6.17	0.11	0.96	223.0 ^{ab}	ND	ND
0	5	6.44	0.11	0.75	212.3 ^b	ND	ND
0.8	0	6.43	0.08	1.03	242.8 ^a	10.5 ^a	5.6
0.8	1	6.43	0.09	1.28	243.5 ^a	4.4 ^b	3.7
0.8	2	6.33	0.07	0.99	203.4 ^b	2.3 ^b	2.7
0.8	5	6.47	0.12	0.79	206.2 ^b	3.6 ^b	2.1
SEM ⁴		0.19	0.019	0.17	14.32	0.511	0.396

P-values for main effects

ZEA	NS	NS	NS	NS	**	**
AdiDetox	NS	NS	NS	NS	**	NS
Zea*AdiDetox	NS	NS	NS	*	**	NS

^{a,b}Means within line with different superscripts differ significantly (P<0.05)

¹Each value represents the least square mean from 8 piglets per each treatment.

²Data represent the means from treatment detected (detection limit of analytical method: 2 μ g/kg). Values obtained using the Zearalenona positive samples

³Data represent the means from treatment detected (detection limit of analytical method: 3 μ g/kg). Values obtained using the Zearalenona positive samples

Sem⁴; Standard error of the means *P<0.05, **P<0.01. NS; Not significant ND; Not detected

7.4. DISCUSSION

7.4.1. The effect of ZEA on young female rats and piglets

The results of our experiments showed that feed intake and the BW gain were not affected by the experimental treatments, either in rats fed ZEA-contaminated diet (6 mg/kg) for 28 days or in piglets fed the diet containing 0.8 mg ZEA/kg feed for 26 days. In contrast, Collins et al., (2006) reported that the feed intake and body weight gain were decreased in pregnant rats once treated daily with various levels of ZEA (1, 2, 4 and 8 mg/kg BW) by gavage. Similarly, James and Smith (1982) reported that feeding rats on a diet containing a high level of ZEA (250 mg ZEA/kg feed) for 14 days resulted in a significant reduction in feed intake and feed conversion rate of the animals. The differences among experiments could be due to differences on the ZEA doses respect to the BW of the animals. In both reported cases, the calculated ZEA daily levels were remarkable higher than those used in the present study.

Our results showed that ZEA contaminated diets increased the relative weight of the uterus (35.4 % in rats and 54.1 % in piglets) and the relative weight of the ovaries (31.1% in rats and 34.4 % in piglets) compared with the Control groups. These results are in agreement with previous studies (Ito and Ohtsubo, 1994; Doll et al., 2004, 2005; Tiemann and Danicke, 2007, and Fink-Gremmels and Malekinejad, 2007) and confirm the potential estrogenic effect of ZEA on the reproductive system of weaning female rats and piglets (Fitzpatrick et al., 1989). However, it is relevant that despite piglets consumed a lower dose of ZEA than rats, the response on the uterus weight was significantly higher, confirming the higher sensitivity of pigs to ZEA (Etienne and Dourmad, 1994; Döll et al., 2005).

Despite differences on the weight of the reproductive organs, no differences were detected on the timing of vaginal opening in rats fed a diet containing 6 mg ZEA/kg for 28 days. Timing of vaginal opening is an external sign of sexual development in female rats and has been used as a biomarker of pubertal onset (Marty et al., 1999).

There are reports in the literature which present contradictory results about the effect of ZEA in the time of vaginal opening. Nikaido et al., (2003) reported that prepubertal exposure to 10 mg ZEA/kg feed can cause earlier vaginal opening and persistent oestrus simultaneous to structural changes on the ovary in rats. Similarly, exposure to ZEA at 0.04 mg/kg BW caused earlier vaginal opening in mice (Hilakivi-Clarke et al., 1998). On other hand, Ito and Ohtsubo (1994) reported that the intraperitoneal injection of 10–30 µg ZEA into juvenile mice on days 1–3 or 1–5 after birth resulted in delayed vaginal opening. Differences between studies could be due to differences on the doses of toxin or the age of the animals.

We didn't observe any effect of dietary ZEA on the relative weight of liver and kidneys in both experiments. Similarly, Forsell et al., (1986) reported that the relative weight of liver and kidneys were not affected when weanling female mice were fed a diet containing 10 mg ZEA/kg for 8 weeks. In contrast, rats exposed to ZEA, but not piglets, showed a significant increase in the relative weight of the spleen. Results of Danicke et al., (2005) showed that the absolute and relative weights of the spleen were increased when gilts were fed diets containing from 4 to 358 µg ZEA/kg feed.

Little work has been reported on the effects of feeding ZEA on serum biochemical parameters. The present results show that feeding ZEA decreased the serum activities of ALP and ALT in weaning rats, which is in contrast with Maaroufi et al. (1996) who reported a significant increase in the activities of ALT, AST and ALP after a single i.p. administration of ZEA in rats. We didn't observe any significant variation on serum biochemical parameters in piglets with the ZEA-contamination except of the increases of ALP activity. Abbas et al.(2006) found that the consumption of ZEA significantly increased some biochemical serum parameters, decreased platelets and induced degenerative changes in liver and kidney tissue.

In the piglet study we detected ZEA and α -zearalenol residues in bile fluids but not in liver tissues. It has been described that there is a linear relationship between ZEA concentration in diets fed to piglets and the ZEA and its derivatives (α -zearalenol and β -

zearalenol) concentrations in the bile fluid and urine, through which the toxin is eliminated (Doll et al., 2003). Previous description of the carry-over of Fusarium toxins (deoxynivalenol and zearalenone) and its derivatives from naturally contaminated ingredients to the pig tissues, mainly bile fluids, liver, serum, kidney, muscle and urine has been also reported by Danicke et al. (2005) and Goyarts et al. (2007).

7.4.2. Effect of the adsorbent AdiDetox in contaminated diets

Detoxification strategies to reduce or eliminate the toxic effects of ZEA in contaminated feeds are difficult to achieve and at present there are no practical commercial treatments that effectively destroy ZEA. The most promising and economical approach for reducing mycotoxicosis in animal feeding is the utilization of adsorbents which bind mycotoxins efficiently in the gastro-intestinal tract and prevent their absorption (Dakovic et al., 2005). Recent studies have shown that the addition of aluminosilicates (HSCAS), bentonite or montmorillonite to mycotoxin-contaminated diets may reduce the bioavailability of some mycotoxins in the gastrointestinal tract, such as aflatoxins, ochratoxin A and T-2 toxin (Phillips, 1999; Abdel-Wahhab et al., 2002). Addition of nutritionally inert sorbents may also be considered as a valuable approach to reduce ZEA toxicity (Zinedine et al., 2007).

Our results showed that AdiDetox did not cause any adverse effects in rats and piglets and confirmed a potential protective role against the toxicity of ZEA. Main effects of the ZEA contamination were the increase on the weight of uterus and ovaries in both species. In both cases, AdiDetox was able to reduce the toxic effects of ZEA in these organs. Previous results on the evaluation of different adsorbent as inhibitors of ZEA contamination have presented contradictory results. Some authors have described that the addition of a hydrated sodium calcium aluminosilicate (HSCAS) alleviated some of the reproductive effects of ZEA in mink (Bursian et al., 1992), and the serum biochemical and haematological effects in mice (Abbes et al., 2006). Speranda et al. (2006) reported also that the addition of 2 g of zeolite clinoptilolite alleviated the toxic effects of ZEA (3 mg ZEA/kg) on haematological and biochemical parameters in weaned

piglets; and Underhill et al., (1995) reported that the addition of cholestyramine reduced the effects of ZEA in a prepuberal mouse uterine weight bioassay. In contrast, other authors reported that the inclusion of a modified aluminosilicate (Doll et al., 2005) or montmorillonite (Lemke et al., 2001) in the diet were not able to prevent the negative effects of dietary ZEA and DON toxins in female weaned piglets and mouse, respectively.

In our study, the concentrations of ZEA and its derivatives in the bile fluid was used as a specific indicator for ZEA absorption in the intestinal tract. Our results showed that supplementation of AdiDetox to the diet contaminated with ZEA significantly reduced the concentrations of ZEA in the bile fluid. This result confirmed the efficacy of AdiDetox to the toxicity of ZEA in piglets.

In conclusion, the present studies demonstrated that ZEA contaminated diet resulted in a significant increase in the relative weight of reproductive organs of rats and piglets. The results from both experiments confirmed a protective role of AdiDetox to the toxicity of ZEA.

7.5. REFERENCES

- Abbes, S. Z. Ouanes, J. ben Salah-Abbes, Z. Houas, R. Oueslati, H. Bacha, and O. Othman. 2006. The protective effect of hydrated sodium calcium aluminosilicate against haematological and pathological changes induced zearalenone in mice. *Toxicon* 47 (5): 567-574.
- Abdel-Wahhab, M.A., S.A. Nada, & F.A. Khalil. 2002. Physiological and toxicological responses in rats fed aflatoxins-contaminated diet with or without sorbent materials. *Anim. Feed Sci. Technol.* 97: 209–219.
- Abid-Essefi, S., I. Baudrimont, W. Hassen, Z. Ouanes, A.T. Mobio, R. Anane, E.E. Creppy, & H. Bacha. 2003. DNA fragmentation, apoptosis and cell cycle arrest

- induced by zearalenone in cultured DOK, Vero and Caco-2 cells: prevention by Vitamin E. *Toxicology* 192: 237–248.
- .Afriyie-Gyawu, E. M.C. Wiles, H.J. Huebner, M.R. Richardson, C. Fickey, & T.D. Phillips. 2005. Prevention of zearalenone-induced hyperestrogenism in prepubertal mice. *J. Toxicol. Env. Health.* 68 (5):353-368.
- Avantaggiato, G. R. Havenaar, & A. Visconti. 2003. Assessing the zearalenone-binding activity of adsorbent materials during passage through a dynamic in vitro gastrointestinal model. *Food Chem. Toxicol.* 41: 1283-1290.
- Avantaggiato G, Havenaar R, Visconti A. 2007. Assessment of the multi-mycotoxin-binding efficacy of a carbon/aluminosilicate-based product in an in vitro gastrointestinal model. *J Agric Food Chem.* 55(12):4810-9.
- AOAC International (1995). Official methods of analysis (16th ed., pp 31-32). Arlington, VA
- Bartas, L. 1977. Vaginal impedance measurement used for mating in the rat. *Lab. Anim.* 11: 53-55.
- BSAS (2003) Nutrient Requirements Standards for Pigs (Authors: C.T. Whittemore, M.J. Hazzledine and W.H. Close) BSAS, Penicuik, Midlothian, UK.
- Bursian, S. J. R.J. Aulerich, & J.K. Cameron 1992. Efficacy of Hydrated Sodium Calcium Aluminosilicate in Reducing the Toxicity of Dietary Zearalenone to Mink. *J. Appl.Toxicol.* 12 (2):85-90.
- Chekir, L.G. K. Maaroufi, E.E. Creppy, & H. Bacha. 1999. Cytotoxicity and genotoxicity of zearalenone: prevention by vitamin E. *J. Toxicol. Toxin Rev.* 18: 355–368.
- Collins, T.F.X., R.L. Sprando, T.N. Black, N. Olejnic, R.M. Eppley, H.Z. Alam, J. Rorie, & D.I. Ruggles. 2006. Effects of zearalenone on in utero development in rats. *Food and Chemical Toxicology* 44:1455–1465.
- Conkova, E. A. Laciakova, B. Pastorova, H. Seidel, & G. Kovac. 2001. The effect of zearalenone on some enzymatic parameters in rabbits. *Toxicol. Lett.* 121 (3):145-149.

- Dacasto, M. P. Rolando, C. Nachtmann, L. Ceppa, & C Nebbia, 1995. Zearalenone mycotoxicosis in piglets suckling sows fed contaminated grain. *Vet. Human Toxicol.* 37, 359-361.
- Dakovic, A. M. Tomasevic-Canovic, V. Dondur, G.E. Rottinghaus, V. Medakovic, & S. Zaric. 2005. Adsorption of mycotoxins by organozeolites. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces.* 46 (1): 20-25.
- Danicke S, K.P. Briissow, H. Valenta, K.H. Ueberschdr, U. Tiemann, M., Schollenberger. 2005. On the effects of graded levels of Fusarium toxin contaminated wheat in diets for gilts on feed intake, growth performance and metabolism of deoxynivalenol and zearalenone. *Mol. Nutr. Food Res.* 49; 932 – 943.
- Diekman, M.A. & G.G. Long 1986. Detrimental action of zearalenone on early-pregnancy in swine. *Journal of Toxicology-Toxin Reviews* 5(2):261. (Meeting abstract)
- Doll, S. S. Danicke, U. Schnurrbusch, 2003. The effect of increasing concentrations of Fusarium toxins in the diets of piglets on histological parameters of uterus. *Mycotox. Res.* 19: 73–76.
- Doll, S. S. Danicke, & U. Schnurrbusch. 2004. The effect of increasing concentrations of Fusarium toxins in piglet diets on histological parameters of the uterus and vagina. *Archives of Animal Nutrition.* 58 (5):413-417.
- Doll, S. S. Gericke S. Danicke, J. Raila, K.H. Ueberschar, H. Valenta, U. Schnurrbusch, F.J. Schweigert, G. Flachowsky. 2005. The efficacy of a modified aluminosilicate as a detoxifying agent in Fusarium toxin contaminated maize containing diets for piglets. *J. Anim. Phy. Anim. Nutr.* 89 (9-10):342-358.
- Etienne, M., and Dourmad, J.Y., 1994. Effects of zearalenone or glucosinolates in the diet on reproduction in sows: a review. *Livestock Production Science*, 40, 99–113
- Fink-Gremmels, J. and & H. Malekinejad. 2007. Clinical effects and biochemical mechanisms associated with exposure to the mycoestrogen zearalenone. *Animal Feed Science and Technology* 137 (2007) 326–341

