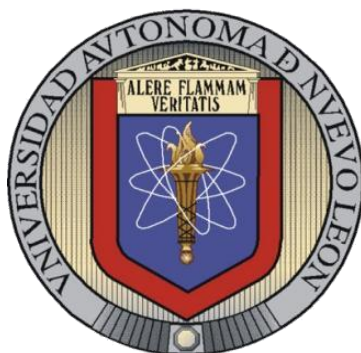


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EFECTO TOXICOLÓGICO DE LA PRESENCIA DE AFLATOXINAS Y
UTILIZACIÓN DE PRODUCTOS REMEDIADORES EN JUVENILES DE
CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei*.**

Por

OSCAR DANIEL GARCÍA PÉREZ

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en Nutrición y Tecnología de
Alimentos para Organismos Acuáticos**

Julio, 2013

**EFFECTO TOXICOLÓGICO DE LA PRESENCIA DE
AFLATOXINAS Y UTILIZACIÓN DE PRODUCTOS
REMEDIADORES EN JUVENILES DE CAMARÓN BLANCO**

Litopenaeus vannamei.

Comité de Tesis

DRA. MIREYA TAPIA SALAZAR
Director de la tesis

DR. DENIS RICQUE MARIE
Secretario

DRA. L. ELIZABETH CRUZ SUAREZ
Vocal

DRA. MARTHA NIETO LÓPEZ
Vocal

DR. DAVID VILLAREAL CAVAZOS
Vocal

AGRADECIMIENTOS

A toda mi familia, quienes me brindaron el apoyo incondicional y quienes nunca me dejaron solo, sin ustedes, no solo esta tesis, si no toda mi vida no estaría completa

A la Dra. Mireya Tapia Salazar, quien fue mi guía en toda la realización de este proyecto, gracias a su paciencia, su interés mostrada, su amistad y sus constantes enseñanzas pude completar esta meta y forjarme en mi desarrollo profesional. Simplemente sin su constante apoyo y su valiosa cooperación esta tesis no estaría terminada.

A la Dra. Martha Nieto López, por sus consejos y la asesoría brindada, ya que fue una parte esencial para la conclusión de esta tesis, y principalmente por su amistad y apoyo moral.

A la Dra. Elizabeth Cruz Suárez y al Dr. Denis Ricque Marie por compartir su sabiduría y brindarme las herramientas necesarias para concluir este proyecto.

Al Dr. David Villarreal Cavazos y al Dr. Julián Gamboa Delgado por todos sus consejos, sus enseñanzas y sobre todo por su amistad.

A la QFB. Maribel Maldonado Muñiz por su incansable colaboración en gran parte de la tesis, por sus consejos brindados y principalmente por el gran apoyo y una apreciable amistad que me otorgo.

Al Dr. Jesús Montemayor Leal y al Dr. Carlos Javier Aguilera González, por el asesoramiento en el trayecto de toda la tesis.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Maricultura: QBP Julio Beltrán, Dr. Alberto Peña, QBP Edith González, Biol. Anahí Zavala, Biol. Perla Ruiz gracias por su apoyo y brindarme su amistad.

Al CONACyT por la beca otorgada durante todo el periodo en el que se desarrolló este proyecto de tesis.

DEDICATORIA

A Dios, quien me dio todo lo tengo, que nunca me dejo solo, que cada día me ayudaba a ser mejor persona, que me da la oportunidad de despertar cada día. Con forme va pasando el tiempo me doy cuenta que sin El no habría alguna esperanza en mi futuro.

*A mi hijo **Ángel Daniel García Sosa**, quien a su corta edad, me enseñó lo que es luchar por vivir, y quien me mostro sin ninguna palabra que la vida es para ganar los retos que tenemos en frente. **MAS QUE DEDICARTE ESTA TESIS, TE DEDICO MI VIDA, PORQUE TU ERES LO MAS PRECIADO QUE TENGO, ERES LA RAZÓN POR LA QUE ME LEVANTO CADA MAÑANA CON UNA SONRISA. TE AMO CON TODO MI SER, GRACIAS POR SEGUIR CON NOTROS.***

*Para mi nueva familia, el amor de mi vida **Sandra Maribel Sosa Monsiváis** quien esta conmigo en las buenas y en las malas, yo no sé qué fuera de mi vida si no estuvieras conmigo, el vivir a tu lado le ha dado un mejor rumbo a mi existencia y **Fernando Puente Sosa**, por su alegría que nunca se acaba y por el hecho que día con día ilumina el hogar con su simpatía.*

