



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE UN SECUESTRANTE DE
MICOTOXINAS EN VACAS LECHERAS SOBRE LOS NIVELES DE
AFLATOXINA M₁ EN LECHE Y ORINA**

María Alejandra Capelli Micheltoarena

TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

URUGUAY

2019



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE UN SECUESTRANTE DE
MICOTOXINAS EN VACAS LECHERAS SOBRE LOS NIVELES DE
AFLATOXINA M₁ EN LECHE Y ORINA**

María Alejandra Capelli Micheltorena

Dra. MSc Carmen García y Santos
Directora de Tesis

Dr. PhD Gonzalo Suárez
Co-director

Dr. PhD Franklin Riet-Correa
Co-director

2019

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE

DEFENSA DE TESIS

**Silvana Carro; DMV, MSc, PhD
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República – Uruguay**

**Elena de Torres; DMV, MSc
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República – Uruguay**

**Silvana Vero; DMV, MSc, PhD
Facultad de Química
Universidad de la República – Uruguay**



UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA
URUGUAY



Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay

Programa de Posgrados

**FACULTAD DE VETERINARIA
Programa de Posgrados**

**ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS
DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL**

**" EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE UN SECUESTRANTE DE
MICOTOXINAS EN VACAS LECHERAS SOBRE LOS NIVELES DE
AFLATOXINA M1 EN LECHE Y ORINA"**

Por: Dra. María Alejandra Capelli Micheltoarena

Directora de Tesis: Dra. Carmen García y Santos

**Codirectores de Tesis: Dr. Gonzalo Suárez
Dr. Franklin Riet-Correa**

Tribunal

Presidente: Dra. Silvana Carro

Segundo Miembro: Dra. Elena De Torres

Tercer Miembro: Dra. Silvana Vero

Fallo del Tribunal:

APROBADA CON MENCIONES

Salón de Posgrado

Martes 17 de diciembre de 2019

El Fallo de aprobación de la Tesis puede ser: Aprobada (corresponde a la nota BBB- en el Acta), o Aprobada con Mención (corresponde a la nota SSS- 12 en el Acta)

hcb

AGRADECIMIENTOS

A Carmen y Gonzalo, por brindarme su apoyo incondicional y su orientación a lo largo de todo el trabajo.

A mis compañeros y amigos de Toxicología, por su colaboración y sobre todo por bancarme en el día a día.

A Mariana e Irene sin las cuales no hubiera sido posible llevar a cabo las actividades de campo.

A Elena De Torres, Maximiliano Pastorini y todos los funcionarios del Campo Experimental N° 2 de Facultad de Veterinaria por su colaboración en el trabajo de campo.

A los integrantes del Área de Farmacología por su apoyo y ayuda en las actividades de Laboratorio.

A Franklin Riet – Correa por su contribución en este proyecto.

A Luis Pérez y a Juan Pablo Ortega de ITPSA.

A CIDEC a través del Proyecto Planisa por el apoyo económico brindado.

A Ariel por apoyarme e impulsarme a superarme y seguir adelante en el camino.

A Lucas por seguir prestándome un poquito de su tiempo.

ÍNDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	2
INTRODUCCIÓN.....	3
ANTECEDENTES ESPECÍFICOS.....	3
Hongos toxicogénicos	3
Micotoxinas	4
Aflatoxinas	5
Metabolismo y efectos tóxicos de las aflatoxinas.....	6
Reglamentación de las aflatoxinas.....	6
Análisis, control y prevención de aflatoxinas.....	7
Prevención y control de micotoxinas.....	8
Caracterización del problema	10
HIPÓTESIS.....	11
OBJETIVOS	11
OBJETIVO GENERAL	11
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
Estrategia de la investigación.....	12
MATERIALES Y MÉTODOS	12
Diseño experimental.....	12
Animales experimentales.....	12
Alimentos y determinaciones.....	14
Producción de hongos y cuantificación de micotoxinas	14
Dieta de las vacas.....	15
Inclusión de aflatoxinas y secuestrante a la dieta.....	15
Tratamientos y períodos.....	16
Animales y determinaciones	16
Análisis producción láctea	17
Toma de muestras de orina.....	17
Determinación de perfiles metabólicos	17
Cuantificación de aflatoxina M ₁	18
Matriz leche	18
Matriz orina.....	19
Análisis estadísticos	19
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
Alimentos y determinaciones.....	21

Producción de hongos y cuantificación de micotoxinas	21
Animales y determinaciones	22
Evaluación de consumo de alimentos.....	22
Análisis de producción láctea.....	22
Perfiles Metabólicos	25
Balance energético	25
Funcionalidad hepática	26
Balance proteico.....	27
Balance iónico	28
Determinación de aflatoxinas M ₁	29
Matriz leche	29
Matriz orina.....	30
CONCLUSIONES.....	32
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
ANEXOS.....	38

RESUMEN

En el presente trabajo se estudió *in vivo* el efecto de la adición de un secuestrante de micotoxinas sobre los niveles de aflatoxina M₁ excretados por leche y orina y el impacto productivo sobre los animales. Con este fin, se realizó un ensayo de campo que consistió en administrar a vacas lecheras en producción un alimento contaminado artificialmente con aflatoxinas y con un agente secuestrante de micotoxinas. En el Laboratorio de Toxicología de Facultad de Veterinaria se cultivó una cepa toxicogénica de *Aspergillus parasiticus* para obtener aflatoxinas. Posteriormente estas toxinas fueron administradas junto con maíz molido a los animales. Doce vacas fueron asignadas aleatoriamente a tres tratamientos, un tratamiento recibió 60 µg/kg de aflatoxina B₁ durante 10 días, otro recibió la misma dosis de aflatoxina más la adición del agente secuestrante y el tercero fue utilizado como control. Los datos fueron analizados con modelo lineal mixto, utilizando para la simplificación del modelo el criterio de Akaike. Todos los análisis fueron realizados con el software R, versión 3.6.0. En las condiciones del ensayo, con una dosis de total de 1140 µg de aflatoxina B₁ al día, los parámetros productivos no se vieron afectados. La aflatoxina administrada a los animales fue detectada en leche y orina 12 horas posteriores a la primera dosificación y los niveles se elevaron entorno a los 15 µg/L, disminuyendo a niveles inferiores a 0,5 µg/L 72 horas posteriores a la última dosificación. El agregado de secuestrante disminuyó en un 43% la excreción de aflatoxina M₁ en leche.

SUMMARY

In this work, the effect of the addition of a mycotoxin sequestering agent on the levels of aflatoxin M₁ excretion in milk and urine and the impact on animal production was *in vivo* studied. For this, a field trial that consisted of administering food artificially contaminated with aflatoxins and with mycotoxins sequestering agent to dairy cows in production was carried out. A toxicogenic strain of *Aspergillus parasiticus* was cultured in the Toxicology Laboratory of the Veterinary School to obtain aflatoxins. Subsequently, these toxins were administered together with ground corn to the animals. Twelve cows were randomly assigned to three treatments, one treatment received 60 µg/kg of aflatoxin B₁ for 10 days, another received the dose of aflatoxin plus the addition of the sequestering agent and the third was used as a control. The data were analyzed with the mixed linear model, using the Akaike criteria for the simplification of the model. All analysis were performed with R software, version 3.6.0. The productive parameters were not affected under the test conditions, with a total dose of 1140 µg of aflatoxin B₁ per day. Aflatoxin administered to animals was detected in milk and urine 12 hours after the first dosage, and the levels rose to around 15 µg/L and decreased to below 0.5 µg/L 72 hours after the last dosage. The addition of a sequestering agent decreased the excretion of aflatoxin M₁ in milk by 43%.

INTRODUCCIÓN

En Uruguay la lechería constituye un rubro agroindustrial muy importante ocupando el cuarto lugar de las exportaciones agropecuarias. Según el último Censo Agropecuario en el año 2018 se produjeron comercialmente 2.173 millones de litros de leche (MGAP-DIEA, 2019). Este volumen que se ha ido incrementando en las últimas décadas, se ve reflejado en el aumento de las exportaciones de leche y subproductos. Para sostener este incremento, ha sido necesario modificar la alimentación de la vaca lechera, fundamentalmente en los meses de menor producción de forraje, donde es necesario utilizar mayor cantidad de concentrados. Actualmente, la vaca lechera en producción recibe mayor variedad de alimentos, dejando de ser la pastura el principal componente de su dieta. Es así que, la alimentación de estos animales se basa en un 60% de alimentos concentrados y reservas forrajeras y el 40% restante en base pastoril (Chilibroste et al. 2005).

Los alimentos concentrados son variados, como granos que aportan energía, harinas de oleaginosas que aportan proteínas, siendo estos tipos de alimentos de origen vegetal, sustratos ideales para el crecimiento de hongos toxicogénicos (Ellis et al. 1991; Coulombe, 1993; Yiannikouris & Jouany, 2002). Muchos de los hongos que allí se desarrollan suelen ser productores de micotoxinas, metabolitos tóxicos que pueden enfermar o matar a los animales que las consumen (Swanson, 1987). La FAO (2004) estimó que, el 25% de las cosechas de cereales y oleaginosas en el mundo están contaminados con diferentes micotoxinas. Por ello es fundamental prevenir el crecimiento de estos hongos toxicogénicos y la producción de micotoxinas, debido a que las condiciones ambientales pueden favorecer ambas situaciones (Coulombe, 1993). La relevancia de estas toxinas, se destaca particularmente en la lechería, donde las micotoxinas son importantes ya que además de provocar perjuicios a nivel de la salud animal, pueden excretarse metabolitos a través de la leche pasando a ser un riesgo potencial para la salud humana (Moss, 1996). Para disminuir el riesgo de la exposición a las micotoxinas, una alternativa es reducir la disponibilidad de estas en los animales. Uno de los métodos empleados con este fin es la utilización de secuestrantes de micotoxina en los alimentos, estas sustancias disminuyendo la biodisponibilidad de las toxinas en los animales que las consumen (Devegowda & Murthy, 2005).

ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

Hongos toxicogénicos

La colonización por hongos puede darse durante toda la cadena agroindustrial de los alimentos apareciendo durante el cultivo, la cosecha o en la etapa de almacenamiento de los alimentos. Los restos vegetales o rastrojos que quedan en

el campo después de la cosecha suelen ser fuente de contaminación para futuros cultivos por la presencia de esporas y esclerotos de hongos (Widstrom, 1992). Factores como el contenido de humedad del sustrato, temperatura, disponibilidad de oxígeno e integridad del grano son condiciones que influyen en el desarrollo fúngico (Coulombe, 1993). Cuando la humedad es superior al 12% y los niveles de oxígeno se encuentran por encima del 0,5% pueden desarrollarse hongos filamentosos en los alimentos. Estas condiciones pueden aparecer en ensilajes cuando se presentan “bolsas” de oxígeno, sin embargo, el pH bajo entre 3-5 de estos alimentos almacenados suele prevenir el desarrollo fúngico. Este pH, sin embargo, favorece el crecimiento de levaduras, las que por su propia actividad aumentan el pH favoreciendo así el desarrollo de hongos. La presencia de mohos y micotoxinas en el ensilaje está bien documentada por autores como Woolford, (1975).

Los principales géneros toxicogénicos productores de micotoxinas, son *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium* (Moss, 1996). Los hongos del género *Fusarium* son clasificados como hongos contaminantes de cultivos, ya que su desarrollo suele ocurrir principalmente antes del almacenamiento. Esto lleva a pérdidas de rendimiento en cultivos y posible contaminación con micotoxinas. Los principales cultivos que suelen afectarse son maíz y trigo, granos que son sustratos ideales para el desarrollo de fusariotoxinas como deoxinivalenol, zearalenona y fumonisina (Whitlow, 2005).

Tanto el género *Aspergillus* como *Penicillium*, se desarrollan en almacenamiento, aunque algunas especies de estos hongos pueden contaminar los cultivos en el campo. *Aspergillus* puede aparecer en varios sustratos, siendo maní, maíz y semillas de algodón sustratos ideales para su desarrollo y producción de micotoxinas. Estos requieren para su crecimiento temperaturas ambientales ideales de 25°C y una actividad de agua que puede variar de 0,65 a 0,80 dependiendo de la especie de *Aspergillus*, mientras que *Penicillium* se desarrolla una actividad de agua de 0,85 pero puede crecer a temperaturas inferiores a 25°C (Martínez, 1988).