- Fitzpatrick, D.W. C.A. Picken, L.C. Murphy, & M.M. Buhr. 1989. Measurement of the relative binding affinity of zearalenone α -zearalenol and β -zearalenol for uterine and oviduct estrogen receptors in swine, rats and chickens; an indicator of estrogenic patencies. *Comp. Biochem. Physiol.* 94:691-694.
- Forsell, J.H., M.F. Witt, J.H. Tai, R. Jensen, & J.J. Pestka. 1986. Effects of 8- week exposure of the B6C3F1 mouse to dietary deoxynivalenol (vomitoxin) and zearalenone. *Food and Chemical Toxicology* 24 (3), 213–219.
- Goyarts, T. S. Danicke, H. Valenta, K.H. Ueberschar. 2007. Carry-over of Fusarium toxins (deoxynivalenol and zearalenone) from naturally contaminated wheat to pigs. *Food Additives And Contaminants.* 24 (4): 369-380.
- Hilakivi-Clarke, L., E. Cho, & R. Clarke. 1998. Maternal genistein exposure mimics the effects of estrogen on mammary gland development in female mouse offspring. *Oncol Rep* 5:609–616.
- Ito, Y., & K. Ohtsubo. 1994. Effects of neonatal administration of zearalenone on the reproductive physiology of female mice. *J. Vet. Med. Sci.* 56: 1155-1159
- James, L.J., & T.K. Smith. 1982. Effect of dietary alfalfa on zearalenone toxicity and metabolism in rats and swine. *J. Anim. Sci.* 55:110–118.
- Kuiper-Goodman, T., P. M. Scott, & H. Watanabe. 1987. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regulat. Toxicol. Pharmacol.* 7: 253–306.
- Lemke, S.L. K. Mayura, W.R. Reeves, N. Wang, C. Fickey, T.D. Phillips. 2001. Investigation of organophilic Montmorillonite clay inclusion in zearalenone-contaminated diets using the mouse uterine weight bioassay. *J.Tox. Environ. Heal. A*, 62: 243-258.
- Marty, M.S., J.W. Crissman, & E.W. Carney. 1999. Evaluation of the EDSTAC female pubertal assay in CD rats using 17 beta-estradiol, steroid biosynthesis inhibitors, and a thyroid inhibitor. *Toxicol. Sci.* 52 (2): 269-277.
- Maaroufi, K., L. Chekir, & E.E. Creppy. 1996. Zearalenone induces modifications of haematological and biochemical parameters in rats. *Toxicon* 34 (5):535-540.
- Minervini, F., M.E. Dell'Aquila, F. Maritato, P. Minoia, & A.Visconti, 2001. Toxic effects of the mycotoxin zearalenone and its derivatives on in vitro maturation of bovine oocytes and 17 beta-estradiol levels in mural granulosa cell cultures. *Toxicology in Vitro.* 15 (4-5):489-495.
- Nikaido, Y., K. Yoshizawa T. Yuri, N. Danbara, T. Hatano, & A. Tsubura. 2003. Prepubertal zearalenone exposure suppresses *N*-methyl-*N*-nitrosourea-induced

- mammary tumorigenesis but causes severe endocrine disruption in female Sprague–Dawley rats. *Nutr Cancer* 47:164–70.
- Pfhol-Leszkowicz, A. L. Ghedira-Chekir, and & H. Bacha 1995. Genotoxicity of zearalenone, an estrogenic mycotoxin: DNA adduct formation in female mouse tissues. *Carcinogenesis* 16: 2315–2320.
- Phillips, T.D. 1999. Dietary clay in the chemoprevention of aflatoxin-induced disease. *Toxicol. Sci.* 52: 118–126.
- Polak M, Gajecki M, Kulik T, Łuczyński MK, Obremski K, Góra M, Gajecka M, Jakimiuk E, Zielonka Ł 2009. The evaluation of the efficacy of sodium carbonate as zearalenone destructor in feeding stuffs. . *Pol J Vet Sci.* 12(1):103-11.
- Rainey, M.C. R.C. Tubbs, D.K. Hardin, N.M. Cox, and & P.O. Drawer. 1991., *Clinical Manifestations of Prepubertal Exposure to Zearalenone in Gilts. Agri-Practice.* 12 (1):35-42.
- Ramos, A.J. E. Hernandez, & J.M. PlaDelfina. 1996. Intestinal absorption of zearalenone and in vitro study of non-nutritive sorbent materials. *Int. J. Pharm.* 128 (1-2):129-137.
- SAS Inc., 1999. SAS® User's Guide: Statistics, Version 8 Edition. SAS Inc., Cary, NC, USA.
- Speranda, M. B. Liker, T. Speranda, V. Seric, Z. Antunovic, Z. Grabarevic, D. Sencic, D. Grguric, & Z. Steiner. 2006. Haematological and biochemical parameters of weaned piglets fed on fodder mixture contaminated by zearalenone with addition of clinoptilolite. *Acta Veterinaria-Beograd.* 56 (2-3):121-136.
- Tiemann, U. & S. Danicke. 2007. In vivo and in vitro effects of the mycotoxins zearalenone and deoxynivalenol on different non-reproductive and reproductive organs in female pigs: A review. *Food. Addit. Contam.* 24 (3):306-314.
- Underhill, K.L. B.A. Rotter, B.K. Thompson, DB. Prelusky, HL. Trenholm. 1995. Effectiveness of cholestyramine in the detoxification of zearalenone as determined in mice. *Bull. Environ. Cont. Toxicol* 54 (1):128-134.
- Visconti, A. & M. Pascale. 1998. Determination of zearalenone in corn by means of immunoaffinity clean-up and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chrom. A.* 815 (1):133-140.
- Zinedine, A. J. M. Soriano, J.C. Molto, & J. Manes. 2007. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. *Food and Chemical Toxicology.* 45 (1): 1-18.

CAPÍTULO 8

Efficacy of the adsorbent FumTox to reduce the toxicity of Fumonisin B₁ in growing rats

Abstract.

Fumonisin B₁ (FB₁) is a toxic metabolite and a potent inhibitor of the ceramide synthesis produced by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium verticilloides*. The objective of this study was to determine the efficacy of the adsorbent FumTox in counteracting the detrimental effects of FB₁ in growing rats. A total amount of 64 male Sprague Dawley growing rats (125 ± 1 g BW) were assigned to 8 dietary treatments for 7 days. The experiment had a 2 x 4 factorial arrangement with two levels of FB₁ (0 and 15 mg of FB₁/kg feed) and four levels of FumTox (0, 1, 2 and 5 g FumTox/kg feed) in the diet. Growth performance, relative organ weights, serum biochemical parameters, sphingolipid levels (sphinganine-Sa and sphingosine-So) and Sa/So ratio in liver and kidneys were evaluated at the end of the experiment. No significant differences were observed in the growth performance between treatments (P>0.05). Low levels of sphingosine (So) and sphinganine (Sa) were detected in the liver. However, So and Sa and Sa/So ratio in kidneys was higher in rats receiving the FB₁ diets (P<0.0001) than in those fed the Control diet. Besides, dietary FB₁ significantly decreased serum aspartate aminotransferase (AST) activity and increased the relative weight of liver and serum cholesterol concentration as compared to the group of rats fed the Control diet (P<0.05). The incorporation of FumTox to the FB₁-contaminated diet reduced significantly the toxic effects of FB₁, and a significant decrease in the Sa content and in the Sa/So ratio in kidneys of FB₁-FumTox fed rats was observed. In conclusion, these findings suggested that FumTox can effectively reduce the toxicity of FB₁ in growing rats.

8.1 Introduction

Fumonisin is a secondary toxic metabolite produced by *Fusarium* species, such as *Fusarium moniliforme* and *Fusarium verticilloides*, which are common contaminants of corn and also has been found in several foods and feeds worldwide (Marasas, 2001). The type FB₁ is the most toxic fumonisin. It is a hepatocarcinogen and a potent inhibitor of the ceramide synthase, a key enzyme in the sphingolipid biosynthetic pathway (Wang *et al.*, 1991; Marasas *et al.*, 2004). Thus, it has been suggested that fumonisin ingestion results in a toxic dose-dependent accumulation of sphinganine (dihydrosphingosine) and sphingosine (Riley *et al.*, 1993) in the kidney and the liver of the animals (Gelderblom *et al.*, 1991). Qiu and Liu (2001) found that sphingolipid metabolism of humans could be affected by FB₁ intake and the urinary Sa/So ratio may be useful for evaluating FB₁ exposure when the contamination is high.

Fumonisin consumption has been associated with animal diseases such as equine leucoencephalomalacia and porcine pulmonary edema (Diaz and Boermans, 1994), as well as kidney and liver toxicity in rats (Voss *et al.*, 1993, Riley and Voss, 2005). Some epidemiological studies have also shown a significant correlation between high levels of FB₁ in corn consumed by humans and the incidence of esophageal cancer (Sydenham *et al.*, 1990 and Chu and Li, 1994). Therefore, FB₁ has been classified by the International Agency for Research on Cancer (IARC) as possible carcinogenic to humans (class 2B) (IARC, 2002).

Numerous strategies have been approached for detoxification or inactivation of mycotoxins in contaminated food and feedstuffs. However, many of these techniques are no practical commercial treatments or ineffective. A new practical approach to mycotoxin detoxification involves the addition of selective sorbents in the diet that tightly bind and reduce the bioavailability of mycotoxins in the gastrointestinal tract of animals. Several sequestering agents were tested for their capacity to adsorb FB₁ *in vitro* and *in vivo*. Cholestyramine, activated carbon, celite and bentonite showed adsorption capacity to FB₁ *in vitro* (Solfrizzo *et al.*, 2000). However, most resulted ineffective when tested *in*

vivo (Solfrizzo et al., 2000; Solfrizzo et al., 2001). Only cholestyramine confirmed efficacy in reducing the toxic effects of fumonisins *in vivo* (Avantaggiato et al., 2005).

FumTox is a new adsorbent resulting from the modification and activation of a diatomaceous earth, which is a natural material extracted from a quarry. The aim of this study was to determine the efficacy of the adsorbent FumTox in reducing effects of dietary FB₁ in growing rats in relation to sphinganine/sphingosine (Sa/So) ratio in liver and kidney as well as the serum biochemistry, growth performance and organ weights.

8.2. Materials and methods

The experiment was performed at the Animal Facility Research Centre of the Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) and received prior approval from the Animal Protocol Review Committee of this institution. The treatment, management, housing, husbandry and slaughtering conditions conformed to the European Union Guidelines.

8.2.1. Chemicals and feed contamination

Pure fumonisin B₁ (Sigma-Aldrich Chimie S.a.r.l France) was dissolved in absolute ethanol (mg/ml) and the solution was sprayed out on 100 g of ground Control diet to prepare a contaminated feed premix. The treated feed was left overnight at room temperature for the solvent to evaporate (min 12 hours). After this time, it was mixed into the basal diet to obtain the desired level of 15 mg of FB₁/kg.

8.2.2. Animals and Experimental Procedures

Sixty-four male Sprague Dawley young rats (125 ± 1 g BW) were allocated in 32 cages (2 rats per cage) and assigned to eight treatments (4 cages, 8 rats per treatment). The eight experimental treatments resulted from a 2 x 4 factorial arrangement with two levels of fumonisin B₁ (0 and 15 mg of FB₁/kg feed) and four levels of the adsorbent FumTox (0, 1, 2 and 5 g FumTox/kg feed). The experimental diets were prepared by the incorporation of FB₁ and FumTox into a Standard Certified Rodent Chow diet (SAFE-Scientific Animal Food Engineering- France). Rats were

housed in wire cages with filter tops at 24 °C of temperature, 55-60 % of humidity and a 12 h light/12 h dark cycle. The experiment lasted for 7 days, during which diets were offered *ad libitum*. Individual average daily gain, and the feed intake and feed conversion rate per cage was recorded at the end of the experiment.

8.2.3. Serum Biochemistry and Organ Weights

At the end of the study, blood samples were collected from all animals by heart puncture after ketamine-xylazine (80 mg/kg) anesthesia. After killing animals, liver and kidneys were removed and weighed (data expressed as relative organ weight; grams of organ per 100 g of BW). Liver and kidneys samples were kept at -80 °C for further analysis of sphinganine and sphingosine by UPLC-TOF. Blood samples were processed within 1 h for hematological and biochemical study. The serum was obtained by centrifugation ($2,500 \times g$ for 15 min) and stored at -80°C until further analysis. Serum biochemical parameters were measured by using Olympus System Reagents (Olympus, Clare, Ireland) and an automatic clinical chemistry analyzer (Olympus AU 400, Hamburg, Germany). The concentration of total protein (TP) was measured by following the Biuret method; uric acid (UA) by following the uricase method; cholesterol by following the cholesterol esterase-peroxidase method; calcium and phosphorus by following the arsenazo III and molybdate method, respectively; triglyceride by following the glycerol phosphate oxidase method; and the enzymatic activities of alkaline phosphatase (ALP) and aspartate aminotransferase (AST, without pyridoxal phosphate addition), by using the recommended International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine reference methods at the Universitat Autònoma de Barcelona, Facultat de Veterinària, Servei de Bioquímica clínica.

8.2.4. Quantification of sphinganine (Sa) and sphingosine (So) in liver and kidney tissue

Sphingolipid extracts, fortified with C17-sphinganine (0.5 nmol), were prepared as described (Merrill et al., 2005) and analyzed by liquid chromatography–mass spectrometry. The liquid chromatography–mass spectrometer consisted of a Waters

Aquity UPLC system connected to a Waters LCT Premier orthogonal accelerated time of flight mass spectrometer (Waters, Millford, MA), operated in positive electrospray ionisation mode. Full scan spectra from 50 to 1500 Da were acquired and individual spectra were summed to produce data points each 0.2 s. Mass accuracy and reproducibility were maintained by using an independent reference spray via the LockSpray interference. The analytical column was a 100mm×2.1mm i.d., 1.7 μm C8 Acquity UPLC BEH (Waters). The two mobile phases were phase A: methanol/water/formic acid (74/25/1 v/v/v); phase B: methanol/formic acid (99/1 v/v), both also contained 5mM ammonium formate. The following linear gradient was programmed: 0.0 min: 80% B; 3 min: 90% B; 6 min: 90% B; 15 min: 99% B; 18 min: 99% B; 20 min: 80% B. The flow rate was 0.3 mL/min. The column was held at 30 °C. Quantification was carried out using the extracted ion chromatogram of each compound, using 50 mDa windows. The linear dynamic range was determined by injecting standard mixtures of So, Sa and C17-Sa. Positive identification of compounds was based on both the LC retention time ($\pm 2\%$) of synthetic standards and the accurate mass measurement with an error < 5 ppm.

8.3. Statistical Analysis

Data were analyzed by using the GLIMMIX procedure of SAS software according to the following model (SAS Institute, 1996). $Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$, where Y_{ijk} is the dependent variable, μ is the overall mean, α_i is the effect of diet contamination, $i = 1, 2$; β_j is the effect of the level of adsorbent, $j = 1, 2, 3$; $(\alpha\beta)_{ij}$ is the interaction between diet and adsorbent and $\varepsilon \sim N(0, \sigma^2_\varepsilon)$ represents the unexplained random error. Tukey's test was used for multiple comparisons when a significant interaction was detected.

8.4. Results

No significant differences were observed in the growth performance between treatments ($P>0.05$), averaging 13.4 g/d for the daily feed intake, 1.88 g/d for the daily body weight gain, and 8.02 for the feed conversion rate (Data not shown). As shown in Table 8.1, the relative weight of kidneys, spleen and intestinal tract were not affected by treatments ($P>0.05$). However, dietary FB₁ caused a significant increase in the relative weight of liver ($P<0.05$). Supplementation of FumTox to the diet contaminated with FB₁ significantly decreased its toxic effect, reducing the relative weight of liver to values not significantly different of the rats fed on the Control diet.