*A mis padres, **Rafael García Mata** y **M^a Concepción Pérez García**, por brindarme tu apoyo y confiaron en mi para realizar cada proyecto de mi vida, todo lo he hecho es gracias a sus consejos, sus palabras de aliento y hasta sus regaños, mi vida sería muy diferente si no me hubieran guiado por el buen camino, no tengo palabras para agradecer el enorme esfuerzo que hicieron porque yo saliera adelante, cada triunfo que hay en mí, ustedes fueron los principales motores que me hicieron darle para delante.*

*A mi hermano **Rafael García Pérez**, por ser mi figura a seguir, las cosas buenas que he hecho es solo tratando de imitar su grandeza, mejor ejemplo de vida nadie me pudo haber dado, me falta mucho para ser como tú y si algún día llego a conseguirlo será gracias a tus enseñanzas.*

*A mi abuela **Elida García Martínez**, por enseñarme a vivir con alegría y a no derrotarme con los pequeños problemas que nos da la vida, sin su constante alegría, gran parte de vida estaría vacía.*

*A todos mis **tíos, tías, primos** y **primas**, porque la alegría que les daba el que yo me superara era un compromiso para mí, por sus palabras de aliento, que nunca se me olvidaran, ustedes me demostraron que no existe ningún problema que no se pueda superar.*

Dicen que no existe la familia perfecta. Pero quien dijo eso, no conoce a la mía

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
LISTA DE TABLAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIACIONES.....	xvi
RESUMEN.....	xix
ABSTRACT.....	xx
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. HIPÓTESIS.....	4
3. OBJETIVOS.....	5
3.1. Objetivo general.....	5
3.2. Objetivos particulares.....	5
4. ANTECEDENTES.....	6
4.1. Aspectos generales de la biología y del camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i> ..	6
4.2. Aspectos generales de las Micotoxinas.....	9
4.3. AF efectos, tipo e incidencia.....	13
4.3.1. Historia de las aflatoxinas.....	13
4.3.2. Tipos de AF.....	13
4.1.3. Incidencia de las AF.....	14
4.1.4. Factores que favorecen a la producción de AF.....	15
4.2. Toxicidad en animales terrestres.....	16
4.2.1. Biotransformación de las AF.....	17
4.2.2. Propiedades oxidativas de las AF.....	19
4.2.3. Excreción de las AF en animales terrestres.....	20
4.3. Efectos de las AF en peces.....	23

4.4. Efectos de las AF en crustáceos.....	26
4.5. Legislación de AF.....	28
4.5.1. Legislación de AF en el mundo (FAO 2004).....	28
4.5.2. Legislación de en México (Norma oficial Mexicana).....	31
4.6. Métodos de control y/o prevención contra las micotoxinas.	32
4.6.1. Métodos de adsorción física de las micotoxinas.	32
4.6.2. Biotransformadores:.....	38
4.6.3. Productos Antioxidantes como protectores contra las AF	38
4.7. Expresión de genes en Camarón.	44
5. MATERIAL Y MÉTODOS	47
5.1. Área de trabajo:.....	47
5.2. Material biológico	49
5.2.1. Origen y manejo de los camarones:	49
5.2.2. Granos contaminados.	50
5.2.3. Ingredientes utilizados.....	50
5.3. Dietas experimentales.	52
5.3.1 Formulación y elaboración de dietas experimentales.	52
5.3.2. Análisis físicos de las dietas experimentales.....	53
5.3.3 Análisis bromatológicos y de micotoxinas en ingredientes y dietas experimentales.....	54
5.4. Parámetros zootécnicos.....	54
5.5. Análisis histológico.....	55
5.6. Estrategia experimental.....	56
5.6.1. Efecto de la inclusión de AF en dietas a dosis altas en parámetros zootécnicos del camarón (Experimento 1).....	56
5.6.2. Efecto de la inclusión de AF en dietas a dosis bajas en parámetros zootécnicos del camarón (Experimento 2).....	57

