

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 759 787**

51 Int. Cl.:

A23K 20/111 (2006.01)

A23K 20/116 (2006.01)

A23K 20/20 (2006.01)

A23K 20/28 (2006.01)

A23K 50/30 (2006.01)

A23K 50/75 (2006.01)

A23L 3/3463 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.05.2011** **PCT/US2011/036809**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.11.2011** **WO11146485**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2011** **E 11784091 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019** **EP 2571384**

54 Título: **Aglutinante de micotoxinas**

30 Prioridad:

17.05.2010 US 345186 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

12.05.2020

73 Titular/es:

KEMIN INDUSTRIES, INC. (100.0%)
2100 Maury Street
Des Moines, Iowa 50317, US

72 Inventor/es:

SCHOETERS, ELKE;
LI, ZHENG;
VAN DYCK, STEFAAN y
LAO, YE

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 759 787 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Aglutinante de micotoxinas

Antecedentes de la invención

La presente invención se refiere en general a aglutinantes de micotoxinas y, más específicamente, a aglutinantes de micotoxinas que usan compuestos húmicos y se define por las reivindicaciones adjuntas.

Las micotoxinas son invisibles, inodoras y no se pueden detectar por el olor o el sabor, pero pueden provocar grandes pérdidas económicas en todos los niveles de producción de piensos agrícolas y especialmente en la producción animal. Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos filamentosos como *Fusarium*, *Aspergillus*, y *Penicillium* antes y durante la cosecha, o durante el almacenamiento (inadecuado). Sus efectos tóxicos son muy diversos (Akande, K.E., Abubakar, M.M., Adegbola, T.A., and Bogoro, S.E. 2006 Nutritional and Health Implications of Mycotoxins in Animal Feeds: A Review. Pakistan Journal of Nutrition, 5: 398-403). En los animales de granja, las micotoxinas tienen efectos negativos en la ingesta de piensos, el rendimiento animal, la tasa reproductiva, la eficiencia del crecimiento, la defensa inmunológica, además de ser cancerígenas, mutagénicas, teratogénicas, causar temblores o dañar el sistema nervioso central, hemorrágico, así como causar daño al hígado y los riñones. Las micotoxinas se metabolizan en el hígado y los riñones y también por microorganismos en el tracto digestivo. Por lo tanto, a menudo la estructura química y la toxicidad asociada de los residuos de micotoxinas excretados por los animales o encontrados en sus tejidos son diferentes de la molécula original (Ratcliff, J. The Role of Mycotoxins in Food and Feed Safety. Presented at Animal Feed Manufacturers Association, August 16, 2002). Pueden ocurrir diversas micotoxinas simultáneamente, dependiendo de las condiciones ambientales y del sustrato (Sohn, H.B., Seo, J.A., and Lee, Y.W. 1999 Co-occurrence of Fusarium Mycotoxins in Mouldy and Healthy Corn from Korea. Food Additives and Contaminants, 16: 153-158). Teniendo en cuenta esta producción coincidente, es muy probable que los animales estén expuestos a mezclas en lugar de compuestos individuales. Los estudios de campo han demostrado que la toxicosis más severa en animales puede ser el resultado de los efectos aditivos y sinérgicos de diferentes micotoxinas (Ratcliff, 2002). El problema de las micotoxinas no solo termina en los piensos o en la reducción del rendimiento animal, muchos se concentran en la carne, los huevos y la leche de los animales y pueden representar una amenaza para la salud humana. Existe una creciente preocupación por los niveles de micotoxinas en los alimentos humanos, tanto de origen vegetal como animal.

Aunque existen diferencias geográficas y climáticas en la producción y aparición de micotoxinas, la exposición a estas sustancias es mundial. Se estima que las micotoxinas afectan hasta el 25 por ciento de los cultivos del mundo cada año (Akande, 2006). La mayoría de los países tienen una regulación estricta sobre los niveles de micotoxinas en los piensos y el objetivo principal de las industrias agrícolas y alimentarias es prevenir la contaminación por micotoxinas en el campo. Las prácticas de manejo para maximizar el rendimiento de la planta y disminuir el estrés de la planta pueden disminuir sustancialmente la contaminación por micotoxinas. Esto incluye la siembra de variedades adaptadas, la fertilización adecuada, el control de malezas, el riego necesario y la rotación adecuada de los cultivos (Edwards, S.G. 2004 Influence of Agricultural Practices on Fusarium Infection of Cereals and Subsequent Contamination of Grain by Tricothecenes Mycotoxins. Toxicology Letters, 153: 29-35). Pero incluso las mejores estrategias de manejo no pueden eliminar la contaminación por micotoxinas en años favorables para el desarrollo de la enfermedad.

Entre las diversas micotoxinas identificadas que afectan especialmente a las aves de corral, algunas se producen significativamente en alimentos y piensos contaminados naturalmente. Son aflatoxinas; ocratoxina, zearalenona, toxina T-2, vomitoxina y fumonisina. Causan efectos perjudiciales en las aves, tales como problemas de crecimiento, depresión inmunológica y palidez en los pollos de engorde, que finalmente provocan pérdidas económicas.

La aflatoxina B1, un metabolito del hongo *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, es un compuesto extremadamente hepatotóxico que con frecuencia contamina los piensos para aves de corral a niveles bajos. Otra familia de micotoxinas producidas por los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* es la ocratoxina. Siendo la ocratoxina, la toxina más potente, afecta negativamente los parámetros de producción y la salud de las aves de corral. La ingestión de ocratoxina causa daño renal severo. La toxina T-2 induce reacciones inflamatorias graves y trastornos neuronales en animales y humanos, mientras que la zearalenona parece no tener ningún efecto sobre la salud y el rendimiento de las aves de corral. Las raciones de aves de corral con altos niveles de contaminación por *Fusarium* se han asociado con bajo rendimiento, rechazo al pienso, diarrea, debilidad en las piernas, lesiones orales y/o alta mortalidad.

La toxicidad y los signos clínicos observados en animales cuando más de una micotoxina está presente en el alimento son complejos y diversos. Las micotoxinas suelen ir acompañadas de otros metabolitos desconocidos que pueden tener efectos sinérgicos o aditivos. La capacidad de los aglutinantes para aliviar los efectos adversos de varias combinaciones de micotoxinas presentes de forma natural en el pienso sobre la productividad y los parámetros bioquímicos y hematológicos del suero aún no se han explorado.

Los métodos prácticos para desintoxicar granos contaminados con micotoxinas a gran escala y de manera rentable no están disponibles actualmente. En la actualidad, uno de los enfoques más prometedores y prácticos es el uso de adsorbentes. Sin embargo, se ha demostrado que diversos adsorbentes afectan el uso de nutrientes (Kubena, L. F., R. B. Harvey, T. D. Phillips, D. E. Corrier, and W. E. Huff. Diminution of aflatoxicosis in growing chickens by the dietary

addition of hydrated sodium calcium aluminosilicate. Poult. Sci. 69:727-735. 1990) y adsorción mineral (Chestnut, A. B., P. D. Anderson, M. A. Cochran, H. A. Fribourg, and K. D. Twinn. 1992. Effects of hydrated sodium calcium aluminosilicate on fescue toxicosis and mineral absorption. J. Anim. Sci. 70:2838-2846) y carecen de efectos aglutinantes contra múltiples micotoxinas de importancia práctica Edrington, T.S.; Sarr, A.B.; Kubena, L.F.; Harvey, R.B.; Phillips, T.D. (1996). Hydrated sodium calcium aluminosilicate (HSCAS), acidic HSCAS, and activated charcoal reduce urinary excretion of aflatoxin M1 in turkey poults. Lack of effect by activated charcoal on aflatoxicosis. Toxicology letter, 89: 115-122).

La zearalenona (ZEA) causa hiperestrogenismo en cerdos cuando se ingiere a niveles tan bajos como 1 µg/g de alimento. La patología en los cerdos es más pronunciada en las primerizas prepuberales y se caracteriza por tumefacción de la vulva, prolapsos de la vagina y el recto y aumento de las glándulas mamarias. En animales fértiles, los efectos de la zearalenona incluyen el fracaso de la concepción, el pseudoembarazo y el aborto. El metabolismo de ZEA parece ocurrir esencialmente en el hígado, lo que conduce a α y β zeatalenol. La enzima que se cree que cataliza la reducción de ZEA a zearalenol es la 3- α -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 α -HSD). También se sabe que esta enzima degrada el 5- α -androstano-3,17-diona, un producto del metabolismo de las hormonas esteroides. Como se sabe en diversos estudios, ZEA y sus metabolitos se excretan principalmente a través de las heces y la orina. Los cerdos son más sensibles a la ZEA que otras clases de ganado, y son deseables los regímenes de alimentación que minimicen las pérdidas debido al desperdicio de pienso y el bajo rendimiento. Se ha demostrado que algunos compuestos (es decir, fibra, formalina, carbonato de sodio y monometilamina) protegen contra numerosos xenobióticos, incluidos los efectos de ZEA.

El uso de inhibidores de moho o la conservación por ácidos solo puede reducir la cantidad de moho pero no influye en el contenido de micotoxinas generadas antes del tratamiento. Si las micotoxinas se han producido antes, no se verán afectadas de ninguna forma por inhibidores de moho o mezclas de ácidos, ya que son compuestos muy estables. De este modo, estos compuestos tóxicos permanecen en el producto anteriormente infectado, incluso si no se pueden ver ni detectar más hongos. La estrategia más común usada para reducir la exposición a las micotoxinas es la disminución de su biodisponibilidad mediante la inclusión de diversos agentes aglutinantes o adsorbentes de micotoxinas, lo que conduce a una reducción de la absorción y distribución de micotoxinas en la sangre y los órganos diana. Las principales ventajas de los adsorbentes incluyen el gasto, la seguridad y la facilidad de agregar a los piensos. Se han probado y usado diversos grupos de sustancias para este propósito, con silicatos de aluminio, en particular arcilla y minerales zeolíticos, como los grupos más comúnmente aplicados.

Los ácidos húmicos son ubicuos y se encuentran dondequiera que la materia se descomponga o se haya transpuesto, como en el caso de los sedimentos. Son componentes naturales del agua potable, el suelo y el lignito. Las sustancias húmicas tienen una fuerte afinidad para unirse a diversas sustancias, tales como metales pesados, herbicidas, diferentes mutágenos, compuestos monoaromáticos y aromáticos policíclicos y minerales. Los agricultores usan humatos para acelerar la germinación de semillas y mejorar el crecimiento del rizoma durante muchos años (Islam, K.M., Schuhmacher, S.A., and Gropp, M.J. 2005 Humic Substances in Animal Culture. Pakistan Journal of Nutrition, 4: 126-134). Los materiales pueden estimular el transporte de oxígeno, acelerar la respiración y promover el uso eficiente de nutrientes por las plantas (Osterberg, R. and Mortensen, K. 1994 The Growth of Fractal Humic Acids: Cluster Correlation and Gel Formation. Radiation and Environmental Biophysics, 33: 269-276). Estas observaciones llevaron a los científicos a estudiar las propiedades específicas de los humatos y sus posibles beneficios para mejorar la salud y el bienestar de humanos y animales. Las sustancias húmicas se han usado como agentes antidiarreicos, analgésicos, inmunoestimulantes y promotores del crecimiento en las prácticas veterinarias en Europa (Islam, 2005). Los ácidos húmicos inhiben el crecimiento bacteriano y fúngico, disminuyendo de este modo indirectamente los niveles de micotoxinas en piensos (Riede, U.N., Zeck-Keapp, G., Freudenberg, N., Keller, H.U., and Seubert, B. 2007 Humate Induced Activation of Human Granulocytes. Virchows Archives of Biology: Cell Pathology, 60: 27-34). Se ha descrito que algunas sustancias húmicas y sus sales interactúan directamente con las micotoxinas por su capacidad de unión a micotoxinas (Sabater-Vilar, M., Malekinejad, H., Selman, M.H.J., Ven Der Doelen, M.A.M., and Fink-Gremmels, J. 2007, In Vitro Assessment of Absorbents Aiming to Prevent Deoxynivalenol and Zearalenone Mycotoxicosis. Micropathologia, 163: 81-90; Ye, S., Lv, X., and Zhou, A. 2009 In Vitro Evaluation of the Efficacy of Sodium Humate as an Aflatoxin B1 Adsorbent. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 3: 1296-1300; Jansen van Rensburg, C., Van Rensburg, C.E.J., Van Ryssen, J.B.J., Casey, N.H., and Rottinghaus, G.E. 2006 In Vitro and In Vivo Assessment of Humic Acid as an Aflatoxin Binder in Broiler Chickens. Poultry Science, 85: 1576-1583), las composiciones de aditivos alimentarios que contienen ácido húmico y humato se describen en los documentos US 2003/003203, US 2004/197384, DE4129874 y US 5626881.

Resumen de la invención

El nuevo grupo de aglutinantes de micotoxinas descritos son sustancias que contienen ácido húmico. La invención proporciona un aglutinante de micotoxinas para piensos, que comprende del 10% al 90% de sustancias húmicas que comprenden un 45% o más de ácido húmico, una solubilidad máxima del 20% a un pH entre 1.5 y 7.0, y una eficacia de unión de micotoxinas *in vitro* de al menos 80% con adsorción de al menos 80% al pH biológico del estómago de un animal monogástrico y desorción no mayor del 10% a pH neutro; y 10% a 90% de materiales de arcilla, en el que la micotoxina comprende zearalenona.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 es un gráfico de puntajes semanales promedio de vulva para todos los grupos de primerizas; Los errores estándar variaron desde 0.3 a 0.5.

La figura 2 es un gráfico de la evolución de la concentración promedio en plasma de estradiol-17 β para diferentes lotes.

5 La figura 3 es un gráfico del porcentaje de ovarios que tienen folículos de ≤ 6 mm de tamaño para diferentes lotes.

La figura 4 es un gráfico del porcentaje de ovarios que tienen folículos > 6 mm de tamaño para diferentes lotes.

La figura 4 es un gráfico del porcentaje de ovarios que tienen folículos > 6 mm de tamaño para diferentes lotes.

La figura 5 es un gráfico del porcentaje de primerizas que tienen ovario hipoplásico y folículos > 6 mm de tamaño.

Descripción de la invención.

10 La presente invención incluye composiciones para agregar a piensos que pueden estar contaminados con una o más micotoxinas. Las composiciones incluyen sustancias húmicas, preferiblemente sustancias húmicas que contienen entre 45% y 99% de ácidos húmicos, que incluyen todos los niveles dentro de dicho intervalo. Las composiciones deben tener una alta afinidad por las micotoxinas específicas que se abordan, lo que da como resultado la formación de un complejo fuerte entre la composición y la micotoxina objetivo que no se verá interrumpida por la solubilidad en el tracto gastrointestinal, de modo que la micotoxina se excretará en las heces. Las composiciones tienen una solubilidad máxima del 20% a pH entre 1.5 y 7.5. Las composiciones de la presente invención que resultan eficaces *in vivo* tienen eficiencias de unión *in vitro* de más del 80%, y preferiblemente más del 90%, con una absorción mínima a pH 3.0 de al menos 80%, y preferiblemente 85%, y una desorción máxima a pH 6.8 de no más del 10%.

20 Las sustancias húmicas apropiadas para la presente invención se pueden obtener de muchas fuentes, pero una fuente preferida es la leonardita. Las sustancias húmicas se combinan con una arcilla, tal como bentonita o sepiolita, en cantidades que varían desde 10% a 90% de una fuente de sustancias húmicas combinadas con cantidades de arcilla que van desde 90% al 10%, y todas las proporciones intermedias. Las sustancias húmicas se combinan preferiblemente con una o más fuentes de iones metálicos u óxidos.

Ácidos húmicos en sustancias naturales.

25 Los ácidos húmicos se forman a través de la humificación química y biológica de la materia orgánica, particularmente plantas y a través de las actividades biológicas de los microorganismos. Se encuentran en la materia orgánica marrón de una variedad de suelos, así como en turbas, estiércol, lignito, leonardita y carbones marrones. En los suelos también se pueden formar mediante ciertos procedimientos secundarios, tales como la polimerización de polifenoles lixiviados por la lluvia de la hojarasca superficial y la condensación de fenoles, quinonas y proteínas que son proporcionados por la acción de los microorganismos del suelo y los pequeños animales sobre los carbohidratos del suelo.

30 Los ácidos húmicos no tienen una estructura sola única, sino que son una mezcla de productos químicos intermedios resultantes de la descomposición y conversión de lignina y otros materiales vegetales en carbón duro. Son moléculas macrocoloidales tridimensionales con un centro poliaromático que contiene estructuras iso y heterocíclicas y cadenas laterales periféricas. La estructura orgánica del ácido húmico se oxida naturalmente, dándole una carga negativa. Los iones positivos, atraídos por los enlaces rotos en el sitio de la oxidación, crean sitios para que se unan los micronutrientes y la microflora. Los carbones de bajo grado, llamados lignito, contienen más ácidos que los carbones de alto grado. Leonardita es una formación particular de lignito altamente oxidado. Este material tiene el mayor contenido de ácidos húmicos de cualquier fuente natural.