The results of dietary FB₁ and FumTox on serum biochemical parameters are summarized in Table 8.2. Serum total protein, uric acid, triglyceride, calcium and phosphorus concentration, and ALP enzyme activity were not affected by dietary addition of FB₁ or FumTox ($P>0.05$). However, serum activity of AST was decreased in the groups of rats fed on the FB₁ treatments. A significant interaction between FB₁ and FumTox on the cholesterol concentration was observed. The presence of FB₁ in the diet increased the concentration of cholesterol in serum, while the addition of FumTox to the FB₁ contaminated diets reduced the cholesterol concentration to values not significant different of the rats fed on the control diet.

Low levels of sphingosine (So) and sphinganine (Sa) were detected in the liver (data not shown), while larger amounts were observed in kidney tissue. The results of dietary FB₁ and FumTox on Sa and So concentration, and Sa/So ratio in kidneys are summarized in Table 8.3. A significant interaction between FB₁ and FumTox was observed in the Sa and So content, and the Sa/So ratio in kidney tissue samples. Thus, while the group of rats which consumed the diet which contained the FB₁ alone increased the Sa, So and Sa/So ratio in kidneys ($P<0.0001$), the incorporation of the FumTox to the FB₁-contaminated diets reduced significantly the Sa and So contents in kidneys. The lowest Sa value was observed with a supplementation of 2 g/kg of FumTox, whereas So contents were less modified by the addition of FumTox in the FB₁-

containing diet. Therefore, Sa/So ratios decreased with the inclusion of FumTox in the FB₁-containing diet in comparison with the ratio calculated in rats fed the FB₁- diet whitout adsorbent. It is worth of mentioning that FumTox alone did not provoked changes on the kidney free sphingoid bases (So and Sa) content.

Table 8.1. Effects of dietary Fumonisin B₁ and FumTox on internal organ weight in growing rats.

Treatments		Liver (g/BW, %) ²	Kidneys (g/BW, %) ²	Spleen (g/BW, %) ²	Intestinal tract (g/BW, %) ²
FB ₁ (mg/kg)	Ads (g/kg)				
0	0	4.24 ^b	0.98	0.36	9.7
0	1	4.26 ^b	1.06	0.32	9.8
0	2	4.53 ^b	0.90	0.44	9.2
0	5	4.50 ^b	1.00	0.42	10.5
15	0	5.40 ^a	0.96	0.44	9.9
15	1	4.96 ^{ab}	1.02	0.44	9.2
15	2	4.42 ^b	1.00	0.41	9.4
15	5	5.02 ^{ab}	0.92	0.43	9.9
Sem ¹		0.182	0.042	0.038	0.409
Main effect		Probability			
FB ₁		**	NS	NS	NS
Ads		NS	NS	NS	NS
FB ₁ *Ads		*	NS	NS	NS

^{a,b}Means within line with different superscripts differ significantly (P<0.05)

¹Standard error of the mean *P<0.05, **P<0.001. NS; Not significant ²(organ weight/BW)*100

Table 8.2 Effects of dietary Fumonisin B₁ and FumTox on serum biochemistry in growing rats.

Treatments		ALP (U/L)	AST (U/L)	TP (g/dL)	UA (mg/dL)	COL (mg/dL)	TRG (mg/dL)	Ca (mg/dL)	P (mg/dL)
FB ₁ (mg/kg)	Ads (g/kg)								
0	0	417.9	82.5	5.80	1.11	98.5 ^b	50.4	11.8	8.9
0	1	452.2	81.0	5.80	0.80	101.4 ^{ab}	47.2	11.6	8.8
0	2	399.2	84.6	5.94	0.98	104.9 ^{ab}	44.7	11.5	9.0
0	5	427.7	80.4	6.00	0.63	104.2 ^{ab}	51.0	12.0	9.1
15	0	417.0	71.6	5.86	0.61	115.4 ^a	62.3	11.9	9.3
15	1	461.3	73.0	6.00	0.89	100.8 ^{ab}	42.8	11.9	8.5
15	2	370.9	70.6	6.03	1.19	100.2 ^{ab}	60.7	12.0	9.5
15	5	439.3	76.8	5.96	0.69	98.1 ^b	52.6	11.6	9.0
Sem ¹		26.15	2.74	0.08	0.13	4.38	6.13	0.15	0.40
Main effect		Probability							
FB ₁		NS	**	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Ads		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
FB ₁ *Ads		NS	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS

^{a,b}Means within line with different superscripts differ significantly (P<0.05)

¹Standard error of the mean. *P<0.05, **P<0.01. NS; Not significant

Table 8.3. Effects of dietary Fumonisin B₁ and FumTox on the sphinganine (Sa) and sphingosine (So) content in individual kidney samples of growing rats

Treatments		Sa(nmol/g)	So(nmol/g)	Sa/So
FB ₁ (mg/kg)	Ads (g/kg)			
0	0	3.1 ^d	21.9 ^c	0.1 ^c
0	1	3.7 ^d	17.2 ^c	0.2 ^c
0	2	5.1 ^d	26.5 ^c	0.2 ^c
0	5	2.9 ^d	15.5 ^c	0.2 ^c
15	0	356 ^a	78.0 ^{ab}	4.5 ^a
15	1	295.7 ^{ab}	71.0 ^{ab}	4.1 ^a
15	2	110.7 ^{cd}	64.9 ^b	1.7 ^b
15	5	176.1 ^{bc}	85.42 ^a	2.0 ^b
SEM ¹		83.93	12.87	0.76
Main effect		Probability		
FB ₁		**	**	**
Ads		**	NS	**
FB ₁ *Ads		**	*	**

^{a,b,c,d}Means within line with different superscripts differ significantly (P<0.05)

¹Standard error of the mean. Results are reported as means for 5 replicates each.

*P<0.01, **P<0.001. NS; Not significant

8.5. Discussion

Fumonisin toxicity in the rat.

Fumonisin have been associated with a significant reduction of the feed intake and growth performance of the animals (Ledoux et al., 1992). Theumer et al (2002) reported a decrease in the feed intake and body weight gain of rats after consuming diets contaminated with 100 mg of FB₁/kg diet during 90 days. In the present study, we did not observe any significant effect of dietary FB₁ (15 mg FB₁/kg) on the feed intake and body weight gain of rats, likely due to the lower toxin level and the shorter exposure

time to the contaminated diets. Our results agree with those of Gelderblom et al., (2001) who observed the absence of changes in the body weight gain and feed intake of rats fed a diet containing 10 and 25 mg FB₁/kg for 24 months. Similarly, Voss et al (1995) observed no differences in body weight or feed intake between rats fed an uncontaminated diet and rats fed diets containing a range from 1 to 27 mg FB₁/kg diet for 13 weeks.

Liver and kidneys are known as the target organs for fumonisin toxicity. In the current study, the relative weight of liver was significantly increased by the dietary FB₁ contamination. However, feeding the FB₁ contaminated diets didn't alter the relative weight of kidney, spleen and intestinal tract. The increase observed in the liver weight is an interesting finding of this study because earlier studies (Bondy et al 1995, Gelderblom et al, 1991) have reported opposite effects. Gelderblom et al., (1997) reported that the relative liver weight significantly decreased in rats fed a diet containing 250 mg FB₁/kg over a period of 21 days. Furthermore, alteration activities of blood enzymes and concentration of cholesterol in serum has been associated with hepatotoxicity in rats treated with FB₁. We found decreased enzymatic activity of AST and increased concentration of cholesterol in serum in rats fed a diet contaminated with FB₁. Pozzi et al., (2001) reported similar effects on serum concentration of cholesterol in male Wistar rats consuming 1.5 mg FB₁/100 g BW for 21 days period. Metelin et al. (1994) reported similar effects on the serum enzymes used as indicators of liver damage and elevated cholesterol when newly weaned piglets were fed on diets containing 175 and 101 mg FB₁/kg diet.

Sphingolipids are important components of eukaryotic cells. The mechanism of action of fumonisins involves inhibition of the enzyme ceramide synthase, a key enzyme in the biosynthesis of sphingolipids (Wang et al., 1991; Riley *et al.*, 1993 and 1994, Mobio et al., 2000). Thus, the increase of the sphinganine (Sa) and sphingosine (So) content, and their ratio (Sa/So), has been shown as an useful biomarker to assess animal exposure to contaminated feeds (Riley et al. 1994; Riley et al., 2001; Voss et al.,

2001). Sphingoid bases (So and Sa) were barely detected in the liver samples of our study. However, Sa and So were suitably quantified in kidneys, and their levels, and Sa/So ratio were significantly increased in the rats fed the FB₁ dietary treatments (15 mg FB₁/kg). These results agree with Solfrizzo et al., (2001) who reported that the Sa concentration and Sa/So ratio increased significantly in kidney, while liver didn't show any increase in rats. Voss et al., (1995) reported that the kidney is the most sensitive target for FB₁ in males, while liver was more severely affected in females. Similarly, Bondy et al., (1996) reported that kidney function was shown to be impaired in male rats administrated by gavage with 1 mg FB₁/kg BW for 11 days, which is roughly equivalent to consumption of 12.5 mg FB₁/kg diet. Riley *et al.* (1994) found significant disruption of sphingolipid metabolism in the kidneys of rats receiving dietary FB₁ for 4 wk, and concluded that the kidney is a primary target of toxicity for FB₁ in Sprague-Dawley rats. Our results confirm the kidney as a significant target of FB₁ in male Sprague-Dawley rats, and validate the use of the Sa and So concentration and/or Sa/So ratio in the kidney tissue as a biomarker of FB₁ consumption and absorption (Riley et al., 1994).

The efficacy of FumTox as adsorbent of FB₁

The use of feed adsorbents is considered the most promising and economical approach for preventing and reducing mycotoxicosis in animals (Dakovic et al., 2005). The basic mechanism involves sequestration of mycotoxins in the gastrointestinal tract and chemisorption, which results in a reduction of their bioavailability (Phillips et al., 1990; Abdel-Vahhap et al., 1999). Numerous sequestering agents such as activated carbon, sodium bentonite, cholestyramine and aluminosilicates have been tested to prevent the detrimental effects of fumonisins on animals (Solfrizzo et al., 2001, Miazzo et al., 2005, Piva et al., 2005). Avantaggiato et al., (2007) reported that carbon aluminosilicate-based product decreased 29 percent the fumonisin absorption in an *in vitro* gastrointestinal model. However, few of these binding agents have showed effectiveness for detoxification of fumonisin contaminated feeds *in vivo* (Solfrizzo et al., 2000). Solfrizzo et al. (2001) described that the addition of cholestyramine into a diet

contaminated with fumonisins reduced the toxic effect of fumonisins in minks by reducing both urinary and renal Sa/So ratios (Solfrizzo et al., 2001). In contrast, Bursian et al., (2004) reported that a commercial esterified glucomannan was ineffective in alleviating effects of FB₁ in mink.

Considering that FB₁ (15 mg FB₁/kg) in the diet promoted significant changes in the liver weight, serum AST activity, cholesterol concentration and the Sa, So levels and Sa/So ratio in kidneys, we were able to test the effectiveness of FumTox for alleviating these toxic effects of FB₁ in rats. Our current study confirmed that animals consuming FumTox at 1, 2 and 5 g/kg levels did not were affected on their growth or biochemical parameters. On the other hand, the addition of FumTox to FB₁-contaminated diets decreased the liver weight and cholesterol concentration in serum, and the Sa and So content, and Sa/So ratio in kidneys. However, it should be remarked that the effect of FumTox was moderate and don't fully avoided a significant accumulation of sphingolipids in the kidney of rats fed the FB₁-contaminated diets. The potential protective role of the FumTox, could be due to the chemisorption of FB₁ to FumTox, resulting in a reduction of FB₁ bioavailability in the gastrointestinal tract.

8.6. Conclusions

Results of this study demonstrate that dietary FB₁ at a level of 15 mg/kg diet promoted toxic effects in the rats, with a significant increase in the liver weight, blood cholesterol concentration and So and Sa and Sa/So ratio in kidneys. Supplementation of the diets with 2 g/kg of FumTox reduced some of the toxic effects of FB₁ in rats.

8.7. Acknowledgments

This research, part of MONALISA EUREKA Project Σ3025!, was supported by PROFIT FIT-0300-2003-335, CDTI 20050012, and Torres Quevedo PTQ2004-0869. We thank Eva Dalmau for excellent technical assistance with sphingoid bases analysis.

8.8. References

- Abdel-Wahhab MA, Nada SA, Amra HA. 1999. Effect of aluminosilicates and bentonite on aflatoxin-induced developmental toxicity in rat. *J. Appl. Toxicol.* 19:199–204.
- Avantaggiato, G., Solfrizzo, M., Visconti, A. 2005. Recent advances on the use of adsorbent materials for detoxification of fusarium mycotoxins. *Food Addit. Contam.* 22(4):379-388.
- Avantaggiato et al. (2007).
- Bondy G, Suzuki C, Barker M, Armstrong C, Fernie S, Hierlihy L, Rowsell P, Mueller, R. 1995. Toxicity of Fumonisin B1 administered intraperitoneally to male Sprague-Dawley rats. *Food Chem. Toxic.* Vol:33 (8):653-665.
- Bondy G, Barker M, Mueller R, Fernie S, Miller JD, Armstrong C, Hierlihy SL, Rowsell P, Suzuki C. 1996. Fumonisin B1 toxicity in male Sprague-Dawley rats. *Adv. Exp. Med. Biol.* 392:251–264.
- Bursian SJ, Mitchell RR, Yamini B, Fitzgerald SD, Murphy PA, Fernandez G, Rottinghaus GE, Moran L, Leefers K, Choi I. (2004) Efficacy of a commercial mycotoxin binder in alleviating effects of ochratoxin A, fumonisin B-1, moniliformin and zearalenone in adult mink. *Veterinary and Human Toxicology.* 46 (3): 122-129.
- Chu FS, Li, GY. (1994) Simultaneous occurrence of fumonisin B and other mycotoxins in moldy corn collected from the People's Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 847–852.
- Dakovic A, Tomasevic-Canovic M, Dondur V, Rottinghaus GE, Medakovic V, Zaric S. 2005. Adsorption of mycotoxins by organozeolites. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 46:20–25.
- Diaz, GJ, Boermans, HJ. 1994. Fumonisin toxicosis in domestic animals: a review. *Veterinary and Human Toxicology*, 36: 548—555.

- Gelderblom WCA, Kriek NPJ, Marasas WFO, Thiel PG. 1991. Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B1, in rats. *Carcinogenesis*. 12:1247–1251.
- Gelderblom WCA, Smuts CM, Abel S, Snyman SD, Van der Westhuizen L, Huber, WW, Swanevelder S. 1997. The effect of fumonisin B1 on the levels and fatty acid composition of selected lipids in rat liver in vivo. *Food Chem. Toxicol.*, 35: 647–656.
- Gelderblom, WCA, Lebepe-Mazur S, Snijman PW, Abel S, Swanevelder S, Kriek NPJ, Marasas WFO. 2001. Toxicological effects in rats chronically fed low dietary levels of fumonisin B1 *Toxicology* 161: 39–51.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). 2002. Fumonisin B. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*, Vol. 82. Lyon: IARC. pp 301–366.
- Ledoux, DR. Brown TP, Weibking TS, Rottinghaus GE. 1992. Fumonisin toxicity in broiler chicks. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 4: 330-333.
- Marasas WFO. 2001, Discovery and occurrence of the fumonisins: A historical perspective. *Environ. Health Perspect.* 109 (Suppl. 2): 239 –243.
- Marasas WFO, Riley RT, Hendricks KA, Stevens VL, Sadler TW, Gelineau-van Waes J, Missmer SA, Cabrera J, Torres O, Gelderblom WCA, Allegood J, Martinez C, Maddox J, Miller JD, Starr L, Sullards MC, Roman AV, Voss KA, Wang E, Merrill AH. 2004. Fumonisin disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and in vivo: a potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin-contaminated maize. *J Nutr.* 134, (4): 711-6.