5.6.3. Capacidad de reducción de aflatoxicosis en camarones alimentados con dietas contaminadas con AF y suplementadas con aluminosilicatos (experimento 3)	59
5.6.4. Capacidad de reducción de aflatoxicosis en camarones alimentados con dietas contaminadas con AF y suplementadas con mezclas de aluminosilicatos con paredes de levadura y otros productos (Experimento 4)	62
5.6.5. Capacidad de reducción de aflatoxicosis en camarones alimentados con dietas contaminadas con AF y suplementadas con diferentes fuentes de antioxidantes (Experimento 5)	64
5.6.6. Efectividad de diferentes niveles de Mycofix-plus® solo o en combinación con <i>U. clathrata</i> para reducir la aflatoxicosis en juveniles de camarón (Experimento 6).....	66
5.6.7. Expresión diferencial de genes en hepatopáncreas de camarón alimentados con dietas contaminadas con diferentes niveles de AF (Experimento 7).....	68
5.7. Analisis estadísticos.....	70
6. RESULTADOS	71
6.1. Composición bromatológica y análisis de micotoxinas de los ingredientes utilizados.....	71
6.2. Efecto de la inclusión de altas dosis de AF en juveniles de camarón blanco <i>L. vannamei</i> (Experimento 1).....	72
6.2.1. Composición química, contenido de micotoxinas y parámetros de estabilidad en las dietas experimentales.....	72
6.2.2. Parámetros de crecimiento en camarones alimentados con las diferentes dietas experimentales.....	74
6.2.3. Análisis histológicos	76
6.2.4. Deposición de AF en tejido.....	79
6.3. Efecto de la inclusión de AF en dietas a dosis bajas en parámetros zootécnicos del camarón (Experimento 2).....	79
6.3.1. Composición química, contenido de micotoxinas y estabilidad de las dietas experimentales.....	79
6.3.2. Parámetros de crecimiento en camarones alimentados con bajos niveles de AF en juveniles de camarón blanco <i>L. vannamei</i>	81
6.3.3. Resultados de análisis histológicos en camarones alimentados con bajos niveles de AF en juveniles de camarón blanco <i>L. vannamei</i>	84

6.4. Efecto de la inclusión de arcillas secuestrantes de micotoxinas en dietas contaminadas sobre parámetros zootécnicos del camarón (Experimento 3)	84
6.4.1. Composición química, contenido de micotoxinas y estabilidad de las dietas experimentales.....	84
6.4.2. Parámetros de crecimientos de camarones alimentados con dietas contaminadas con micotoxinas y suplementadas con diferentes tipos de arcillas. .	87
6.5. Efecto de la inclusión de mezclas remediadoras de dietas contaminadas con AF sobre los parámetros zootécnicos del camarón (Experimento 4).	94
6.5.1. Composición química, contenido de micotoxinas y estabilidad de las dietas experimentales.....	94
6.5.2. Resultados de los parámetros de crecimiento de camarones alimentados con dietas contaminadas con AF y suplementados con productos elaborados a base de arcillas y otros compuestos.	96
6.6. Efectos de la inclusión de antioxidantes en dietas contaminadas con AF sobre los parámetros zootécnicos del camarón (Experimento 5).....	101
6.6.1. Composición química, contenido de micotoxinas y estabilidad de las dietas experimentales.....	101
6.6.2. Parámetros de crecimiento en camarones alimentados con dietas suplementadas con AF y suplementadas con compuestos antioxidantes.....	104
6.7. Efectos de la inclusión de niveles crecientes de Mycofix Plus® solo o en combinación con harina de alga U. clathrata en dietas contaminadas con AF sobre parámetros zootécnicos del camarón (Experimento 6).....	109
6.7.1. Composición química, contenido de micotoxinas y estabilidad de las dietas experimentales.....	109
6.7.2. Parámetros de crecimiento de camarones alimentados con dietas contaminadas con AF y suplementadas con diferentes niveles de Mycofix Plus® y harina de ulva.	111
6.8. Expresión diferencial de 292 genes en hepatopáncreas de camarón en relación al consumo de diferentes niveles de AF (Experimento 7).....	114
7. DISCUSIONES	121
7.1. Dietas experimentales.	121
7.1.1. Composición química de los alimentos experimentales.	121
7.1.2. Estabilidad del alimento y absorción de agua.	121