Ejemplo 1

40 Se realizó un experimento para determinar el contenido de ácido húmico de cinco sustancias que contienen ácido húmico natural. Los ácidos húmicos se midieron mediante un método volumétrico con titulación de los extractos según la Norma Internacional (ISO 5073:1999 Brown coals and lignites. Determination of humic acids).

Los resultados de los análisis de las sustancias que contienen ácido húmico se muestran en la tabla 1. Todos los productos excedieron el requisito mínimo divulgado de 45% de ácido húmico, excepto HS3 (28.34%) y HS4 (44.62%).

45 Tabla 1 - Contenido de ácido húmico determinado por ISO 5073:1999.

Sustancia que contiene ácido húmico	Contenido de ácido húmico (%)
HS1	46.31
HS2	64.84

HS3	28.34
HS4	44.62
HS5	67.45

Solubilidad de sustancias que contienen ácido húmico a diferentes pH

La mayoría de las sustancias de ácido húmico están químicamente unidas a componentes inorgánicos (arcilla u óxidos), y una parte más pequeña se disuelve en las soluciones o en el suelo, particularmente en condiciones alcalinas. Una característica importante de las sustancias húmicas es que se pueden combinar con iones metálicos, óxidos y minerales arcillosos para formar complejos solubles o insolubles en agua y pueden interactuar con compuestos orgánicos tales como alquenos, ácidos grasos, sustancias capilares activas y pesticidas.

Los adsorbentes usados para dificultar la absorción gastrointestinal de las micotoxinas deberían tener una alta afinidad por las micotoxinas específicas, lo que da como resultado la formación de un complejo fuerte que no se alterará y se excretará a través de las heces. Esto implica que los ácidos húmicos, como los principales compuestos activos, no se pueden disolver en ningún lugar del tracto gastrointestinal. Las sustancias de ácido húmico descritas pueden no tener una solubilidad superior al 20% a pH 1.5; 3.0 y 7.0 (esto es, recuperación mínima del 80% de retenido).

Ejemplo 2

Se realizó un experimento para determinar la parte no soluble de las sustancias que contienen ácido húmico. Brevemente, se disolvió una cantidad de 0.15 g de producto en 75 ml de solución reguladora de fosfato 0.1 M (ajustado a pH 1.5; 3.0 o 7.0) y se incubó durante una hora a temperatura ambiente en una placa de agitación magnética (600 rpm). Todas las suspensiones se filtraron a través de un filtro de 55 mm (Macherey-Nagel, MN GF-4). El retenido se secó durante dos horas a 130 °C. La cantidad de material retenido se calculó como la diferencia de masa entre el filtro vacío y el filtro + material retenido seco. La recuperación (%) se calculó como la proporción "cantidad retenida"/"producto en masa" y se expresó como porcentaje. Las muestras se analizaron por triplicado y se calcularon las medias. El material de referencia fue ácido húmico purificado (HA, Sigma Aldrich. Lot 0001411101, número de cas: 1415-93-6).

La recuperación de la fracción no soluble de la suspensión de HA a pH 7 no fue posible. La filtración de esta suspensión no se pudo realizar debido a las "sustancias flotantes" que se formaron durante la etapa de incubación que hicieron que el filtro no fuera permeable. El experimento se repitió en solución reguladora de citrato ajustado a pH 6.2. Sin embargo, los resultados fueron los mismos. Las otras suspensiones de los productos se podrían filtrar fácilmente en cada pH probado. Los resultados de los retenidos recuperados se muestran en la tabla 2. Todos menos dos productos alcanzaron la recuperación mínima de retenido del 80% en las diferentes condiciones de pH. La recuperación del retenido de HS1 fue demasiado baja a pH 1.5; la recuperación de los retenidos de HS3 fue demasiado baja en todos los niveles de pH probados.

Tabla 2. Fracción no soluble de sustancias que contienen ácido húmico a diferentes pH, expresada como % de masa recuperada en retenido.

	pH					
	1.5		3		7	
	media	stdev	media	stdev	media	stdev
HA	80.97	4.13	84.65	3.18	ND	ND
HS1	78.41	0.97	80.46	1.14	85.40	0.48
HS2	85.02	1.21	86.54	0.80	84.23	0.75
HS3	67.80	0.78	68.16	0.93	64.14	2.62
HS4	80.75	1.58	84.54	2.30	92.13	0.42
HS5	83.24	0.85	84.73	0.46	86.47	2.02
ND: no se determinó la recuperación retenida de HA a pH 7						

Ejemplo 3

En un segundo experimento sobre la solubilidad de sustancias que contienen ácido húmico, se disolvieron 0.015 g (en lugar de 0.15 g) de los productos HS2, HS3 y HA en 75 ml de solución reguladora de fosfato 0.1 M (pH 1.5; 3.0 o 7.0).

Después de una incubación durante una hora a temperatura ambiente en una placa de agitación magnética, la morfología de las suspensiones de los tres productos probados fue claramente diferente (Figura 1). Los resultados de los retenidos recuperados se muestran en la tabla 3. El color marrón oscuro de la suspensión de HA a pH 7 correspondió con una alta solubilidad del producto a este pH (Tabla 3).

Tabla 3. Fracción no soluble de sustancias que contienen ácido húmico a diferentes pH, expresada como % de masa recuperada en retenido.

	pH					
	1.5		3		7	
	media	stdev	media	stdev	media	stdev
HA	103.17	2.69	128.41	8.93	54.82	5.74
HS2	107.86	10.44	115.98	7.56	121.25	11.06
HS3	106.88	8.59	126.59	9.57	91.24	2.02

10 Capacidad de unión a micotoxinas *in vitro* de sustancias que contienen ácido húmico

Durante el procedimiento de adsorción, la micotoxina no está realmente unida a la superficie del aglutinante. Las fuerzas electrostáticas que unen la toxina con el aglutinante no son enlaces permanentes, lo que significa que el procedimiento de adsorción es reversible. Un cambio en el entorno del aglutinante de micotoxinas (por ejemplo, en el tracto digestivo) puede tener un efecto dramático en la eficacia de la unión. El parámetro principal que influye es el pH del medio ambiente. Los cambios en el pH pueden cambiar tanto la micotoxina como la superficie del aglutinante, provocando una modificación de la atracción entre los dos. En un animal, en el intestino anterior, las condiciones de pH bajo pueden promover la adsorción de micotoxinas, mientras que en el tracto digestivo (pH más neutro) la micotoxina puede liberarse nuevamente. Debido al vasto efecto del pH sobre la adsorción, es primordial importancia usar un sistema *in vitro* que imite el cambio de las condiciones de pH a lo largo del tracto gastrointestinal.

20 Ejemplo 4

Se realizó un estudio sobre la evaluación *in vitro* de la eficacia de desintoxicación de micotoxinas de posibles secuestrantes de sustancias que contienen ácido húmico contra la zearalenona. Se midieron la adsorción en un ambiente ácido (pH 3.0), que simula el pH del estómago de un animal monogástrico, y la desorción a un pH casi neutro (pH 6.8) que simula las condiciones de pH en el intestino de un animal monogástrico. El porcentaje neto de eficiencia de desintoxicación de micotoxinas se determinó como porcentaje de adsorción menos porcentaje de desorción.

Se agregaron partes alícuotas por duplicado de solución reguladora de fosfato 0.1 M (ajustado a pH 3.0) que contenía 300 ppb de zearalenona en solución (10 ml) a tubos de polipropileno Falcon con tapa de rosca de 15 ml a los que se habían agregado 0.05 gramos de cada adsorbente. Los tubos de ensayo se colocaron en un agitador orbital durante 60 minutos a temperatura ambiente. Cada solución de prueba de micotoxinas se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante acuoso se aisló para el análisis de micotoxinas (adsorción). Las pellas se volvieron a suspender en solución reguladora de fosfato 0.1 M pH 6.8. Los tubos de ensayo se colocaron nuevamente en un agitador orbital durante 60 minutos a temperatura ambiente y luego se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante acuoso se analizó para determinar la zearalenona (desorción). Las concentraciones de zearalenona se determinaron usando ELISA (Euro-Diagnostica). Las soluciones reguladas de prueba de zearalenona (pH 3.0 o 6.8) sin adsorbentes se usaron como estándar.

En la tabla 4 se presenta un resumen de la adsorción de micotoxinas *in vitro* por cinco muestras. Los resultados mostraron que todos los productos adsorbieron efectivamente zearalenona a pH 3.0 (adsorción por encima del valor mínimo requerido del 85%), excepto HS3. Se observaron diferencias notables para la desorción a pH 6.8. Se demostró que los productos HS3 y HS4 superaban el valor máximo del 10% de desorción. Las otras tres muestras cumplieron el requisito. Solo los productos HS2 y HS5 cumplieron la mínima eficacia de unión *in vitro* requerida del 90%.

Tabla 4. Unión *in vitro* de zearalenona por sustancias que contienen ácido húmico a pH 3.0 y 6.8.

Adsorbente	Unión de ZEA <i>in vitro</i>		
	Absorción (%)	Desorción (%)	Eficiencia (%)

	media	SD	media	SD	media
HS1	92.32	5.01	8.91	0.48	83.40
HS2	96.20	2.39	3.12	1.77	93.08
HS3	80.68		35.70		44.99
HS4	86.65	13.54	26.57	0.40	59.95
HS5	96.78	2.07	1.70	0.28	96.36

Ejemplo 5

Se compararon dos sustancias de ácido húmico (HS2 y HS3) con ácido húmico purificado (HA, Sigma Aldrich. Lot 0001411101, número de cas: 1415-93-6) en un ensayo de unión de micotoxinas *in vitro* similar al ensayo descrito en el ejemplo 4, con la única modificación de que la detección de zearalenona se realizó mediante análisis por HPLC, después de la extracción de la micotoxina por una columna AOZ (VICAM, EE. UU.).

Los análisis de HPLC se realizaron en un sistema de suministro de disolvente LC ternario SP8800 con desgasificación con helio (Spectra Physics, EE. UU.), Un muestreador automático SP 8880 (Spectra Physics, EE. UU.) con un bucle de 20 µl, un integrador Chromjet (Thermo, EE. UU.), un calentador de columna Croco Cil™ (Cluzeau Info Labo, Francia) y un detector de fluorescencia UV FP-920 (Jasco, Japón), columnas Chromsep Nucleosil 100-5 C18 SS 250 * 4.6 mm (L * ID) (Varian, Países Bajos) o equivalente. Las columnas fueron protegidas con una columna de protección apropiada. Se usó una parte alícuota de la solución de prueba de zearalenona regulada original como el estándar de HPLC.

Los resultados se resumen en la tabla 5. Los datos de HS2 y HS3 confirmaron los resultados del ejemplo 4. La adsorción de zearalenona en ácido húmico purificado a pH 6.8 fue muy alta (96.93%). Sin embargo, a pH 6.8, el 30.83% de la zearalenona unida se volvió a liberar.

Tabla 5. Unión *in vitro* de zearalenona por sustancias que contienen ácido húmico a pH 3.0 y 6.8. Los resultados son valores medios de análisis duplicado. Para HS3, solo estaban disponibles los análisis únicos.

Adsorbente	Unión de ZEA <i>in vitro</i>				
	Absorción (%)		Desorción (%)		Eficiencia (%)
	media	SD	media	SD	media
HS2	94.40	0.56	2.96	0.48	91.44
HS3	86.03		31.71		54.33
HA	96.93	0.36	30.83	0.51	66.10

En conclusión, dos productos HS2 y HS5 cumplieron las tres características preferidas para aglutinantes de micotoxinas mejorados de la presente invención.

Ejemplo 6

Materiales y métodos

Soluciones usadas para la determinación total de ácido húmico en sustancias que contienen ácido húmico. Los ácidos húmicos se midieron mediante un método volumétrico con titulación de los extractos según la Norma Internacional (ISO 5073:1999 Brown coals and lignites. Determination of humic acids). La tabla 6 ofrece una visión general de las diferentes soluciones usadas en el procedimiento.

Tabla 6 - Soluciones usadas para la determinación del ácido húmico

Solución	Composición
Pirofosfato de sodio	15 g de Na ₄ P ₂ O ₇ (10H ₂ O) + 7 g de NaOH en H ₂ O hasta 1L
Hidróxido de sodio	10 g de NaOH en H ₂ O hasta 1L
Solución estándar de dicromato de potasio	4.9036 g de K ₂ Cr ₂ O ₇ , previamente secada a 130 °C, en H ₂ O hasta 1L

Solución oxidante de dicromato de potasio	20 g de $K_2Cr_2O_7$ en H_2O hasta 1L
Indicador de 1,10-fenantrolina	1.5 g de 1,10-fenantrolina + 1 g de $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$
Ácido sulfúrico	concentrado, $\rho_{20} = 1.84$ g/ml
Sulfato ferroso de amonio	40 g de $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ + 20 ml de H_2SO_4 en H_2O hasta 1L

La solución de titulación de sulfato ferroso de amonio se estandarizó frente a la solución estándar de dicromato de potasio para cada lote de muestras a analizar. Se pipetearon veinticinco ml de solución estándar de dicromato de potasio en un matraz cónico de 300 ml. Se agregaron setenta ml a 80 ml de agua. Se agregaron cuidadosamente 10 ml de ácido sulfúrico concentrado y 3 gotas de indicador de 1,10-fenantrolina. Después de enfriar, la solución se tituló con la solución estándar de sulfato ferroso de amonio a un color rojo. La concentración se calculó, en moles por L, de la solución de sulfato ferroso de amonio como sigue (1): donde c es la concentración, expresada en moles por L, de la solución de sulfato ferroso de amonio; V es el volumen de solución de sulfato ferroso de amonio requerido para la titulación.

$$(1) \quad c = 0.1 \times \frac{25}{V}$$

Extracción de ácidos húmicos totales. Se obtuvieron cinco sustancias que contienen ácido húmico, en adelante denominadas leonardita. La tabla 7 ofrece una visión general de la fuente de cada leonardita. Para la extracción de los ácidos húmicos, se pesaron 0.2 ± 0.0002 g de muestra de análisis en un matraz cónico. Se agregaron ciento cincuenta ml de solución de extracción de pirofosfato de sodio alcalino (ácidos húmicos totales) y se mezcló hasta que la muestra se humedeció completamente. Se colocó un pequeño embudo en el matraz y se calentó en el baño de agua hirviendo durante 2 h, agitando frecuentemente para asegurar la precipitación del material insoluble. El matraz se retiró del baño de agua, se dejó enfriar a temperatura ambiente y el extracto y el residuo se transfirieron a un matraz volumétrico de 200 ml. El extracto se diluyó hasta la marca con agua y se agitó para asegurar una mezcla completa.

Determinación de los ácidos húmicos totales. Para la determinación de los ácidos húmicos en los extractos, se pipetearon 5 ml de extracto en un matraz cónico de 250 ml a 300 ml. Se agregaron al matraz cinco ml de solución oxidante de dicromato de potasio. Se agregaron cuidadosamente 15 ml de ácido sulfúrico concentrado. La solución se colocó en un baño de agua hirviendo durante 30 minutos. la solución se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó a aproximadamente 100 ml. Se agregaron tres gotas de indicador de 1,10-fenantrolina a la solución y se titularon con la solución de titulación de sulfato ferroso de amonio a un color rojo ladrillo. Como muestras en blanco para ácidos húmicos totales, se reemplazan 5 ml de extracto por 5 ml de pirofosfato de sodio.