Micotoxinas

Se conocen más de 300 micotoxinas, según la FAO (2004), algunas tienen gran importancia mundial, ya que pueden afectar la salud del hombre y los animales. Estas toxinas son producidas en la fase activa del crecimiento de los hongos toxicogénicos. Estos hongos pueden desarrollarse en los alimentos sin producir micotoxinas ya que estas son producto de su metabolismo secundario. Su producción suele asociarse a factores que desencadenen stress en los hongos, como son condiciones climáticas extremas, mal manejo en la cosecha y en el almacenamiento (Whitlow, 2005). Las condiciones para la producción de micotoxinas muchas veces difieren con las que necesita el hongo para su

desarrollo, los principales factores suelen ser temperatura, humedad, oxígeno y acidez (Moss, 1996).

Las micotoxinas pueden ser producidas por varias especies de hongos y suelen ser específicas, cuanto más compleja es su biosíntesis menor es la cantidad de especies que las producen. Es así que, una micotoxina puede ser producida por uno o varios tipos de hongos dependiendo de su complejidad. La producción de estos metabolitos por parte de un hongo indica que este alcanza un determinado nivel de diferenciación bioquímica, morfológica y fisiológica (Moss, 1996).

De las micotoxinas estudiadas las que tienen mayor interés veterinario son las fumonisinas, zearalenona, deoxinivalenol y aflatoxinas. Las tres primeras, son producidas por *Fusarium*, mientras que las aflatoxinas, por cepas de *Aspergillus*. Las fumonisinas se asocian generalmente al consumo de maíz contaminado, variando la sintomatología según la especie animal. En equinos producen leucoencefalomalacia (Marasas et al. 1988), mientras que en suinos, edema pulmonar (Harrison et al. 1990). La zearalenona es una micotoxina que presenta una acción estrogénica, actuando como disruptor endócrino (Zinedine et al. 2007) mientras que el deoxinivalenol produce rechazo al alimento en los suinos (Mok et al. 2013).

Las aflatoxinas (AF) son de las micotoxinas más estudiadas por sus efectos carcinogénicos, en la salud y en la producción animal. Uno de sus metabolitos, aflatoxina M₁, es eliminado por huevo y leche llegando a través de estos alimentos al consumo humano. Esto lleva a que se consideren metabolitos tóxicos de gran importancia en salud pública (Battacone, 2005).

Aflatoxinas

Las AF son un grupo de micotoxinas hepatotóxicas, carcinogénicas, teratogénicas y mutagénicas. Químicamente son difurano cumarinas y según su estructura se clasifican en dos grandes grupos difuro-cumaro-ciclo-pentanonas (AFB₁, AFB₂, AFB₂A, AFM₁, AFM₂, AFM₂A y aflatoxicol) y las difuro-cumaro-lactonas (AFG₁, AFG₂, AFG₂A, AFGM₁, AFGM₂, AFGM₂A y AFB₃). Estas toxinas son termorresistentes, siendo estables aun en los procesos térmicos a los que se someten los alimentos. Sumado a ello, las AF son incoloras, insípidas e inodoras, características que hacen que su consumo sea imperceptible (Urrego & Diaz, 2006).

La relevancia de las aflatoxinas está dada por ser capaces de producir en el hombre o en los animales que las consuman hepatotoxicidad, inmunosupresión y teratogenicidad entre otros efectos tóxicos (Kensler et al. 2011). Debido a esto la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer, clasifica a la AFB₁ en el grupo 1A, por ser hepatotóxica y carcinogénica para el hombre. Mientras que la AFM₁ es clasificada como potencial carcinogénico grupo 1B (IARC, 1993; IARC, 2002). La

importancia de la AFB₁ está dada cuando animales en lactancia reciben dietas altamente contaminadas, debido a que parte de esta micotoxina se metaboliza en el organismo animal hasta AFM₁, y se excreta a través de la leche, pudiendo ser detectada en este producto y en sus derivados (Battacone et al. 2005; Firmin et al. 2011).

Metabolismo y efectos tóxicos de las aflatoxinas

Los rumiantes presentan menor susceptibilidad a las AF en comparación con otras especies, ello se debe a que son metabolizadas por microorganismos ruminales, llegando en menor concentración al intestino donde son mayormente absorbidas. De la metabolización ruminal se puede obtener aflatoxicol, metabolito potencialmente carcinogénico y mutagénico (Coulombe et al. 1982). Este se obtiene mediante una reacción de óxido-reducción reversible, considerándolo como un posible reservorio de AFB₁ (Wong & Hsieh, 1980). Las AF una vez absorbidas, llegan por difusión vía porta al hígado, donde producen su principal daño, ya que en este órgano es donde se produce la mayor biotransformación. En sangre, se transportan unidas a la albúmina, ejerciendo su efecto tóxico sobre los demás tejidos y acumulándose en ellos cuando son ingeridas por un tiempo prolongado (Mostrom & Jacobsen, 2011; Coppock et al. 2018).

La AFB₁ que llega al hígado, va a ser degradada en diferentes metabolitos, siendo los de mayor toxicidad la aflatoxina B₁-8,9-epóxido, aflatoxina M₁ (AFM₁), M₂ y aflatoxicol. La aflatoxina B₁-8,9-epóxido es la más tóxica, ya que puede formar aductos al unirse al ADN, ARN y proteínas, ocasionando mutagénesis y carcinogénesis (Mostrom & Jacobsen, 2011). Ejercen un efecto inmunosupresor e influyen negativamente en la producción de leche (Helferich et al. 1986). Algunos autores manifiestan que, para que se produzcan alteraciones reproductivas y de salud en el ganado lechero las dietas deben superar los 100 µg/Kg (Patterson & Anderson, 1982). Según Garrett et al. (1968) para que se manifieste disminución de la ganancia de peso en los animales, deben consumir dietas con niveles de 700 µg/Kg, efecto que no se observa cuando consumen dietas de 100 a 300 µg/Kg.

Reglamentación de las aflatoxinas

El control de las AF resulta ser un punto crítico en la cadena agroalimentaria ya que son contaminantes naturales de los alimentos y resulta difícil eliminarlas por lo que es frecuente la exposición del hombre y los animales a las mismas. Para regular el consumo de alimentos contaminados, organismos internacionales como FAO y OMS establecieron límites para los niveles de estas toxinas (FAO, 1977). Las reglamentaciones suelen compartirse entre países, es así que Uruguay se rige por la reglamentación del MERCOSUR. En esta se establecen niveles de 20 µg/kg para alimentos como maíz y maní de consumo humano. La Dirección General de Servicios Ganaderos del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP)

sugiere para el maíz, cereal muy utilizado en suplementación de bovinos, el mismo límite cuando es utilizado para alimentación de vacas lecheras. A su vez, en Brasil se utilizan los mismos niveles de acuerdo al *Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal* (2009). La Unión Europea mediante la Directiva 2002/32/EC, publicada en el Diario Oficial Europeo, reglamente para dietas destinadas a ganado lechero límites máximos de 5 µg/kg de AFB₁.

Para AFM₁ los niveles máximos permitidos en leche fluida en Uruguay, son de 0,5 µg/L y de 5 µg/L en leche en polvo, de acuerdo a lo establecido por la reglamentación del MERCOSUR y el Reglamento Bromatológico Nacional. La Unión Europea presenta niveles de tolerancia inferiores, en leche entera el límite es de 0,05 µg/L y en la destinada a lactantes el nivel se reduce a 0,025 µg/L (Diario Oficial de la Unión Europea). Estos límites son de interés para Uruguay debido a que, las exportaciones de lácteos con ese destino, son controladas, no pudiendo superar para su ingreso, los valores mencionados.

En Uruguay, se realizan controles oficiales de los niveles de AF en alimentos destinados a los animales y a través del Plan Nacional de Residuos Biológicos, de AFM₁ en leche para consumo humano. Estudios recientes fueron realizados en Facultad de Veterinaria por el Laboratorio de Toxicología, en 18 establecimientos lecheros del sur del país determinando AF en alimentos destinados a vacas lecheras y AFM₁ en leche de tanque de frío. Del total de muestras de alimentos (n=37) del estudio, el 91,8% presentaron contaminación por AF. El 100% de las muestras de leche analizadas (n=18), presentaron niveles de AFM₁, desatancándose que en ninguno de los casos fueron superados los niveles máximos permitidos para nuestro país (Capelli et al. 2019).

Análisis, control y prevención de aflatoxinas

El riesgo del consumo de alimentos contaminados con AF, han llevado al desarrollo de metodologías para detectar, prevenir y eliminar su presencia en los alimentos. La determinación y cuantificación de las micotoxinas se puede realizar por diferentes métodos cromatográficos e inmunoensayos (Diaz & Smith, 2005). Según el *Codex stan* (1995), los niveles de contaminación por micotoxinas deben ser lo más bajo posible siguiendo buenas prácticas agrícolas e industriales. Este propone medidas para reducir la contaminación fúngica ambiental y en el alimento. En estos últimos, la detoxificación de AF, minimiza el riesgo toxicológico para animales y su presencia en subproductos de origen animal destinado al consumo humano.

La metodología para la determinación de micotoxinas requiere de análisis sensibles a niveles bajos de detección ya que los límites son extremadamente bajos µg o ng (Magan & Olsen, 2004). Existen diferentes métodos analíticos, los más usados se

basan en inmunología y cromatografía. A excepción de los métodos inmunológicos que generalmente no requieren un paso previo, los demás necesitan una fase de extracción para mejorar la sensibilidad de la técnica y reducir interferencias (Turner et al. 2015).

Dentro de los métodos cromatográficos para la cuantificación de micotoxinas podemos considerar la cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía líquida (LC) y cromatografía gaseosa (GC) aunque en la actualidad las más utilizadas son cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y cromatografía líquida de ultra resolución (UHPLC) (Turner et al. 2015). Entre los métodos de inmunoensayo existen desde los más complejos de inmunosensores hasta los más simples como el de flujo lateral y el de ELISA. Este último es muy utilizado en la actualidad, ya que son técnicas más económicas y sencillas de implementar (Soriano del Castillo, 2007).

Prevención y control de micotoxinas

El manejo para prevenir o minimizar la presencia de micotoxinas, debería comenzar en el campo, ello implica el tipo de siembra, riego, control de malezas, variedad y rotación de cultivos (Edwards, 2004). Los factores climáticos no pueden ser controlados y estos influyen sobre el desarrollo de hongos y micotoxinas, por lo que muchas veces las medidas de prevención utilizadas en el campo no son eficientes y se debe actuar en la cosecha y almacenamiento. En la cosecha se tiene que evitar el daño del grano, ya que predispone a la contaminación por hongos y a la posible aparición de micotoxinas. Durante el almacenamiento los excesos de humedad y elevada temperatura deben controlarse para disminuir el riesgo de contaminación fúngica (Shapira & Paster, 2004).

En el almacenamiento se pueden utilizar sustancias inhibitorias del crecimiento fúngico, pero estas no actúan sobre el contenido de micotoxinas si ya existiera. Cuando los alimentos están contaminados por micotoxinas una de las estrategias utilizadas para su control es la aplicación de agentes secuestrantes. Estas sustancias son polímeros inorgánicos u orgánicos de gran peso molecular que reducen la absorción en el tubo digestivo de las micotoxinas, reduciendo la toxicidad de estas en el organismo animal. Para ello, los secuestrantes forman complejos irreversibles con estas toxinas en la luz intestinal y posteriormente son eliminadas por las heces (Devegowda & Murthy, 2005).

En nuestro país se comercializan diferentes secuestrantes de micotoxinas para bovinos, algunos son específicos para reducir los efectos tóxicos de las AF y otros actúan sobre varias micotoxinas al mismo tiempo. El agente secuestrante debería ser efectivo en la extracción, destrucción e inactivación de las micotoxinas, no debe

producir residuos tóxicos en los productos tratados ni en los alimentos derivados de animales que lo consumen. Además, no deben ser carcinogénicos o mutagénicos, ni alterar la aceptabilidad y las propiedades nutritivas de los alimentos. Por último, deben ser económicos para no incrementar el costo final del producto (Zakhia-Rozis et al. 2005).