7.2. Parámetros zootécnicos.....	123
7.2.1. Efecto de las AF sobre los parámetros de rendimiento del camarón <i>L. vannamei</i> (Experimentos 1 y 2).	123
7.2.2. Capacidad de reducción de aflatoxicosis en camarones por la presencia de aluminosilicatos (Experimento 3).	128
7.2.3. Capacidad de reducción de aflatoxicosis en camarones por la presencia de mezclas de aluminosilicatos con paredes de levadura y otros productos (Experimento 4).....	131
7.2.4. Capacidad de reducción de aflatoxicosis en camarones por la presencia de diferentes fuentes de antioxidantes (Experimento 5).	133
7.2.5. Efectividad de diferentes niveles de Mycofix Plus® solo o en combinación con <i>U. clathrata</i> para reducir la aflatoxicosis en juveniles de camarón (Experimento 7).....	136
7.3. Expresión diferencial de 292 genes de hepatopáncreas en camarones alimentados con una dieta libre de AF y una contaminada con 1000 ppb de AFT.....	138
8. CONCLUSIONES	140
9. LITERATURA CITADA	144
RESUMEN BIBLIOGRÁFICO	172

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1 Principales micotoxinas agrupadas según su origen (adaptado de Carrillo, 2003)	11
2 Trastornos ocasionados por las diferentes Micotoxinas (adaptado de Carrillo, 2003).....	12
3 Media y rangos de niveles máximos tolerables (mg/kg) para algunas (o grupos de ellas) AF en el 2003 y número de países en los cuales es regulado (FAO 2004).....	30
4 Límites permitidos en diferentes etapas de producción animal.....	32
5 Compuestos antioxidantes de las diferentes especies de macro-algas.	42
6 Parámetros de calidad de agua para cada uno de los experimentos	48
7 Peso promedio (g) y origen de los camarones utilizados en cada uno de los experimentos.....	49
8 Ingredientes utilizados para la elaboración de las dietas experimentales.....	51
9 Formulación para las dietas experimentales del experimento 1	57
10 Formulación para las dietas experimentales del experimento 2	58
11 Producto, composición y procedencia de los productos secuestrantes a base de aluminosilicatos evaluados en el presente bioensayo.....	59
12 Formulación para las dietas experimentales del experimento 3	61
13 Producto, procedencia y composición de las mezclas remediadoras evaluadas en el presente bioensayo.....	62
14 Formulación para las dietas experimentales del experimento 4	63
15 Producto, procedencia y propiedades de los Antioxidantes evaluados en el presente bioensayo.....	64
16 Formulación para las dietas experimentales del experimento 5	65
17 Formulación para las dietas experimentales del experimento 6	67
18 Composición química y contenido de micotoxinas en los ingredientes utilizados en la formulación de todas las dietas experimentales.....	71
19 Composición proximal en base húmeda (%), cantidad de micotoxinas totales y estabilidad en el agua de alimentos experimentales con diferentes niveles de inclusión de AF del experimento 1.	73

20	Parámetros zootécnicos de los camarones alimentados con las diferentes dietas experimentales durante 28 días (Experimentos 1).....	75
21	Actividad a nivel histológico de los camarones alimentados con las diferentes dietas experimentales del bioensayo de dosis altas de AF. Los valores dentro del paréntesis indica el grado de severidad basado en una escala entre 1 a 4.	77
22	Composición proximal en base húmeda (%), cantidad de micotoxinas totales y estabilidad en el agua de alimentos experimentales con diferentes niveles de inclusión de AF del experimento 2.	80
23	Parámetros zootécnicos de los camarones alimentados con las diferentes dietas experimentales durante 64 días (Experimentos 2).....	82
24	Actividad a nivel histológico de los camarones alimentados con las diferentes dietas experimentales del bioensayo de dosis bajas de AF. Los valores dentro del paréntesis indica el grado de severidad basado en una escala entre 1 a 4.....	84
25	Composición proximal en base húmeda (%), cantidad de micotoxinas totales y estabilidad en el agua de alimentos experimentales con diferentes niveles de inclusión de AF del experimento 3.	86
26	Parámetros zootécnicos de los camarones alimentados con las diferentes dietas experimentales durante 42 días divididos por Aluminosilicato (Experimento 3).	88
27	Parámetros zootécnicos de los camarones alimentados con las diferentes dietas experimentales durante 42 días divididos por Aluminosilicato (Experimento 3).	89
28	Parámetros zootécnicos de los camarones alimentados con las diferentes dietas experimentales durante 42 días divididos por Aluminosilicato (Experimento 3).	90
29	Parámetros zootécnicos de los camarones alimentados con las diferentes dietas experimentales durante 42 días divididos por Aluminosilicato (Experimento 3).	91
30	Composición proximal en base húmeda (%), cantidad de micotoxinas totales y estabilidad en el agua de alimentos experimentales con diferentes niveles de inclusión de AF del experimento 4.	95
31	Parámetros zootécnicos de los camarones alimentados con las diferentes dietas experimentales durante 42 días divididos por mezcla remediadora (Experimento 4)....	97
32	Parámetros zootécnicos de los camarones alimentados con las diferentes dietas experimentales durante 42 días divididos por mezcla remediadora (Experimentos 4). .	98
33	Parámetros zootécnicos de los camarones alimentados con las diferentes dietas experimentales durante 42 días divididos por mezcla remediadora (Experimentos 4). .	99