Cálculo de los ácidos húmicos totales. El contenido total de ácido húmico ($w_{HA, t}$) se calculó como un porcentaje en masa de la muestra analizada según la siguiente fórmula (2) donde 0.003 es la masa de carbono en milimoles, en g/mmol; V_0 es el volumen de la solución de titulación de sulfato ferroso de amonio usada en el título en blanco, en ml; V_1 es el volumen de la solución de titulación de sulfato ferroso de amonio usada en el título del extracto, en ml; c es la concentración de la solución de titulación de sulfato ferroso de amonio, en mol/L; V_e es el volumen del extracto, en ml; V_a es el volumen de la alícuota tomada para la titulación, en ml; 0.59 es la proporción promedio del contenido de carbono de los ácidos húmicos para los carbones marrones y los lignitos; m es la masa de la muestra tomada para la prueba, en g.

$$w_{HA} = \frac{(V_0 - V_1) \times 0.003 \times c}{0.59 \times m} \times \frac{V_e}{V_a} \times 100$$

Tabla 7 - Fuentes de leonardita

Leonardita	Fuente
HS1	Xuguang Jieneng Co., Ltd, provincia de Yunnan, China
HS2	Poortershaven, Rotterdam, Países Bajos
HS3	HuminTech, Dusseldorf, Alemania
HS4	Pingxiang Jiali Ceramic Materials Co., Ltd, provincia de Jiangxi, China
HS5	Double Dragons Humic Acid Co.Ltd. Xinjiang, China

Solubilidad de muestras de leonardita a diferentes pH. Se realizó un experimento para determinar la parte no soluble de las muestras de leonardita. En resumen, se disolvieron 0.15 g de muestra en 75 ml de solución con un pH ajustado de 1.5, 3.0 o 7.0. La solución a pH 1.5 era una solución Clark and Lubs compuesta por 25 ml de KCl 0.2 M, 20.7 ml de HCl 0.2 M diluido a 100 ml con agua MilliQ (Millipore, Bruselas, Bélgica). La solución a pH 3.0 fue NaH_2PO_4 0.1 M ajustada a pH usando H_3PO_4 (Acros, Geel, Bélgica); la solución a pH 7.0 fue $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 M ajustada a pH usando NaH_2PO_4 0.1 M. Todos los productos químicos eran de VWR International, Lovaina, Bélgica). La suspensión se incubó durante una hora a temperatura ambiente en una placa de agitación magnética (600 rpm). Después de una hora, todas las suspensiones se filtraron a través de un filtro de fibra de vidrio de 55 mm (GF-92, Whatman, Dassel, Alemania). El producto retenido se secó durante dos horas en un horno a 130 °C. La cantidad de material retenido se calculó como la diferencia de masa entre el filtro vacío y el filtro + material retenido seco. La recuperación (%) se calculó como la proporción "cantidad retenida"/"producto en masa" y se expresó como porcentaje. Las muestras se analizaron por triplicado y se calcularon las medias. El material de referencia fue ácido húmico purificado (HA, Sigma Aldrich, Bornem, Bélgica). La recuperación de la fracción no soluble de la suspensión de HA a pH 7 no fue posible. La filtración de esta suspensión no se pudo realizar debido a las "sustancias flotantes" que se formaron durante la etapa de incubación que hicieron que el filtro no fuera permeable. El experimento se repitió en una solución de citrato 0.1M ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en agua MilliQ) ajustado a pH 6.2 usando $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ para las muestras HS2, HS3 y HA. Sin embargo, los resultados fueron los mismos. Las otras suspensiones de los productos se podrían filtrar fácilmente en cada pH probado. Para resolver el problema de solubilidad del ácido húmico a pH 7, el experimento se repitió usando solo 0.02 g de muestra en lugar de 0.15 g. Solo se repitieron las muestras HS2, HS3 y HA. Todas las demás condiciones de prueba permanecieron iguales.

Capacidad de unión a micotoxinas *in vitro* de sustancias que contienen ácido húmico. Los detalles sobre el método *in vitro* se pueden encontrar en la instrucción interna LB-IV-20/142-E²; Determinación de la eficacia de desintoxicación de micotoxinas en un "procedimiento de dos fases" junto con el análisis por HPLC. Sin embargo, la modificación de este procedimiento fue necesaria porque la leonardita incluida en el nuevo producto aglutinante de toxinas interfirió severamente con la detección por HPLC de las micotoxinas cuando los sobrenadantes se inyectaron directamente en el sistema de HPLC. Por lo tanto, se usa una etapa de limpieza de la columna de inmunoafinidad (IAC, Vicam, EE. UU.) (Véase más abajo para más detalles).

Se midieron la adsorción en un ambiente ácido (pH 3.0), que imita el pH del estómago de un animal monogástrico, y la desorción a un pH casi neutro (pH 6.8), que imita las condiciones de pH en el intestino de un animal monogástrico. El porcentaje neto de eficiencia de desintoxicación de micotoxinas se determinó como porcentaje de adsorción menos porcentaje de desorción. Se agregaron partes alícuotas por duplicado de solución de fosfato 0.1 M (ajustada a pH 3.0) que contenía 300 ppb de zearalenona en solución (10 ml) a tubos de polipropileno Falcon con tapa de rosca de 15 ml a los que se habían agregado 0.05 gramos de cada adsorbente. Los tubos de ensayo se colocaron en un agitador orbital durante 60 minutos a temperatura ambiente. Cada solución de prueba de micotoxinas se centrifugó (5000-12000 g) durante 10 minutos hasta que se obtuvo una solución transparente. El sobrenadante acuoso se aisló para el análisis de zearalenona (adsorción). La pella se volvió a suspender en solución de fosfato 0.1 M pH 6.8. Los tubos de ensayo se colocaron nuevamente en un agitador orbital durante 60 minutos a temperatura ambiente y luego se centrifugaron. El sobrenadante acuoso se aisló para análisis de zearalenona (desorción). Después de la centrifugación de la solución a pH 3.0 y 6.8, se introduce una etapa de limpieza de IAC. Después de desechar el líquido protector de las columnas IAC, las columnas se lavaron con 8 ml de solución salina regulada con fosfato (PBS) pH 7.4. Luego, se aplicaron 3 ml de sobrenadante a la columna. Posteriormente, la columna se lavó con 20 ml de agua mQ y se secó con vacío suave durante unos segundos. Se eluyó la zearalenona con 3 ml de ácido acético glacial al 2% (v/v) en metanol (MeOH) en tubos de vidrio. El eluato completo se evaporó hasta que se secó bajo una corriente suave de N_2 a 60 °C y se volvió a disolver en 1.5 ml de acetonitrilo/agua mQ 60/40 (v/v) antes del análisis por HPLC. Las concentraciones de zearalenona se determinaron usando HPLC (todas las muestras) y ELISA (HS1, HS2, HS4, HS5). Las soluciones de prueba de zearalenona (pH 3.0 o 6.8) sin adsorbentes se usaron como estándar.

Resultados

Determinación del contenido total de ácido húmico en diferentes muestras de leonardita. Los resultados de los análisis se muestran en la tabla 8. El contenido total de ácido húmico en las muestras 2 y 5 es el más alto; las muestras 1 y 4 muestran niveles medios y la muestra 3 es la más baja.

Tabla 8 - Contenido total de ácido húmico en muestras de leonardita (n = 2)

Muestra	Promedio	SD
HS1	46.31	0.81
HS2	64.84	0.29
HS3	31.01	0.38
HS4	44.62	0.36

HS5 67.45 2.15

5

10

Solubilidad de muestras de leonardita a diferentes pH. Los resultados de los retenidos recuperados a diferentes pH usando una solución de fosfato se muestran en la tabla 9. La muestra HS3 mostró la mayor solubilidad en el intervalo de pH probado. El retenido de ácido húmico a pH 7 no se pudo recuperar. A pH 7 se disolvió completamente, formando una suspensión. Esta lechada bloqueó los filtros. La prueba se repitió con HA, HS2, HS3 y una solución de citrato a pH 6.2; La tabla 10 muestra que los resultados para HA fueron los mismos usando la solución de citrato. Los resultados de los retenidos recuperados usando solo 0.02 g de HA, HS2, HS3 y la solución de fosfato se muestran en la tabla 11. Debido a la menor concentración de la muestra, los filtros no se bloquearon y se pudo calcular la recuperación. Está claro que el ácido húmico muestra la mayor solubilidad a pH 7 en comparación con todas las demás muestras. Esto también se confirmó mediante inspección visual de las muestras después de la incubación. Debido al error al pesar y recuperar pequeñas cantidades de muestra, las desviaciones estándar fueron grandes. Por lo tanto, se debe dar preferencia al uso de 0.2 g de muestra.

Tabla 9 - Fracción no soluble de leonardita, expresada como % de masa recuperada en retenido (fosfato, n = 3).

	pH					
	1.5		3		7	
	media	stdev	media	stdev	media	stdev
HA	80.97	4.13	84.65	3.18	/	/
HS1	78.41	0.97	80.46	1.14	85.40	0.48
HS2	85.02	1.21	86.54	0.80	84.23	0.75
HS3	67.80	0.78	68.16	0.93	64.14	2.62
HS4	80.75	1.58	84.54	2.30	92.13	0.42
HS5	83.24	0.85	84.73	0.46	86.47	2.02

15

Tabla 10 - Fracción no soluble de leonardita, expresada como % de masa recuperada en retenido (citrato, n = 3).

	media	stdev
HA	/	/
HS2	100.82	2.20
HS3	53.06	1.96

Tabla 11 - Fracción no soluble de leonardita, expresada como % de masa recuperada en retenido (0.02 g de muestra, n = 3).

	pH					
	1.5		3		7	
	media	stdev	media	stdev	media	stdev
HA	103.17	2.69	128.41	8.93	54.82	5.74
HS2	107.86	10.44	115.98	7.56	121.25	11.06
HS3	106.88	8.59	126.59	9.57	91.24	2.02

Capacidad de unión a micotoxinas *in vitro* de leonardita. En la tabla 12 se presenta un resumen de la adsorción de micotoxinas *in vitro* analizada por ELISA; por HPLC en la tabla 13. Los resultados muestran que todos los productos adsorben efectivamente la zearalenona a pH 3.0, teniendo HS3 la adsorción más baja. Se observaron diferencias notables para la desorción a pH 6.8. HS3 y HS4 muestran un alto grado de desorción en comparación con las otras muestras.

Tabla 12 - Unión *in vitro* de zearalenona por muestras de leonardita, evaluada mediante ELISA (n = 4).

	Adsorción (%)		Desorción (%)		Eficacia (%)	
	media	stdev	media	stdev	media	stdev
HS1	92.32	5.01	8.91	0.48	83.40	4.53
HS2	96.20	2.39	3.12	1.77	93.08	4.16
HS4	86.65	13.54	26.57	0.40	59.95	14.00
HS5	96.78	2.07	1.70	0.28	96.36	2.04

Tabla 13 - Unión *in vitro* de zearalenona por muestras de leonardita, evaluada mediante HPLC (n = 3).

	Adsorción (%)		Desorción (%)		Eficacia (%)	
	media	stdev	media	stdev	media	stdev
HA	96.93	0.36	30.83	0.51	66.10	0.19
HS2	94.40*	0.56	2.96	0.48	91.44	1.04
HS3	82.47	3.13	34.37	3.74	48.10	6.39
* n=2						

10 Ejemplo 7

Materiales y métodos

Diseño experimental. Se asignaron al azar 60 lechones destetados hembras (mestizos RongchangXDabai) con un peso promedio de 9 kg a 5 grupos diferentes. Hubo 3 réplicas para cada grupo con 4 lechones por réplica. Los cinco grupos fueron: 1) control negativo (NC), 2) control positivo (PC), 3) Toxfin Supreme (TS) 1, 4) TS2 y 5) TS3. El grupo NC fue alimentado con dietas basales limpias (sin contaminación por ZEA) sin Toxfin Supreme; el grupo de PC recibió dietas contaminadas con ZEA (1 ppm) sin Toxfin Supreme; y los grupos TS1, TS2 y TS3 fueron alimentados con dietas contaminadas con ZEA (1ppm) suplementadas con 1, 2 y 3 g/kg de Toxfin Supreme, respectivamente. Todos los lechones fueron criados en corrales y acceso *ad libitum* a pienso y agua. Todos los lechones fueron alimentados con dietas basales durante una semana antes del inicio de la prueba, para que pudieran adaptarse al entorno experimental.

Preparación del pienso contaminado con zearalenona. Los niveles de nutrientes de las dietas basales cumplieron con los requisitos de NRC (Tabla 14). Se almacenaron aproximadamente 800 kg de maíz en una habitación a 28 °C con una humedad relativa del 70% durante semanas para obtener maíz enmohecido que contenía aproximadamente 3 mg/kg de ZEA. Al agregar maíz mohoso para reemplazar el maíz normal en la dieta basal, la concentración de zearalenona en todas las dietas de tratamiento fue de aproximadamente 1 ppm (Tabla 14). Las dietas basales también contenían una concentración muy baja de ZEA (aproximadamente 65 ppb). La concentración de ZEA de las cinco dietas diferentes se determinó usando los kits de ensayo de Zearalenona (Beacon Company).

Tabla 14 - Diseño experimental y composición de las dietas

Grupo	NC	PC	TS1	TS2	TS3
Zearalenona(ppm)	0.065	1.05	1.12	1.08	1.10
Toxfin Supreme (g/kg)	0	0	1	2	3

Ingredientes, %					
Maíz	53	53	53	53	53
Trigo regular	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5
Soja	24.76	24.76	24.76	24.76	24.76
Harina de trigo	5	5	5	5	5
Harina de pescado	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5
Aceite de soja	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Lisina	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Met	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Thr	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
Fosfato dicálcico	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Caliza	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
1% de premezcla	1	1	1	1	1
Sal	1	1	1	1	1
Composición de nutrientes					
DE, KCal/kg	3417	3417	3417	3417	3417
Proteína calculada, %	20	20	20	20	20
Grasa cruda, %	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4
Ca, %	0.82	0.82	0.82	0.82	0.82
P, %	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42
* Premezcla (peso/kg): Mn 40mg, Fe 130mg, Zn 130mg, Cu 15mg, I 0.35mg, Se 0.3mg, V _A 11,025IU, V _{D3} 22,03IU, V _E 80IU, V _K 4.4mg, V _{B1} 4.4mg, V _{B2} 11mg, pantoténico 35 mg, ácido nicotínico 59.5 mg, cloro 330 mg, ácido fólico 0.9 mg, biotina 0.5 mg y V _{B12} 55 µg.					

Rendimiento de crecimiento. Los pesos corporales y el consumo de pienso se registraron en los días 1 y 42 para calcular la ingesta de pienso diaria promedio (ADFI), el aumento de peso diario promedio (ADG) y la proporción de conversión alimentaria (FCR).

- 5 Prueba de eficacia de unión a zearalenona. ZEA se midió en heces, para lo cual se recogieron las heces totales de cada grupo y se pesaron a los 21, 22, 23, 40, 41 y 42 días. Después de una homogeneización completa, aproximadamente el 10% de las heces totales se almacenaron a -20 °C para futuros análisis. Durante el mismo período, se registró el consumo de pienso de cada grupo para calcular con precisión la cantidad de ZEA consumida por los lechones. La
- 10 eficacia de unión de Toxfin Supreme sobre ZEA *in vivo* se expresó como un porcentaje, y se calculó como la proporción del contenido total de zearalenona en las heces en comparación con la ingesta total de ZEA. El análisis de ZEA se realizó según el manual del kit de ensayo (Beacon Company).

β-estradiol en suero. En los días 1, 21 y 42, se recogieron tres muestras de sangre de cada grupo a través de la vena externa de la cola de cerdo. El análisis del β-estradiol en suero se realizó según el manual del kit de ensayo (Jiancheng Biotechnology Institute, Nanjing, China).

- 15 Medida del tamaño de la vulva. La longitud y el ancho de la vulva de cada lechón se midieron usando un calibrador vernier en los días 1, 21 y 42. El área de la vulva se calculó según la fórmula: área = (longitudXancho/2).

Análisis histológico. Al final del experimento, se sacrificaron 3 lechones de cada grupo. Los ovarios y el útero se extirparon inmediatamente y luego se fijaron en la solución de Bouin. Luego se incrustaron en parafina y se seccionaron a 5 µm. Finalmente, las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) y se calculó el número de células foliculares y acinares. El examen histopatológico fue realizado bajo microscopía óptica por los laboratorios de patología experimental (Department of Veterinary Sciences; Southwest University, Chongqing, China).

Análisis estadístico. Los datos se sometieron a la prueba de homogeneidad de varianzas de Levene antes del análisis de las diferencias grupales. Los datos se procesaron mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA) seguido de la prueba de Duncan usando SPSS 16.0. Se consideró que las diferencias eran significativamente diferentes a $P < 0.05$.

Resultados

- 5 Rendimiento de crecimiento. No hubo diferencias en ADFI y FCR de lechones entre todos los grupos, y en comparación con el grupo de control negativo, el ADG de lechones disminuyó significativamente en el grupo de PC (Tabla 15). La adición de Toxfin Supreme en dietas contaminadas con ZEA a 1, 2 y 3 g/kg mejoró el ADG de los lechones y los devolvió al mismo ADG que el nivel de control negativo (Tabla 15). Toxfin Supreme no tuvo ningún efecto sobre ADFI y FCR, pero ayudó en la recuperación de ADG de lechones alimentados con dietas contaminadas con ZEA en las tres concentraciones.

Tabla 15 - Desempeño de crecimiento de lechones alimentados con diferentes dietas

Grupo	NC	PC	TS1	TS2	TS3
ADG (kg/día)	0.61±0.02 ^a	0.56±0.02 ^b	0.58±0.03 ^{ab}	0.59±0.01 ^{ab}	0.60±0.03 ^{ab}
ADFI (kg/día)	1.29±0.09	1.24±0.06	1.29±0.10	1.28±0.05	1.34±0.11
FCR(g:g)	2.13±0.12	2.22±0.08	2.21±0.09	2.16±0.09	2.24±0.10

Nota: los valores en la misma fila con diferentes letras de superíndice difieren significativamente ($p < 0.05$)

- 15 Eficacia de unión de ZEA *in vivo* de Toxfin Supreme. Se recolectaron muestras fecales y se analizaron para determinar la presencia de ZEA. En pienso contaminados con ZEA natural, aproximadamente el 35% de ZEA se podría eliminar en las heces (Tabla 16). Toxfin Supreme aumentó significativamente la capacidad de unión de ZEA de una manera dependiente de la dosis, siendo 64% en TS1, 77% en TS2 y 92% en TS3 (Tabla 3).