La mayoría de los secuestrantes se pueden clasificar como compuestos orgánicos o inorgánicos, existiendo un tercer tipo que son los sintéticos (Di Gregorio et al. 2014). Entre los orgánicos se encuentran los glucomananos esterificados (EGM) y dentro de los inorgánicos los aluminosilicatos (Díaz & Smith, 2005).

Los secuestrantes inorgánicos se encuentran subdivididos en filosilicatos que incluyen las bentonitas y en tectosilicatos donde se encuentran las zeolitas (Huwig et al. 2001). Las bentonitas presentan una gran superficie de unión y alta capacidad de intercambio de cationes y moléculas polares. La *European Food Safety Authority* (EFSA, 2001), evaluó la eficiencia y seguridad de estas como aditivos alimenticios, determinando que no proporcionan ningún riesgo toxicológico para el animal. A su vez las bentonitas tienen gran afinidad en la adsorción de las AF (Kong et al. 2014). Las zeolitas presentan una estructura tridimensional formada por SiO_4 y AlO_4 unidos por átomos de O_2 . El exceso de cargas negativas cuando se sustituye parcialmente el Si_4 por Al_3 es compensado por los iones de sodio, calcio y potasio (Daković et al. 2003). Las zeolitas modificadas tienen más afinidad por la adsorción de fumonisinas que por AF (Baglieri et al. 2013), aunque existen otros estudios que han demostrado buena capacidad de estas sustancias para adsorber AF (Daković et al. 2010). Los aluminosilicatos hidratados de calcio y sodio (HSCAS), se encuentran clasificados dentro de los secuestrantes inorgánicos, presentan una gran capacidad de unión a las AF mientras que no son tan eficientes con las micotoxinas producidas por el género *Fusarium* (Ramos & Hemhdez, 1997).

Dentro de los agentes secuestrantes orgánicos, los más utilizados son paredes de levaduras como las de *Saccharomyces cerevisiae*, formadas principalmente por lípidos, proteínas y polisacáridos (glucanos y mananos). La adsorción se produce por una interacción entre las toxinas y grupos funcionales de la pared celular, presentando mayor capacidad de unión con las fusariotoxinas (Pfohl-Leskowicz et al. 2015). Otros son las bacterias ácido lácticas (BAL) son grupos tolerantes a los ácidos, se encuentran en productos lácteos y en plantas en descomposición. Han sido estudiadas por tener efecto sobre el desarrollo de hongos toxicogénicos y la producción de micotoxinas, debido a que compiten por nutrientes y producen variaciones del pH (Laitila et al. 2002; Kabak et al. 2006). El carbón activado, es un polvo insoluble que se obtiene de pirolisis de varios compuestos orgánicos, su capacidad de adsorción depende del tamaño de partícula, área de superficie y naturaleza de la toxina. Estudios *in vitro* han demostrado que es efectivo para controlar el deoxinivalenol y la fumonisina B₁ (Avantaggaito et al. 2005). Aún hay muchas micotoxinas para las que no se ha determinado su afinidad. Uno de los mayores problemas que presenta el carbón activado es su capacidad de adsorber

nutrientes esenciales cuando la concentración en el alimento es alta (Vekiru et al. 2007).

Caracterización del problema

En los rodeos lecheros de alto rendimiento la alimentación es un pilar fundamental ya que permite cubrir las altas demandas energéticas y metabólicas de los animales en producción. Conforme estos animales son expuestos a altas exigencias metabólicas, están predispuestos a sufrir fácilmente trastornos metabólicos y tóxicos. Es así que, la presencia de sustancias tóxicas como aflatoxinas en los alimentos, puede ser un factor agravante de esta situación contribuyendo como una limitante y salud puede ocasionar un impacto económico en los sistemas productivos. Un ejemplo de esto es el aumento en la incidencia de mastitis en rodeos lecheros que consumen alimentos contaminados con aflatoxinas, lo que contribuye a la merma de la producción láctea y al descarte temprano de animales. Para mitigar el impacto de las aflatoxinas, la utilización de secuestrantes es un método cada vez más difundido entre productores ya que su incorporación ha demostrado disminuir las pérdidas económicas ocasionadas por el consumo de estas sustancias. La eficiencia de los secuestrantes está ampliamente demostrada en estudios *in vitro*, estos estudios son fundamentales al momento de desarrollar los productos. En actualidad existe una creciente inquietud sobre la eficiencia de estos agentes en animales, particularmente en ganado lechero y más en vaca de alta producción. Este problema surge debido a que muchas veces los resultados *in vitro* no son fiel reflejo de la realidad, ya que estos estudios no tienen la interferencia de variables que se presentan en los estudios *in vivo* y que son difíciles de replicar en el laboratorio.

HIPÓTESIS

El agregado de un secuestrante de aflatoxinas a una dieta con aflatoxina B₁ administrada a vacas lecheras en producción, reduce la presencia de aflatoxina M₁ en la leche y orina de los animales, pudiendo afectar la producción de estos animales.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el impacto productivo del agregado de un secuestrante a una dieta contaminada artificialmente con aflatoxina B₁ sobre los niveles de aflatoxina M₁ en leche y orina de vacas Holstein en producción.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Detectar la presencia de aflatoxina M₁ en leche y orina de vacas lecheras en producción que consumen una dieta contaminada artificialmente con aflatoxina B₁.

Evaluar el efecto de la exposición aguda de aflatoxina B₁ sobre productividad y perfil metabólico de vacas en producción láctea con o sin el agregado de un secuestrante comercial.

Cuantificar el porcentaje de reducción de los niveles de aflatoxina M₁ en leche de vacas en producción suplementadas con una dieta contaminada artificialmente con aflatoxina B₁, adicionada con un secuestrante comercial.

Estrategia de la investigación

El trabajo experimental consistió en actividades de laboratorio y de campo. Las primeras se llevaron a cabo en el Laboratorio de Toxicología y Farmacología de Facultad de Veterinaria, vinculándose al cultivo de hongo y producción de micotoxinas, con posterior cuantificación de estas mediante técnicas cromatográficas. Las actividades de campo se llevaron a cabo en el Campo Experimental N° 2 de Facultad de Veterinaria, probándose la eficiencia *in vivo* en vacas lecheras en producción de un secuestrante de aflatoxinas. El trabajo fue financiado por la Comisión de Investigación y Desarrollo Científico (CIDE) a través del Programa PLANISA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental

Animales experimentales

El ensayo se llevó a cabo en el tambo comercial del Campo Experimental N°2 de la Facultad de Veterinaria, Universidad de la República (34°41'S, 56°32'O) entre los meses de octubre y diciembre 2017. Del total del rodeo lechero en producción (n= 160) se pre-seleccionaron 16 animales, raza Holstein, multíparas, con similar producción de leche ($22 \pm 3,4$ litros), tiempo de lactancia (180 a 200 días) y condición corporal de 3 y 4. A estos animales se les extrajo sangre de la vena coccígea para determinar los perfiles metabólicos (PM) y establecer su balance, en función de ello, se seleccionaron 12 animales sanos con similares condiciones metabólicas que fueron los destinados al ensayo. Los analitos evaluados fueron marcadores de energía (beta-hidroxibutirato, ácidos grasos no esterificados, colesterol y urea), indicadores de funcionalidad hepática (enzimas aspartato amino transferasa (AST) y gama glutamil transferasa (GGT), balance proteico (albúmina, globulina y proteínas séricas) e iónico (calcio, fósforo, relación calcio: fósforo y magnesio sérico) (Tabla 1). Todos los análisis fueron realizados en el Laboratorio de endocrinología y metabolismo animal de Facultad de Veterinaria, Montevideo Uruguay.

Tabla 1. Valores de los perfiles metabólicos iniciales de los 16 animales pre-seleccionados. *CC: condición corporal, BHB: betahidroxibutirato, NEFA: ácidos grasos no esterificados, COL: colesterol, URE: urea, PRO: proteína, ALB: albuminas, GLO: globulinas, Ca: calcio, P: fosforo, Ca:P : relación calcio fosforo, Mg: magnesio AST: aspartato aminotransferasa, GGT: glutamil gamatrasferasa, Rec: refractario.*

Nº	Ident	CC	BHB	NEFA	COL	URE	PRO	ALB	GLO	Ca	P	Ca:P	Mg	AST	GGT
		1 al 5	mmol/L	mmol/L	mmol/L	mmol/L	g/L	g/L	g/L	mmol/L	mmol/L	-	mmol/L	U/L	U/L
1	926	4	0,40	0,22	6,0	1,6	73	31	42	2,1	1,5	1,3	1,0	70	28
2	243	3	0,66	0,25	4,5	3,0	76	26	49	2,2	1,4	1,5	0,8	100	28
3	100	3	0,40	0,15	4,4	2,1	68	30	38	2,1	1,3	1,6	1,0	66	23
4	241	4	0,66	0,18	6,2	3,1	67	29	39	2,3	1,6	1,4	0,9	90	12
5	921	3	0,36	0,15	4,0	2,1	72	27	45	2,2	1,3	1,7	0,9	78	22
6	808	4	0,44	0,24	3,5	2,1	79	29	50	2,2	1,6	1,4	0,7	68	18
7	307	3	0,34	0,15	5,7	1,3	82	26	56	2,1	1,9	1,1	0,8	67	18
8	501	3	0,65	0,24	4,5	1,4	76	29	47	2,2	1,5	1,5	0,8	62	18
9	9	3	0,50	0,15	3,4	2,7	84	25	59	2,2	2,0	1,1	0,7	94	22
10	311	3	0,58	0,22	6,1	2,6	74	30	44	2,5	1,7	1,5	0,9	96	24
11	101	3	0,39	0,17	6,1	3,0	71	29	42	2,3	1,5	1,5	1,0	85	24
12	28	4	0,37	0,23	4,4	2,2	75	29	45	2,4	1,8	1,3	0,9	77	29
13	946	4	Rec	0,17	4,7	2,6	72	29	44	2,3	1,7	1,4	0,9	77	34
14	224	3	0,50	0,16	4,5	2,5	71	30	41	2,2	2,1	1,1	0,9	64	21
15	42	4	Rec	0,15	3,8	1,7	75	31	44	2,5	1,6	1,6	0,8	78	18
16	36	4	0,44	0,15	5,2	2,6	76	28	48	2,2	1,7	1,3	0,8	58	28

Alimentos y determinaciones

Producción de hongos y cuantificación de micotoxinas

En el Laboratorio de Toxicología de Facultad de Veterinaria se cultivó una cepa de *Aspergillus parasiticus* en extracto de agar malta (MEA) a 28°C por 5 días. Para ellos se utilizó una cepa de *A. parasiticus* (242695) de la colección de referencia del *Mycological Institute Inglaterra* (Figura 1). Para la producción de aflatoxinas, se obtuvieron discos de micelio de los bordes de crecimiento de las colonias de *A. parasiticus* y se inocularon en granos de arroz blanco grano largo, tipo 1, hidratados y esterilizados. Posteriormente fueron incubados en oscuridad a 28°C durante 7 días. Con el objetivo de inactivar al hongo, el material de cultivo fue esterilizado en autoclave durante 15 min a 121°C.

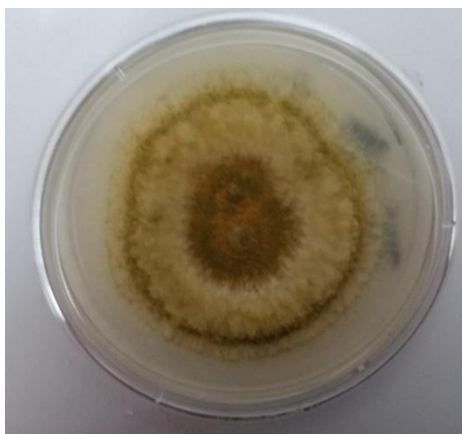


Figura 1. Colonia de *Aspergillus parasiticus* (242695) cultivada en caja de Petri con extracto de agar malta.