34	Composición proximal en base húmeda (%), cantidad de micotoxinas totales y estabilidad en el agua de alimentos experimentales con diferentes niveles de inclusión de AF del experimento 5.	103
35	Parámetros zootécnicos de los camarones alimentados con las diferentes dietas experimentales durante 42 días divididos por mezcla remediadora (Experimentos 5).	105
36	Parámetros zootécnicos de los camarones alimentados con las diferentes dietas experimentales durante 42 días divididos por mezcla remediadora (Experimentos 5).	106
37	Parámetros zootécnicos de los camarones alimentados con las diferentes dietas experimentales durante 42 días divididos por mezcla remediadora (Experimentos 5).	107
38	Composición proximal en base húmeda (%), cantidad de micotoxinas totales y estabilidad en el agua de alimentos experimentales con diferentes niveles de inclusión de AF del experimento 6.	110
39	Parámetros zootécnicos de los camarones alimentados con las diferentes dietas experimentales durante 42 días (Experimentos 6).....	112
40	Resultados generales de los análisis con microarreglos.	115
41	Expresión diferencial de genes de hepatopáncreas de camarón alimentados con DCL y DCC respecto a camarones alimentados con la DCC	116

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Principales países productores de <i>Litopenaeus vannamei</i> (Estadísticas Pesqueras de la FAO, 2006)	7
2 Ciclo de producción de <i>L. vannamei</i> (FAO, 2006).....	8
3 Correlación entre la población con altas tasas de cáncer en hígado y el riesgo de exposición crónica a AF.	13
4 Estructura de las principales formas de AF	14
5 Incidencia de AF al rededor del mundo en el año 2011 (http://www.mycotoxins.info/myco_info/Hottopic/2012/HT4_2012_Biomin%20mycotoxin%20survey%202011.pdf).	16
6 Metabolismo de la AFB ₁ al ser metabolizada por las células hepáticas (Santacrose <i>et al.</i> , 2008).	19
7 Generación de EOR durante el metabolismo del AFB ₁ por el Citocromo P450... 20	
8 Países con y sin regulación de micotoxinas (FAO 2004).....	29
9 Cobertura de regulaciones de micotoxinas de habitantes a nivel mundial en 1995 y 2003 (FAO 2004).	29
10 Límite a nivel mundial de AF en el alimento (FAO 2004).	30
11 Límite a nivel mundial de total de AF en el alimento (FAO 2004)	31
12 Estructura básica de silicatos (Mitchell, 1993).....	35
13 Estructura de los diferentes silicatos (adaptado de Mitchell, 1993).....	36
14 Raíz de cúrcuma (<i>Cúrcuma longa Linn</i>) (imagen de 21food.com).....	39
15 Planta <i>Urtica</i> (imagen de Wikimedia Commons)	44
16 <i>Rhus verniciflua</i> (imagen de Wikimedia Commons)	44
17 Sala de bioensayos del programa Maricultura de la facultad de Ciencias Biológicas de la UANL	48
18 a) Extracción de hepatopáncreas de camarón; b) Hepatopáncreas en RNA <i>later</i> para preservar el RNA de las muestras.....	68
19 Estrategia general de análisis de expresión génica por medio de microarreglos en camarón.	69