Tabla 16 - Eficacia de unión a zearalenona *in vivo* de Toxfin Supreme (%)

Tiempo (día)	PC	TS1	TS2	TS3
21-23	35.45±2.66 ^a	65.04±2.97 ^b	77.86±6.97 ^c	95.02±1.87 ^d
40-42	36.04±1.83 ^a	63.62±1.22 ^b	76.18±4.80 ^c	90.09±3.65 ^d
Promedio	35.74±1.10 ^a	64.32±1.52 ^b	77.02±1.21 ^c	92.55±3.08 ^d

Tenga en cuenta que los valores en la misma fila con diferentes letras de superíndice difieren significativamente ($p < 0.05$)

- 20 La concentración de β -estradiol. En los días 21 y 42, la concentración de β -estradiol en suero del grupo PC fue aproximadamente 52% y 41% más baja que la concentración encontrada en el grupo NC (Tabla 17). Estos datos mostraron que ZEA disminuyó significativamente la secreción de estradiol en lechones destetados. En comparación con la PC, las concentraciones de β -estradiol en los lechones tratados con Toxfin Supreme del grupo TS1 (1 g/kg) aumentaron, pero aún fueron más bajas que las del grupo NC (Tabla 17). La concentración de β -estradiol aumentó significativamente y alcanzó niveles de NC en los grupos tratados con Toxfin Supreme TS2 (2g/kg) y TS3 (3g/kg) (Tabla 4).
- 25 Toxfin Supreme tuvo una mejor eficacia como aglutinante de ZEA cuando se administró en dosis más altas.

Tabla 17 - Concentración en suero de β -estradiol de lechones en los días 1, 21 y 42 (ng/L)

Tiempo (día)	NC	PC	TS1	TS2	TS3
1	21.59±4.46	21.87±5.44	20.96±3.99	22.91±2.49	21.69±3.02
21	23.97±3.92 ^a	12.46±0.84 ^c	14.13±1.60 ^c	18.20±1.94 ^b	19.78±1.25 ^b
42	28.67±5.71 ^a	11.83±1.37 ^c	17.90±2.28 ^b	26.51±1.04 ^a	23.81±1.56 ^a

Nota: los valores en la misma fila con diferentes letras de superíndice difieren significativamente ($p < 0.05$)

Mediciones de tamaño de vulva. El tamaño de la vulva de cada lechón se controló en los días 1, 21 y 42. El tamaño de la vulva en este ensayo se expresó como un porcentaje y se calculó como la proporción del tamaño de la vulva en los días 1 y 21, y el día 1 y el día 42 en cada grupo. Tanto a los 21 como a los 42 días, los aumentos del tamaño de la vulva en el grupo TS2 y TS3 fueron significativamente menores que los del grupo PC y el grupo TS1. El tamaño de las vulvas en el grupo TS3 fue similar al del grupo NC (Tabla 18). Toxfin Supreme podría aliviar el aumento del tamaño de la vulva inducido por ZEA a una dosis de 2, 3 g/kg (Tabla 18).

Tabla 18 - Proporción del área de vulva de lechones alimentados con una dieta contaminada con ZEA entre 1 y 21, 42 días de edad (%)

Tiempo (día)	NC	PC	TS1	TS2	TS3
21	174.40±42.23 ^a	412.55±64.35 ^c	317.02±62.06 ^c	252.07±43.85 ^b	220.41±54.37 ^{ab}
42	198.07±47.04 ^a	478.36±62.04 ^c	374.46±47.93 ^c	296.75±53.69 ^{bc}	240.40±50.94 ^{ab}

Nota: los valores en la misma fila con diferentes letras de superíndice difieren significativamente (p <0.05)

Análisis histológico. Se observaron muestras de tejido de útero y útero mediante microscopía óptica y se registró la cantidad relativa de células foliculares y acinares para cada grupo (Tabla 19). Estos resultados indicaron que el número de acinos aumentó significativamente en el grupo TS2 y TS3 en comparación con los del grupo PC. Toxfin Supreme en una dosis de 2-3 g/kg alivió los efectos de ZEA en el desarrollo de los ovarios y el útero de la cerda.

Tabla 19 - Cantidad relativa de células foliculares y acinares de ovarios y útero de lechones alimentados con dietas contaminadas con zearalenona (células/cm²)

Grupo	NC	PC	TS1	TS2	TS3
Folículo	5379±1185 ^a	2832±766 ^b	2657±564 ^b	3859±890 ^{ab}	3843±519 ^{ab}
Ácino	1309±146 ^a	542±37 ^b	873±148 ^b	1265±268 ^a	1298±247 ^a

Nota: los valores en la misma fila con diferentes letras de superíndice difieren significativamente (p <0.05)

Discusión

En este experimento, ZEA ~1 ppm disminuyó el ADG de los lechones pero no tuvo efectos significativos sobre ADFI y FCR. Los efectos negativos de los adsorbentes de micotoxinas en la depresión del crecimiento animal siempre se consideran porque el adsorbente también puede unir ciertos nutrientes tales como vitaminas y minerales, como se ha demostrado cuando se evaluó *in vitro* (Tomasevic- Canovic M, Dakovic A, Markovic V. 2000. Adsorption effects of mineral adsorbents; Part III: Adsorption behaviour in the presence of vitamin B6 and microelements. Acta Veterinaria, 50(1):23-30). En este estudio, Toxfin Supreme no mostró efectos negativos en el rendimiento e incluso mostró una ligera mejora en el ADG de los lechones. Puede ser que la concentración de minerales y vitaminas en los piensos comerciales sea lo suficientemente relativa y la dosis de absorbentes agregados en los piensos es muy pequeña.

La zearalenona es bien conocida como un agonista completo de los receptores de estrógenos debido a la estructura química muy similar al estradiol. Una ppm de ZEA causó efectos evidentes de hiperestrogenismo visual en lechones destetados hembras, tales como hinchazón de la vulva después de 3-6 semanas de exposición. La exposición a las dietas tratadas con ZEA durante 3 y 6 semanas, la excreción de estradiol se redujo significativamente en comparación con los niveles excretados a través de los lechones de control. La concentración de estradiol en suero se recuperó a niveles normales cuando se agregó Toxfin Supreme a dietas contaminadas con zearalenona a 2, 3 g/kg de pienso. Como se muestra en este experimento, Toxfin Supreme (2-3 g/kg) absorbió aproximadamente el 75-90% de la ingesta de zearalenona en lechones y luego se eliminó a través de las heces. Esta es la razón por la cual Toxfin Supreme puede ayudar a mejorar la excreción de estradiol y puede aliviar los signos clínicos inducidos por ZEA, tales como el rojo y la hinchazón de la vulva del lechón.

Ejemplo 8

Material y métodos

Animales experimentales. Los pollos de engorde de corral mixtos y de veinticuatro días de edad de una variedad comercial (T44 x SA51) se obtuvieron de un criadero comercial. Se pesaron individualmente y se distribuyeron aleatoriamente a diferentes jaulas con piso de alambre. El peso inicial promedio fue de 417.35 ± 45.26 g (media de 200 aves) con una temperatura ambiente de 20 ± 5 °C, iluminación natural y ventilación manual.

Formulación de alimentación. Los animales fueron alimentados con una dieta basal comercial, no medicada, de harina de maíz y soja que contenía o excedía los niveles de nutrientes críticos recomendados por el National Research Council (1994). Los ingredientes del pienso usados en la formulación de la dieta de control no contenían micotoxinas a niveles detectables. La dieta de control basal se formuló como se muestra en la tabla 20.

5 Tabla 20 - Ingredientes para piensos usados en la formulación de la dieta basal. Composición porcentual de la dieta basal (g/100g).

Ingrediente	Porcentaje de la dieta (g/100 g)
Trigo	50.00
Harina de soja	25.64
Maíz	12.00
Cebada	5.00
Aceite de soja	1.00
Fosfato dicálcico	1.00
Harina de pescado	1.00
Carbonato de calcio	0.90
Grasa animal	2.00
Sal	0.25
Bicarbonato de sodio	0.13
* Premezcla de vitaminas/minerales	0.40
Metionina	0.30
Lisina	0.30
Treonina	0.08
Total	100.00
Análisis aproximado	
Materia seca	89.63
Proteína total	19.30
Ceniza	5.20
Grasa	5.00
Fibra	3.00
Lisina	1.13
Metionina	0.28
Recuento de levadura y moho (cfu/g)	3.6×10^3
* Vit. A 12500 UI; Vit. D33500 UI; tocoferoles 4000 UI; Vit. K3 800 mg; folacina 200 mg; tiamina 600 mg; riboflavina 1800 mg; niacina 6000 mg; pantotenato de calcio 2000 mg; piridoxina 600 mg; cianocobalimina 4 mg; biotina 8 mg; manganeso 30,000 mg; zinc 20,000 mg; yodo 480 mg; cobalto 80 mg; selenio 40 mg; BHT 25,000 mg; agente antiaglomerante 6000 mg.	

Preparación de la dieta. Los aglutinantes son productos comerciales vendidos por Kemin Europe N.V. con las marcas registradas Toxfin (codificadas como B1) y Toxfin Supreme (codificadas como B2); Toxfin es una mezcla de sepiolita y

bentonita y Toxfin Supreme es una mezcla de leonardita y sepiolita. Cuatro cultivos de hongos micotoxigénicos, que contienen Aflatoxina B1 (codificada como AFB1), Fumonisin B1 (codificada como FB1), Ocratoxina A (codificada como OA) y T-2, se obtuvieron de Kemin Europe N.V. Las toxinas se incorporaron a la dieta basal mezclando las cantidades apropiadas con una dieta de 2 Kg y luego se mezclan con el resto de la dieta basal en un mezclador de pienso de paletas para producir las concentraciones deseadas (Tabla 21). Para probar la eficacia de los aglutinantes como tratamientos dietéticos para las micotoxicosis, la dieta contaminada con micotoxinas se suplementó con 3000 ppm de B1 y otra dieta suplementada con 3000 ppm de B2 (Tabla 21). Los aglutinantes se agitaron completamente durante 30 segundos a mano antes de dosificar el pienso y se mezclaron las cantidades apropiadas con una dieta contaminada con micotoxinas de 2 kg y luego se mezclaron con el resto de la dieta contaminada en un mezclador de pienso de paletas para producir los tratamientos deseados.

Se analizaron diferentes muestras del alimento contaminado con micotoxinas antes de comenzar el ensayo para verificar la concentración final de OA por HPLC como un indicador de homogeneidad.

Diseño experimental. Los animales se asignaron al azar a diferentes grupos de tratamiento y se alojaron en 4 jaulas (10 pollos por jaula). Los tratamientos fueron replicados cinco veces. Las cajas individuales en jaulas contenían un abrevadero y un alimentador. Se permitió a las aves aclimatarse al ambiente de las jaulas durante 1 día antes del comienzo de la prueba de alimentación. Se suministró a los animales pienso y agua *ad libitum*. El consumo de pienso se registró diariamente para cada jaula. Los animales fueron pesados al final de la semana (aves de 28 días) y luego fueron sacrificados por CO₂.

Tabla 21 - Niveles de micotoxinas y aglutinantes contenidos en diferentes dietas experimentales

	FB1	AFB1	OA	T-2	B1	B2
Cantidad	989.47	29.79	16.79	11.85	287.37	287.37
Concentración de toxinas	1900	800	1400	1982.61		
Cantidad agregada a los lotes (g)	329.83	9.79	5.60	3.95	95.80	95.80
Concentración final en pienso						
T1	1BLD	BLD	BLD	BLD	BLD	BLD
T2	20 ppm	250 ppb	250 ppb	250 ppb	0	0
T3	20 ppm	250 ppb	250 ppb	250 ppb	3000 ppm	0
T4	20 ppm	250 ppb	250 ppb	250 ppb		3000 ppm
BLD: por debajo del límite detectable						

Colección de muestras de heces. Los pollos de engorde tuvieron acceso *ad libitum* a la dieta de control durante la adaptación 1-d a las jaulas, seguido de una prueba 3-d en cada réplica. Cada período de prueba de 5 días consistió en 1-d de ajuste, 3-d de alimentación de dieta experimental y 1-d para la transición; las dietas de prueba se alimentaron continuamente durante el período de prueba de 3-d. Después de la mañana alimentándose en el día de transición, se recolectaron muestras fecales (aproximadamente 400 g de heces húmedas por tratamiento) del piso de acero inoxidable detrás de los animales, se almacenaron en paquetes de plástico en condiciones de refrigeración y se enviaron a un laboratorio certificado para el análisis de micotoxinas. Las muestras húmedas se liofilizaron inmediatamente después de ser recibidas por el laboratorio.

Cuantificación de micotoxinas en heces.

Muestras de heces de pollos de engorde. Los excrementos se recolectaron como se describe en la sección de diseño experimental y se enviaron al laboratorio el mismo día. Se pesaron (389.9 ± 69.1 g) y se liofilizaron. Las muestras se volvieron a pesar para estimar la humedad y se trituraron y mezclaron con mortero y mano de mortero. Todas las muestras se congelaron y almacenaron a -20 °C hasta que se requirieron.

Aparatos y reactivos. El acetonitrilo y el metanol de grado HPLC se compraron de Lab-Scan (Dublín, Irlanda) y el ácido acético de grado HPLC de Merck (Darmstadt, Alemania). Se obtuvo agua ultrapura de un aparato Milli-Q Plus de

Millipore (Milford, MA). Las columnas de inmunoafinidad RIDA ocratoxina A fueron suministradas por R-Biopharm AG (Glasgow, Escocia). Sigma (St. Louis, MO) proporcionó los patrones de aflatoxina B1; fumonisina B1 y ocratoxina A y se prepararon soluciones madre (0.01 mg/ml) en metanol y se almacenaron a -21 °C. Panreac (Barcelona, España) proporcionó los reactivos para la solución reguladora de bicarbonato de sodio pH 8.1 (0.13 M) y la solución reguladora de fosfato PBS salina pH 7.4 (20 mM).

El sistema LC consistió en un cromatograma líquido de alto rendimiento Agilent Technologies 1100 acoplado a un detector de fluorescencia Agilent a: (1) 365 nm (excitación) y 455 nm (emisión) para aflatoxina B1; (2) 335 nm (excitación) y 440 nm (emisión) para fumonisina B1; (3) 333 nm (excitación) y 460 nm (emisión) para ocratoxina A. La columna LC era Ace 5 C18, 250 x 4.6 mm, tamaño de partícula de 5 µm (Advanced Chromatography Technologies, Aberdeen, Escocia). Las fases móviles de LC isocrática fueron: (1) agua destilada, acetonitrilo y metanol (55:30:15 v/v/v); la velocidad de flujo: 1,2 ml/min para aflatoxina B1; (2) agua destilada, acetonitrilo y ácido acético (51:48:1 v/v/v); la velocidad de flujo: 1,2 ml/min para ocratoxina A; (3) agua destilada, acetonitrilo y ácido acético (53:46:1 v/v/v); la velocidad de flujo: 1,2 ml/min para fumonisina B1.

Análisis de aflatoxina-B1, ocratoxina-A y fumonisina-B1 en heces de pollos de engorde. El método analítico usado en este ensayo ha sido descrito previamente por Arino et al., (2007) con algunas modificaciones. En resumen, (1) Aflatoxinas-B1: se mezclaron 5 g de heces de pollos de engorde con 25 ml de metanol al 70%; (2) Ocratoxina A: se mezclaron 5 g de heces de pollos de engorde con 20 ml de metanol al 70%; (3) Fumonisin-B1: se mezclaron 10 g de heces de pollos de engorde con 20 ml de metanol al 75% usando un homogeneizador durante 15 minutos. El extracto se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos y se filtró por Whatman n° 1. Los filtrados de aflatoxina y ocratoxina se purificaron a través de la inmunoafinidad de la toxina RIDA. La limpieza de inmunoafinidad se realizó según las instrucciones del fabricante: equilibrar con 2 ml de PBS/metanol (90/10), pasar el extracto de muestra lenta y continuamente a través de la columna, enjuagar la columna con 10 ml de PBS/metanol (90/10), y eluir con 2 ml de metanol. Las diferentes toxinas eluidas se recogieron en un vial opaco. Los eluidos se evaporaron a sequedad en un bloque de calentamiento bajo una corriente suave de nitrógeno, y se volvieron a disolver en el metanol: agua destilada: ácido acético, (30:69:1 v/v/v).