La cuantificación de AF se realizó en el Laboratorio de Farmacología de Facultad de Veterinaria mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC-Fluorescencia), de acuerdo al método AOAC, "*Official methods of analysis of the association of official analytical chemists*" 15 th (1990), con modificaciones. Para la determinación de las AF se utilizó 5 g de arroz al que se le extrajo las micotoxinas con el agregado de metanol al 70% (1:5), siendo posteriormente filtrado con papel *Watham* N° 4 e inyectado 100 µl en el equipo de HPLC-Fluorescencia (UltiMate 3000, UHPLC, Dionex, USA). Cada muestra fue analizada por triplicado. Para la curva de calibración se utilizaron 5 soluciones de trabajo preparadas con acetonitrilo de 2, 10, 20, 40 y 80 ng/mL de AF, preparadas con el estándar de referencia de Triology®liquid Standard, TSL-108. La derivatización se realizó con H₂O miliq, ácido acético glacial y ácido trifluoroacético (70:10:20). La fase móvil utilizada fue H₂O miliq, acetonitrilo y

metanol (66:17:17), con una velocidad de flujo de 2 mL/min. La columna empleada fue C18 de 250 x 4,6 mm, tamaño de partícula 5 µm, Nucleodur (Macherey Nagel GmbH) a una temperatura de 25°C y una señal de excitación: emisión de 360/440 nm. El límite de cuantificación fue de 2 ng/mL de AF.

Dieta de las vacas

La dieta que recibieron los animales durante el ensayo, fue calculada de acuerdo al *National Research Council – NRC (2001)*, en función del peso corporal y los litros de leche producidos. La misma estaba compuesta de silo pack de alfalfa, silo planta entera de maíz (SMPE), harina y cascarilla de soja, urea, núcleo de vitaminas y minerales (Anexo 1). Los alimentos utilizados fueron previamente analizados para determinar si existía contaminación natural de micotoxinas. Para ello se realizó un *screening* para AF (límite detección, kit Ridascreen®AflaSC, Alemania), zearalenona y deoxinivalenol. La metodología empleada fue de inmunoensayo ligado a enzimas (Elisa), kit Ridascreen®AflaSC (aflatoxinas), kit Ridascreen®ZeaSC (zearalenona) y kit Ridascreen®DeoxiSC (deoxinivalenol). Todos los kits eran de R-Biopharm - Alemania. Los resultados fueron leídos utilizando un espectrofotómetro Bio-Tek® Instruments.Inc. Modelo EL301 a una longitud de onda de 450 nm y analizados con el software RIDASOFT Win®. Todas las determinaciones fueron realizadas por duplicado.

Inclusión de aflatoxinas y secuestrante a la dieta

De los 12 animales seleccionados, ocho recibieron durante 10 días una dosis diaria de 60 µg/kg de AFB₁ en base a 19 kg de materia seca, alcanzando una dosis diaria total de 1140 µg de AFB₁ por animal. Para la administración de la dosis de AFB₁ se utilizaron 350 g de maíz molido, sustrato seleccionado por su alta palatabilidad, lo que aseguró el consumo total de la dosis diaria de AFB₁ por las vacas. Todos los animales recibieron individualmente los demás componentes de la dieta y se evaluó el porcentaje de rechazo (alimento no consumido). Posteriormente pastoreaban un potrero de pradera de más de 4 años libre de malezas tóxicas con disponibilidad de agua *ad libitum*.

A cuatro de los ocho animales que recibieron AFB₁, se les adicionó en la dieta el secuestrante evaluado, siendo un aluminocilicato hidratado de sodio y calcio (HSCAS) activado (MYCO-AD de *Special Nutrients*). El mismo fue elegido según la eficiencia *in vitro* frente AF reportada en trabajos nacionales por Pan et al. (2016). La inclusión en la dieta se realizó de acuerdo a las especificaciones indicadas por el fabricante (50g/día/animal).

Tratamientos y períodos

Al inicio del ensayo (Día 0), los 12 animales seleccionados fueron adjudicados aleatoriamente a tres tratamientos (T) identificándolos con collares de diferente color (Figura 2).

- Tratamiento control (TC): alimento libre de aflatoxina B₁ y de secuestrante (n=4)
- Tratamiento aflatoxinas (TA): alimento contaminado artificialmente con aflatoxina B₁ (n=4)
- Tratamiento secuestrante (TS): alimento contaminado artificialmente con aflatoxina B₁ más secuestrante (n=4)

Todos los tratamientos eran administrados posterior al ordeño de la mañana.

El ensayo duró 18 días y tuvo tres períodos de alimentación:

- Período 1: cuatro días, de adaptación al manejo, todos los animales recibieron TC (n=12).
- Período 2: diez días de administración de tratamientos TC (n=4), TA (n=4) y TS (n=4).
- Período 3: cuatro días, todos los animales recibieron TC (n=12).



Figura 2. Animales experimentales identificados con collares de diferente color, recibiendo los tratamientos respectivos.

Animales y determinaciones

En la rutina diaria los animales experimentales eran ordenadas al finalizar del ordeño de las vacas del tambo. El manejo de los animales experimentales fue

aprobado por la Comisión de Ética en el Uso de Animales de Facultad de Veterinaria, protocolo CEUAFVET-159, de acuerdo a la Ordenanza sobre el uso de animales de experimentación, docencia e investigación universitaria de la UdelaR.

Análisis producción láctea

En ambos ordeños (diariamente), se midió la producción de leche individual de los animales con medidor Waikato, modelo Mkv-Milk Meter ($Prod_{am}$ = litros producidos en la mañana; $Prod_{pm}$ = litros producidos en la tarde). La producción diaria total ($Prod_{total}$) se obtuvo sumando ambas mediciones ($Prod_{am} + Prod_{pm}$). Las muestras de leche se colectaron en envase estéril de 250 mL y se almacenaron a $-18^{\circ}C$ en freezer laboratorio de Toxicología de Facultad de Veterinaria – UdelaR, hasta el momento de la cuantificación de AFM_1 . En días alternos se colectaron muestras de leche en frascos de 50mL y se remitieron refrigeradas al Sector calidad de leche (SECALE) de la Cooperativa Nacional de Productores de Leche (Conaprole) para la determinación de composición y células somáticas. La materia grasa y las proteínas se realizaron por Crioscopia *Screening* (IT00 131320 05 –Análisis de composición por Milkoscan FT6000 basado en IDF 141:2000). El análisis de células somáticas se realizó por Fossomatic 5000 basado en IDF 148 Parte 2:2003.

Toma de muestras de orina

Mediante técnica de masaje vulvar (Kasari, 2001) se colectaron en frasco de 250 mL orina de todos los animales para determinar la presencia de AFM_1 . La colecta se realizaba posterior al ordeño de la tarde y las muestras se almacenaron en freezer a $-18^{\circ}C$ hasta su procesamiento en el laboratorio de Toxicología de Facultad de Veterinaria - UdelaR.

Determinación de perfiles metabólicos

Al final del ensayo (D18) se realizó una nueva determinación de los principales marcadores de energía (beta-hidroxibutirato, ácidos grasos no esterificados, colesterol y urea), indicadores de funcionalidad hepática (enzimas aspartato amino transferasa (AST) y gama glutamil transferasa (GGT), balance proteico (albúmina, globulina y proteínas séricas) y iónico (calcio, fósforo, relación calcio:fósforo y magnesio sérico) de todos los animales incluidos en el experimento.

Cuantificación de aflatoxina M₁

Matriz leche

La cuantificación de AFM₁ se realizó por HPLC según el método 980.21 de la AOAC (1990) con modificaciones. Para la determinación se emplearon 15 mL de leche, centrifugados a 3000 rpm a 4 °C, al que se le retiró el sobrenadante. Se filtró en papel *Whatman* N° 4 y se obtuvieron 10 mL para retener la AFM₁, en columnas de inmunoafinidad EASI-EXTRACT®AFLATOXIN de Triology. Posteriormente las columnas fueron lavadas con fosfato bufferado salino, secadas con aire y eluidas con 1,25 mL de metanol, acetonitrilo (40:60) y 1,25 mL de H₂O miliq. Del total del eluido colectado, 100 µL fueron inyectados en el equipo de HPLC-Fluorescencia. Para la curva de calibración se utilizaron 5 soluciones de trabajo de 0,025; 0,05; 0,1; 0,5 y 1 ng/mL de AFM₁ obtenidos a partir del estándar líquido de Triology. La fase móvil estaba compuesta por H₂O miliq:acetonitrilo:metanol (66:17:17) y la velocidad de flujo fue de 2 mL/min (Figura 3 a). La columna empleada fue de C18 (250 x 4,6 mm, tamaño de partícula 5 µm) Nucleodur® (Macherey Nagel GmbH) a una temperatura de 25°C y una señal de excitación/emisión de 360/440 nm. El límite de cuantificación para esta técnica fue de 0.025 ng/mL de AFM₁ (Figura 3 b).

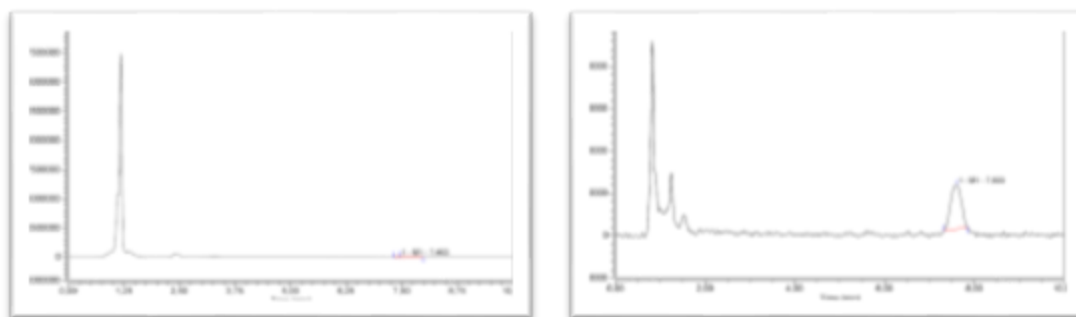


Figura 3 a. Cromatograma de fase móvil utilizada en la determinación de aflatoxina M₁ por HPLC.
3 b. Cromatograma de aflatoxina M₁ con un tiempo de retención de 7,60 minutos.

La excreción de AFM₁, fue calculada basada en la producción de leche del día de la colecta, según la siguiente ecuación:

Concentración de AFM ₁ x litros de leche día totales

La transferencia de AFB₁ fue calculada como:

Excreción de AFM ₁ / Consumo de AFB ₁ x 100

Matriz orina

La cuantificación de AFM₁ se realizó mediante la técnica de ELISA de acuerdo a la metodología propuesta en el kit utilizado Helica Biosystems inc. Cat. N° 991AFLM01U-96, USA, límite de detección de 150 ng/mL. Se utilizaron 5 mL de orina que fueron centrifugados a 2500 rpm durante 5 min. Posteriormente la muestra fue diluida 1:20 con agua destilada al igual que los estándares de 0,0; 0,15; 0,40; 1,50 y 4 ng/mL. Se emplearon 100 µL de muestra y de estándares, cada muestra fue analizada por duplicado. Los resultados fueron leídos utilizando un espectrofotómetro Bio-Tek® Instruments.Inc. Modelo EL301 a una longitud de onda de 450 nm. Se corroboró en la muestra de orina la presencia de AFM₁ mediante HPLC (figura 4).

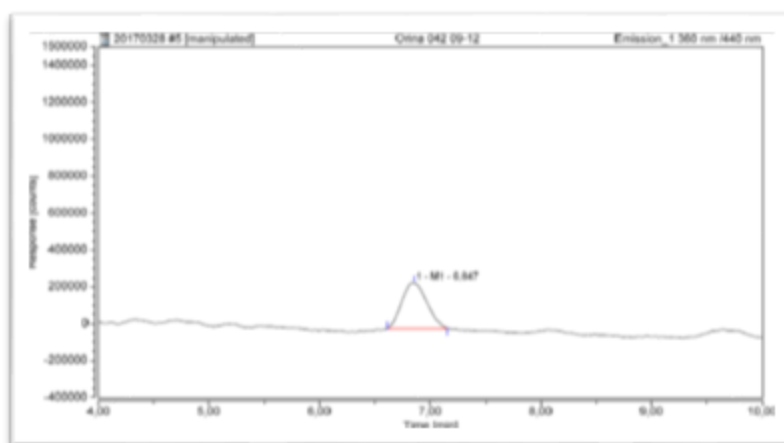


Figura 4. Cromatograma aflatoxina M₁ en muestra de orina, con un tiempo de retención de 6,64 minutos.