- Metelin GK, Haschek WM, Ness DK, Hall WF, Harlin KS, schaeffer DJ, beasley VR, 1994. Temporal and dose-response features in swine fed corn screenings contaminated with fumonisin mycotoxins. *Mycopathologia*.126 (1): 27-40.
- Merrill AH, Sullards MC, Allegood JC, Samuel K, Wang E. 2005. Sphingolipidomics: High-throughput, structure-specific, and quantitative analysis of sphingolipids by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Methods*, 36 (2): 207-224.
- Miazzo R, Peralta MF, Magnoli C, Salvano M, Ferrero S, Chiacchiera SM, Carvalho ECQ, Rosa CAR, Dalcero A. 2005. Efficacy of sodium bentonite as a detoxifier of broiler feed contaminated with aflatoxin and fumonisin. *Poult. Sci.* 84:1–8.
- Mobio TA, Baudrimont I, Sanni A, Shier TW, Saboureau D, Dano SD, Ueno Y, Steyn PS, Creppy EE 2000. Prevention of vitamin E of DNA fragmentation and apoptosis induced by fumonisin B1 in C6 glioma cells. *Arch. Toxicol.*, 74, 112–119.
- Monaci L, Palmisano F, Matrella R, Tantillo G. 2005. Determination of ochratoxin A at part-per-trillion level in Italian salami by immunoaffinity clean-up and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* 1090:184–187.
- Phillips TD, Clement BA, Kubena LF, Harvey RB. 1990. Detection and detoxification of aflatoxins: Prevention of aflatoxicosis and aflatoxin residues with hydrated sodium calcium aluminosilicate. *Vet. Hum. Toxicol.* 32:15–19.
- Piva A, Casadei G, Pagliuca G, Cabassi E, Galvano F, Solfrizzo M, Riley RT, Diaz DE. 2005. Activated carbon does not prevent the toxicity of culture material containing fumonisin B1 when fed to weanling piglets. *Jornal Animal Science*. 83:1939-1947.

- Pozzi CR, Correa B, Xavier JG, Direito GM, Orsi RB, Matarazzo SV. 2001. Effects of prolonged oral administration of fumonisin B1 and aflatoxin B1 in rat. *Mycopathologia*; 151:21-27.
- Qui, M. and Liu, X. 2001. Determination of sphinganine, sphingosine and Sa/So ratio in urine of human exposed to dietary fumonisin B1. *Food Addit. Contam.* 18 (3):263-269.
- Qiu M, Liu X, Wang Y, Zhang, C. 2001. Survey on the fumonisins intake and the urinary Sa/So ratio of people suffered from a high incidence of esophageal cancer. *Journal of hygiene research (Wei Sheng Yan Jiu)* 30, (6), 365-7.
- Riley RT, AN NH, SHOWKER JL, YOO HS, NORRED WP, CHAMBERLAIN WJ, WANG E, MERRILL AH, MOTELIN G, BEASLEY VR, HASCHEK WM 1993. Alteration of tissue and serum sphinganine to sphingosine ratio: An early biomarker of exposure to fumonisin-containing feeds in pigs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 118:105–112.
- Riley RT, HINTON DM, CHAMBERLAIN WJ, BACON CW, WANG E, MERRILL AH, VOSS KA. 1994. Dietary fumonisin B1 induces disruption of sphingolipid metabolism in Sprague-Dawley rats: A new mechanism of nephrotoxicity. *J. Nutr.*, 124, 594–603.
- Riley RT, Enongene E, Voss KA, Norred WP, Meredith FI, Sharma RP, Spitsbergen J, Williams DE, Carlson DB, Merrill AH. 2001. Sphingolipids perturbations as mechanisms for fumonisin carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives* 109 (2): 301-308.
- Riley RT, Voss KA. 2006. Differential sensitivity of rat kidney and liver to fumonisin toxicity: organ-specific differences in toxin accumulation and sphingoid base metabolism. *Toxicol Sci.* 92, (1): 335-45.
- SAS Institute. 1996. *SAS User's Guide: Statistics*. SAS Institute, Cary, NC.

- Solfrizzo M, De Girolamo A, Visconti A, Sizoo E, Van Egmond H. 2000. Determination of fumonisins B1 and B2 in corn based foodstuffs by high performance liquid chromatography after immunoaffinity clean-up. In: *X International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, Guaruja, Brazil, 21–25 May*, p. 52 (abstract).
- Solfrizzo M, Carratu' MR, Avantaggiato G, Galvano F, Pietri A, Visconti A. 2001. Ineffectiveness of activated carbon in reducing the alteration of sphingolipid metabolism in rats exposed to fumonisin-contaminated diets. *Food and Chem Toxicol* 39: 507–511.
- Solfrizzo et al., (2001) *In vitro* and *in vivo* studies to assess the effectiveness of cholestyramine as a binding agent for fumonisins.
- Sydenham EW, Thiel PG, Marasas WFO, Shephard GS, Van Schalkwyk DJ, Koch KR. 1990. Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence in areas of the Transkei, Southern Africa. *J. Agric. Food Chem.* 38: 1900–1903.
- Theumer, MG, Lopez G, Masih DT, Chulze SN, Rubinstein R. 2002. Immunobiological effects of fumonisin B1 in experimental subchronic mycotoxicoses in rats. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* 9:149–155.
- Voss KA, Chamberlain WJ, Bacon CW, Norred WP. 1993. A preliminary investigation on hepatic toxicity in rats fed purified fumonisin B1. *Nat. Toxins*, 1, 222–228.
- Voss KA, Chamberlain WJ, Bacon CW, Herbert RA, Walters DB, Norred WP. 1995. Subchronic feeding study of the mycotoxin fumonisin B1 in B6C3F1 mice and Fischer 344 rats. *Fundam. Appl. Toxicol* 24: 102–110.
- Voss KA, Riley RT, Norred WP, Bacon CW, Meredith FI, Howard PC, Plattner RD, Collins T, Hansen DK, Porter JK. 2001. An overview of rodent toxicities: Liver,

and kidney effects of fusarium moniliforme and fumonisins. *Environ. Health Perspectives* 109: 259-266.

Wang E, Norred WP, Bacon CW, Riley RT, Merrill A. 1991. Inhibition of sphingohpid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. *Journal Biological Chemistry* 266: 14486-14490.

CAPÍTULO 9
DISCUSIÓN GENERAL

La contaminación por hongos en las materias primas destinadas a la alimentación animal, es un hecho inherente a la existencia de estos microorganismos y como tal, es casi imposible encontrar productos y co-productos libres de ellos y de sus metabolitos.

La posibilidad de que los animales en producción consuman en algún momento micotoxinas en los piensos es elevada, lo que puede determinar efectos negativos en la productividad, así como un riesgo de salud pública por el consumo de productos de origen animal contaminados. Numerosos estudios ya han demostrado los efectos adversos de un consumo reducido pero crónico de micotoxinas en humanos, como es su potencial teratogénico (Qiu y Liu, 2001; Marasas et al.,2004; Maresca et al.,2008; Torres-Sánchez y López-Carrillo 2010).

Prevenir estos riesgos es complicado, y para ellos se han propuesto diferentes estrategias. Una de ellas, muy lógica, es la prevención de la producción de toxinas por parte del hongo a nivel de campo o silos de almacenamiento. Sin embargo, la dificultad de controlar los factores ambientales reduce considerablemente sus posibilidades de éxito. El resto de estrategias son posteriores a la cosecha, y se dirigen a destruir o bloquear las micotoxinas mediante la aplicación de métodos químicos, físicos o biológicos que actúan como detoxificantes o secuestrantes de la toxina en los piensos. Esta última estrategia es la que centra el trabajo de la presente memoria. Como tal, nuestro objetivo será enfocar la discusión desde tres puntos de vista: i., mediante la evaluación de los efectos inespecíficos y específicos determinados por el consumo de micotoxinas por los animales, ii.- evaluando la capacidad de los adsorbentes de corregir estos efectos tóxicos, y iii.- considerando la repercusión de estos resultados y las posibles aplicaciones prácticas.

9.1 Efecto de las micotoxinas sobre la producción y la salud de los animales

9.1.1. Efecto de las micotoxinas sobre los consumos de pienso, crecimiento y producción.

Por su prevalencia, las micotoxinas Aflatoxina B1 (AFB1), Ocratoxina A (OTA), Fumonisina B1 (FB1) y Zearalenona (ZEA) hacen parte del grupo de toxinas que más efectos adversos tienen sobre la salud pública y productividad animal y en consecuencia son de las que más comúnmente afectan la seguridad alimentaria (JECFA, 2001; WHO, 2002; CAST, 2003). Otras micotoxinas, como la vomitoxina (DON), patulina, o tricotecenos también son importantes. Más aún, hoy sabemos que las micotoxinas pueden coexistir con otras debido a la habilidad de algunos hongos para producir varias micotoxinas en el mismo sustrato; y los efectos de unas pueden ser potenciados por la presencia de otras.

Como norma general, una materia prima con mala calidad fúngica es indicativa de un elevado riesgo de contener micotoxinas. Sin embargo, la ausencia de hongo no asegura que el ingrediente esté libre de micotoxinas. Mientras eliminar la contaminación fúngica puede ser relativamente sencillo, eliminar micotoxinas una vez producidas es bastante más complicado. Un ejemplo revelador de esta situación son las plantas de producción de bioetanol, en donde las micotoxinas de los cereales se concentran (hasta en 3 veces) en los granos de destilería (Wu y Munkvold, 2008).

A diferencia de los humanos, el estudio realizado de la exposición que experimentan los animales al consumo de ingredientes contaminados con micotoxinas es mucho más reducido. En la tabla 9.1 se presentan los resultados recogidos en una amplia evaluación de ingredientes en una fábrica de piensos (Espada, 2008). En general, la mayor parte de los lotes de ingredientes presentaron niveles de micotoxinas por debajo de los niveles recomendados, si bien se detectaron algunos lotes positivos para todas las micotoxinas estudiadas.

Tabla 9.1. Porcentaje de lotes de ingredientes con presencia de micotoxina por encima de los niveles recomendados (mg/kg) en los piensos completos de los lechones (Espada, 2008).

Micotoxina	Ingredientes	% lotes positivos	Nivel de referencia
Aflatoxina B ₁	Maíz	4	>0,010
Ocratoxina A	Cebada	1	>0,050
	Maíz	1	
Deoxinivalenol	Maíz	13	>0,900
	Trigo	7	
	Salvado de trigo	9	
Zearalenona	Maíz	4	>0,100
	Harina de soja	8	
Fumonisina	Maíz	9	> 5

Como premisa previa cabe decir que los niveles de micotoxinas estudiados en la presente memoria estuvieron claramente por encima de los valores recomendados, y por encima de los habitualmente identificados en los ingredientes en condiciones prácticas. La concentración de micotoxinas en los piensos contaminados evaluados fueron para la aflatoxina B₁, 1mg/kg, la ocratoxina, 2 mg/kg; la zearalenona 0,8-6 mg/kg; y fumonisina, 15 mg/kg. La decisión de evaluar niveles tan elevados de micotoxinas estuvo dirigida a favorecer la exposición de los animales y la identificación de sus efectos tóxicos; así como la capacidad de los agentes bloqueantes de corregir estos efectos.

La mayoría de efectos de las micotoxinas sobre los animales puede describirse mediante el estudio de diferentes factores inespecíficos de la salud animal, como son el consumo de pienso, el crecimiento de los animales o su producción. Sin embargo, para mayor certeza sobre el efecto tóxico y la posible eficacia de los agentes detoxificantes,

se viene evaluando otros parámetros descriptivos del estado de salud del animal, como son los parámetros fisiológicos, bioquímicos, o tisulares.

La bibliografía de los últimos 50 años proporciona descripciones detalladas de los diferentes efectos provocados por el consumo de micotoxinas en las diferentes especies. De forma general, podemos concretar que cada micotoxina puede tener efectos particulares sobre la salud animal, y que los efectos pueden tener una mayor o menor dimensión en función del grado de contaminación, pero también de la sensibilidad de la especie o animal considerado (referida en la revisión de literatura de este trabajo). Así, por ejemplo, la ZEA, que es muy normal hallarla coexistiendo con varios tricotecenos, tiene propiedades estrogénicas en la mayoría de mamíferos que la consumen. La infertilidad, la reducción en la producción de leche y el hiperestrogenismo en vacas se ha asociado a la ZEA (Placinta et al., 1999). Sin embargo, los efectos son más pronunciados en el ganado porcino, donde los efectos de hiperestrogenismo en animales jóvenes aparecen con dosis de Zea moderadas, por debajo de 0,6 mg/kg modificando parámetros bioquímicos como la GGT y GLDH e inmunológicos como la IgA (Doll et al., 2003).

En el presente proyecto tuvimos que realizar experimentos consecutivos de evaluación de la capacidad de bloqueo para diferentes micotoxinas. Para ello, decidimos escoger especies de referencia que pudieran mostrar una elevada sensibilidad a la micotoxina evaluada, tanto en parámetros de rendimientos, como en parámetros fisiológicos o bioquímicos (las aves para aflatoxina y ocratoxina; el cerdo para la zearalenona, y las ratas, tanto para la zearalenona como las fumonisinas).

En la prueba realizada con AFB1 en broilers (Experimento I) se demostró el efecto negativo de la toxina sobre el consumo de alimento, la ganancia de peso y una pobre conversión alimenticia. En el mismo sentido, la OTA también redujo el consumo de alimento en aves de puesta (Experimento II) y ello produjo una disminución en la producción de huevo (masa) y en su promedio de peso. No observamos diferencias significativas en los rendimientos de los animales con la zearalenona o la fumonisina,

lo que pone en evidencia la conveniencia de haber incorporado en el estudio otros parámetros descriptivos de la toxicidad de las micotoxinas, más allá de las respuestas productivas. Bien al contrario, la incorporación de niveles crecientes de zearalenona en las ratas (Experimento III) estuvo asociada a un incremento en el peso de los animales y de la eficiencia de utilización del pienso. Estos resultados son similares a los observados en otro estudio con ratones (Nikaido et al. 2004) y podría sugerir un incremento en la eficiencia de crecimiento. Un efecto similar se ha descrito en la ingestión de pienso y ganancia de peso en cerdos alimentados con piensos contaminados con toxinas del género *Fusarium* (Swamy et al. 2002). El alfa-zearalanol, un derivado metabólico de la ZEA (Olsen, 1989) fue utilizado como promotor del crecimiento en los EEUU desde 1969 para incrementar los rendimientos en el engorde de terneros (Apple et al., 1991). Sin embargo, su aplicación fue prohibida en la Unión Europea desde 1985.