El filtrado de fumonisina se eluyó en un colector de vacío SPE (SAX 500 mg). Los cartuchos se acondicionaron previamente con 5 ml de metanol al 75% seguido de 5 ml de agua destilada a una velocidad de flujo de 1 ml/min, antes de cargar 10 ml de la solución de muestra a una velocidad de flujo de 0.8 ml/min. Posteriormente, los cartuchos se lavaron con metanol al 75% seguido de metanol al 100%. La retención de fumonisina en los cartuchos se eluyó en tubos de color ámbar que contenían ácido acético:metanol (1:99 v/v) y el eluato se evaporó a sequedad en un bloque de calentamiento bajo una corriente suave de nitrógeno y se volvió a disolver en los disolventes de inyección (acetonitrilo: agua destilada: ácido acético, 46:53:1, v/v/v).

Se inyectaron alícuotas de aflatoxinas y fumonisinas de 20 µl y alícuotas de ocratoxina de 100 µl en el sistema LC-FLD. La identidad de la ocratoxina se confirmó químicamente mediante la formación de éster metílico según Li et al. (1998). La identidad de aflatoxina y fumonisina se confirmó químicamente según UNE-EN 14123 y UNE-EN 13585. El método analítico se validó internamente con respecto a la precisión y la recuperación. La recuperación promedio y la desviación estándar relativa (RSDr, repetibilidad) obtenidas por el método descrito fueron 84% para OA; 75% para AFB1 y 90.6% para FB1, (RSD 5%, 5%, 3.8%, respectivamente). Las características de rendimiento se encontraban dentro de los márgenes aceptables indicados en el Reglamento de la Comisión No. 401/2006 (EC, 2006). El estudio de sensibilidad para aflatoxina, ocratoxina y fumonisina indicó que los límites de cuantificación (LOQ) fueron: 0.2 ng/g; 2 ng/g y 200 ng/g respectivamente.

Análisis de la toxina T-2 en heces de pollo de engorde. La toxina T-2 se analizó mediante la técnica ELISA (Ridascreen®). Se mezcló una cantidad de 5 g de heces de pollo de engorde con 25 ml de metanol al 70% y se homogeneizó (agitador magnético) durante 10 minutos. El extracto se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos y se filtró por Whatman n° 1. Los volúmenes totales de 50 µl del extracto se diluyeron con 950 µl de solución reguladora PBS. Las muestras y los estándares se usaron según las instrucciones del fabricante. La medición se realizó fotométricamente a 450 nm y el límite de detección fue < 5ppb (aproximadamente 3.5 µg/kg).

Análisis estadísticos. Se analizaron todos los datos ANOVA mediante el procedimiento SPSS (SPSS versión 15.0; 2006). Las medias de tratamiento con diferencias significativas se clasificaron mediante la prueba de rango múltiple de Tukey. Los coeficientes de correlación de Pearson se calcularon entre las variables. Todas las declaraciones de diferencias se basaron en la significación en p < 0.05.

Resultados

Efectos clínicos. En el día 1, los excrementos de todas las aves tenían una consistencia normal. Esta condición comenzó a cambiar hasta el día 3, excepto para el lote de control, cuando los excrementos comenzaron a quedar pegajosos y adheridos a los pisos de los corrales de malla de alambre y alrededor del área de las aves. Informes anteriores han asociado la diarrea con la toxicidad por fumonisina después de 4-13 días de alimentación infectada. Se ha informado de excrementos pegajosos de pollos de engorde alimentados con maíz infectado con Fusarium; una depresión en la dieta, la digestibilidad de la materia seca y la diarrea se asociaron con este fenómeno.

Los datos en el presente estudio indican una descripción cualitativa en la consistencia de las heces, sin embargo, el contenido de humedad fecal en el día 3 no fue significativamente diferente ($p > 0.05$) entre los tratamientos (Tabla 22). Estos valores se consideran normales. No se observó mortalidad debido a las dietas.

Tabla 22 - Contenido de humedad fecal en pollos de engorde alimentados con diferentes dietas durante 3 días

	Humedad (%)
T1 (control)	63.0 $\pm$ 11.0
T2 (micotoxinas)	64.0 $\pm$ 8.6
T3 (micotoxinas + B1)	61.6 $\pm$ 10.7
T4 (micotoxinas + B2)	65.0 $\pm$ 7.3
Los valores representan la $\pm$ SD de cinco grupos de diez pollos de engorde por tratamiento. Cada valor es una media de cinco determinaciones	

5

Consumo y aumento de peso. Los pesos iniciales y finales de las aves alimentadas con dietas experimentales se presentan en la tabla 23. No hubo diferencia estadística en el peso corporal. Sin embargo, el peso final de las aves y la ingesta de piensos alimentados con la dieta T2 (pienso contaminado con micotoxinas) fueron respectivamente 2% y 1% menos que los del lote de control ($p > 0.05$). Por el contrario, las aves alimentadas con aglutinantes mostraron mayor peso corporal final y consumo de pienso que las aves de control por lotes ($p > 0.05$).

10

Tabla 23 - Influencia de las dietas experimentales sobre el peso corporal y la ingesta total de piensos de pollos de engorde alimentados durante 3 días

	Peso corporal (g/ave)		Ingesta total de pienso (g/10 aves; 3 d)	¹ Cambio(%)	Diferencia de ingesta de piensos desde el control (%)
	24 días	28 días			
T1	415.9 $\pm$ 53.84	448.5 $\pm$ 65.5	1266.4 $\pm$ 139.8	0	0
T2	416.7 $\pm$ 45.75	440.3 $\pm$ 58.7	1253.2 $\pm$ 119.8	-2	-1
T3	418.0 $\pm$ 43.23	463.7 $\pm$ 53.9	1318.0 $\pm$ 121.3	+3.4	+4.1
T4	418.7 $\pm$ 39.25	461.9 $\pm$ 68.5	1334.8 $\pm$ 177.7	+3.0	+5.4
Sig (*)	NS	NS	NS		
* NS: sin diferencias significativas ($p > 0.05$)					
Los valores representan el $\pm$ SD de cinco grupos de diez pollos de engorde por tratamiento					
¹ Cambio = cambio porcentual en el peso corporal en relación con los controles					

15

Las micotoxinas en los excrementos. La tabla 24 muestra diferentes concentraciones de toxinas en los excrementos de las aves después de 3 días de alimentación con dietas experimentales. Los resultados mostraron que la concentración de aflatoxina B1 en los excrementos de aves alimentadas con B1 fue 66% significativamente más alta ($p < 0.05$) que las aves alimentadas con dieta T2. La concentración de aflatoxina B1 en los excrementos de aves alimentadas con B2 fue 26% significativamente más alta ($p < 0.05$) que aquellas aves alimentadas con dieta T2. La concentración de fumonisina B1 en los excrementos de aves alimentadas con B1 y B2 fueron respectivamente 52% y 8% más altas que las aves alimentadas con dieta T2. Aunque no se conoce el modo preciso de acción de los aglutinantes (B1 y B2), se plantea la hipótesis de que los aglutinantes podrían atrapar parcialmente las moléculas de aflatoxinas y fumonisinas en su matriz evitando una absorción parcial de aflatoxinas y fumonisinas del tracto gastrointestinal. Así, se demostró que B1 y B2 administrados concomitantemente con un conjunto de micotoxinas adsorben AFB1 y FB1, limitando así la biodisponibilidad de AFB1 y FB1 y aumentando la excreción en las aves. Sin embargo, los aglutinantes no tuvieron efecto sobre la excreción de ocratoxina A y toxina T-2 después de 3 días de exposición a la dieta. Hasta la fecha, no se ha encontrado que ningún sorbente reduzca los efectos tóxicos de la toxina T-2 y OA (Kubena et al., 1990; Huff, W. E., L. F. Kubena, R. B. Harvey, and T. D. Phillips. Efficacy of hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the individual and combined toxicity of aflatoxin and ochratoxin A. Poult. Sci. 71: 64-69. 1992; Bailey, R. H., L. F. Kubena, R. B. Harvey, S. A. (1998). Buckley, and G. E. Rottinghaus. Efficacy of various; sorbents to reduce the toxicity of aflatoxin and T-2 toxin; in broiler chickens. Poult. Sci. 77:1623-1630; García, A.R.; Avila, E.; Rosiles, R.; Petrone, V.M. (2003).

20

25

30

Evaluation of two mycotoxin binders to reduce toxicity of broiler diets containing Ochratoxin A and T-2 toxin Contaminated Grain. Avian Diseases 47:691-699).

Han aparecido nuevos productos de unión en un intento de contrarrestar las micotoxinas (Hoerr, F. J., W. W. Carlton, J. Tuite, R. F. Vesonder, W. K. Rohwedder, and G. Szigeti. Experimental thricothecene mycotoxicosis produced in broiler chickens by *Fusarium sporotrichiella* var. *sporotrichioides*. Avian Pathol. 11:385-405. 1982; Devegowda, G., and M. V. L. N. Raju. 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). Br. Poult. Sci. 41:640-650. 2000); sin embargo, no se han evaluado adecuadamente ya que la mayoría de ellos solo han recibido una evaluación *in vitro*, que no proporciona información confiable sobre la actividad sorbente en condiciones de campo. Esto debe considerarse no solo en un procedimiento de evaluación de sorbentes, sino también en la fuente de micotoxinas, ya que muchas evaluaciones han consistido en la adición de micotoxinas puras al pienso. En condiciones realistas, el grano contaminado incluye muchos otros metabolitos, la mayoría de ellos no identificados, que definitivamente tienen efectos en las aves. Diferentes investigaciones han enfatizado las diferencias entre los efectos tóxicos observados en aves alimentadas con dietas contaminadas con micotoxinas puras y aquellas alimentadas con dietas contaminadas con cultivos de hongos micotoxigénicos (Hoerr et al., 1982; Rotter, R. G., A. A. Frohlich, R. R. Marquardt, and D. Abramson. Comparison of the effects of toxin-free and toxin containing mold contaminated barley on chick performance. Can. J. Anim. Sci. 69:247-259. 1989). En la actualidad, sin embargo, el uso de adsorbentes de unión a micotoxinas es la forma más aplicada de protección a los animales contra los efectos nocivos del pienso descontaminado. Hasta ahora, no se probó ningún adsorbente único para ser eficaz contra la mayoría de los tipos de micotoxinas. Sin embargo, la adición de diferentes adsorbentes al pienso proporciona herramientas versátiles para prevenir la micotoxicosis.

Tabla 24 - Concentración de micotoxinas en heces detectadas por HPLC¹ después de 3 días de exposición a la dieta. (resultados expresados como ng/g de heces liofilizadas)

	T1	T2	T3	T4	Sig(*)
Aflatoxina B ₁ (ppb)	BDL ²	18.8 ^a ± 2.6	23.7 ^b ± 1.9	20.4 ^{ab} ± 2.8	*
Ocratoxina A (ppb)	BDL	55.0 ± 17.7	51.7 ± 4.0	60.0 ± 10.4	NS
Fumonisin B ₁ (ppb)	BDL	545.8 ^a ± 207.1	910.0 ^b ± 98.4	823.5 ^{ab} ± 119.0	*
T-2 (ppb)	BDL	115.6 ± 4.4	123.8 ± 19.0	105.2 ± 18.8	NS

Cada valor es una media de cinco determinaciones + SD

Los valores de archivo con diferentes superíndices son significativamente diferentes

¹HPLC se usó para determinar las micotoxinas, excepto para T-2 que fue confirmado por ELISA

²BLD significa por debajo del límite detectable

25 Conclusiones

Los resultados obtenidos en nuestro estudio indicaron que el consumo de pienso no se vio afectado por la inclusión en la dieta de dietas contaminadas con micotoxinas ($p > 0.05$) después de 3 días de exposición. La suplementación con aglutinantes no tuvo ningún efecto sobre el consumo de pienso y el aumento de peso.

Se demostró que B1 y B2 administrados concomitantemente con un conjunto de micotoxinas adsorben eficazmente AFB1 y FB1, limitando así la biodisponibilidad de AFB1 y FB1 y aumentando la excreción en las aves.

Ejemplo 9

Material y métodos

Animales y alimentación.

En el diseño experimental, se alojaron 60 primerizas (Topigs) en corrales individuales adyacentes entre sí en el mismo cobertizo en grupos de 15 animales. A las primerizas se les permitió acceso *ad libitum* a alimentos y agua. La composición de los ingredientes se muestra en la tabla 25.

Tabla 25 - Composición de las dietas usadas para determinar el efecto de los adsorbentes sobre la toxicosis por zearalenona en las primerizas prepuberales

	Control	ZEA	ZEA + NT	ZEA + ET
Zearalenona pura (ppm)	0.02	1.03	1.14	1.05
Vomitoxina (ppm)	0.30	0.31	0.36	0.27
NT (ppm)	0	0	3000	0
ET (ppm)	0	0	0	3000
Ingrediente	Porcentaje de dieta ^a			
Cebada	35.00	36.00	35.50	34.00
Trigo	32.53	33.00	31.50	34.00
Soja (FF Danex)	7.97	7.97	7.97	34.20
Soja (47/5 Brasil)	11.00	11.05	12.00	11.30
Pulpa de remolacha azucarera 8/7.5	2.00	3.00	2.00	2.50
Grasa	2.30	2.26	2.34	2.36
Treonina	0.00	0.00	0.00	0.00
Triptófano	0.02	0.02	0.03	0.02
Lisina 50% Líquido	0.05	0.05	0.05	0.04
Fosfato dicálcico sa	0.20	0.20	0.20	0.20
Vitazym 02	0.10	0.10	0.10	0.10
Salbiotic	0.30	0.30	0.30	0.30
Vitaproteína Visp 50pl	2.50	2.50	2.50	2.50
Vitapops	6.00	6.00	6.00	6.00
Análisis próximo (%) ^b				
Humedad	9.76	9.98	9.83	9.93
Proteína	18.73	18.18	18.59	18.32
Fibra	4.33	4.45	4.43	4.20
Grasa	6.81	6.51	6.65	6.72
Ceniza	5.45	5.33	5.56	5.54
Almidón	39.08	40.21	39.79	39.66

^(a) Porcentajes expresados en materia seca.

^(b) Los porcentajes de subconjuntos no siempre suman 100% porque no se determinaron todos los componentes

5

La toxina pura y los adsorbentes disponibles comercialmente, vendidos bajo la marca registrada Toxfin (codificada como NT) y Toxfin Supreme (codificada como ET), fueron suministrados por Kemin Europe N.V.; Toxfin es una mezcla de bentonita y sepiolita y Toxfin Supreme es una mezcla de sepiolita y leonardita, un mineraloide con alto contenido de sustancias húmicas. Se incluyeron en la dieta contaminada experimentalmente, lo que resultó en una concentración de ZEA en la dieta de aproximadamente 1 ppm. La dieta de control contenía 0.02 ppm de ZEA (de materias primas) y cualquier adsorbente (Tabla 25). Las dietas ZEA + NT y ZEA + ET contenían aproximadamente 1 ppm de ZEA y 3000 ppm de NT y ET, respectivamente. Se alimentaron diferentes lechones a los lechones durante 6 semanas. La ingesta total de pienso se registró durante la duración de la prueba. A partir de los datos de rendimiento, se calcularon la

ganancia diaria (kg/día), la ingesta diaria de pienso (kg/día) y la eficiencia del pienso (ganancia/ingesta del pienso) que describe todo el período de prueba.

Determinación de zearalenona en piensos.

- 5 Se usó un método aprobado por AOAC para la determinación de zearalenona en muestras de pienso por HPLC y TLC (Scott, P. M., T. Panalalrs, S. Kanhre and W. F. Miles. 1978. Determination of zearalenone in cornflakes and other com-based foods by thin layer chromatography, high matography/high resolution mass spectrometry. I.AOAC 61593). Para calcular los valores de zearalenona, se evaluaron determinaciones por duplicado de 10 mezclas diferentes de pienso.

Evaluación clínica.

- 10 Se observaron todas las primerizas prepuberales semanalmente para detectar signos de hiperestrogenismo. Las vulvas se evaluaron para determinar las características de hinchazón, enrojecimiento y aumento de la estimulación estrogénica usando una escala subjetiva de 5 puntos (1 = menos estimulada; 5 = escala más estimulada).

Todas las primerizas analizadas estaban aparentemente sanas sin signos de infección clínica. La frecuencia respiratoria y cardíaca fueron normales. Las glándulas mamarias, vulva, mucosa, heces y orina estaban normales.

- 15 Mediante el uso de la prueba serológica, los lechones se clasificaron como negativos para todos los principales patógenos de los lechones, excepto para Circovirus. Los resultados no estaban disponibles en este estudio pero estaban certificados por la granja de origen.

Muestras de sangre.