20	Principales parámetros zootécnicos de los camarones alimentados con las dietas experimentales en el en el experimento de dosis altas de AFT. a) TC, b) sobrevivencia, c) CA d) TCA, e) IHS y e) ERN.	76
21	Morfología de las diferentes células del hepatopáncreas	77
22	Niveles de vacuolización encontrados en los camarones alimentados con los diferentes niveles de AF.	78
23	Contenido de AF en tejido completo de camarones de <i>L. vannamei</i> alimentados con dietas contaminadas con 500, 1000 y 2000 ppb.	79
24	Principales parámetros zootécnicos de los camarones alimentados con las diferentes dietas experimentales a los 64 días en el bioensayo de dosis bajas a) TC, b) CA c) sobrevivencia y d) TCA.	83
25	a) Consumo de alimento y b) Tasa de crecimiento de los camarones alimentados con las dietas controles y Novasil Plus [®]	92
26	a) Consumo de alimento y b) Tasa de crecimiento de los camarones alimentados con las dietas controles y Zeolex Extra [®]	92
27	a) Consumo de alimento y b) Tasa de crecimiento de los camarones alimentados con las dietas controles y Mycofix Select [®]	92
28	a) Consumo de alimento y b) Tasa de crecimiento de los camarones alimentados con las dietas controles y Fixat [®]	93
29	Eficiencia de retención de nitrógeno de los camarones alimentados con las diferentes dietas a base de aluminosilicatos a los 42 días (Tukey $\alpha=0.05$)	93
30	a) CA y b) TC de los camarones alimentados con las dietas controles y Aflabalan [®]	100
31	a) CA y b) TC de los camarones alimentados con las dietas controles y Mycosorb [®]	100
32	a) CA y b) TC de los camarones alimentados con las dietas controles y Mycofix plus [®]	100
33	ERN de los camarones alimentados con las diferentes dietas a base de mezclas remediadoras a los 42 días (Tukey $\alpha=0.05$)	101
34	a) Consumo de alimento y b) Tasa de crecimiento de los camarones alimentados con las dietas controles y Curcumina	108
35	a) Consumo de alimento y b) Tasa de crecimiento de los camarones alimentados con las dietas controles y CLA	108

36	a) Consumo de alimento y b) Tasa de crecimiento de los camarones alimentados con las dietas controles y harina de alga.....	108
37	Principales parámetros zootécnicos de los camarones alimentados con las diferentes dietas experimentales a los 42 días en el bioensayo de Mycofix Plus®-Algas. a) TC, b) CA y c) TCA.	113
38	Laminillas de los microarreglos de las los hepatopáncreas de camarones alimentados con la a) DCL y b) la dieta contaminada con 1000 ppb de AFT.....	114
39	Porcentaje de los genes estimulados, reprimidos y sin diferencia de los genes de hepatopáncreas de los camarones alimentados con la DCL y la DCC.....	115
40	Porcentaje de genes expresados diferencialmente en los camarones alimentados con la DCL y la DCC con 1000 ppb de AF, englobados de acuerdo a su función biológica	116

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIACIONES

Abs. H₂O	Absorción de Agua
AC	carbón activado
AF	Aflatoxinas
AFB₁	Aflatoxina B1
AFB₂	Aflatoxina B2
AFBO	exo-aflatoxin B1-8,9-epoxide
AFG₁	Aflatoxina G1
AFG₂	Aflatoxina G2
AFL	Aflatoxicol
AFM1	Aflatoxina M1
AFT	aflatoxinas totales
ALB	Albumina
ALP	Fosfatasa alcalina
ANOVA	análisis de varianza de una sola vía
aprox.	aproximadamente
cDNA	DNA complementario
CIAD	Centro de Investigación de Alimentos y Desarrollo
CLA	ácido linoléico conjugado
Cy3	cianina (verde)
Cy5	cianina (rojo)
DCC	Dieta Control Contaminada
DCL	Dieta Control Limpia
DL₅₀	Dosis letal media
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DON	Deoxinivalenol
ELN	Extracto Libre de Nitrógeno
EOR	Especies de Oxígeno Reactivas
ERN	eficiencia de retención de nitrógeno
EST	etiqueta de secuencia de expresión
<i>et al.</i>	Et alii: locución latina que significa “y otros”
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y alimentación
g	gramos
g/L	gramos por litro
GHS	Glutación
GPx	Glutación Peroxidasa
GST	Glutación S-transferasa
H₂O₂	Peróxido de Hidrogeno
H³	tritio
HIS	índice Hepatosomático
HO·	Radical Hidroxilo

HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
HSCAS	aluminosilicatos de sodio y calcio hidratados
Kcal	Kilocalorías
kDa	kilo Dalton
Kg	Kilogramo
L	litros
log	logaritmo
mg	miligramo
mg/L	miligramos por litro
ml	mililitros
mm	milímetro
MMN	montmorillonita nanocompuesta
mRNA	RNA mensajero
My®	Mycifix Plus®
ND	No Detectado
ng	nanogramos
O₂⁻	Anión Superóxido
pH	potencial de hidrogeno
PL	Postlarvas
PMS	Perdida de Materia Seca
PP	Perdida de Proteína
ppb	partes por billón
ppm	partes por millón
PVPP	polivinilpolipirrolidona
RNA	Ácido ribonucleico
Sig.	significancia
SOD	Superóxido Dismutasa
SON	Sonora
SSH	Supresión de sustracción de hibridación
TCA	tasa de conversión alimenticia
TCE	tasa de crecimiento específico
TP	Total de proteína
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
UV	ultravioleta
VI	Vía intramuscular
WSSV	virus del síndrome de mancha blanca
YHV	virus de cabeza amarilla
α	alpha
β	beta
%	Partes por cien
<	menor que
=	igual que
>	mayor que
°C	Grado centígrado

μ	micrómetro
μg	microgramo
μg/kg	microgramos por kilo
μM	micromolar
μm	micrometros

RESUMEN

El remplazo de ingredientes de origen animal debido a su escasas y altos costos de producción ha dado lugar a la utilización de ingredientes vegetales. Las Aflatoxinas son micotoxinas producidas en granos y el consumo en animales terrestres disminuye la sobrevivencia y los parámetros de rendimiento. El presente trabajo evaluó el efecto de aflatoxinas totales sobre el rendimiento de juveniles de camarón *Litopenaeus vannamei*. Para esto se suministraron granos naturalmente contaminados con una cepa productora principalmente de aflatoxinas a la dieta obteniendo niveles crecientes de contaminación. Posteriormente se evaluaron compuestos con capacidad de aminorar las aflatoxinas. En la primera etapa se alimentaron camarones con niveles de 0, 500, 1000 y 2000 ppb. Comparados con los de la dieta control, existe una reducción en la tasa de crecimiento (TC) (17 a 33%), consumo de alimento (CA) (13 a 24%), además de disminuir la sobrevivencia (62 a 72%) para los alimentados con 1000 y 2000 ppb, este último acompañado del aumento en el índice hepatosomático. A nivel histológico el consumo de aflatoxinas reduce la actividad de las células B, la actividad mitótica de las células E, acompañado de un proceso de inflamación y atrofia de los túbulos del hepatopáncreas, relacionado directamente con el incremento de aflatoxinas. En la inclusión de aflatoxinas a dosis bajas (0, 10, 20, 40, 60 y 120 ppb), sin alterar la sobrevivencia, a partir de 60 ppb existe una disminución en la TC (18%) y a 120 ppb disminuye el CA (11.5%). Para determinar la remediación de las aflatoxinas en el alimento, se utilizaron diferentes productos como aluminosilicatos (Novasil Plus[®], Zeolex Extra[®], Mycofix Select[®] y Fixat[®]), mezclas remediadoras (Aflabalan[®], Mycofix Plus[®] y Mycosorb[®]) y antioxidantes (Curcumina, harina de alga *Ulva* y ácido linoleico conjugado), para esto se elaboraron 2 dietas controles, una libre de aflatoxinas (DCL) y una contaminada (DCC), a partir de estas se realizaron combinaciones donde se integraba un producto a cada dieta control. Los resultados sugieren que el uso de algunos de estos productos no alteran los resultados al integrarse a las dietas controles (Mycofix Select[®], Fixat[®], Mycosorb[®] y curcumina), otros aminoran los efectos de las aflatoxinas en la DCC, no obstante afectan el rendimiento añadiéndolos a la DCL (Zeolex Plus[®], Aflabalan[®]) y otros mantienen o mejoran el rendimiento de los camarones incorporándolos a la DCL, además disminuyen los efectos negativos de las aflatoxinas al integrarlos a la DCC sin llegar a igualar a los camarones de la DCL (Novasil Plus[®], Mycofix Plus[®], alga *Ulva*, ácido linoleico conjugado). Posteriormente se realizó un bioensayo donde se comprobó la efectividad del Mycofix Plus[®] a diferentes dosis, solo o en combinación con la harina de alga *Ulva* en dietas contaminadas con aflatoxinas, donde se encontró que el uso de .25% de Mycofix Plus[®] solo o en combinación con el alga, ayudan a disminuir los efectos de las aflatoxinas. Un análisis de expresión diferencial por medio de un microarreglo, correlaciona algunos de los resultados de las pruebas *in vivo* con la expresión de algunos genes en los camarones.