9.1.2. Efectos tóxicos metabólicos, morfológicos e histológicos

A diferencia de los resultados observados en crecimiento y producción, el consumo en todos los ensayos de niveles elevados de micotoxinas provocó modificaciones en los parámetros hematológicos, bioquímicos, morfológicos de órganos o tisulares. Para el caso de la aflatoxina en broilers, las modificaciones afectaron a las concentraciones séricas del enzima fosfatasa alcalina, total de proteína, albúmina y ácido úrico. En un estudio previo, Klein et al., (2000) indicaron que la extrema sensibilidad de las aves a la AFB₁, se debe a la combinación de la activación eficiente de la toxina y la desintoxicación deficiente de la micotoxina en el hígado. Sabemos que los niveles elevados de los parámetros bioquímicos a nivel sanguíneo (transaminasas, fosfatasas), son un buen indicador de la lesión hepática. En caso de lesiones hepatocelulares y necrosis de las células del parénquima, estas enzimas se liberan de los tejidos dañados hasta el torrente sanguíneo. Este efecto fue observado por Ravi Rastogi y colaboradores (2001) al aplicar una dosis de 2 ppm de AFB₁

intraperitonealmente a ratas. La AFB1 incrementó significativamente la actividad de la GGT y ALP en hígado y redujo la GTS en 27% y el glicógeno en 32%.

En el experimento hecho con ocratoxina y gallinas ponedoras se observó también una alteración de las concentraciones séricas de fosfatasa alcalina, ácido úrico, colesterol y triglicéridos, y un incremento del peso del hígado. El consumo de piensos contaminados con OTA tiene un impacto económico importante en los animales monogástricos y aves de corral y la industria del cerdo. Los animales rumiantes son más resistentes que los monogástricos a la toxicidad de la OTA. Los cerdos son generalmente considerados la especie más sensible a la nefrotoxicidad por OTA (Kuiper-Goodman y Scott, 1989; EFSA, 2006). Los cambios degenerativos que afectan a las células epiteliales en algunos túbulos proximales se observaron en cerdos que recibieron una dieta con OTA en 0,8 mg / kg durante seis meses, así como los cambios proliferativos en el intersticio, que predominó después de un año (Stoev et al., 2002).

La industria avícola también se ve afectada por la contaminación por OTA. Pavos, pollos y patos son susceptibles a esta toxina. Los signos típicos de ocratoxicosis en aves de corral son la reducción en la ganancia de peso, mala conversión alimenticia, reducción de la producción de huevos, la mala calidad de cáscara de los huevos y nefrotoxicidad. El consumo de pienso contaminado con OTA (1-5 mg / kg) alteró la bioquímica sérica de animales de diferente edad, incluyendo reducciones en el colesterol, proteínas totales, albúmina, globulina, potasio, y triglicéridos, y el aumento de ácido úrico, creatinina y en las actividades de la fosfatasa alcalina (ALP) y gamma glutamina transpeptidasa (GGT) (Gentles et al., 1999). Las pérdidas de peso, diarrea, la excreción excesiva de orina y lesiones renales son también habituales en los pollos alimentados con una dieta contaminada con 2 mg de ocratoxina A / kg (Dwivedi y Burns, 1984).

En contraste con aflatoxina y ocratoxina, los efectos de la zearalenona fueron menos marcados a nivel de parámetros de toxicidad identificados en sangre, y únicamente se observó un ligero incremento en la concentración de la fosfatasa alcalina. Los efectos

de la zearalenona fueron evidentes en el peso de los órganos reproductivos, tanto en la rata como en los lechones hembra en crecimiento. Las respuestas fueron especialmente pronunciadas en estas últimas, incluso cuando las dosis de zearalenona en el pienso fueron considerablemente menores que en ratas (0,8 vs. 6 mg/kg, respectivamente). Los resultados coinciden con referencias previas (Doll et al., 2003) y confirman la adecuación de este parámetro de estudio para evaluar la actividad de posibles agentes bloqueantes.

El consumo de fumonisina por parte de los animales también se ha relacionado con la alteración de parámetros bioquímicos y fisiológicos. En caballo, el consumo elevado de fumonisinas se ha relacionado con un cuadro clínico denominado leucoencefalomalacia. En patos con dosis de 128 ppm, se incrementó la proteína total sérica, el colesterol, la ALT, lactato deshidrogenasa y ALP, mostrando el incremento más visible en riñones, lo que sugiere que es un órgano sensible para esta micotoxina (Tran et al., 2005). En nuestra prueba en ratas (Experimento V) con dosis de FB1 de 15 ppm no observamos cambios en la concentración de ALP, si bien disminuyó la actividad de la AST, aumentó la esfinganina y la relación Esfinganina/Esfingosina en riñones, manifestando el efecto tóxico de la FB1 sobre los animales. La FB1 es la fumonisina más tóxica. Se trata de un hepatocarcinógeno y un potente inhibidor de la sintetasa de ceramida, un enzima clave en la ruta biosintética de los esfingolípidos (Wang et al, 1991; Marasas et al, 2004). Los resultados encontrados en el presente estudio confirman que la ingestión de fumonisina provoca una acumulación tóxica de la esfinganina (dihidroesfingosina) y la esfingosina (Riley et al., 1993) en el riñón y el hígado de los animales (Gelderblom et al., 1991). Nuestros animales mostraron el acumulo de esfinganina y esfingosina especialmente en las muestras renales, lo que nos llevo a escoger este parámetro como indicador de toxicidad de la fumonisina en la rata, y como parámetro testigo de la eficacia del bloqueante evaluado.

9.2 Utilización de ingredientes bloqueantes de micotoxinas en la digesta

El método más viable prometedor y económico para prevenir o reducir los efectos de las micotoxinas en la alimentación animal, es la utilización de adsorbentes o secuestrantes que se unen de manera eficiente a la molécula tóxica en el tracto gastrointestinal y así evitar la absorción en el intestino. Diferentes estudios utilizando diferentes tipos de arcillas en las dietas han demostrado que pueden reducir la biodisponibilidad de algunas micotoxinas en el tracto. Un factor valioso de estos aditivos, es que deben ser inocuos y no intervenir con la absorción de principios nutritivos. En las tablas 9.2 y 9.3, se presenta el resumen de eficacia en aves y porcino presentado en un informe de revisión sobre los agentes detoxificantes utilizados como aditivos en la alimentación animal (Scientific report, EFSA, 2009). En breve, podemos afirmar que son numerosos y variados los productos que han mostrado capacidad de bloqueo para la aflatoxinas, tanto en aves como en cerdos; mientras que la descripción de productos bloqueantes de otras micotoxinas es considerablemente inferior.

Entre los trabajos descritos para la aflatoxina B1 en aves, se han descrito capacidad de bloqueo para diferentes productos, como el silicato aluminico de calcio y sodio (0,5%), la bentonita de sodio (0,3-0,5%), montmorillonita (0,3-0,5%), la zeolita (1%), clinoptilolite (1,5-2,5%), y las paredes de levaduras y glucomananos (0,1%). En nuestro estudio la incorporación de nuestro adsorbente (derivado de la tierra de diatomeas) a dosis entre 0,1 y 0,2% resultó eficaz para reducir en un 50% los cambios promovidos en los animales por la dieta tóxica frente al control. Las aflatoxinas son moléculas aromáticas planas con un carácter hidrofílico que les predispone a adherirse con relativa facilidad en superficies planas. La presencia en la molécula de aflatoxina de ramificaciones beta dicarbonilo permite la formación de enlaces con metales catiónicos (ejemplo Al^{3+}) presentes en las arcillas. En contraste con las aflatoxinas, la zearalenona es una molécula macrocíclica con un carácter más hidrofóbico que la aflatoxina; mientras que la ocratoxina es una molécula poliaromática más hidrofóbica incluso que la zearalenona. La fumonisina B1 es una molécula de cadena larga

alifática, con cuatro grupos carboxílicos. La presencia de estos grupos determina que su capacidad de unión a otros compuestos dependa mucho del pH.

Tabla 9.2 Agentes detoxificantes probados en broiles . Ensayos *in vivo*. (EFSA, 2009)

DETOXIFYING AGENTS	MYCOTOXIN									
	Aflatoxin (AFB1)	Cyclopiazonic acid	DAS	DON	Fusaric acid	Nivalenol	OTA	T2 toxin	ZEA	
HSCAS	+	-					-	-		
Clinoptilolite	+/-	-								
Modified nano montmorillonite	+									
Mg K aluminosilicate	+/-									
Sodium bentonite	+									
Ca montmorillonite	+									
Synthetic crystalline aluminosilicate	+/-									
Acidic phyllosilicate		-								
Zeolite	+		-			-		-		
Diatomaceous earth							+			
Charcoal							-			
Superactivated charcoal	+/-							+/-		
BHT	+									
Cell wall saccharomyces cerv.	+									
Yeast glucomannans	+									
Esterified glucomannans	+			+/-	+		+	-	+	
Xylanase				-						
Live yeast culture residue	+									
Nocardia corynebacteroides	+/-									
Eubacterium			+	+				+		
Yeast Trichosporon mycotoxinivorans							+		-	
Saccharomyces cerevisiae	+									
Ammonia	+									
Calcium propionatex	+/-									
PVPP	+/-			-						

Celdas oscuras indican que el producto ha mostrado efectos positivos contra los efectos de las micotoxinas. Celdas claras, indican que el producto no ha sido efectivo. + Efecto positivo del agente; - Efecto negativo del agente; +/- Efecto positivo del agente sobre algunos parámetros y sin efecto en otros.

Tabla 9.3 Agentes detoxificantes probados en cerdos. Ensayos in vivo. (EFSA, 2009)

DETOXIFYING AGENTS	MYCOTOXINS					
	Aflatoxins (AFB1)	DON-NIV	Fumonisin	OTA	T2 toxin	Zearalenone
HSCAS	+	-				
Montmorillonite		-				-
Sodium bentonite	+	-				
Calcium bentonite	+					
Zeolite	+					+
Sepiolite	+					
palygorskite	+					
Ammonium carbonate		-				
Charcoal			+/-			
Polyvinylpyrrolidone		-				
Yeast glucomannans	+	+/-			-	+
Apple pomace		+				
Alfafa						+
Content of large intestine of hens		+				
<i>Eubacterium</i>		+				
Combination of <i>Eubacterium</i> BBSH 797 with dried yeasts and clays		-				

Celdas oscuras indican que el producto ha mostrado efectos positivos contra los efectos de las micotoxinas. Celdas claras, indican que el producto no ha sido efectivo. + Efecto positivo del agente; - Efecto negativo del agente; +/- Efecto positivo del agente sobre algunos parámetros y sin efecto en otros.

En todos los ensayos realizados en este trabajo de tesis (Experimentos I,II,IV, V) se ha evidenciado la respuesta positiva de los adsorbentes utilizados para reducir los efectos perjudiciales de las toxinas evaluadas. En los dos ensayos donde se evaluó el aporte de un nivel creciente de adsorbente (aflatoxina y zearalenona) pudimos aproximarnos también a valorar el efecto dosis respuesta del adsorbente. De hecho, la incorporación en todos los diseños de un tratamiento libre de micotoxinas, y un

tratamiento contaminado sin adsorbente permitió cuantificar la efectividad relativa de la dosis de adsorbente. La concentración efectiva 50 (EC50) puede definirse como la concentración de adsorbente en el pienso (%) que reduce los efectos tóxicos en un 50%, y que puede plantearse como equivalente del índice de bloqueo 50 (BC50) determinado *in vitro*, o concentración en la que se bloquea *in vitro* la mitad de la micotoxina.

Para el caso particular de la aflatoxina en broilers, los valores de EC50 oscilaron entre 0,1 y 0,2%, tanto para parámetros de producción como para parámetros bioquímicos o morfológicos (Tabla 9.4).

Tabla 9.4 Valores medios de cambio de peso (g), índice de conversión, fosfatasa alcalina, proteína sérica y peso de hígado (g) en la dieta Control y contaminada con Aflatoxina, y valor estimado de la concentración efectiva 50 (EC50) para pollos broilers (Experimento I).

	Control	Afla	Media	EC50 (valor)
Cambio Peso (g)	2308	1951	2129	0,2 (2319)
IC	1,62	1,78	1,7	0,2 (1,67)
ALP	2302	3456	2879	0,1 (2102)
Prot. sérica	2,68	2,38	2,53	0,1 (2,62)
Hígado (g)	2,09	2,70	2,39	0,1 (2,32)

Para el ensayo de la ocratoxina en las gallinas ponedoras, el aporte de una dosis de 0,5% del adsorbente fue próximo al EC50 para los parámetros de producción (puesta de huevo y masa de huevo producido). Sin embargo, el aporte de 0,5% de adsorbente reflejó que el valor de EC50 debería ser superior para otros parámetros bioquímicos, el peso del hígado o la presencia de residuos en el huevo (Tabla 9.5).

Tabla 9.5. Valores medios de ingestión de pienso (g/d), producción de huevo (g/d), concentración sérica de fosfatasa alcalina, peso relativo del hígado (%) y concentración de OTA en yema de huevo en los tratamientos Control y contaminado con OTA, y valor estimado de EC50 (Experimento II).

	Control	OTA	Media	EC50 (valor)
Ingestión	147,3	126,7	137	0,5 (136,7)
Prod. huevo	62	55,4	58,7	0,5 (59,4)
ALP	474	1940	1207	>0,5 (1430)
Hígado	2,36	2,90	2,63	>0,5 (2,90)
OTA residuo	No Detect.	15,1	7,5	>0,5 (12)

La incorporación de adsorbente en el pienso contaminado con zearalenona en lechones permitió reducir los efectos tóxicos sobre el aparato reproductor y los parámetros bioquímicos. La dosis efectiva 50 (EC50) fue próxima a 0,5% para los efectos sobre el tamaño del útero y ovarios, e inferior (0,1-0,2%) para la concentración de fosfatasa alcalina o la presencia de residuos en líquido biliar (Tabla 9.6).

Tabla 9.6 Valores medios de peso de útero (g), peso de ovarios (g), fosfatasa alcalina, residuos ZEA y α zearalenol en bilis de los lechones que consumieron la ración Control y contaminada con Zearalenona. Valores estimados de EC50 (%) (Experimento IV, ensayo 2).

	Control	ZEA	Media	EC50 (valor)
Utero	564	1230	897	0,5 (898)
Ovario	102	156	129	0,5 (107)
ALP	217	243	230	0,2 (203)
Zea en bilis	No Detect.	10,5	5,2	0,1 (4,4)
α zearalenol en bilis	No Detect.	5,6	2,8	0,2 (2,7)

En relación a los resultados obtenidos con la contaminación del pienso con fumonisina, la incorporación de un nivel de adsorbente de 0,5% permitió reducir algunos de los efectos tóxicos, como fue el acumulo de los derivados de los esfingolípidos (Sa y So). La concentración efectiva 50 fue de 0,1-0,2% para el peso relativo del hígado, concentración de esfinganina y relación esfinganina / esfingosina (Sa/So), como lo podemos apreciar en la siguiente tabla.