- 20 Se recogió sangre a través de la vena externa de la cola del cerdo en un tubo que contiene anticoagulante EDTA para hematología y otro tubo sin EDTA para análisis bioquímico. La recolección de sangre se realizó a las 0, 3 y 6 semanas y coincidió con el pesaje de los animales. Los análisis se realizaron inmediatamente después de la extracción de sangre. Una fracción de la sangre recogida en un tubo seco se centrifugó a 2000 g durante 15 minutos a temperatura ambiente. El rendimiento del suero se transfirió a tubos Eppendorf y se usó para determinar algunos parámetros biológicos. El recuento de células sanguíneas y el análisis hematológico de rutina se realizaron usando un contador celular automatizado, con dilución adaptada. Las determinaciones de la actividad enzimática se lograron por duplicado y los resultados se expresaron en unidades internacionales/Litro (UI/L).

Estradiol-17-β (E2).

- 30 Las concentraciones en suero de estradiol-17-β (E2) se determinaron mediante un inmunoensayo enzimático quimioluminiscente competitivo en fase sólida (Immullite®). La fase sólida (cuenta) está recubierta con anticuerpo policlonal antiestradiol de conejo validado previamente. El reactivo contiene fosfatasa alcalina (intestino de ternera bovina) conjugada con estradiol. El conjugado de la enzima estradiol compite con el estradiol en la muestra por sitios de unión de anticuerpos limitados en la cuenta. El exceso de muestra y reactivo se eliminan mediante un lavado centrífugo. Finalmente, se agrega sustrato quimioluminiscente a la cuenta y se genera señal en proporción a la enzima unida. Los resultados se expresaron en pg/ml y la sensibilidad analítica fue de 15 pg/ml.

Muestras de orina y heces.

- 35 Se colocaron seis animales de cada corral en jaulas de metabolismo individual en una habitación a 27±2 °C durante 20 días consecutivos; 1 semana de adaptación a jaulas y 4 semanas (4 días por semana) para registros diarios de consumo y recolección fecal y urinaria. Al final de aproximadamente 12 horas, los animales fueron retirados por turnos de tres de las jaulas y devueltos a los corrales. Se tomaron muestras diariamente. La recolección de heces y orina fue aproximadamente del 10% de la excreción total. Las muestras fueron congeladas y enviadas por transporte a un laboratorio para determinar la presencia de metabolitos derivados de ZEA.

Sacrificio.

- 45 Después de 3 semanas de exposición a la dieta, se sacrificaron 5 lechones de cada corral de tratamiento el mismo día, en el mismo matadero, ubicado a menos de 50 km de la granja, en términos comerciales, según los estándares europeos. Los animales fueron aturdidos con CO y posteriormente desangrados. Útero, riñones e hígado fueron extirpados y pesados. Se colocaron aproximadamente 25 g de hígado y riñón frescos en un matraz de formalina. Inmediatamente después del sacrificio, el órgano reproductor fue recuperado, identificado y colocado individualmente en solución salina regulada con fosfato (PBS, Sigma-Aldrich, Madrid) para evitar el secado de las estructuras para su posterior evaluación. Se recogieron aproximadamente 5 ml de bilis de cada animal sacrificado en un tubo para analizar la concentración de ZEA para una mejor comprensión de la degradación de ZEA. Los tubos biliares fueron enviados por transporte al laboratorio en condiciones de refrigeración. Todas las muestras fueron almacenadas y transportadas en refrigeradores a diferentes laboratorios. Después de 6 semanas, todos los animales restantes se sacrificaron y se tomaron muestras en las mismas condiciones descritas anteriormente. Los cadáveres fueron incautados y destruidos adecuadamente.

Examen de histopatología.

Se examinó a cada hembra para detectar anomalías graves en órganos seleccionados (hígado, riñones, ovarios y útero). Los órganos fueron pesados y medidos. Se valoraron los aspectos macroscópicos, microscópicos y morfométricos. Los tejidos seleccionados y todas las lesiones macroscópicas se fijaron en formalina regulada neutra al 10%, se embebieron en parafina, se seccionaron a 3-5 µm, se tiñeron con hematoxilina y eosina, y se examinaron mediante microscopía óptica. El examen histopatológico de los tejidos fijos fue realizado por un laboratorio universitario de patología.

Análisis de los datos.

Se realizó un análisis de varianza bidireccional en los parámetros sanguíneos, ovario, oviducto, cuello uterino, peso de los cuernos uterinos y tamaño de la vagina, ovario, oviducto, cuello uterino, cuernos uterinos. Los factores o variables independientes considerados en este análisis fueron el tratamiento (cuatro niveles: sin ZEA añadida, 1 ppm de ZEA, 1 ppm de ZEA + 3000 ppm de NT y 1 ppm de ZEA + 3000 ppm de ET) y el tiempo (dos niveles: 3 y 6 semanas de exposición). Las interacciones tratamiento x tiempo se usaron para determinar si el tiempo tiene algún efecto significativo sobre el efecto de la toxicosis por zearalenona/adsorbentes. Las diferencias entre tratamientos o exposición temporal se analizaron mediante la prueba t de Student. Se utilizó la prueba de chi-cuadrado para medir la asociación entre las variables categóricas del estudio. Todos los análisis estadísticos se realizaron con SPSS (Statistical Package for the Social Science for Windows, version 15.0, 2006).

Resultados

Aumento de peso, consumo de pienso y eficiencia del pienso de los animales.

Tabla 26 - Desviación media y estándar de la evolución del peso en primerizas.

Tiempo (semanas)	Control	ZEA	ZEA +NT	ZEA +ET	Sig(*)
0	16.96 ±0.98	16.36 ±1.4	16.18 ±1.98	15.53 ±1.92	NS
3	27.7 ±2.12	26.07 ±2.28	26.61 ±2.04	25.38 ±1.83	NS
6	34.4 ±2.29	36.2 ±2.69	36.38 ±1.79	34.4 ±3.68	NS

(*) NS = No significativo

Tabla 27 -. Resumen de rasgos de productividad en diferentes lotes.

	Control	ZEA	ZEA + NT	ZEA + ET	Sig(*)
Ingesta diaria de pienso (kg/día)	1.08 ±0.09	1.20 ±0.02	1.01 ±0.04	1.05 ±0.11	NS
Eficiencia alimentaria (ganancia/ingesta de piensos; kg/kg)	2.16 ±0.383	2.09 ±0.194	1.74 ±0.256	1.90 ±0.651	NS
Ganancia diaria (kg/día)	0.593 ±0.11	0.589 ±0.12	0.595 ±0.14	0.598 ±0.09	NS
Ingesta oral de ZEA (mg/día por animal)	0.02 ±0.001 ^a	1.23 ±0.01b	1.15 ±0.03b	1.10 ±0.01b	***

(*) NS = No significativo (p > 0.05); *** (p < 0.001)

Ni la zearalenona ni los adsorbentes tuvieron ningún efecto sobre el aumento de peso de las primerizas (Tabla 26). No hubo diferencias ni en el consumo de pienso ni en la eficiencia del pienso (Tabla 27). No hubo diferencias entre las primerizas tratadas con ZEA para la ingesta oral de ZEA. Estos datos respaldan los hallazgos de James and Smith (James, L.J.; Smith, T.K. (1982). Effect of dietary alfalfa on Zearalenone toxicity and metabolism in rats and swine. Journal of Animal Science, 55:110-118) que señalaron que en cerdos, ZEA no tuvo un efecto significativo sobre las características de crecimiento.

Efectos clínicos

En las 3 semanas posteriores a la exposición de la dieta a dietas experimentales, las puntuaciones de la vulva aumentaron. Las dietas contaminadas con ZEA produjeron puntuaciones de vulva mayores que las de los controles (Fig. 1).

El aumento se incrementó en el siguiente orden significativo: ZEA $\geq$ ZEA + NT > ZEA + ET $\geq$ CON. Dentro de las 6 semanas de exposición a la dieta, los efectos fueron de mayor intensidad a los observados en la semana 3 (Tabla 28). Los resultados demostraron que ET y NT no aliviaron todos los efectos clínicos de ZEA, pero se descubrió que el adsorbente ET era más eficaz.

Tabla 28 - Desviación media y estándar del tamaño de la vulva de las primerizas después de 6 semanas de exposición a diferentes dietas.

6 semanas	Control	ZEA	ZEA + NT	ZEA + ET	Sig(*)
Tamaño de la vulva (cm)	1.45 $\pm$ 0.28 ^a	3.12 $\pm$ 0.52 ^c	2.81 $\pm$ 0.41 ^{bc}	2.48 $\pm$ 0.30 ^b	***

(*) a-c: dentro de una fila, el valor con una letra superíndice fue significativamente diferente ($p < 0.001$)

Resultados del análisis de sangre.

El metabolismo de ZEA parece ocurrir esencialmente en el hígado que conduce a α y β zearalenol, siendo este último no tóxico.

Tabla 29 - Desviación media y estándar de los parámetros sanguíneos en el día 0.

Tiempo (0 días)	Control	ZEA	ZEA + NT	ZEA + ET	Sig(*)
Leucocitos (recuento/mm ³)	24500 $\pm$ 2072	19920 $\pm$ 2072	19249 $\pm$ 2072	20939 $\pm$ 2072	NS
ALP (IU/litro [†])	1002 $\pm$ 83	845 $\pm$ 83	895 $\pm$ 83	956 $\pm$ 85	NS
GGT (IU/litro)	57 $\pm$ 8	59 $\pm$ 8	74 $\pm$ 8	73 $\pm$ 8	NS
ALT ((IU/litro)	70 $\pm$ 6	65 $\pm$ 6	64 $\pm$ 6	56 $\pm$ 6	NS
AST (IU/litro)	119 $\pm$ 62	181 $\pm$ 62	159 $\pm$ 62	213 $\pm$ 64	NS
Estradiol-17- β (pg/ml)	23 $\pm$ 2	26 $\pm$ 2	21 $\pm$ 2	21 $\pm$ 2	NS
Tiempo*Tratamiento					NS

(*) NS = No significativo. [†] ALP: fosfatasa alcalina; GGT: γ -glutamilttransferasa; ALT: alanina aminotransferasa; AST: aspartato aminotransferasa

Para obtener una visión general sobre la toxicología de la zearalenona, principalmente la toxicidad del hígado, los riñones y los órganos reproductivos, se han investigado otros posibles efectos adversos sobre las enzimas sanguíneas o los marcadores biológicos después de 3 y 6 semanas de exposición.

No se observaron diferencias para los parámetros sanguíneos entre los animales al comienzo del estudio, lo que indicaba el mismo estado saludable para diferentes lotes (Tabla 29). Sin embargo, la actividad de ALP y AST de todos los lotes superó el valor de referencia (ALP $\leq$ 300 IU/L; AST $\leq$ 80 IU/L). La actividad de GGT no fue significativamente diferente entre los tratamientos, pero las primerizas tratadas con adsorbente mostraron los valores más altos ($p < 0.05$).

La tabla 30 muestra la influencia de los tratamientos sobre los parámetros hematológicos en las primerizas prepuberales después de 3 semanas de exposición a la dieta de ZEA y adsorbentes. En las primerizas tratadas con ZEA y ZEA + NT, la actividad ALP fue significativamente menor que en los lotes control y ZEA + ET. Como también se muestra en la tabla 30, los cerdos prepúberes tratados con adsorbente tenían mayores actividades de GGT que sus contrapartes no tratados. No se encontraron diferencias en ningún otro parámetro sanguíneo entre lotes.

Tabla 30 - Desviación media y estándar de los parámetros sanguíneos después de 3 semanas de exposición a diferentes dietas.

Tiempo (3 semanas)	Control	ZEA	ZEA + NT	ZEA + ET	Sig(*)
--------------------	---------	-----	----------	----------	--------

Leucocitos (recuento/mm ³)	9854±1346	13320±1300	11719±1346	12695±1300	NS
ALP (IU/1†)	954±47 ^c	790±45 ^{ab}	760±51 ^a	929±64 ^{bc}	*
GGT (IU/1)	78±10 ^{ab}	56±9 ^a	96±11 ^b	107±13 ^b	*
ALT ((IU/1)	63±4	55±4	53±4	50±5	NS
AST (IU/1)	100±8	79±8	90±9	91±11	NS
Estradiol-17-β (pg/ml)	29±2	25±2	23±3	30±3	NS
Tiempo*Tratamiento					NS

(*) a-b: dentro de una fila, el valor con una letra superíndice fue significativamente diferente ($p \leq 0.01$); NS = No significativo.

† ALP: fosfatasa alcalina; GGT: γ -glutamyltransferasa; ALT: alanina aminotransferasa; AST: aspartato aminotransferasa

5 La actividad de ALP fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en el lote de control después de 6 semanas de exposición (Tabla 31). La actividad de GGT no fue significativamente diferente entre lotes, pero los cerdos prepuberales tratados con adsorbentes mostraron nuevamente los valores más altos. Las diferencias de ALP y GGT encontradas desde la 3 hasta la semana 6, pueden sugerir que existe una variación biológica para recuperarse del estrés entre y dentro de los grupos.

Tabla 31 - Desviación media y estándar de los parámetros sanguíneos después de 6 semanas de exposición a diferentes dietas.

Tiempo (6 semanas)	Control	ZEA	ZEA + NT	ZEA + ET	Sig(*)
Leucocitos (recuento/mm ³)	3921±665	3839±665	4829±743	3920±665	NS
ALP (IU/1†)	1093±66 ^b	688±66 ^a	683±69 ^a	830±66 ^a	*
GGT (IU/1)	64±11	46±11	56± 11	66±11	NS
ALT ((IU/1)	63±	52±6	63± 7	46±6	NS
AST (IU/1)	63±7	63±7	77±8	67±7	NS
Estradiol-17-β (pg/ml)	25±3 ^b	20±3 ^a	17±3 ^a	26±3 ^b	*
Tiempo*Tratamiento					NS

(*) a-b: dentro de una fila, el valor con una letra superíndice fue significativamente diferente;

** ($p < 0.01$); *** ($p < 0.001$); NS = no significativo

† ALP: fosfatasa alcalina; GGT: γ -glutamyltransferasa; ALT: alanina aminotransferasa; AST: aspartato aminotransferasa

10 Con respecto a ZEA, las concentraciones dietéticas de 1 ppm durante 6 semanas de exposición no afectaron la función hepática y alteraron los parámetros sanguíneos en nuestros experimentos.

15 La tabla 31 muestra diferencias de concentración en plasma de estradiol-17-β (E2) ($p < 0.05$) en la semana 6. De alta a baja concentración de plasma E2, el orden del lote fue: CON = ZEA + ET > ZEA = ZEA + NT. Estos resultados podrían sugerir que la ET se une de manera efectiva a la zearalenona y luego la concentración en plasma media de estradiol fue similar al grupo control, lo que indica que los niveles basales de producción de estradiol endógeno para las primerizas prepuberales se mantuvieron con suplementos de ET después de 6 semanas de exposición. Se encontró una evolución similar para la concentración en plasma de E2 en todos los lotes (Fig. 2). Hubo un aumento de E2 en la semana 3 y volvió a los niveles basales en la semana 6. El ligero aumento de la concentración en plasma de E2 encontrado en CON y ZEA + ET no fue diferente ($p > 0.05$) a los niveles basales, mientras que fue diferente a ZEA y ZEA + NT debido a la disminución significativa de E2 en la semana 6. Los resultados indicaron que los perfiles hormonales durante la fase puberal de las primerizas fueron modificados por la zearalenona en la dieta. De hecho, la maduración de la respuesta hipotálamo-hipofisaria al estradiol, que culmina en la capacidad de producir un aumento de LH preovulatorio, ocurre durante el período prepuberal. La unidad hipotálamo-hipofisaria es sensible a los estrógenos mucho antes de que ocurra

la pubertad. Por ejemplo, ya a los 40 días de edad, la LH aumentó en suero después del benzoato de estradiol (EB), pero el patrón fue uno de múltiples aumentos pequeños que fueron menos sincrónicos y de menor magnitud que en las primerizas de 160 días (Fleming, M. W. and R. A. Dailey. 1985. Longitudinal study of the surge of gonadotropins induced by exogenous hormones in prepuberal gilts. *Endocrinology* 116:1893). Dial et al. (Dial, G.D., O.K.Dial, R.S. Wkinson and P.J.Dziuk. 1984. Endocrine and ovulatory response of the gilt to exogenous gonadotropins and estradiol during sexual maturation. *Biol. Reprod.* 30:289) informaron que a los 175 días de edad, se produjo un solo un aumento de LH similar al de una cerda madura en respuesta a EB, pero a edades más tempranas los resultados fueron similares a los de Fleming and Dailey (1985). Debido a que la zearalenona afecta algunos tejidos diana de estrógenos, la exposición a la zearalenona antes de la pubertad podría alterar potencialmente los mecanismos sensibles al estrógeno implicados en la maduración del hipotálamo y la concentración basal de E2 en plasma.