Análisis estadísticos

Los datos se reportaron como media, \pm desvío estándar (DE) y rango. Para determinar el nivel de reducción de AFM₁ en los grupos experimentales, se utilizó un Modelo Lineal Mixto, considerando los efectos fijos (tratamiento, tiempo y producción de leche) y aleatorios (animal). Para la simplificación de los modelos se consideraron las interacciones y la significación de cada variable en el modelo mediante el criterio de información de Akaike (AIC, Sakamotoy col. 1978) con los análisis estadísticos de estimación de máxima verosimilitud restringida (REML) y la representación gráfica de los supuestos. Para la comparación entre los distintos niveles de los efectos fijos se consideró un nivel de confianza de 0,05. Todos los análisis fueron realizados utilizando la función *lmer* de la librería «nlme» del software R, versión 3.6.0 (2019-04-26) (R Core Team, 2019).

Finalmente, se aplicó la prueba de correlación de Pearson para relacionar la producción de leche.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Alimentos y determinaciones

Producción de hongos y cuantificación de micotoxinas

Se inocularon 22 kg de arroz con *A. parasiticus* (Figura 5) con una concentración total de 4560 µg/kg de AFB₁. El cromatograma (Figura 6 a) es de una de las muestras de arroz inoculado con *A. parasiticus* (242695) donde se observaron los picos de AFG₁, AFB₁, AFG₂ y AFB₂, los mismos tiempos de retención que se presentan en el cromatograma de la solución estándar, (Figura 6 b) de una concentración 80 ng/mL.



Foto 5. Arroz contaminado con inóculo de *Aspergillus parasiticus* (242695), observándose la aflatoxina por fluorescencia (expuesto a luz UV).

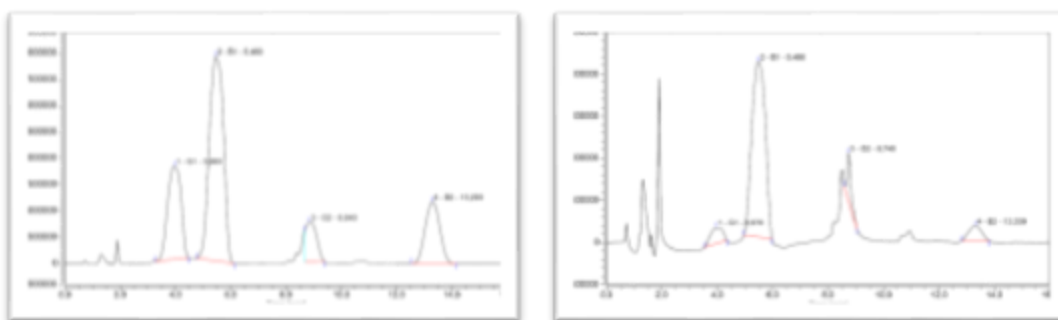


Figura 6 a. Cromatograma de muestra de arroz contaminado con aflatoxinas, donde se observan los picos de AFG₁, AFB₁, AFG₂ y AFB₂. **b.** Cromatograma con retención de AFG₁, AFB₁, AFG₂ y AFB₂ de la solución estándar de 80ng.

Las concentraciones producidas por la cepa de *Aspergillus* estuvieron dentro de los rangos esperados. Rojo et al., (2014) y Maki et al., (2016) con una metodología similar a la utilizada en este ensayo obtuvieron resultados de 45,4 y 48,6 x 10³ µg/kg y 758 x 10³ µg/kg de AFB₁ respectivamente, los niveles fueron

superiores a los obtenidos en este trabajo. Las diferencias en la producción de AFB₁ posiblemente se deba a que la cepa utilizada por estos autores (*A. parasiticus* - NRRL 2999) difiere a la empleada en el presente trabajo.

Animales y determinaciones

Evaluación de consumo de alimentos

Durante todos los días del ensayo posterior a la administración de los diferentes tratamientos, se determinó el porcentaje de rechazo al alimento ofrecido, no observándose rechazo de consumo en ninguno de los grupos, siendo ingerida la totalidad del alimento. Kutz et al. 2009 y Ogunade et al. 2016 tampoco observaron disminución en el consumo de los alimentos administrados a los animales experimentales durante la dosificación de las aflatoxinas.

Análisis de producción láctea

En la Figura 7 se expresa el promedio de litros de leche producidos por día ($Prod_{total}$) por los animales experimentales. El promedio de producción en los 17 días que duro el ensayo fue de $20,4 \pm 3,0$ L de leche, los que estuvieron en un rango de 14,2 a 28,1 L. La producción de leche promedio en litros de la mañana ($Prod_{am}$) fue de $10,8 \pm 1,8$ L y el promedio de la tarde ($Prod_{pm}$) $9,6 \pm 1,9$ L. Si bien la producción tuvo una relativa disminución de 0,07 L/día ($p < 0,05$), no se determinó un efecto significativo de los tratamientos sobre la producción láctea. Los litros de leche producidos por animal por día en el ensayo se encontraron próximos a la media nacional de 18 L/vaca/días, según la encuesta nacional de productores de leche realizada por el Instituto Nacional de Leche (INALE, 2014).

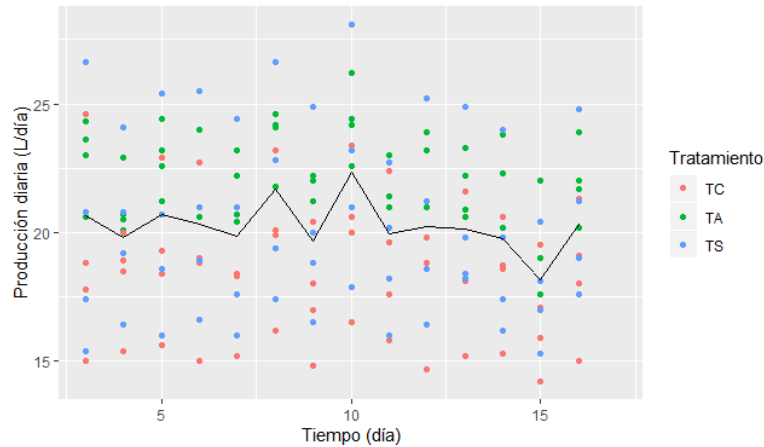


Figura 7. Producción diaria de leche de los animales expresada en litros durante todos los días del ensayo, indicando el promedio general para todos los animales.

La $Prod_{total}$ se correlacionó positivamente con $Prod_{am}$ y $Prod_{pm}$ ($r=0,812$ y $0,845$ respectivamente), mientras que estas dos presentaron baja correlación entre sí ($r=0,375$) (Figura 8). Por lo tanto, se seleccionó para la medición de AFM_1 la producción láctea de la tarde debido a la alta correlación de esta con la $Prod_{total}$.

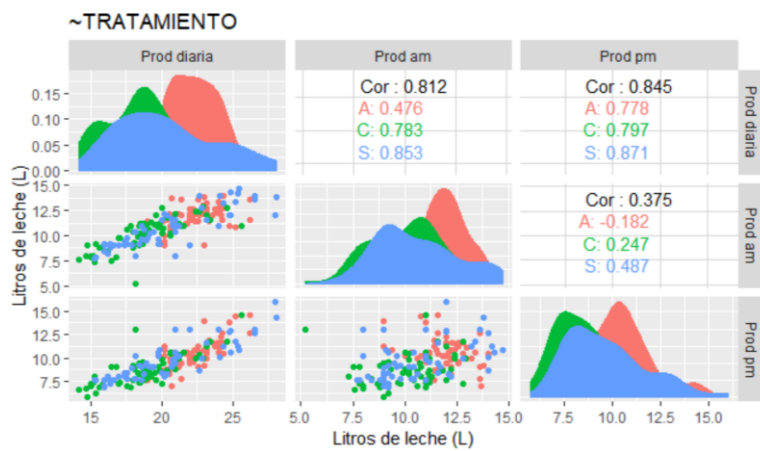


Figura 8. Producción total de leche ($Prod_{total}$), producción de la mañana ($Prod_{am}$) y producción de la tarde ($Prod_{pm}$), expresadas en litros (L), con sus correlaciones (~ tratamiento). La distribución de los datos se observa en diagonal para cada uno de los grupos (A=TA [rojo]; C=TC [verde]; S=TS [azul]).

Los datos de los análisis de materia grasa, proteína y células somáticas determinados a las muestras de leche obtenidas de todos los animales se presentan en las figuras 9, 10 y 11 respectivamente. Para la materia grasa los valores medios fueron de $4,07 \pm 0,12$ g/100mL, para la proteína fueron de $3,56 \pm 0,10$ g /100mL mientras que para las células somática la media fue de 150.333 cel/mL. No hubo efecto del tratamiento ni del tiempo, ya que no se observaron

diferencias significativas después de la administración de los diferentes tratamientos ($P < 0.05$).

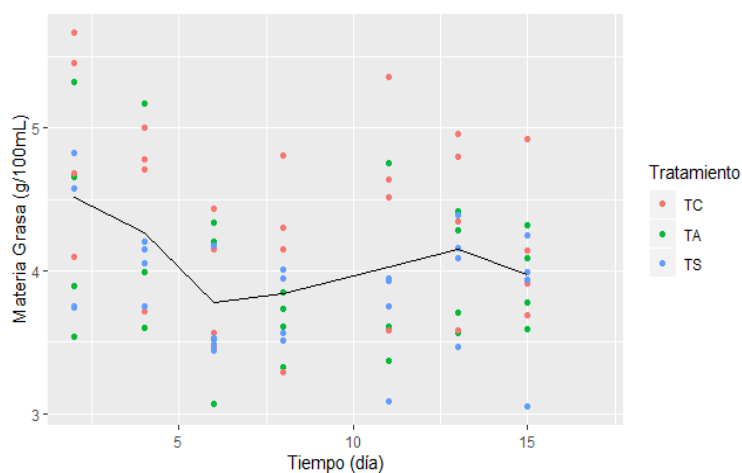


Figura 9. Promedio de los valores de materia grasa expresados en gramos por 100 mL de leche, de los animales del ensayo ($P > 0.05$). (Tratamiento aflatoxina =TA [rojo]; Tratamiento control=TC [verde]; Tratamiento secuestrante=TS [azul]).

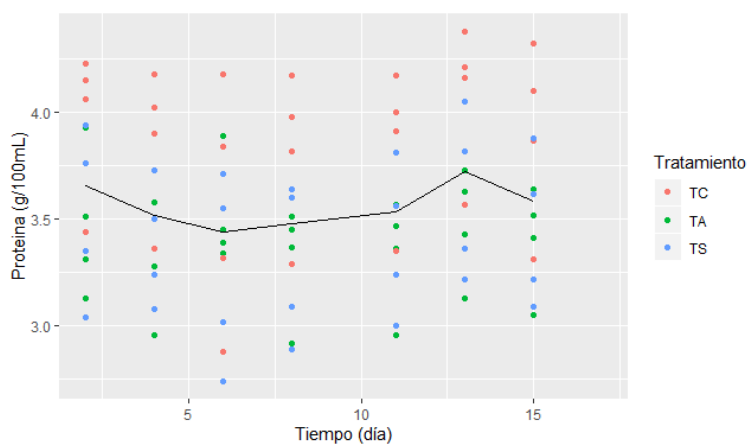


Figura 10. Promedio de los valores de las proteínas de la leche expresados en gramos cada 100 mL de leche, de los animales ($P > 0.05$). (Tratamiento aflatoxina =TA [rojo]; Tratamiento control=TC [verde]; Tratamiento secuestrante=TS [azul]).