Tabla 9.7 Valores de peso relativo de hígado (g), Esfinganina libre (Sa), Esfingosina libre (So), relación Sa/So y valores de EC50 para ratas alimentadas con la dieta Control y contaminadas con FB1; y valores estimados de EC50(%) (Experimento V).

	Control	FB1	Media	EC50 (valor)
Hígado	4,24	5,4	4,82	0,1 (4,96)
Sa	3,1	356	180	0,2 (110)
So	21	78	50	>0,5 (85,4)
Sa/So	0,1	4,5	2,3	0,2 (1,7)

9.3 Consideraciones generales y prácticas sobre el uso de adsorbentes de micotoxinas en ganadería

La contaminación de los alimentos con algún tipo de micotoxinas generalmente causa un efecto dosis-dependiente, que afecta parámetros importantes como la ganancia de peso, altera constantes fisiológicas y modula la respuesta inmune. Estos efectos, muestran que la exposición a algún tipo de micotoxina, incluso a niveles bajos, puede resultar en grandes pérdidas económicas, debido a la disminución del rendimiento y alteraciones fisiológicas en el animal que los imposibilita para dar su potencial productivo y para hacer frente a las infecciones. Son innegables los efectos de la micotoxinas en la salud animal y humana, lo que hace prioritaria la investigación en este campo.

La inclusión en la alimentación animal de aditivos destinados a bloquear, retardar o disminuir la exposición de los animales a la toxina representa una alternativa para reducir los posibles residuos tóxicos en los alimentos de origen animal para consumo humano. El uso de estos aditivos tecnológicos, basados en diferentes tipos de arcillas y materiales adsorbentes, junto con buenas prácticas de manejo de las materias primas y piensos, debería contribuir a reducir la exposición de la población humana y animal a las numerosas micotoxinas conocidas.

Es importante resaltar que de todos los parámetros analizados en los diferentes estudios de toxicidad y efectividad de adsorbentes, muchos no responden de una misma forma a la dosis de micotoxina, lo que complica la interpretación de los resultados. Generalmente, parámetros inespecíficos como el consumo de alimento o crecimiento son menos sensibles, que parámetros más específicos (metabólicos, histológicos o de residuos). Esta respuesta confirma el interés de incorporar en las pruebas *in vivo* el estudio de parámetros de toxicidad más específicos, y a ser posible análisis de residuos en los productos animales.

CAPÍTULO 10

Conclusiones

CONCLUSIONES

Los resultados recogidos en la presente memoria nos permiten concluir que:

1. El consumo por diferentes especies de raciones con niveles elevados de micotoxinas (aflatoxina B1, 1mg/kg; ochratoxina, 2mg/kg; zearalenona, 0,8-6 mg/kg y fumonisina, 15 mg/kg), por encima de los niveles máximos permitidos o recomendados en alimentación animal (Directivas 2002/32/CE; 2003/100/CE; 2006/576/CE), afectó la salud y rendimiento de los animales. Los efectos fueron detectables en diferentes parámetros no específicos, como el consumo de pienso, crecimiento y producción (para la aflatoxina y ochratoxina), y el peso relativo e histología de algunos órganos, y los niveles hematológicos y bioquímicos para todas las micotoxinas estudiadas.
2. El consumo de raciones contaminadas con ochratoxina (1mg/kg) por las gallinas ponedoras determinó la presencia de la micotoxina en los huevos. El consumo de zearalenona en la ración de cerdos en crecimiento (0,8 mg/kg) determinó la presencia de zearalenona y sus metabolitos en líquido biliar.
3. Las respuestas estrogénicas encontradas por el consumo de zearalenona junto con la ración en diferentes especies, como la rata y el cerdo, evidencian la mayor sensibilidad del cerdo al consumo oral de Zearalenona
4. La incorporación de los diferentes adsorbentes evaluados (en dosis variables entre 0,1 y 0,5%) sobre raciones no contaminadas con micotoxinas no provocó cambios en los rendimientos productivos ni los parámetros bioquímicos o morfológicos de los animales estudiados.
5. La incorporación de los diferentes adsorbentes evaluados (en dosis variables entre 0,1 y 0,5%) sobre raciones contaminadas con micotoxinas atenuó una buena parte de los parámetros afectados por las micotoxinas.
6. La incorporación de los diferentes adsorbentes evaluados en diseños experimentales que incorporan un tratamiento libre de micotoxinas, un tratamiento contaminado y un tratamiento contaminado con el bloqueante añadido nos permitió estimar la dosis o

concentración efectiva 50 de adsorbente (EC50), como aquella que reduce los efectos tóxicos en un 50%. En las pruebas realizadas, la EC50 del adsorbente evaluado para la aflatoxina en broilers fue 0,1-0,2% según el parámetro considerado; próxima a 0,5% para la ocratoxina en gallinas ponedoras y zearalenona en lechones; y 0,2% para fumonisina B₁ en ratas.

7. La EC50 determinada según la presencia de residuos de micotoxinas o sus derivados metabólicos en los productos o tejidos animales fue superior a 0,5% para la ocratoxina en gallinas ponedoras, y entre 0,1-0,2% para el adsorbente testado en lechones consumiendo el pienso contaminado con zearalenona

Los resultados y conclusiones descritos en la presente memoria confirman la efectividad de los adsorbentes evaluados en el bloqueo parcial de micotoxinas en el tracto digestivo. El registro de parámetros no específicos de toxicidad y específicos de residuos de micotoxinas en los tejidos permite calcular aproximadamente una dosis efectiva de incorporación del adsorbente en el pienso.

CAPÍTULO 11

Referencias Bibliográficas

- Abdel-Raheim M. A. Meki, Sary Kh. Abdel-Ghaffar, Ibrahim El-Gibaly. 2001. Aflatoxin B1 Induces Apoptosis in Rat Liver: Protective Effect of Melatonin. *Neuroendocrinology Letters* 22:417–426.
- Abdel-Wahhab MA, Nada SA, Farag IM, Abbas NF, Amra HA. 1998. Potential protective effect of HSCAS and bentonite against dietary aflatoxicosis in rat: with special reference to chromosomal aberrations. *Nat Toxins*. 6(5):211-8.
- Abdel-Wahhab, M.A., Nada, S.A., and Khalil, F.A. 2002. Physiological and toxicological responses in rats fed aflatoxin-contaminated diet with or without sorbent materials. *Anim. Feed Sci. and Technol.*, 97: 209–219
- Abramson D, Mills JT, Boycott BR. 1983. Mycotoxins and mycoflora in animal feedstuffs in western Canada. *Can J Comp Med*. 1983 Jan;47(1):23-6.
- Al-Degs, Y., Khraisheh, M.A.M., Tutunji, M.F., 2001. Sorption of lead ions on diatomite and manganese oxides modified diatomite. *Water Res*. 35 (15), 3724–3728.
- Al-Ghouti, M.A., M. A. M. Khraisheh, S. J. Allen, M. N. Ahmad. 2003. The removal of dyes from textile wastewater: a study of the physical characteristics and adsorption mechanisms of diatomaceous earth. *Journal of Environmental Management*, 69(3): 229-238
- Allen, F. 1972. A natural earth that controls insects. *Organic Gardening and Farming* 19: 50-56.
- Angsubhakorn, S., Poomvises, P., Romruen, K., Newberne, P. 1981. Aflatoxicosis in horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 178:274-278.
- Anton, A.; Lisazo, J. 2001. Hongos y micotoxinas. Fundación Iberica para la Seguridad Alimentaria. Tres Cantos (Madrid).
- AOAC. 2000. Association of Official Analytical Chemist International. *Official Methods of Analysis*. 17. Ed. Gaithersburg (MD). 1170 p.
- Apple, J.K., Dikeman, M.E., Simms, D.D., Kuhl, G., 1991. Effects of synthetic hormone implants, singularly or in combinations, on performance, carcass traits, and longissimus muscle palatability of Holstein steers. *J Anim Sci* 69: 4437-4448.

- Asrani, R. C. Katoch, V. K. Gupta, S. Deshmukh, N. Jindal, D. R. Ledoux, G. E. Rottinghaus and S. P. Singh. 2006. Effects of Feeding *Fusarium verticillioides* (Formerly *Fusarium moniliforme*) Culture Material Containing Known Levels of Fumonisin B1 in Japanese Quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Poultry Science* 85:1129–1135.
- Atroshi, F., Rizzo, A., Westermarck, T., Ali-Vehmas, T. 2002. Antioxidants nutrients and mycotoxins. *Toxicology* 180: 151-167.
- Avantaggiato, G., Havenaar, R., Visconti, A. 2004. Evaluation of the intestinal absorption of deoxynivalenol and nivalenol by an in vitro gastrointestinal model, and the binding efficacy of activated carbon and other adsorbent materials. *Food chem Toxicol.* 42: 817-24.
- Avantaggiato, G., Havenaar, R., Visconti, A. 2003. Assessing the zearalenone-binding activity of adsorbent materials during passage through a dynamic in vitro gastrointestinal model. *Food chem Toxicol.* 41: 1283-1290
- Avantaggiato G, Havenaar R, Visconti A. 2007. Assessment of the multi-mycotoxin-binding efficacy of a carbon/aluminosilicate-based product in an in vitro gastrointestinal model. *J Agric Food Chem.* 55(12):4810-9.
- Barug, D., Van Egmond, H., López-García, R., Van Osenbruggen, T., Visconti, A. 2004. Meeting the mycotoxin menace. Wageningen Academic Publishers. The Netherlands.
- Bennett, J. and Klich, M. 2003. Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* 16: 497-516.
- Biehl, M., Prelusky, D., Koritz, GD., Hartin, KE., Buck, WB., Trenholm, HL. 1993. Biliary excretion and enterohepatic cycling of zearalenone in immature pigs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 121: 152- 159.
- Blank, R., Rolf, JP., Sudekum, KH., Frohlich, A., Marquardt, R., Wolfram, S. 2003. Effects of Chronic Ingestion of Ochratoxin A on Blood Levels and Excretion of the Mycotoxin in Sheep. *J. Agric. Food Chem.* 51, 6899-6905.

- Bertke, EM. 1964. The effect of ingestion of diatomaceous earth in white rats: A subacute toxicity test. *Toxicology and Applied Pharmacology* 6 (3) 284-291
- Bertolotto, R. C. 2004. Uso de desechos de tierras filtrantes (diatomita + perlita) como insumo para dieta de novillo de engorda. Tesis de Grado. Universidad Católica de Temuco. Facultad de Acuicultura y Ciencias veterinarias. Escuela de Medicina Veterinaria. Temuco. Chile.
- Bondy, GS., Suzuki, C., Fernie, S., Armstrong, C., Hierlihy, S., Savard, M., Barker, M. 1997. Toxicity of fumonisin B1 to B6C3F1 mice: a 14-day gavage study. *Food Chem. Toxicol.* 35(10-11): 981-89.
- Borrell J, Gimeno G.2003. Micotoxinas en los alimentos: medidas de prevención y detoxificación. *Alimentación* 567:569-71.
- Bottalico, A. and Perrone, G. 2002. Toxigenic fusarium species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *Eur.J.Plant Pathol.*, 108:611-624.
- Braunberg RC, Gantt O, Barton C, Friedman L. 1992. In vitro effects of the nephrotoxins ochratoxin A and citrinin upon biochemical function of porcine kidney. *Arch Environ Contam Toxicol.* 22(4): 464-70.
- Breinholt, V., Arbogast, D., Loveland, P., Pereira, C., Dashwood, R., Hendricks, J., Bailey, G. 1999. Chlorophyllin chemoprevention in trout initiated by aflatoxin B1 bath treatment: an evaluation of reduced bioavailability vs target organ protective mechanisms. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 158: 141-151.
- Brown, R. L., Cleveland, T. E., Payne, G. A., Woloshuk, C. P., Campbell, K. W., and White, D. G. 1995. Determination of resistance to aflatoxin production in maize kernels and detection of fungal colonization using an *Aspergillus flavus* transformant expressing *Escherichia coli* b-glucuronidase. *Phytopathology* 85:983-989.
- Burns, R.P. and Dwivedi, P. 1986. The natural occurrence of ochratoxin A and its effects in poultry. *Pathology and Immunology. World Poultry Sci.* 42:48-62

- Burke JM; Coleman SW; Chase CC Jr; Riley DG; Looper ML; Brown MA. 2010. Interaction of breed type and endophyte-infected tall fescue on milk production and quality in beef cattle. *J. An Sc.* 88(8): 2802-11.
- Castaing, J. 1998. Uso de las arcillas en la alimentación animal. XIV Curso de Especialización: Avances en Nutrición y Alimentación Animal. FEDNA. España.
- Casteel SW, Turk JR, Cowart RP, Rottinghaus GE. 1993. Chronic toxicity of fumonisin in weanling pigs. *J Vet Diagn Invest.* 1993 Jul;5(3):413-7.
- CAST. 2003. Mycotoxins. Risks in plant, animal, and human systems. Task Force Report, No. 139 January 2003. Council for Agricultural Science and Technology, Ames, Iowa.
- Chang CF, Huff WE, Hamilton PB. 1979. A leucocytopenia induced in chickens by dietary ochratoxin A. *Poult. Sci.* 58: 555-558
- Coulombe, R.A. 1993. Symposium: Biological action of mycotoxins. *J. Dairy Sci.* 76:880-891.
- Council for Agricultural Science and Technology (CAST), 2003. Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems. Task Force Report, vol. 139. Council for Agricultural Science and Technology, Ames, Iowa, USA.
- Coppock RW, Mostrom MS, Sparling CG, Jacobsen B, Ross SC. 1990. Apparent zearalenone intoxication in a dairy herd from feeding spoiled acid-treated corn. *Vet.Hum.Toxicol.* 32(3): 246-8.
- Cotty, P. J., P. Bayman, D. Egel, and K. Elias. 1994. Agriculture, *Aspergillus* and aflatoxins, p. 1–27. In K. A. Powell, A. Renwick, and J. F. Peberdy (ed.), *The genus Aspergillus*. Plenum Press, New York, N.Y.
- Coker, D. 1998. Design of sampling plans for the determination of mycotoxins in foods and feeds. In *mycotoxin agriculture and food safety*. Ed. K.K Sinha and D. Bhatnagar. New York:Marcel Dekker Inc. p.109-133.
- Creppy, E.E., 2002. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol. Lett.* 127, 19–28.