Tabla 32 - Efecto temporal de la exposición a la dieta sobre los parámetros sanguíneos para diferentes lotes.

	Control	ZEA	ZEA + NT	ZEA + ET
Leucocitos (recuento/mm ³)	***	***	***	***
ALP (IU/1†)	NS	NS	NS	NS
GGT (IU/1)	NS	NS	*	*
ALT ((IU/1)	NS	NS	NS	NS
AST (IU/1)	**	**	*	*
Estradiol-17-β (pg/ml)	NS	*	*	NS

* (p <0.05); ** (p <0.01); *** (p <0.001); NS = No significativo (p > 0.05)

† ALP: fosfatasa alcalina; GGT: γ-glutamilttransferasa; ALT: alanina aminotransferasa; AST: aspartato aminotransferasa

La tabla 32 muestra la influencia de la exposición a la dieta sobre los parámetros sanguíneos y las enzimas hepáticas dentro del lote. Aunque el recuento de leucocitos está dentro del intervalo de referencia desde el inicio hasta la semana 3, se encontró una disminución muy significativa (p <0.001). Después de 6 semanas de exposición, los recuentos de leucocitos estaban por debajo del intervalo de referencia (p <0.001) debido a una linfopenia severa para todos los lotes (datos no mostrados). La destrucción de las células linfoides podría sugerir agentes de infección, pero los animales no mostraron otros signos de enfermedad. Además, se encontró neutrofilia (datos no mostrados) lo que sugiere signos de estrés. La actividad de ALP no cambió en ningún lote durante 6 semanas y la actividad de ALP de alto nivel demostró que todos los lotes tenían la misma cantidad de estrés. AST y GGT permanecieron altos en todos los grupos de animales durante 3 semanas (diferencias no significativas; p > 0.05) pero ambos disminuyeron significativamente a la semana 6 (p <0.05). Hong Yu et al., (Hong Yu, VMD; En-dong Bao, PhD; Ru-qian Zhao, PhD; Qiong-xia Lv, VMD. (2007). Effect of transportation stress on heat shock protein 70 concentration and mRNA expression in heart and kidney tissues and serum enzyme activities and hormone concentrations of pigs. November 2007, Vol. 68, No. 11, Pages 1145-1150) observó que un estrés severo en los cerdos podría manifestarse como un aumento de las actividades en suero de AST.

Lesiones anatómicas y patológicas.

La tabla 33 muestra que las dietas contaminadas con ZEA produjeron un aumento en el peso de la vagina (p <0.05) después de 3 semanas de exposición. Los lotes NT y ET tenían un peso vaginal similar al grupo ZEA. Kurtz et al., (Kurtz, H. J., M. E. Naim, G. H. Nelson, C. M. Christensen and C. J. Mirocha. 1969. Histologic changes in the genital tracts of swine fed estrogenic mycotoxin. *Am. J. Vet. Res.* 30:551) observaron metaplasia del epitelio en el cuello uterino y la vagina de las primerizas prepuberales de 6 semanas alimentadas con ZEA (1 mg/día por animal durante 8 días) lo que podría explicar nuestros resultados. También se observó que un 20% de las primerizas tratadas con ZEA tenían folículos > 6 mm de tamaño y ovario hipoplásico (Fig. 5). Quizás la estimulación estrogénica de ZEA fue tan fuerte que incluso los ovarios hipoplásicos respondieron a los efectos de ZEA. No se encontraron folículos > 6 mm de tamaño y ovario hipoplásico para el resto de los lotes. Los lotes tratados con ZEA y NT tuvieron los porcentajes más altos de ovarios hipoplásicos (p > 0.05) (Tabla 36). Se observó que los ovarios hipoplásicos y ovulados solo se observaron en algunas primerizas de lote de ZEA (25%).

Después de 6 semanas de exposición, los resultados patológicos fueron significativamente diferentes entre lotes. Estas diferencias fueron (Tabla 34):

• Peso del oviducto: ZEA ≥ ZEA + NT ≈ ZEA + ET > CON

• Peso y tamaño de los cuernos uterinos: ZEA = ZEA + NT $\geq$ ZEA + ET > CON

• Peso del cuello uterino: ZEA + ET $\geq$ ZEA + NT $\geq$ ZEA $\geq$ CON

• Peso de la vagina: ZEA = ZEA + NT > ZEA + ET > CON

• Tamaño de la vagina: ZEA = CON = ZEA + NT > ZEA + ET

5 • Peso del órgano reproductor (oviducto-cuello uterino): ZEA = ZEA + NT $\approx$ ZEA + ET > CON

También se encontraron diferencias en el peso de los órganos: no hubo diferencias significativas entre los lotes ZEA, ZEA + NT y ZEA + ET, pero en general fueron significativamente más altas que el lote de control. Estos resultados demostraron que la inclusión de ZEA en la dieta causó un crecimiento excesivo del órgano reproductor después de 6 semanas de exposición ($p < 0.01$). Sin embargo, la adición de ET en la dieta mostró el menor peso reproductivo dentro de los tratamientos con ZEA.

La tabla 34 muestra síntomas hiperestrogénicos causados por exposición a ZEA en la semana 6. Diferentes elementos reproductivos aumentaron de tamaño y aumentaron de peso cuando se expuso a ZEA. En la mayoría de los casos, el aumento y la ganancia de peso de los lotes tratados con ZEA y NT fueron significativamente diferentes a las primerizas de control y tratadas con ET. Como se esperaba, las primerizas tratadas con ZEA mostraron los valores más altos y el lote de control los más bajos. NT y ET proporcionaron un efecto moderado tóxico parcial de ZEA. Adicionalmente, las primerizas tratadas con 20% de ZEA; el 22% de NT y el 10% de ET tenían folículos > 6 mm de tamaño y crecimiento de ovario hipoplásico (Fig. 5), pero no se encontraron casos en el control.

La tabla 37 mostró lesiones histopatológicas de diferentes órganos después de 6 semanas de exposición a la dieta. Todas las primerizas tratadas con ET tenían pielitis (60% moderada y 40% severa) y fue significativamente mayor ($p < 0.05$) a los otros grupos de animales. Las lesiones hepáticas como la hepatitis intersticial y el incremento del tejido conectivo fueron significativamente menores para controlar el lote ($p < 0.05$) que demostró que la exposición a la dieta ZEA produjo características de toxicidad hepática. Ni la suplementación con NT ni ET minimizó la hepatotoxicidad. También se encontró un alto porcentaje de casos de colangiohepatitis mononuclear en las primerizas de todos los lotes (Tabla 37), incluido el control uno. Debido a la alta actividad de ALP durante el ensayo, la colangiohepatitis podría ser el resultado de un largo período de exposición al estrés.

La tabla 35 muestra el efecto temporal de la exposición a la dieta sobre las estructuras de los órganos reproductivos dentro de los lotes. Se encontró un aumento significativo en el peso del órgano reproductor para todos los lotes. Un aumento del lote de control indicó un crecimiento fisiológico. El crecimiento observado de la estructura del órgano reproductor y el patrón de aumento fueron similares para los lotes tratados con ZEA y NT y diferentes para los lotes de ZEA + ET y control. Los lotes tratados con ET y de control tuvieron un patrón de crecimiento casi similar durante el ensayo. Estos datos demuestran que ET superó los síntomas de hiperestrogenismo de ZEA de manera más eficiente que NT.

Otro efecto observado fue el número de ovarios que tienen folículos de ≤ 6 mm de tamaño. Todos los ovarios registrados después del sacrificio se clasificaron por el tamaño más grande de folículo como pequeño/mediano (≤ 6 mm) y grande (> 6 mm). La figura 3 muestra un bajo porcentaje de ovarios que tienen folículos pequeños hasta la semana 3 y un aumento significativo hasta la semana 6, excepto para el grupo tratado con ET. El porcentaje de ovarios con folículos pequeños no fue significativamente diferente en la misma semana ($p > 0.05$). La figura 4 muestra folículos grandes encontrados en lotes tratados con ZEA y ninguno para los restos después de 3 semanas de exposición a la dieta. Dentro de las 6 semanas de exposición, se detectaron folículos grandes en todos los grupos de primerizas. Los recuentos más bajos se encontraron en lotes de control y tratados con ET. En general, no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$). Es probable que cualquier incremento en el número o tamaño de folículos inducido por ZEA haya sido enmascarado por el efecto de la producción endógena, ya que las primerizas se acercaban a la pubertad. Las primerizas de esta edad y peso tienen una tasa de crecimiento folicular ovárico prepuberal pero nunca termina en folículos maduros y grandes (> 6 mm) o en el procedimiento de ovulación. Los folículos > 6 mm de tamaño y el ovario ovulado no se esperaban a la edad de las primerizas experimentales, luego la actividad estrogénica de ZEA podría promover estas irregularidades y también explicaba las lesiones de congestión encontradas en los oviductos y ovarios. Después de 3 semanas de exposición, el lote de ZEA registró el 20% de los casos de folículos grandes (> 6 mm) y ninguno para el resto (Fig. 5). En 6 semanas, se observaron folículos grandes en todos los lotes. Los lotes de control y suplementados con ET registraron los casos más bajos ($p < 0.05$). La hiperactividad ovárica (folículos > 6 mm de tamaño y ovario hipoplásico) aumentó durante el ensayo para todos los lotes, excepto para el control. ET mostró el incremento más bajo ($p < 0.05$) que sugirió que ET alivia la hiperactividad ovárica que induce ZEA.

Tabla 33 - Desviación media y estándar de las mediciones de la estructura del órgano reproductor. Resultados obtenidos después de 3 semanas de exposición a diferentes dietas.

3 semanas	Control	ZEA	ZEA + NT	ZEA + ET	Sig(*)
Ovario					

Peso (g)	0.62±0.25	0.25±0.25	0.37±0.25	0.55±0.25	NS
Tamaño (cm)	1.55±0.20	1.20±0.20	1.18±0.20	1.38±0.20	NS
Oviductos:					
Peso (g)	0.40±0.08	0.44±0.08	0.45±0.08	0.38±0.08	NS
Tamaño (cm)	14.88±1.55	12.65±1.55	11.85±1.55	13.15±1.55	NS
Cuernos uterinos:					
Peso (g)	8.09±2.40	10.50±2.40	10.08±2.40	10.64±2.40	NS
Tamaño (cm)	32.45±4.05	32.70±4.05	35.45±4.05	35.90±4.05	NS
Cuello uterino					
Peso (g)	0.40±0.14	0.58±0.13	0.44±0.13	0.51±0.13	NS
Tamaño (cm)	0.63±0.10	0.70±0.09	0.70±0.09	0.90±0.09	NS
Vagina					
Peso (g)	24.34±3.75a	36.13±2.37 ^b	38.64±3.06 ^b	33.96±2.37ab	*
Tamaño (cm)	21.75±1.87	21.70±1.18	20.83±1.52	21.80±1.18	NS
Peso del órgano reproductor (oviductos-cuello uterino; g)	10.80±3	11.77±2.68	11.34±2.68	12.08±2.68	NS

(*) a-b: dentro de una fila, el valor con una letra superíndice fue significativamente diferente; * (p < 0.05);

NS = No significativo (p > 0.05)

Tabla 34 - Desviación media y estándar de las mediciones de la estructura del órgano reproductor. Resultados obtenidos después de 6 semanas de exposición a diferentes dietas.

6 semanas	Control	ZEA	ZEA + NT	ZEA + ET	Sig(*)
Ovario					
Peso (g)	1.34±0.18	1.23±0.18	1.21±0.19	0.93±0.18	NS
Tamaño (cm)	1.99±0.14	1.93±0.14	1.85±0.15	1.65±0.14	NS
Oviductos:					
Peso (g)	0.53±0.05a	0.77±0.05b	0.65±0.06ab	0.67±0.05ab	*
Tamaño (cm)	14.76±1.10	14.73±1.10	16.18±1.15	16.79±1.10	NS
Cuernos uterinos:					
Peso (g)	12.63±2.03a	26.07±1.7bc	25.70±1.90bc	20.59±1.79b	***
Tamaño (cm)	39.76±3.43a	56.53±2.87bc	49.94±3.21bc	47.75±3.02b	**
Cuello uterino					
Peso (g)	0.30±0.11a	0.53±0.10ab	0.62±0.10bc	0.86±0.10c	*
Tamaño (cm)	0.58±0.08	0.50±0.07	0.56±0.07	0.61±0.07	NS
Vagina					
Peso (g)	21.91±5.30a	66.34±5.30c	60.03±3.75c	42.82±5.30b	*

Tamaño (cm)	26.5±2.64b	27.00±2.64b	31.25±1.87b	16.50±2.64a	*
Peso del órgano reproductor (oviductos-cervix; g)	14.97±2.27a	28.17±2.12b	28.11±2.12b	23.06±2.00b	*

(*) ^{a-c}: dentro de una fila, el valor con una letra superíndice fue significativamente diferente

* (p < 0.05); ** (p < 0.01); *** (p < 0.001); NS = No significativo (p > 0.05)

Tabla 35 - Efecto temporal de la exposición a la dieta sobre las estructuras de los órganos reproductivos para diferentes lotes

	Control	ZEA	ZEA + NT	ZEA ET
Ovario				
Peso (g)	*	**	**	*
Tamaño (cm)	*	**	*	*
Oviductos:				
Peso (g)	*	**	*	**
Tamaño (cm)	NS	*	***	NS
Cuernos uterinos:				
Peso (g)	**	***	***	**
Tamaño (cm)	*	***	**	*
Cuello uterino				
Peso (g)	NS	NS	NS	NS
Tamaño (cm)	NS	NS	NS	*
Vagina				
Peso (g)	NS	**	*	*
Tamaño (cm)	NS	*	*	NS
Peso del órgano reproductor (oviductos-cervix; g)	*	***	**	**

(*) Dentro de una fila, el valor con una letra superíndice fue significativamente diferente; * (p < 0.05);

** (p < 0.01); *** (p < 0.001); NS = No significativo (p > 0.05)

5 Tabla 36 - Histopatología del órgano reproductor, riñón e hígado después de 3 semanas de exposición a diferentes dietas. Resultados expresados en porcentaje de animales.

Histopatología (3 semanas)	Control	ZEA	ZEA + NT	ZEA + ET	Sig(*)
Órgano reproductor					
Cuello uterino (leve)	0%	0%	0%	20%	NS
Oviducto (leve)	0%	0%	20%	0%	NS
Ovario					
Hipoplástico	40%	50%	60%	40%	t

Preovulatorio	0%	0%	20%	0%	NS
Previoovulatorio severo	0%	0%	0%	0%	NS
Ovulación-hipoplasia severa	0%	25%	0%	0%	t
Riñones					
Nefritis intersticial mononuclear multifocal					
Leve	20%	40%	20%	20%	NS
Moderada	80%	60%	60%	40%	NS
Grave	0%	0%	0%	0%	NS
Pielitis					
Leve	0%	0%	20%	20%	NS
Moderada	20%	40%	0%	20%	NS
Grave	20%	0%	0%	20%	NS
Complicaciones graves	0%	0%	0%	0%	NS
Pielonefritis (leve)	0%	0%	0%	0%	NS
Nefritis intersticial pleomórfico multifocal					
Leve	0%	0%	0%	0%	NS
Moderada	0%	0%	0%	0%	NS
Dilatación glomerular					
Leve	0%	0%	0%	0%	NS
Complicaciones graves	0%	0%	0%	0%	NS
Congestión glomerular (leve)	0%	0%	0%	0%	NS
Degeneración grasa tubular (leve)	0%	20%	0%	0%	NS
Fibrosis medular (leve)	0%	0%	0%	0%	NS
Hígado					
Degeneración grasa	100%	100%	40%	80%	NS
Degeneración hidrópica	80%	60%	80%	40%	NS
Congestión central					
Leve	0%	0%	20%	0%	NS
Moderada	100%	80%	40%	80%	NS
Distorsión de la arquitectura lobular					
Leve	20%	0%	0%	0%	NS
Moderada	0%	20%	0%	0%	NS
Hepatitis septal	100%	80%	60%	60%	NS
Hepatitis intersticial					
Leve	100%	80%	40%	80%	NS
Moderada	0%	0%	20%	0%	NS

Colangiohepatitis mononuclear					
Leve	80%	100%	100%	80%	NS
Moderada	0%	0%	0%	0%	NS
Fibrosis severa	0%	0%	0%	0%	NS
Complicaciones graves	0%	0%	0%	0%	NS
Incremento de tejido conectivo					
Leve	40%	40%	40%	20%	NS
Moderado	0%	0%	0%	0%	NS
Fibrosis capsular	0%	0%	0%	0%	NS
t = tendencia; NS = No significativo (p> 0.05)					

Tabla 37 - Histopatología del órgano reproductor, riñón e hígado después de 6 semanas de exposición a diferentes dietas. Resultados expresados en porcentaje de animales.