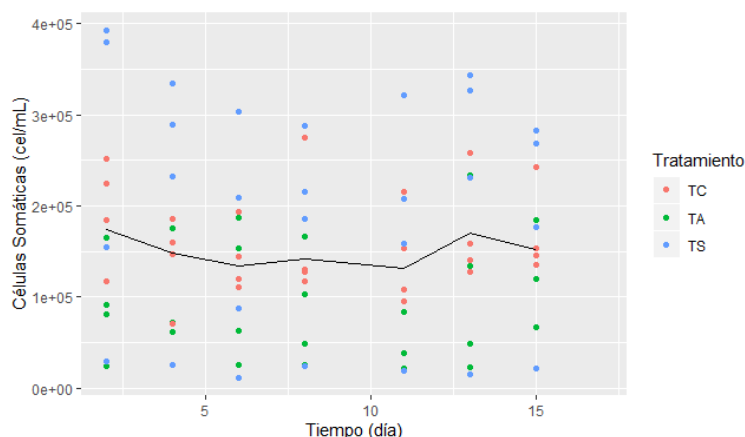


Figura 11. Promedio de los valores de células somáticas por mL de leche de los animales del ensayo ($P>0,05$). (Tratamiento aflatoxina =TA [rojo]; Tratamiento control=TC [verde]; Tratamiento secuestrante=TS [azul]).

La composición de la leche no se vio afectada por el consumo de alimentos contaminados con AFB₁. Estos resultados coinciden con los obtenidos por autores como Kutz et al. 2009, Queiroz et al. 2012 y Maki et al. 2016. Los resultados sobre el recuento de células somáticas pueden compararse con los obtenidos por Weatherly et al. 2018 y Rodrigues et al. 2019. En estos trabajos no se reportan diferencias significativas de los parámetros mencionados a un nivel de exposición similar al utilizado en nuestro estudio.

Perfiles Metabólicos

Los informes de los perfiles metabólicos realizados al comienzo y al final del ensayo se presentan en los anexos 2 y 3 respectivamente. Los metabolitos analizados fueron agrupados de acuerdo al balance energético, funcionalidad hepática, balance proteico e iónico.

Balance energético

Los metabolitos indicativos del balance energético (beta-hidroxibutirato (BHB), ácidos grasos no esterificados (NEFA), colesterol (COL) y urea) se presentan en la Figura 12. Los valores de NEFA, generalmente utilizados para reflejar el balance energético de los animales en diferentes etapas productivas, son inferiores a 0,2 mmol/L cuando el balance es positivo (Drackley, 1999). En el estudio, la media de los NEFA para todos animales fue de $0,17\pm 0,05$ mmol/L manteniéndose dentro de los rangos esperados. No hubo efecto tratamiento ($P>0,05$), sobre ninguno de los metabolitos evaluados.

Se observó, un efecto tiempo sobre COL y urea ($P < 0,05$), lo que se podría explicar por la dieta corregida que recibieron los animales al inicio del ensayo, influyendo positivamente sobre el balance energético.

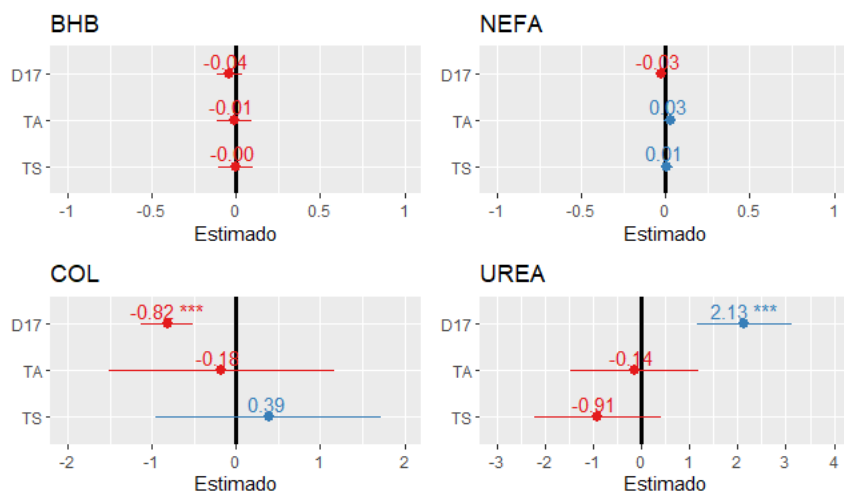


Figura 12. Valores estimados de Beta-hidroxi butirato (BHB), Ácidos grasos no esterificados (NEFA), colesterol (CLO) y Urea de los grupos TA y TS comparados con el grupo TC y entre los días 0 y 17 (* = $P < 0,05$).

Funcionalidad hepática

En la Figura 13 se presentan los valores de las determinaciones de las enzimas AST y GGT. Al día 17 del ensayo los valores promedios para AST y GGT de todos los animales fueron de 120 ± 18 U/L y $27 \pm 5,3$ U/L, respectivamente, manteniéndose dentro de los rangos normales. No se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre los animales de los grupos TA y TS en el día cero. Sin embargo, existió diferencia entre el día cero y 17 ($P < 0,05$). Esta variación no se atribuyó a los tratamientos administrados, debido a que el cambio se presentó en todos los animales del ensayo, por lo que esta diferencia podría atribuirse al efecto tiempo.

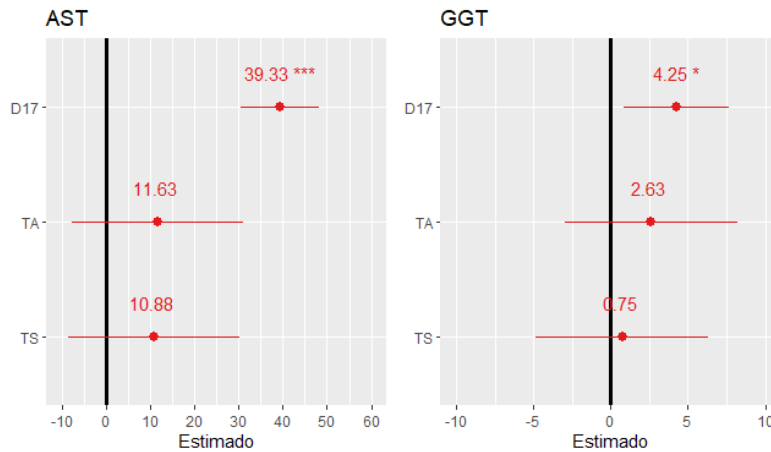


Figura 13. Valores estimados de las enzimas Aspartato Amino Transferasa (AST) y Gama Glutamil Transferasa (GGT) de los grupos TA (tratamiento aflatoxina) y TS (tratamiento secuestrante) respecto al grupo TC (grupo control) en los días 0 y 17 del ensayo (* = $P < 0,05$).

La AST, es una enzima utilizada como indicador de daño hepático, aunque no es específica, ya que sus isoformas citosólicas y mitocondriales pueden encontrarse en eritrocitos, músculo esquelético y cardíaco. Su incremento se puede observar en enfermedades de curso agudo, aumentando 6 a 8 horas posteriores al daño, disminuyendo en pocos días. La elevación de GGT, indica daño hepático de tipo canalículo, siendo más específica que la AST (Noro, et al. 2006). El aumento de su actividad plasmática puede estar asociado a intoxicaciones por alcaloides pirrolizidínicos o aflatoxinas entre otras.

Balance proteico

La medición de la albúmina (ALB), globulina (GLB) y proteínas (PROT), corresponden al balance proteico y se presentan en la Figura 14. No se determinaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos ($P > 0,05$). Al igual que para los demás parámetros analizados existe un efecto tiempo, por lo que se observan diferencias significativas entre el día cero y el 17 del ensayo, manteniéndose los valores medios de los grupos dentro de las medias de referencia (ALB: 35 ± 3 g/L; GLB: 40 ± 6 g/L; PROT: 78 ± 6 g/L).

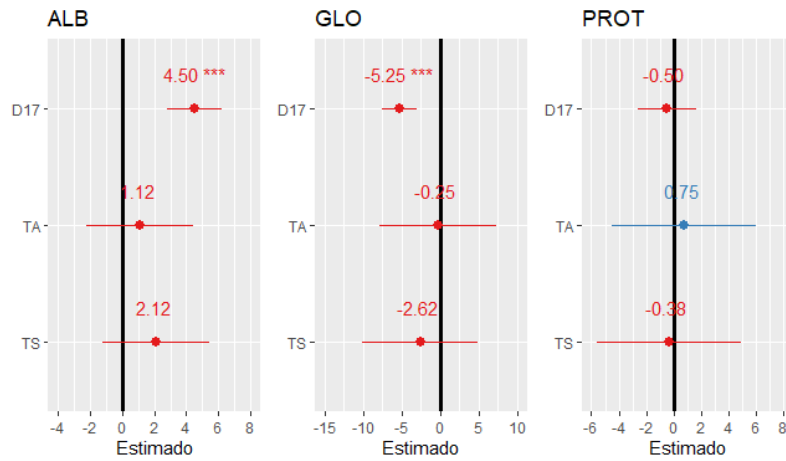


Figura 14. Valores estimados de albúmina (ALB), globulina (GLO) y proteína sanguínea (PROT) de los grupos TA (tratamiento aflatoxinas) y TS (tratamiento secuestrantes) comparados con el control de los días (D) 0 y 17 del ensayo (* = $P < 0,05$).

Balance iónico

Los niveles de calcio (Ca), fósforo (P) y magnesio iónico (Mg), así como la interacción de calcio y fósforo (Ca:P), se presentan en la figura 15. Durante el desarrollo del ensayo no se observó efecto de los tratamientos administrados a los animales, aunque se vieron variaciones entre los días 0 y 17. Todos los valores se mantuvieron dentro de los valores medios para la especie (Ca: $2,35 \pm 0,15$ mmol/L; P: $1,7 \pm 0,3$ mmol/L; Mg: $1,1 \pm 0,12$ mmol/L; Ca:P: $1,3 \pm 0,2$).

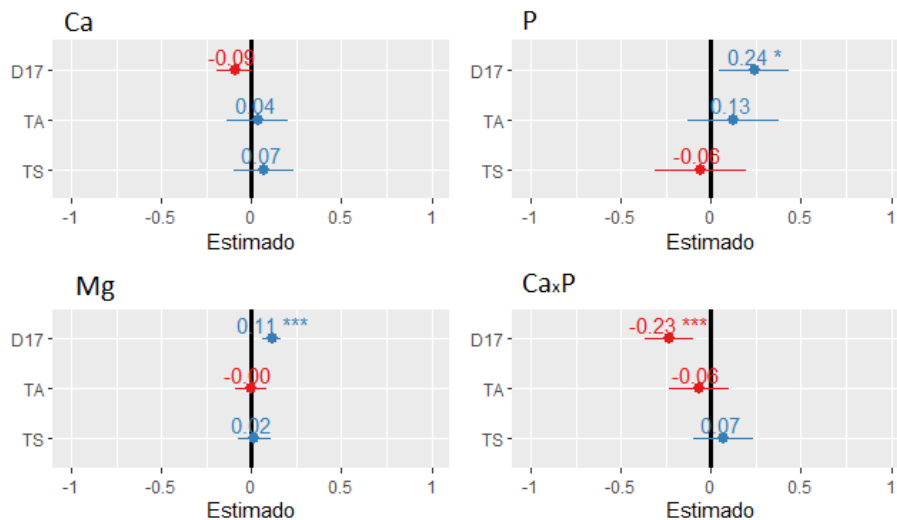


Figura 15. Estimados de los valores sanguíneos de calcio, fosforo y magnesio iónico y la relación entre los dos primeros de los grupos TA (tratamiento aflatoxinas) y TS (tratamiento secuestrante) comparados con el grupo control (* = $P < 0,05$).

Determinación de aflatoxinas M₁

Matriz leche

Período Administración de las aflatoxinas

La metabolización de AFB₁, fue cuantificada a través de la eliminación de AFM₁ en leche (Figura 16). Al primer ordeño después de la primera administración de los tratamientos ambos grupos presentaron niveles similares de AFM₁ en leche, pero a los días 6 y 10 pos inicio de la administración el grupo TA presentó niveles superiores de AFM₁ que el grupo TS ($P < 0,05$). El porcentaje de transferencia global de AFB₁ a AFM₁ excretada a través de la leche para el grupo TA fue de 1,04% y para el grupo TS fue de 0,48%.

En el día 10, el grupo TA presentó una concentración promedio de $13,2 \pm 2,4$ $\mu\text{g/L}$, mientras que el grupo TS presentó un promedio de $7,5 \pm 1,6$ $\mu\text{g/L}$. El porcentaje promedio de la reducción en la excreción de AFM₁ en leche fue de 43 % del grupo TA con respecto al grupo TS.