- Cuero, R. and Ouellet, T. 2005. Metal ions modulate gene expression and accumulations of the mycotoxins aflatoxin and zearalenone. *J. appl. Microbiol.* 98, 598—605.
- Denli, M., F. Okan, F. Doran and T.C. İnal. 2005. Effect of dietary conjugated linoleic acid (CLA) on carcass quality, serum lipid variables and histopathological changes of broiler chickens infected with aflatoxin B1. *South African Journal of Animal Science* 35 (2).
- D'Mello, J.P.F., Macdonald, A.M.C., 1997. Mycotoxins. *Anim. Feed Sci. Technol.* 69, 155-166.
- D'Mello, J.P.F., Placinta, C.M., Macdonald, A.M.C. 1999. Fusarium mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Anim. Feed Sci Tech.* 80: 183-205.
- Desai K, Sullards MC, Allegood J, Wang E, Schmelz EM, Hartl M, Humpf HU, Liotta DC, Peng Q, Merrill AH Jr. Fumonisin and fumonisin analogs as inhibitors of ceramide synthase and inducers of apoptosis. 2002. *Biochim Biophys Acta.* 1585(2-3):188-92.
- Devegowda, G. and Murthy, T.N.K. 2005. Mycotoxins: Their effects in poultry and practical solutions. . In: *The mycotoxin Blue Book.* (D.E. Díaz, ed.) Nottingham University Press, pp. 25-56.
- Diaz, GJ. And Boermans HJ. 1994. Fumonisin toxicosis in domestic animals: a review. *Vet. Hum. Toxicol.* 36: 548-55.
- Díaz, D., W. Hagler, J. Blackwelder, J. Eve, B. Hopkins, K. Anderson, F. Jones and L. Whitlow. 2004. Aflatoxin binders II: Reduction of aflatoxin M1 in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed. *Mycopathologia* 157: 233-241.
- Diaz, D. Smith, T. 2005. Mycotoxins sequestering agents: practical tools for the neutralisation of mycotoxins. In: *The mycotoxin Blue Book.* (D.E. Díaz, ed.) Nottingham University Press. pp.323-340
- Döll S., Gericke2, S. Danicke, J. Raila, K.-H. Ueberschar, H. Valenta, U. Schnurrbusch, F. J. Schweigert and G. Flachowsky. 2005. The efficacy of a modified aluminosilicate as a detoxifying agent in Fusarium toxin contaminated maize containing diets for piglets. *J.Anim Phys Nutr.*89:342-58.

- Döll, S.; Danicke, S.; Valenta, H.; Flachowsky, G., 2004: In vitro studies on the evaluation of mycotoxin detoxifying agents for their efficacy on deoxynivalenol and zearalenone. *Archives of Animal Nutrition* 58, 311–324.
- Döll, S., S. Dänicke, K.-H. Ueberschär, H. Valenta, U. Schnurrbusch, M. Ganter, F. Klobasa and G. Flachowsky. 2003. Effects of graded levels of Fusarium toxin contaminated maize in diets for female weaned piglets. *Arch. Anim. Nutri.* 57(5): 311-334.
- Dwivedi, P.; Burns, R.B. 1984. Pathology of ochratoxicosis in young broiler chicks. *Res. Vet. Sci.*, 36, 92–103.
- Edrington TS, Kamps-Holtzapfle CA, Harvey RB, Kubena LF, Elissalde MH, Rottinghaus GE. 1995. Acute hepatic and renal toxicity in lambs dosed with fumonisin-containing culture material. *J Anim Sci.* 1995 Feb;73(2):508-15.
- Edrington TS, Kubena LF, Harvey RB, Rottinghaus GE. 1997. Influence of a superactivated charcoal on the toxic effects of aflatoxin or T-2 toxin in growing broilers. *Poult Sci.* 1997 Sep;76(9):1205-11.
- EMAN, 2010. (European Mycotoxin Awareness Network), Fact sheets on evaluation and risk issues. Citrinin: Natural occurrence.. Available online at: <http://www.mycotoxins.org/>
- Espada, L. 2008. Análisis de micotoxinas por ELISA en productos para alimentación animal. <http://www.inzar.net>.
- Etienne, M., and Dourmad, J.Y., 1994. Effects of zearalenone or glucosinolates in the diet on reproduction in sows: a review. *Livestock Production Science*, 40, 99–113
- European Food Safety Authority (EFSA). Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to ochratoxin A in Food. *EFSA J.* 2006, 365, 1–56.
- European Food Safety Authority (EFSA) Scientific Report. Review of mycotoxin-detoxifying agents used as feed additives: mode of action, efficacy and feed/food safety. EFSA 2009.

- Faixová Z, Š. Faix, R. Bořutová, L. Leng. 2007. Efficiency of Dietary Selenium to Counteract toxicity of Deoxynivalenol in Growing Broiler Chickens. *Acta Vet. Brno.* 76: 349-356.
- Fayrer-Hosken, R. Heusner, G. Hill, N. Caudle, A. 2008. Review on Effects of Fescue Grass Ergot Alkaloids in the Horse and Preliminary Study on Effect of Fescue Grass Ergot Alkaloid in the Stallion. *J. Equine Vet. Sc.* 28 (11): 666
- FAO. 1997. Worldwide regulations for mycotoxins 1995. A compendium. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. P.7-28
- Fernandez A, Verde MT, Gascon M, Ramos J, Gomez J, Luco DF, Chavez G. 1994. Variations of clinical biochemical parameters of laying hens and broiler chickens fed aflatoxin-containing feed. *Avian Pathol.* 1994 Mar;23(1):37-47.
- Friend, DW., Thompson, BK. Trenholm, HL., Boermans, HJ., Hartin, KE., Panich, PL. 1992. Toxicity of T-2 toxin and its interaction with DON when fed to young pigs. *J. Anim. Sci.* 72: 703-11.
- Galvano, F., Piva, A., Rietieni, A., Galvano, G. 2001. Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins: a review. *J. Food prot.* 64:120-131.
- Galvano, F., Rietieni, A., Piva, G., Pietri, A. 2005. Mycotoxins in human food chain. In: *The mycotoxin Blue Book.* (D.E. Díaz, ed.) Nottingham University Press, pp. 187-224.
- Gelderblom, WC., K. Jaskiewicz, W. F. O. Marasas, P. G. Thiel, R. M. Horak, R. Vleggaar, and N. P. J. Kriek. 1988. Fumonisin- novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme* Appl. *Environ. Microbiol.* 54:1806–1811.
- Gelderblom WCA, Kriek NPJ, Marasas WFO, Thiel PG. 1991. Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B1, in rats. *Carcinogenesis* 12:1247–1251.
- Gelderblom WC, Smuts CM, Abel S, Snyman SD, Van der Westhuizen L, Huber WW, Swanevelder S. 1997. Effect of fumonisin B1 on the levels and fatty acid composition of selected lipids in rat liver in vivo. *Food Chem Toxicol.* 35(7): 647-56.

- Gentles, A.; Smith, E.E.; Kubena, L.F.; Duffus, E.; Johnson, P.; Thompson, J.; Harvey, R.B.; Edrington, T.S. 1999. Toxicological evaluations of cyclopiazonic acid and ochratoxin A in broilers. *Poult. Sci.*, 78, 1380–1384.
- Gimeno, A. 1999. Revisión genérica del problema de los hongos y las micotoxinas en la alimentación animal. pp.1-153. en www.mycotoxin.com(consultado 15-06-2005).
- Gimeno, A.y Martins, M.L. 2003. Micotoxinas y Micotoxicosis en animales y humanos. Special nutrients, INC. Talleres gráficos D.E.L S.R.L. Buenos Aires.
- Gómez, G., Sidler, S., Escobero, S., Lizardo, R. 2003. Empleo de arcillas como adsorbentes de micotoxinas en alimentación. *Mundo Ganadero*. 155: 22-29.
- González, F. and Yu, A. 2006. Cytochrome P450 and xenobiotic receptor humanized mice. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 46: 41-64.
- Guthrie, LD., 1979. Effects of aflatoxin in corn on production and reproduction in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 62(suppl.1): 134-142.
- Hamilton, P., Huff, W., Harris, J. and Wyatt, R.D. 1982. natural occurrence of ochratoxicosis in poultry. *Poult. Sci.* 61: 1832-1836
- Harrison LR, Colvin BM, Greene JT, Newman LE, Cole JR Jr. 1990. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. *J Vet Diagn Invest.* 2(3):217-21.
- Harvey RB, Elissalde MH, Kubena LF, Weaver EA, Corrier DE, Clement BA.1992. Immunotoxicity of ochratoxin A to growing gilts. *Am J Vet Res.* 53(10):1966-70.
- Harvey, R.B., Kubena, L.F., Elissalde, M.H., Phillips, T.D. 1993. Efficacy of zeolitic ore compounds on the toxicity of aflatoxin to growing broiler chickens. *Avian diseases.* 37: 67-73.
- Harvey, R.B., Edrington, T.S., Kubena, L.F., Elissalde, M.H., Casper, H.H., Rottinghaus, G.E., Turk, J.R., 1996. Effects of dietary fumonisin B1-containing culture material,

- deoxynivalenol-contaminated wheat or their combination on growing barrows. *Am. J. Vet. Res.* 57, 1790±1794.
- Helferich, W.G., Garrett, W.N., Hsieh, D.P.H., Baldwin, R.L., 1986. Feedlot performance and tissue residues of cattle consuming diets containing aflatoxins. *J. Anim. Sci.* 62, 691–696.
- Hinton, DM, Bacon, CW. 1995. *Enterobacter cloacae* is an endophytic symbiont of corn. *Mycopathologia.* 1995;129(2):117-25.
- Hoehler, D., and R. R. Marquardt. 1996. Influence of vitamins E and C on the toxic effects of ochratoxin A and T-2 toxin in chicks. *Poult. Sci.* 75:1508–1515.
- Hussein, H. S., and J. M. Brasel. 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* 167:101–134.
- Huwig, A., Freimund, S., Kappeil, O., Dutler, H. 2001. Mycotoxin detoxification on animal feed by different adsorbents. *Tox. Lett.* 122: 179-188.
- Jand, S.K., Singh, P.P., Singh, A., 1995. Observations on occurrence of poultry diseases associated with mycotoxins in feed. *Ind. J. Anim. Sci.* 65, 1063–1067.
- Javed T, Richard JL, Bennett GA, Dombrink-Kurtzman MA, Bunte RM, Koelkebeck KW, Côté LM, Leeper RW, Buck WB. 1993. Embryopathic and embryocidal effects of purified fumonisin B1 or *Fusarium proliferatum* culture material extract on chicken embryos. *Mycopathologia.* 123(3):185-93.
- JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). 2001. Fifty-sixth meeting, 6–15 February, Geneva.
- Jones, F., Genter, M., Hagler, W., Hansen, J., Mowrey, B., Poore, M., Whitlow, L. 1994. Understanding coping with effects of mycotoxins in livestock feed forage. Published by North Carolina Cooperative Extension Service (North Carolina State University, Raleigh, NC.). Electronic Publication DRO-29, December, number AG-523, p. 1-31.
- <http://www.ces.ncsu.edu/disaster/drought/dro-29.html> (consultado 06-06-07).

- Jørgensen, K. Rasmussen, G. and Thorup, I. 1996. Ochratoxin A in Danish cereals 1986-1992 and daily intake by the Danish population. *Food Addit. Contam.* 13: 95-104.
- Jouany, J.P., Diaz, D. 2005. Effects of mycotoxins in ruminants. In: *The mycotoxin Blue Book*. (D.E. Díaz, ed.) Nottingham University Press, pp. 295-322.
- Kennedy, D., Hewitt, S.A., McEvoy, J.D., Currie, J.W., Cannavan, A., Blanchflower, W.J., Elliot, C.T. 1998. Zeranone is formed from fusarium ssp. toxins in cattle in vivo. *Food Addit. Cont.* 15: 393-400.
- King, R.R., McQueen, R.E., Levesque, D., Greehalgh, R. 1984. Transformation of DON (Vomitoxin), by rumen microorganisms. *J. Agric. Food Chem.* 32:1181-83.
- Klein, P. J., Buckner, R., Kelly, J., and Coulombe, R. A., J. 2000. Biochemical Basis for the Extreme Sensitivity of Turkeys to Aflatoxin B1. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 165, 45–52
- Klich M, Mendoza C, Mullaney E, Keller N, Bennett JW. 2001. A new sterigmatocystin-producing *Emericella* variant from agricultural desert soils. *Syst Appl Microbiol.* 2001 Apr;24(1):131-8
- Kubena, L. F., R. B. Harvey, W. E. Huff, D. E. Corrier, T. D. Phillips, and G. E. Rottinghaus. 1990. Efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the toxicity of aflatoxin and T-2 toxin. *Poult. Sci.* 69:1078–1086.
- Kryukov VS, Krivstov VI, Krupin V and Polania S. 1992. Effect of aflatoxin on protein utilization by broilers. *Pticeprvodstvo* 3:13–15.
- Kuiper-Goodman, T. and Scott, P.M. 1989. Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomed. Environ. Sci.* 2:179-248
- Kuronic, Z. 1998. Diatomaceous earths, a group of natural insecticides. Review. *J. Stored prod. Res.* 34(2-3): 87-97
- Lemke SL, Mayura K, Reeves WR, Wang N, Fickey C, Phillips TD. 2001. Investigation of organophilic montmorillonite clay inclusion in zearalenone-contaminated diets using the mouse uterine weight bioassay. *J Toxicol Environ Health A.* 62: 243-58.