Histopatología (6 semanas)	Control	ZEA	ZEA + NT	ZEA + ET	Sig(*)
Órgano reproductor					
Cuello uterino (leve)	0%	0%	0%	11%	NS
Oviducto (leve)	0%	70%	33%	22%	NS
Ovario					
Hipoplástico	10%	0%	0%	10%	NS
Preovulatorio	0%	33%	44%	20%	NS
Previoovulatorio severo	0%	0%	11%	20%	NS
Ovulación-hipoplasia severa	0%	22%	11%	0%	t
Riñones					
Nefritis intersticial mononuclear multifocal					
Leve	60%	20%	44%	10%	NS
Moderada	30%	40%	22%	60%	NS
Grave	0%	20%	0%	0%	NS
Complicaciones graves	0%	0%	22%	20%	NS
Pielitis					
Leve	20%a	20%a	33%a	60%b	*
Moderada	0%a	10%a	33%a	40%b	*
Grave	0%	20%	0%	0%	NS
Complicaciones graves	0%	0%	0%	0%	NS
Pielonefritis (leve)	0%	10%	0%	0%	NS

Nefritis intersticial pleomórfico multifocal					
Leve	10%	0%	0%	0%	NS
Moderada	0%	10%	0%	0%	NS
Dilatación glomerular					
Leve	0%	20%	0%	0%	NS
Complicaciones graves	10%	10%	0%	0%	NS
Congestión glomerular (leve)	0%	10%	10%	0%	NS
Degeneración grasa tubular (leve)	0%	10%	0%	20%	NS
Fibrosis medular (leve)	0%	10%	11%	40%	NS
Hígado					
Degeneración grasa	80%	80%	100%	90%	NS
Degeneración hidrópica	100%	100%	100%	100%	NS
Congestión central					
Leve	90%	70%	67%	40%	NS
Moderada	0%	30%	33%	60%	NS
Distorsión de la arquitectura lobular					NS
Leve	40%	20%	56%	70%	NS
Moderada	0%	10%	0%	10%	NS
Hepatitis septal	80%	100%	100%	90%	NS
Hepatitis intersticial					
Leve	10%a	80%b	67%b	70%b	*
Moderada	30%	20%	33%	30%	NS
Colangiohepatitis mononuclear					
Leve	90%b	80%b	56%b	10%a	***
Moderada	10%	10%	44%	40%	NS
Fibrosis severa	0%	0%	0%	50%	t
Complicaciones graves	0%	0%	0%	0%	NS
Incremento de tejido conectivo					
Leve	13%a	60%b	64%b	40%b	*
Moderado	20%	7%	0%	27%	NS
Fibrosis capsular	10%	30%	11%	20%	NS

(*) a-b: dentro de una fila, el valor con una letra superíndice fue significativamente diferente; NS = No significativo; * (p <0.05); *** (p <0.01); (p > 0.05)

Conclusiones

- 5 Una concentración en la dieta de 1 ppm de Zearalenona y 3000 ppm de adsorbentes no promovió el empeoramiento o la mejora de los rasgos de productividad después de 6 semanas de exposición, ni afectaron la función enzimática del hígado ni los parámetros sanguíneos. Se descubrió que el adsorbente ET es más eficaz que el adsorbente NT para aliviar los efectos del hiperestrogenismo visual (hinchazón por tumefacción y aumento de la vulva) desde la semana 3 hasta la semana 6.
- La evaluación histológica demostró que el ovario hiperactivo (ovario hipoplásico y folículos grandes) inducido por la exposición a zearalenona podría reducirse significativamente al agregar el adsorbente ET a la dieta animal, y que el adsorbente ET promovió la respuesta hipotálamo-hipofisiaria normal al estrógeno en esa concentración en plasma de E2 se mantuvo constante (niveles basales).
- 10 En resumen, 1 ppm de ZEA confiere toxicidad multiorgánica en primerizas prepuberales después de 6 semanas de exposición y ET proporciona un efecto moderado tóxico parcial o completo de esta micotoxina.

REIVINDICACIONES

1. Un aglutinante de micotoxinas para piensos, que comprende del 10% al 90% de sustancias húmicas que comprenden un 45% o más de ácido húmico, una solubilidad máxima del 20% a un pH entre 1.5 y 7.0, y una eficacia de unión de micotoxinas *in vitro* de al menos 80% con adsorción de al menos 80% al pH biológico del estómago de un animal monogástrico y desorción no mayor del 10% a pH neutro; y 10% a 90% de materiales de arcilla, en los que la micotoxina comprende zearalenona.
2. Un aglutinante de micotoxinas como se define en la reivindicación 1, que comprende además una fuente de iones metálicos u óxidos.
3. Un aglutinante de micotoxinas como se define en la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la fuente de sustancias húmicas comprende leonardita.
4. Un pienso que comprende un aglutinante de micotoxinas como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Un aglutinante de micotoxinas como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para uso en la prevención de micotoxicosis en animales.
6. Un aglutinante de micotoxinas para uso según la reivindicación 5, en el que el aglutinante de micotoxinas es un aditivo alimentario para piensos.
7. Un método de reducción de la biodisponibilidad de micotoxinas en piensos contaminados con micotoxinas que comprende tratar el pienso con un aglutinante de micotoxinas como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

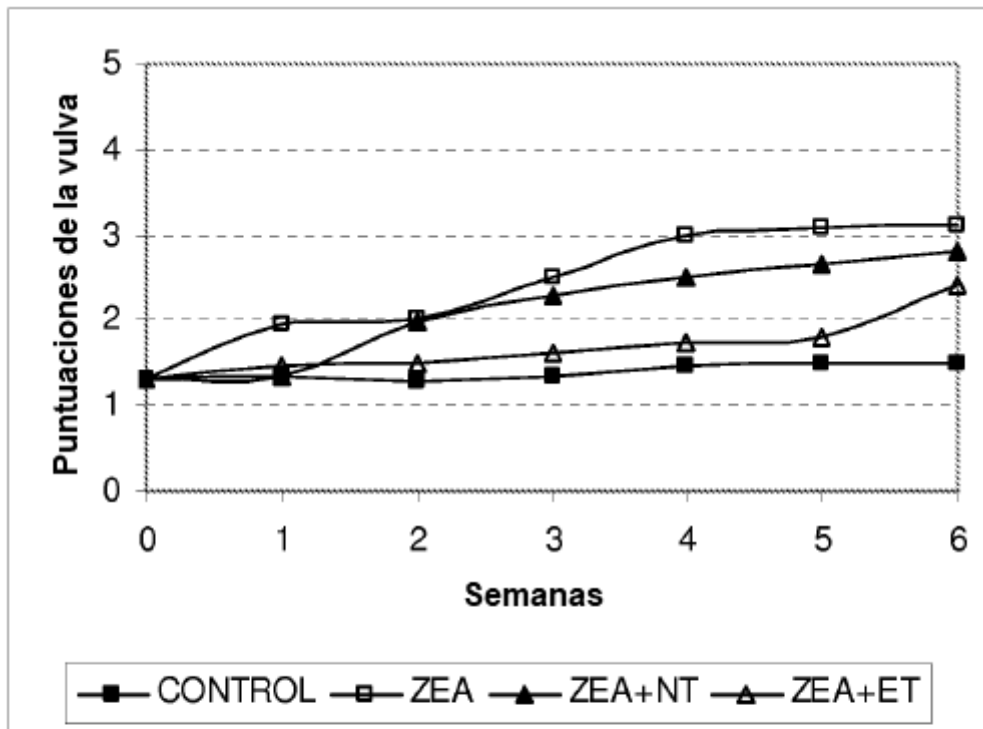


FIG. 1

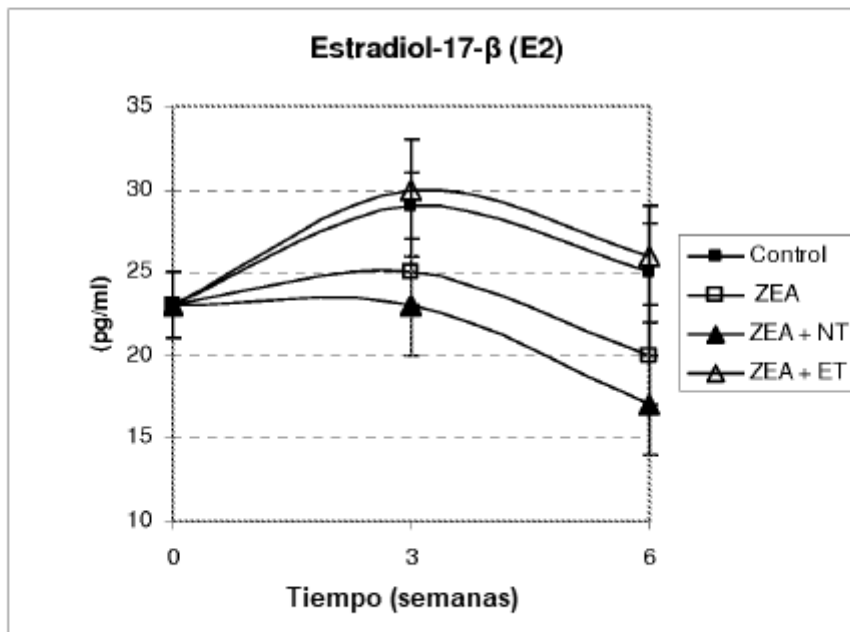


FIG. 2

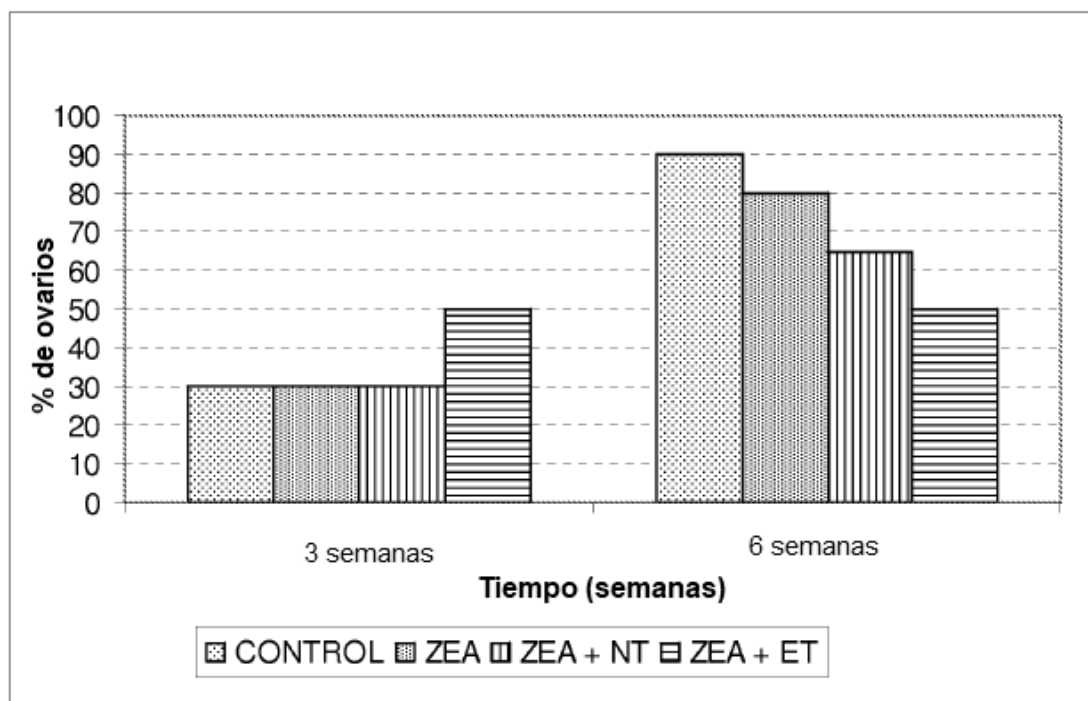


FIG. 3

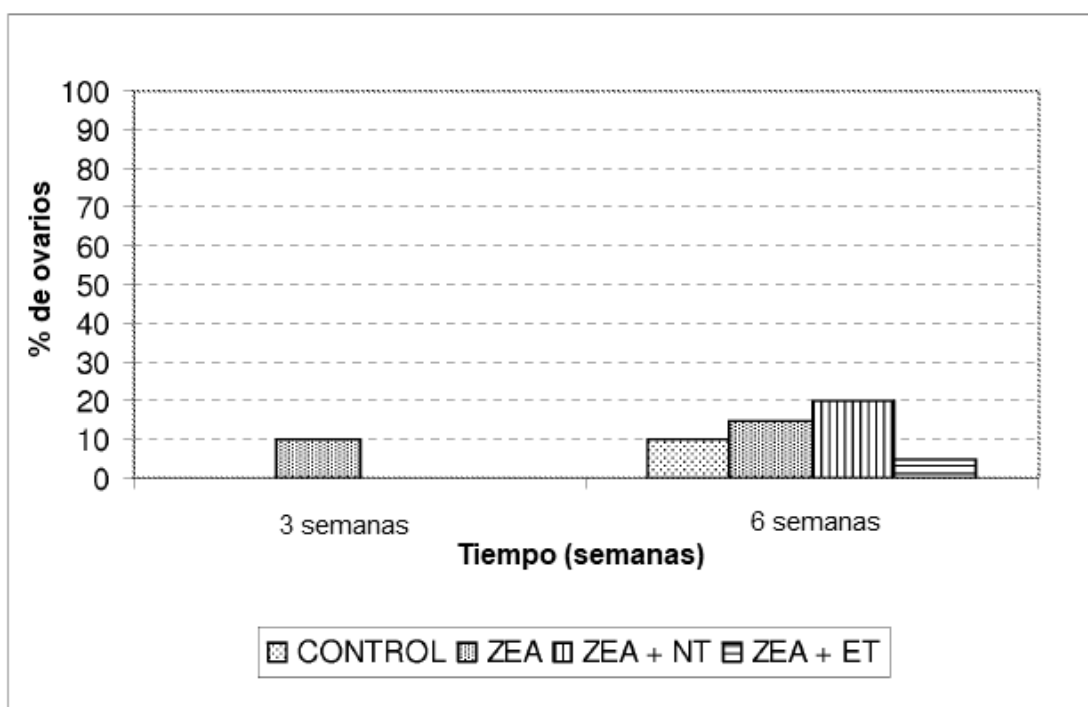


FIG. 4

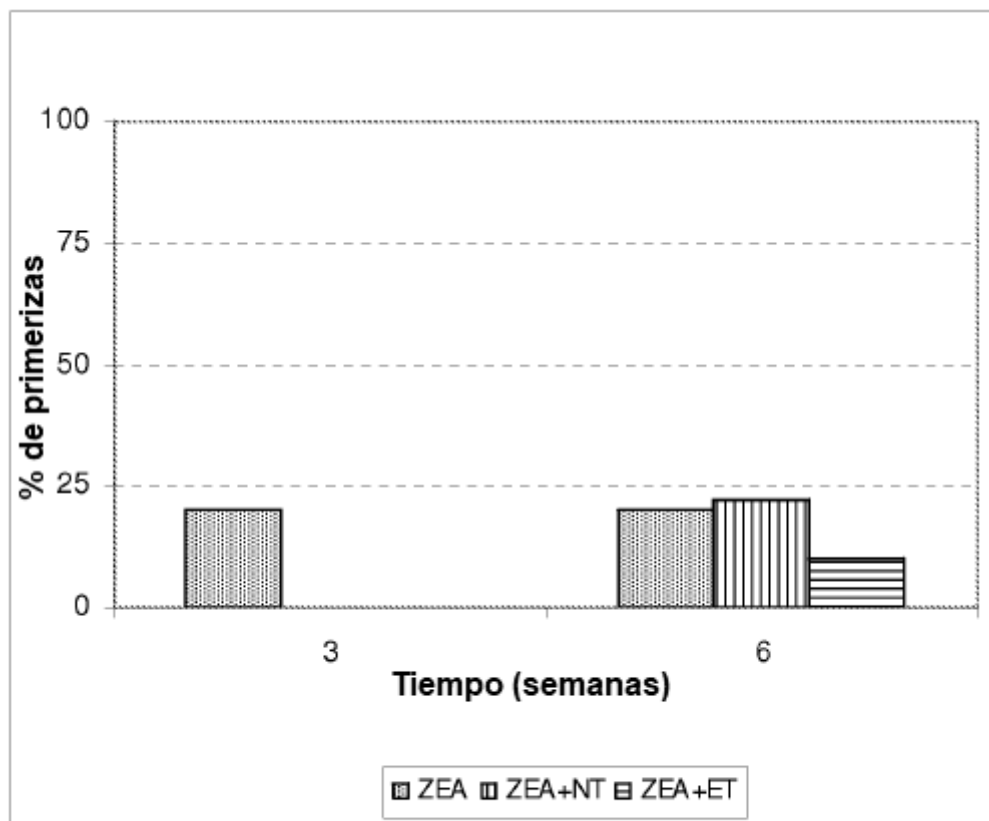


FIG. 5