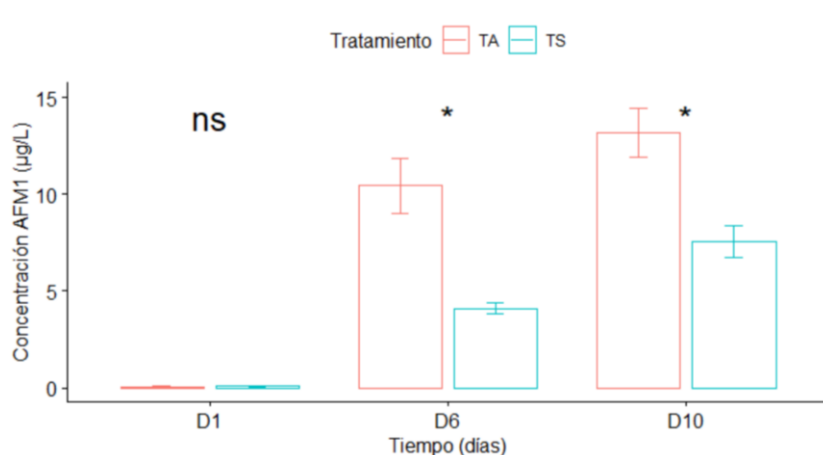


Figura 16. Concentración de AFM₁ en leche de los grupos TA (tratamiento aflatoxinas) y TS (tratamiento secuestrantes) durante el periodo de administración de los tratamientos. (* $P < 0,05$).

Trabajos similares utilizando secuestrantes a base de bentonitas, levaduras o HSCAS determinaron una disminución en la tasa de transferencia de AFB₁ administrada en la dieta a la AFM₁ excretada en leche (Kutz et al. 2009, Queiroz et al. 2012; Xiong et al. 2015; Rodrigues et al. 2019). Mientras que Weatherly et al. (2018), utilizando como agente secuestrante la arcilla de bentonita y AFB₁ en dosis de 100 mg/kg en cápsulas de gelatina administradas 1 hora después de la administración de la ración, no encontraron diferencias significativas en dichas tasas de transferencia.

Periodo de eliminación de Aflatoxinas

Los datos que muestran la eliminación de la AFM₁ 72 horas posteriores al retiro de la ración contaminada con AFB₁ y de la dosificación del secuestrante se presentan en la Figura 17. Una vez suspendida la administración de AF, las pendientes de eliminación de AFM₁ en leche fueron similares para ambos grupos, alcanzando a las 72 horas niveles inferiores a 0,5 µg/L. No se observó una dependencia entre la eliminación de AFM₁ en leche y la producción láctea de los animales (P>0,05).

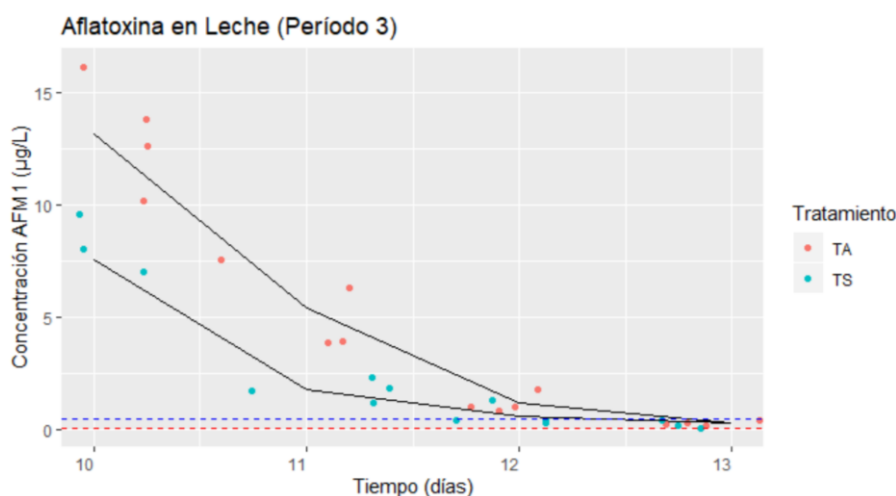


Figura 17. Perfiles de eliminación de AFM₁ (µg/L) en leche 72 horas posteriores a la suspensión de la administración de los tratamientos. Las líneas punteadas en azul y rojo indican los límites máximos de AFM₁, 0,5 µg/L (MERCOSUR) y 0,05 µg/L (Unión Europea), respectivamente. (Tratamiento aflatoxinas=TA [rojo]; Tratamiento secuestrantes= TS [azul]).

Autores como Queiroz et al. (2012) y Rojo et al. (2014) observaron que entre 72 y 96 horas posteriores a la suspensión de AFB₁ en la dieta, los niveles de AFM₁ en la leche era indetectable o se encontraba en niveles muy bajos. Dicho resultado coincide con lo encontrado en nuestro ensayo, en el que a las 72 horas la leche de los animales presentaba niveles de inferiores a 0,5 µg/L en ambos tratamientos. Mientras que los niveles fueron superiores para la reglamentación de la Unión Europea que establece 0,05 µg/L. Resultados similares obtuvo Xiong et al. (2015), donde encontró 24 horas posteriores a la eliminación de AFB₁ de la dieta niveles inferiores a los permitidos por la FDA (0,5 µg/L).

Matriz orina

La AFM₁ fue detectada en la orina de los animales de los grupos TA y TS a las 12 horas posteriores a la administración de los tratamientos, mientras que en el grupo TC no se detectaron niveles del metabolito (límite de detección del kit

utilizado 150 ng/mL). Sulzberger et al. (2017) cuantificó la presencia de AFM₁ en orina de vacas lecheras, después de administrar una dieta con cápsulas de gelatina conteniendo 100 µg/kg AFB₁ durante 3 días. En este trabajo se cuantificaron niveles variables de AFM₁ excretada a través del sistema renal. La concentración de esta toxina en orina está bien documentada en humanos, su estudio se debe a que es utilizada como marcador del consumo de AFB₁ (Ali et al. 2017). En bovinos los perfiles de excreción de AFB₁ en orina aún no están definidos.

CONCLUSIONES

La aflatoxina B₁ suministrada en la dieta de vacas lecheras en producción, fue detectada y cuantificada como aflatoxina M₁ en leche y orina en las primeras 12 horas posteriores a su administración. El suministro progresivo de 60 µg/kg de aflatoxina B₁, determinó niveles de aflatoxina M₁ en leche próximos a los 15 µg/L, 72 horas posteriores al cese de su administración los niveles fueron inferiores a los permitidos en la reglamentación MERCOSUR.

La exposición aguda de 60 µg/kg de aflatoxina B₁ no afectó la producción láctea, ni los analitos cuantificados en los perfiles metabólicos de las vacas que recibieron la dieta contaminada con o sin agregado de un secuestrante comercial.

La inclusión de un agente secuestrante en la dieta contaminada con AFB₁ de vacas lecheras en producción, contribuyó a disminuir en un 43 % los niveles de AFM₁ excretados por leche en relación a los encontrados en los animales que recibieron solamente la dieta con AFB₁.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ali, N., Blaszkewicz, M., Hossain, K., & Degen, G. H. (2017). Determination of aflatoxin M1 in urine samples indicates frequent dietary exposure to aflatoxin B1 in the Bangladeshi population. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 220(2), 271–281. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2016.11.002>
- Avantaggaito, G., Solfrizzo, M., & Visconti, A. (2005). Recent advances on the use of adsorbent materials for detoxification of Fusarium mycotoxins. *Food Additives and Contaminants*, 22(4), 379–388. <https://doi.org/10.1080/02652030500058312>
- Baglieri, A., Reyneri, A., Gennari, M., & Nègre, M. (2013). Organically modified clays as binders of fumonisins in feedstocks. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 48(9), 776–783. <https://doi.org/10.1080/03601234.2013.780941>
- Battacone, G., Nudda, A., & Pascale, M. (2005). Transfer of Aflatoxin B1 from Feed to Milk and from Milk to Curd and Whey in Dairy Sheep Fed Artificially Contaminated Concentrates. *Journal of Dairy Science*, 88, 3063–3069. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72987-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72987-8)
- Capelli, A., Suarez, G., & Garcia y Santos, C. (2019). Aflatoxinas en alimentos y leche de vacas de 18 establecimientos comerciales de las regiones centro-sur y este de Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*, 55(212). <https://doi.org/10.29155/vet.55.212.2>
- Chilibroste, P., Gibb, M., & Tamminga, S. (2009). Pasture characteristics and animal performance. *Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism*, 681–706. <https://doi.org/10.1079/9780851998145.0681>
- Codex Alimentarius*. (1995). *Codex general standard for contaminants and toxins in food and feed (Codex Stan 193-1995)*
- Coppock, R. W., Christian, R. G., & Jacobsen, B. J. (2018). Aflatoxins. In *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles: Third Edition* (pp. 983–994). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811410-0.00069-6>
- Coulombe, R. A., Shelton, D. W., Sinnhuber, R. O., & Nixon, J. E. (1982). Comparative mutagenicity of aflatoxins using a Salmonella /trout hepatic enzyme activation system. *Carcinogenesis*, 3(11), 1261–1264. <https://doi.org/10.1093/carcin/3.11.1261>
- Coulombe, R. A. (1993). Biological action of mycotoxins. *Journal of Dairy Science*, 76(3), 880–891. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77414-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77414-7)
- Coulombe R.A. Jr. (1993). SYMPOSIUM: BIOLOGICAL ACTION OF MYCOTOXINS Biological Action of Mycotoxins 1. *Journal of Dairy Science*, 76, 880–891. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77414-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77414-7)