- Leeson, S., Diaz, G., Summers, J.D., 1995. Aflatoxins. In: Leeson, S., Diaz, G., Summers, J.D. (Eds.), *Poultry Metabolic Disorders and Mycotoxins*. University Books, Canada, Ont., pp. 248–279.
- Lindemann, M., Blodgett, D., Harper, A., Kornegay, E., Doerr, J. 1997. Appraisal of the value of selected clays and minerals in diets with and without aflatoxin-contaminated maize fed to young pigs. *J. anim. Feed Sci.* 6: 507-519.
- Liu, B.H., Yu, F.Y., Wu, T.S., Li, S.Y., Su, M.C., Wang, M.C., Shih, S.M. 2003. Evaluation of genotoxic risk and oxidative AND damage in mammalian cells exposed to mycotoxins patulin and citrinin. *Toxicol Appl. Pharmacology.* 191(3): 255-263.
- Lopez de Cerain, A., Jimenez, AM, Ezpeleta, O., Bello, J. 2000. Efectos tóxicos de la ocratoxina A. *Revista de toxicología*, 17: 61-69.
- Magan, N.; Olsen, M. 2004. *Mycotoxins in Food - Detection and Control*. (pp. 357). Woodhead Publishing. Online version available at:
<http://www.knovel.com/knovel2/Toc.jsp?BookID=1247&VerticalID=0>
- Malekinejad H, Akbari P, Allymehr M, Hobbenaghi R, Rezaie A. 2010. Cyclopiazonic acid augments the hepatic and renal oxidative stress in broiler chicks. *Hum Exp Toxicol.* Sep 27. [Epub ahead of print]
- Marasas, WF., RT. Riley, KA. Hendricks, VL. Stevens, TW. Sadler, J. Gelineau-van Waes, SA. Missmer, J. Cabrera, O. Torres, WC. Gelderblom, J. Allegood, C. Martínez, J. Maddox, J. D Miller, L Starr, M. C Sullards, A VRoman, KA. Voss, E Wang and AH. Merrill, Jr. 2004. Fumonisin Disrupt Sphingolipid Metabolism, Folate Transport, and Neural Tube Development in Embryo Culture and In Vivo: A Potential Risk Factor for Human Neural Tube Defects among Populations Consuming Fumonisin-Contaminated Maize. *J. Nutr.* 134: 711-716.
- Marin, D., I. Taranu, R. P. Bunaciu, F. Pascale, D. S. Tudor, N. Avram, M. Sarca, I. Cureu, R. D. Criste, V. Suta, and I. P. Oswald. 2002. Changes in performance, blood parameters,

- humoral and cellular immune responses in weanling piglets exposed to low doses of aflatoxin. *J. Anim. Sci.* 80:1250–1257.
- Malekinejad, H., Maas-Bakker, RF., Fink-Gremmels, J. 2005. Bioactivation of zearalenone by porcine hepatic biotransformation. *Vet. Res.* 36(5-6): 799-810.
- Maresca M, Yahi N, Younès-Sakr L, Boyron M, Caporiccio B, Fantini J. 2008. Both direct and indirect effects account for the pro-inflammatory activity of enteropathogenic mycotoxins on the human intestinal epithelium: stimulation of interleukin-8 secretion, potentiation of interleukin-1beta effect and increase in the transepithelial passage of commensal bacteria. *Toxicol Appl Pharmacol.* 228(1):84-92
- Marquardt, R. and Frohlich, A. 1992. A review on recent advances in understanding ochratoxicosis. *J. Anim.Sci.* 70: 3968-3988.
- Martins HM, Mendes Guerra MM, d'Almeida Bernardo FM. 2007. Occurrence of aflatoxin B1 in dairy cow feed over 10 years in Portugal (1995-2004). *Rev Iberoam Micol.* 24(1):69-71.
- Merrill AH Jr, van Echten G, Wang E, Sandhoff K. 1993. Fumonisin B1 inhibits sphingosine (sphinganine) N-acyltransferase and de novo sphingolipid biosynthesis in cultured neurons in situ. *J Biol Chem.* 1993 Dec 25;268(36):27299-306
- Mikami, O., Yamamoto, S. Yamanaka, N. Nakajima, Y. 2004. Porcine hepatocytes apoptosis and reduction of albumin secretion induced by deoxynivalenol. *Toxicology* 15: 241-249.
- Miller, D.M., Wilson, D.M. 1994. Veterinary diseases related to aflatoxins. in: Eaton, D.L and Groopman, J.D. (eds) *The toxicology of aflatoxins.* pp. 347-364. Academy Press Inc. San Diego-New York.
- Nelson, P.E, Desjardin, A.E, Plattner, R.D. 1993. Fumonisin, mycotoxins produced by *Fusarium* Species: Biology, Chemistry and significance. *Ann. Rev. Phytopathol.* 31: 233-252.
- Newman, K.E, Raymond, S. 2005. Effects of mycotoxins in horses. . In: *The mycotoxin Blue Book.* (D.E. Díaz, ed.) Nottingham University Press, pp.57-76.

- Nikaido, Y., Yoshizawa, K., Danbara, N., Tsujita-Kyutoku, M., Yuri, T., Uehara, N., Tsubara, A., 2004. Effects of maternal xenoestrogen exposure on development the reproductive tract and mammary gland in female CD-1 mouse offspring. *Reprod. Toxicol* 18: 803-811.
- Obremski K, Gajecka M, Zielonka L, Jakimiuk E, Gajecki M. 2005. Morphology and ultrastructure of small intestine mucosa in gilts with zearalenone mycotoxicosis. *Pol J Vet Sci.*;8(4):301-7.
- Official Journal of the European Communities. Commission Directives 2002
- Official Journal of the European Communities. Commission Directives 2003/100/CE of 31 October.
- Ogido, R., Olivera, CA., Ledoux, D., Rottinghaus, G., Correa, B., Butkeraitis, P., Reis, T., Gonzales, E., Albuquerque, R. 2004. Effects of prolonged administration of AFB1 and FB1 in laying japanese quail. *Poultry Sci.* 83: 1953-58.
- Olsen, M. and Kiessling, KH. 1983. Species differences in zearalenone-reducing activity in subcellular fractions of liver from female domestic animals. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 52(4):287-91.
- Olsen, M., 1989. Metabolism of zearalenone in farm animals. In: Chelkowski, J. (Ed.), *Fusarium: Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity*. Elsevier, Amsterdam, pp. 167–177.
- Oswald, IP., Desautels, C., Laffitte, J., Fournout, S., Peres, SY., Odin, M., Le Bars, P., Le Bars, J., Fairbrother, JM. 2003. The mycotoxin FB1, increases intestinal colonization by pathogenic *E. Coli* in pigs. *Appl. Env. Microbiol.* 69: 5870-74.
- Osweiler GD, Kehrl ME, Stabel JR, Thurston JR, Ross PF, Wilson TM.1993. Effects of fumonisin-contaminated corn screenings on growth and health of feeder calves. *J Anim Sci.* 71(2):459-66.
- Patterson, R., and Young, LG. 1993. Efficacy of HSCAS screening and dilution in reducing the effects of mould contaminated corn in pigs. *Can. J. Anim. Sci.* 73: 615-622.

- Pimpukdee, K., Kubena, L., Bauley, C., Huebner, H., Afriyie-Gyawu, E., Phillips, T. 2004. Aflatoxin-induced toxicity and depletion of hepatic vitamin A in Young broiler chicks: protection of chicks in the presence of low levels of novasilplus in the diet. *Poult.Sci.* 83: 737-744.
- Placinta, CM., D'Mello, JP., Macdonal, AM. 1999. A review of worldwide contamination of cereals grains and animal feed with fusarium mycotoxins. *Anim. Feed Sci.Tech.* 78:21-37.
- Plumlee, K.H and Galey, FD. 1994. Neurotoxic mycotoxins: a review of fungal toxins that cause neurological disease in large animals. *J Vet. Internal medicine* 8, 49-54.
- Polan, C.E., J. Hayes and T. Campbell. 1974. Consumption and fate of aflatoxin B1 by lactating cows. *J. Agric. Food Chem.* 22: 635-638.
- Polak M, Gajecki M, Kulik T, Łuczyński MK, Obremski K, Góra M, Gajecka M, Jakimiuk E, Zielonka Ł. 2009. The evaluation of the efficacy of sodium carbonate as zearalenone destructor in feeding stuffs. *Pol J Vet Sci.*;12(1):103-11.
- Polak M, Gajecka M, Jakimiuk E, Obremski K, Gajecki M, Smoczyński L, Luczyński M, Góra M, Baranowski M, Zielonka L, Zwierzchowski W. 2004. Metabolic profile of pigs fed feed containing zearalenone destructor. *Pol J Vet Sci.*7(3):187-91
- Qiu M, Liu X, Wang Y, Zhang, C. 2001. Survey on the fumonisins intake and the urinary Sa/So ratio of people suffered from a high incidence of esophageal cancer. *Journal of hygiene research (Wei Sheng Yan Jiu)* 30, (6), 365-7.
- Raju, M. and Devegowda, G. 2000. Influence of modified glucomannan on performance and organ morphology, serum biochemistry and hematology in broilers exposed to individual and combined mycotoxicosis (aflatoxin, ochratoxin and T-2 toxin). *Br.Poult.Sci.* 41: 640-650.
- Ramos, A. y Hernández, E.1997. Adsorción in vitro de aflatoxinas mediante la utilización de compuestos adsorbentes: montmorillonita. *Rev.Iberoam Micol* 14:72-77.

- Ravi Rastogi, Arvind Kumar Srivastava and Anil Kumar Rastogi. 2001. Biochemical Changes Induced in Liver and Serum of Aflatoxin B1-Treated Male Wistar Rats: Preventive Effect of Picroliv. *Pharmacology & Toxicology* 2001, 88, 53–58
- Riley, R. And Pestka, J.2005. Mycotoxins:metabolism, mechanisms and biochemical markers. In: *The mycotoxin Blue Book*. (D.E. Díaz, ed.) Nottingham University Press, pp. 279-294
- Riley, R. T., An, N. Y., Showker, J. L., Yoo, H. S.,Norred,W. P., Chamberlain, W.J., Wang, E., Merrill, A.H. Jr, Motelin, G., Beasley, V.R., and Haschek, W.M., 1993. Alteration of tissue and serum sphinganine to sphingosine ratio: an early biomarker of exposure to fumonisin-containing feeds in pigs. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 118, 105- 112
- Riley, R. and Showker, J.1991. The mechanism of patulin's cytotoxicity and the antioxidant activity of indole tetramic acids. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 109: 108-126
- Sagaram, U.S., Kolomiets, M., Shim, W.B.2006. Regulation of Fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*-Maize system. *Plant Pathol J.* 22(3): 203-210
- Samapundo, S., Devlieghere, F., De Meulenaer, B., Geeraerd, A.H., Van Impe, J.F., Debevere, J.M., 2005. Predictive modelling of the individual and combined effect of water activity and temperature on the radial growth of *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* on corn. *Int. J. Food Microbiol.* 105, 35–52.
- Sanchis, V.; Marin. S.; Ramos, A.J. 2000. Control de micotoxinas emergentes. Situación legislativa actual. *Rev. Iberoam. Micol.* 17, S69-S75.
- Santin, E. 2005. Mould growth and mycotoxin production. In: *The mycotoxin Blue Book*. (D.E. Díaz, ed.) Nottingham University Press, pp.225-234.
- Schell, T.C., Lindemann, M.D, Kornegay, E.T and Blodgett, D.J. 1993. Effects of feeding aflatoxin-contaminated diets with and without clay to weanling and growing pigs on performance, liver function and mineral metabolism. *J. Anim. Sci.* 71:1209-1218.

- Schroeder JJ, Crane HM, Xia J, Liotta DC, Merrill AH Jr. 1994. Disruption of sphingolipid metabolism and stimulation of DNA synthesis by fumonisin B1. A molecular mechanism for carcinogenesis associated with *Fusarium moniliforme*. *J Biol Chem.* 269(5):3475-81.
- Seeling K, Boguhn J, Strobel E, Dänicke S, Valenta H, Ueberschär KH, Rodehutschord M. 2006. On the effects of *Fusarium* toxin contaminated wheat and wheat chaff on nutrient utilisation and turnover of deoxynivalenol and zearalenone in vitro (Rusitec). *Toxicol In Vitro.* 2006 Aug;20(5):703-11.
- Scott, P.M. 1996. Effects of processing and detoxification treatment on ochratoxin A: Introduction. *Food Addit.Cont.* 13 (suppl): 19-22.
- Sharma, R.P. 1993. Immunotoxicity of mycotoxins. *J.Dairy Sci.* 76:892-897.
- Shetty PH, Hald B, Jespersen L. 2007. Surface binding of aflatoxin B1 by *Saccharomyces cerevisiae* strains with potential decontaminating abilities in indigenous fermented foods. *Int J Food Microbiol.* 113(1):41-6.
- Shier, WT., Shier, AC., Xie, W., Mirocha, CJ. 2001. Structure-activity relationships for human estrogenic activity in zearalenone mycotoxins. *Toxicol.* 39 (9): 1435-8.
- Smith, E.E., Kubena, L.F., Braithwaite, R.B., Harvey, R.B., Phillips, T.D., Reine, A.H., 1992. Toxicological evaluation of aflatoxin and cyclopiazonic acid in broiler chickens. *Poult. Sci.* 71, 1136–1144.
- Smith, T. 2005. Update: Mycotoxins and adsorbents. *Feed International* 26 (4), 15-21.
- Smith, T.K., G. Díaz and H.V. Swamy. 2005. Current concepts in mycotoxicoses in swine. In: *The mycotoxin Blue Book.* (D.E. Díaz, ed.) Nottingham University Press, pp. 235-248.
- Surai, P. and Dvorska, J. 2005. Effects of mycotoxins on antioxidant status and immunity. In: *The mycotoxin Blue Book.* (D.E. Díaz, ed.) Nottingham University Press, pp.93-137
- Stove, SD., Paskalev, M., Macdonald, S., Mantle, PG. 2002. Experimental one year ochratoxin A toxicosis in pigs. *Exp. Toxicol. Pathol.* 53: 481-487.

- Swamy T. K. Smith, E. J. MacDonald, H. J. Boermans†, and E. J. Squires. 2002. Effects of feeding a blend of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on swine performance, brain regional neurochemistry, and serum chemistry and the efficacy of a polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent. *J. Anim. Sci.* 80:3257–3267
- Sweeney, M. J. and Dobson, A.D. 1998. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *Int. J. food Microbiol.* 43, 141-58.
- THE COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. Commission Regulation (EC) No. 1881/2006-303-L364/17. Brussels: Official Journal European Union, 2006. P 13-14
- THE COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. Commission Regulation (EC) No. L41/12.12/02/02. Reg (EC) No. 257/2002.
- Torres-Sánchez L, López-Carrillo L. 2010. Fumonisin intake and human health. *Salud Publica Mex.* 52(5):461-7.
- Tran S.; A Auvergne; G Benard; J D Bailly, Tardieu, D., Babile, R., Guerre, P. 2005. Chronic Effects of Fumonisin B1 on Ducks Poultry Science 84- 1. 22-28
- Van Heugten, E., J. W. Spears, M. T. Coffey, E. B. Kegley, and M. A. Qureshi. 1994. The effect of methionine and aflatoxin on immune function in weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 72:658–664.
- Verma, J., Swain, BK., Johri, TS. 2002. Effect of various levels of aflatoxin and ochratoxin A and combination thereof on protein and energy utilisation in broilers. *J. Sci. Food Agric.* 82: 1412-17.
- Visconti A, Marasas WFO, Miller JD, Riley R. Micotoxins of growing interest. Conference on Mycotoxins. Tunisia:Trid Joint FAO/WHO/UNEP International, Tunis; 1999.p.2,4,7.
- Wang, E., Norred, W., Bacon, C., Riley, R. and Merrill, A. 1991. Inhibition of Sphingolipid biosynthesis by fumonisins. *J. Biol. Chem.* 266: 14486-14490.

- Weaver, G.A., Kurtz, H.J., Behrens, J.C., Robison, T.S., Seguin, B.E., Bates, F.Y., Mirocha, C.J., 1986. Effect of zearalenone on the fertility of virgin dairy heifers. *Am. J. Vet. Res.* 47, 1395-1397.
- Winfree, R. and Allred, A. 1992. Bentonite Reduces Measurable Aflatoxin B1 in Fish Feed. *Progressive fish-culturist* 54: 157-162.
- World Health Organization. World Health Organisation.WHO. (2002) Evaluation of certain mycotoxins in food. Fifty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, WHO Technical Report Series 906, Geneva, Switzerland, February 2002; p. 70.
- Wu F, Munkvold GP.2008. Mycotoxins in ethanol co-products: modeling economic impacts on the livestock industry and management strategies. *J Agric Food Chem.* 2008 Jun 11;56(11):3900-11.