- Daković, A., Kragović, M., Rottinghaus, G. E., Sekulí, Z., Milí Ceví C A, S., Milonjí C C, S. K., & Zari, S. (2010). Influence of natural zeolitic tuff and organozeolites surface charge on sorption of ionizable fumonisin B 1. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 76, 272–278. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.11.003>
- Daković, A., Tomašević-Čanović, M., Rottinghaus, G., Dondur, V., & Mašić, Z. (2003). Adsorption of ochratoxin A on octadecyldimethyl benzyl ammonium exchanged-clinoptilolite-heulandite tuff. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 30(1–2), 157–165. [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(03\)00067-5](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(03)00067-5)
- Di Gregorio, M. C., De Neeff, D. V., Jager, A. V., Corassin, C. H., De Pinho, A. C., De Albuquerque, R., Fernandes Olivera, C. A. (2014). Mineral adsorbents for prevention of mycotoxins in animal feeds: EBSCOhost. *Toxin Reviews*, 33, 125–135. <https://doi.org/DOI: 10.3109/15569543.2014.905604> REVIEW
- Drackley, J. K. (1999). Biology of Dairy Cows During the Transition Period: the Final Frontier? *Journal of Dairy Science*, 82(11), 2259–2273. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(99\)75474-3](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(99)75474-3)
- Edwards, S. G. (2004). Influence of agricultural practices on fusarium infection of cereals and subsequent contamination of grain by trichothecene mycotoxins. *Toxicology Letters*, 153, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.04.022>
- Ellis, W. O., Smith, J. P., & Simpson, B. K. (1991). Aflatoxins in food : Occurrence , Biosynthesis , Effects on Organisms , Detection , and Methods of Control. *Critical Reviews in Food Scienc*, 30(3), 403–439.
- FAO. (1977). *Report of the Joint FAO/WHO/UNEP Conference on Mycotoxins held in Nairobi, 19-17 September, 1977*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Retrieved from <https://apps.who.int/iris/handle/10665/36872>
- FAO. (2004). *Reglamento a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones en el año 2003*. Retrieved from http://www.fao.org/es/ESN/index_en.stm
- Firmin, S., Morgavi, D., Yiannikouris, A., & Boudra, H. (2011). Effectiveness of modified yeast cell wall extracts to reduce aflatoxin B1 absorption in dairy ewes. *Journal of Dairy Science*, 94, 5611–5619. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4446>
- Garrett, W. N., Heitman, H., & Booth, A. N. (1968). Aflatoxin Toxicity in Beef Cattle. *Experimental Biology and Medicine*, 127(1), 188–190. <https://doi.org/10.3181/00379727-127-32652>
- Harrison, L. R., Colvin, B. M., Greene, J. T., Newman, L. E., & Cole, J. R. (1990). Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1 , a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2(3), 217–221.
- 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. *Journal of Animal Science*, 62(3), 691–696. <https://doi.org/10.2527/jas1986.623691x>
- Kabak, B., Dobson, A. D. W., & Var, I. (2006). Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(8), 593–619. <https://doi.org/10.1080/10408390500436185>
- Kensler, T. W., Roebuck, B. D., Wogan, G. N., & Groopman, J. D. (2011). Aflatoxin: A 50-year Odyssey of mechanistic and translational toxicology. *Toxicological Sciences*, 120(SUPPL.1), 28–48. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq283>
- Kong, C., Shin, S. Y., & Kim, B. G. (2014). Evaluation of mycotoxin sequestering agents for aflatoxin and deoxynivalenol: An in vitro approach. *SpringerPlus*, 3(1), 1–4. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-346>
- Kutz, R. E., Sampson, J. D., Pompeu, L. B., Ledoux, D. R., Spain, J. N., Vázquez-Añón, M., & Rottinghaus, G. E. (n.d.). Efficacy of Solis, NovasilPlus, and MTB-100 to reduce aflatoxin M 1 levels in milk of early to mid lactation dairy cows fed aflatoxin B 1. *Journal of Dairy Science*, 92, 3959–3963. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2031>
- Laitila, A., Alakomi, H. L., Raaska, L., Mattila-Sandholm, T., & Haikara, A. (2002). Antifungal activities of two *Lactobacillus plantarum* strains against *Fusarium* moulds in vitro and in malting of barley. *Journal of Applied Microbiology*, 93(4), 566–576. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01731.x>
- Magan, N., & Olsen, M. (2004). *Mycotoxins in food. Mycotoxins in food*. <https://doi.org/10.1533/9781855739086>
- Maki, C., Thomas, A., Elmore, S., Romoser, A., Harvey, R., Ramirez-Ramirez, H., & Phillips, T. (2016). Effects of calcium montmorillonite clay and aflatoxin exposure on dry matter intake, milk production, and milk composition. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10242>
- Marasas, W. F. O, Kellerman, T. S., Gelderblom, W. C. A., Coetzer, J. A. W., Thievi, P. G., Vander Lugt, J. J., Van Der Lugt, P. G. &. (1988). *Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B1 isolated from Fusarium moniliforme Onderstepoort J. vet. Res* (Vol. 55). Retrieved from <https://repository.up.ac.za/bitstream/handle/2263/42389/43marasas1988>.
- Martinez, E. (1988). Manual para la identificación de hongos en ganos y sus derivados. Universidad autonoma de la ciudad de Mexico. 1ª ed. Mexico.
- Mok, C., Shin, S. Y., & Kim, B. G. (2013). Aflatoxin, deoxynivalenol, and zearalenone in swine diets: Predictions on growth performance. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 23(2), 243–254.
- Moss, M. O. (1996). Mycotoxins. *Mycological Research*, 100(5), 513–523. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(96\)80001-3](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(96)80001-3)
- Mostrom, M. S., & Jacobsen, B. J. (2011). Ruminant Mycotoxicosis. *Veterinary*

Clinics of NA: Food Animal Practice, 27, 315–344.
<https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2011.02.007>

- Noro, M., Vargas, V., Pulido, R. G., & Wittwer, F. (2006). Efecto del tipo de concentrado sobre indicadores sanguíneos del metabolismo de energía y de proteínas en vacas lecheras en pastoreo primaveral. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 38(3), 227–232. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2006000300005>
- Ogunade, I., Arriola, K., Jiang, Y., Driver, J., Staples, C., & Adesogan, A. (2016). Effects of 3 sequestering agents on milk aflatoxin M1 concentration and the performance and immune status of dairy cows fed diets artificially contaminated with aflatoxin B1. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-10905>
- Pan, D., García Santos, C., & Bettucci, L. (2016). In vitro evaluation of sequestering agents for aflatoxins. *Veterinaria (Montevideo)*, 52(201), 23–27.
- Patterson, D. S., & Anderson, P. H. (1982). Recent aflatoxin feeding experiments in cattle. *The Veterinary Record*, 110(3), 60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7064326>
- Pfohl-Leszkowicz, A., Hadjeba-Medjdoub, K., Ballet, N., Schrickx, J., & Fink-Gremmels, J. (2015). Assessment and characterisation of yeast-based products intended to mitigate ochratoxin exposure using in vitro and in vivo models. *Food Additives and Contaminants* -, 32(4), 604–616. <https://doi.org/10.1080/19440049.2014.970590>
- Queiroz, O. C. M., Han, J. H., Staples, C. R., & Adesogan, A. T. (2012). Effect of adding a mycotoxin-sequestering agent on milk aflatoxin M1 concentration and the performance and immune response of dairy cattle fed an aflatoxin B1-contaminated diet. *Journal of Dairy Science*, 95(10), 5901–5908. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-5287>
- Ramos, A. J., & Hemhdez, E. (1997). Prevention of aflatoxicosis in farm animals by means of hydrated sodium calcium aluminosilicate addition to feedstuffs : a review, 8401(96). [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(96\)01084-X](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(96)01084-X)
- Rodrigues, R. O., Rodrigues, R. O., Ledoux, D. R., Rottinghaus, G. E., Borutova, R., Averkieva, O., & Mcfadden, T. B. (2019). Feed additives containing sequestrant clay minerals and inactivated yeast reduce aflatoxin excretion in milk of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 1. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-16151>
- Rojo, F., Patricio Martínez, S., Isaías Espinoza, V. H., Nathal Vera, M. A., De Lucas Palacios, E., & Reyes Velázquez, W. P. (2014). Evaluación de adsorbentes para la reducción de aflatoxina M1 en leche de vacas alimentadas con dietas contaminadas artificialmente con AFB1. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 5(1), 1–15. Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11242014000100001
- Shapira, R., & Paster, N. (2004). Control of mycotoxins in storage and techniques

- for their decontamination. In M. Magan, N. Olsen (Ed.), *Mycotoxins in Food. Detection and Control*. (pp. 190–223). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9781855739086.2.190>
- Soriano, J. M., & Castillo, D. (n.d.). *Micotoxinas en alimentos*. Retrieved from <http://www.diazdesantos.es>
- Sulzberger, S. A., Melnichenko, S., & Cardoso, F. C. (2017). Effects of clay after an aflatoxin challenge on aflatoxin clearance, milk production, and metabolism of Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, *100*(3), 1856–1869. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11612>
- Swanson, B. G. (1987). Acta Horticulturae no swanson.pdf. *Food Science and Human Nutrition*, *207*, 49–61.
- Turner, N. W., Bramhmbhatt, H., Szabo-Vezse, M., Poma, A., Coker, R., & Piletsky, S. A. (2015). Analytical methods for determination of mycotoxins: An update (2009–2014). *Analytica Chimica Acta*, *901*, 12–33. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2015.10.013>
- Urrego, J. R., & Diaz, G. J. (2006). Aflatoxinas : Mecanismos de toxicidad en la etiología de cáncer hepático celular.
- Vekiru, E., Fruhauf, S., Sahin, M., Ottner, F., Schatzmayr, G., & Krska, R. (2007). Investigation of various adsorbents for their ability to bind Aflatoxin B1. *Mycotoxin Research*, *23*(1), 27–33. <https://doi.org/10.1007/BF02946021>
- Weatherly, M. E., Pate, R. T., Rottinghaus, G. E., Roberti Filho, F. O., & Cardoso, F. C. (2018). Physiological responses to a yeast and clay-based adsorbent during an aflatoxin challenge in Holstein cows. *Animal Feed Science and Technology*, *235*(June 2017), 147–157. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.11.019>
- Whitlow, L. W. (n.d.). *Molds and Mycotoxins in Feedstuffs-Prevention and Treatment*.
- Woolford, M. K. (1975). Microbiological screening of the straight chain fatty acids (c1-c12) as potential silage additives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *26*(2), 219–228. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740260213>
- Xiong, J. L., Wang, Y. M., Nennich, T. D., Li, Y., & Liu, J. X. (2015). Transfer of dietary aflatoxin B1 to milk aflatoxin M1 and effect of inclusion of adsorbent in the diet of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, *98*(4), 2545–2554. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7842>
- Yiannikouris, A., & Jouany, J.-P. (2002). Review article Mycotoxins in feeds and their fate in animals : a review. *Journal of Applied Animal Research*, *51*, 81–99. <https://doi.org/10.1051/animres>
- Zinedine, A., Soriano, J. M., Moltó, J. C., & Mañes, J. (2007). Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. *Food and Chemical Toxicology*, *45*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.07.030>

ANEXOS

1. DIETA DE LOS ANIMALES

Animal Performance

DMI - Actual : 18.4 (kg/day)

DMI - Predicted : 18.9 (kg/day)

NEI Allowable Milk : 25.9 (kg/day)

MP Allowable Milk : 23.9 (kg/day)

Milk Production : 24.0 (kg/day)

Days to gain one condition score : > 305

Daily Weight Change due to Reserves : 0.3 (kg/day)

Protein Values

RDP Required : 1734 (g/d)

RDP Supplied : 1864 (g/d)

RDP Balance : 130 (g/d)

RUP Required : 949 (g/d)

RUP Supplied : 941 (g/d)

RUP Balance : -8 (g/d)

MP - Bacterial : 943 (g/d)

MP - RUP : 713 (g/d)

MP - Endogenous : 87 (g/d)

CP - Diet : 15.2 (%DM)

CP - RDP : 10.1 (%DM)

CP - RUP : 5.1 (%DM)

Diet Concentrations

NDF : 47.4 (%DM)
Forage NDF : 29.1 (%DM)
ADF : 31.3 (%DM)
NFC : 30.3 (%DM)
Undiscounted TDN : 64 (%DM)
ME : 2.35 (Mcal/kg DM)
NEI : 1.47 (Mcal/kg DM)
NEg : 0.90 (Mcal/kg DM)
Ca : 0.5 (%DM)
P : 0.3 (%DM)
Ether-Extract : 2.7 (%DM)
DCAD : 221 (mEq/kg)

Target Diet Concentrations

NEI : 1.36 (Mcal/kg)
MP : 92 (g/kg)

Ca : 2 (g/kg)
P : 2 (g/kg)

Diet Summary

Energy and Protein Supply

Feed Name	DMI (kg/day)	TDN (g/day)	ME (Mcal/day)	NEI (Mcal/day)	NEg (Mcal/day)	CP (g/day)	RUP (g/day)	RDP (g/day)	NDF (kg/day)	MCP (g/day)
Silo Pack	4.0	2559	9.4	5.9	3.6	652	225	427	1.3	-
SMPE	7.0	4225	14.5	8.9	4.9	385	134	251	4.1	-
Harina de Soja	2.3	1751	7.7	5.0	3.5	1135	371	764	0.6	-
Grano Maiz Seco	0.4	293	1.1	0.7	0.5	21	10	12	0.1	-
Cascarilla Soja	4.5	2944	10.6	6.6	4.1	472	202	270	2.8	-
Nucleo Vit-Min	0.3	0	0.0	0.0	0.0	0	0	0	0.0	-
Urea	0.1	0	0.0	0.0	0.0	141	0	141	0.0	-
Totals :	18.4	11772	43.3	27.0	16.5	2806	941	1864	8.7	1474

Feed Name	ME (Mcal/kg)	NEI (Mcal/kg)	NEg (Mcal/kg)	Kp (%/hr)
Silo Pack	2.36	1.47	0.90	5.11
SMPE	2.07	1.27	0.70	5.11
Harina de Soja	3.37	2.18	1.52	6.70
Grano Maiz Seco	3.03	1.95	1.33	6.70
Cascarilla Soja	2.39	1.49	0.92	6.70
Nucleo Vit-Min	0.00	0.00	0.00	6.70
Urea	0.00	0.00	0.00	6.70

Increment over Maintenance : 3.0 X
Energy/Protein Discount Factor : 3.7%
Undiscounted TDN in Diet : 63.9%
Diet RUP Digestibility : 75.7%