ABSTRACT

Fish meal replacement by plant-derived ingredients in aquaculture diets allows formulating feeds that meet specific nutritional requirements, while also reducing costs. Inclusion of plant-derived ingredients to aquafeeds has increased the dietary incidence of non-nutritional compounds such as mycotoxins. Aflatoxin is a type of mycotoxin produced by *Aspergillus* molds, and their presence in terrestrial feeds reduces feed intake, growth rate, survival and causes immune suppression. The present research evaluated the effect of naturally contaminated aflatoxin grains on performance of juvenile *Litopenaeus vannamei*. In a first experiment, shrimp were fed diets containing 0, 500, 1000 and 2000 ppb total aflatoxins (TAF). Feeding aflatoxin-contaminated diets to shrimp reduced growth rate (GR, 17 to 33%) and feed intake (FI, 13 to 24%). Dietary inclusion levels of 1000 and 2000 ppb decreased survival (62 to 72%) and the inclusion level 2000 ppb increased the hepatosomatic index. Histology results showed that dietary aflatoxin reduces the activity of B cells and the cell mitotic activity of E cells, accompanied by an inflammatory process and atrophy of hepatopancreas tubules and the occurrences of histological alterations were directly proportional to aflatoxin inclusion level. In a second experiment, shrimp fed diets containing 60 and 120 ppb TAF decreased GR by 18% and FI by 11.5%. Several commercial products were evaluated to determine their capacity to reduce aflatoxicosis in shrimp. These products were classified as aluminosilicates products (Novasil Plus[®], Zeolex Extra[®], Mycofix Select[®] and Fixat[®]), mixed products (Aflabalan[®], Mycofix Plus[®] and Mycosorb[®]) and antioxidant products (curcumin from *C. longa*, seaweed *Ulva* flour and conjugated linoleic acid). Each test product was evaluated in non-contaminated aflatoxin diets (NAFD) and aflatoxin contaminated diets (AFCD). The results suggest that the inclusion of some of the test products did not affect the performance of shrimp fed NAFCD; whereas when included to the AFCD some of these products reduced some of the negative effect presence of aflatoxin. In a final experiment, AFCD diets were supplemented with different inclusion levels of Mycofix Plus[®], either alone or in combination with *Ulva* seaweed meal, results showed that the dietary inclusion of 0.25% of Mycofix Plus[®] alone or in combination with *Ulva* meal, assisted in reducing some of the negative effects caused by the presence of dietary aflatoxin. An analysis of differential expression using a microarray showed some changes in the expression of some genes in shrimp fed aflatoxin contaminated diet.

1. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial la acuicultura representa uno de los sectores productores de alimento con más crecimiento en el mundo, posiblemente es el sector de producción de alimentos con el crecimiento más acelerado, además de ser una alternativa tecnológicamente viable ante la creciente demanda de alimentos de origen proteico para el consumo generalizado de la población humana.

El total de la producción mundial de pescado, crustáceos y moluscos ha logrado tener un amplio margen de crecimiento alcanzando los 144.6 millones de toneladas en 2009. Mientras que la producción de la pesca de captura se ha mantenido en un nivel en torno a los 90 millones de toneladas desde 2001, la producción acuícola ha seguido mostrando un fuerte crecimiento, aumentando a una tasa de crecimiento medio anual del 6,1% de 34,6 millones de toneladas en 2001 a 55,7 millones de toneladas en 2009 (FAO, 2013). Según la FAO (2011) El camarón es la especie más importante comercializada en todo el mundo, siendo la especie *Litopenaeus vannamei* la que ha tenido una alza en su producción llegando a aumentar más de 760% en un periodo del 2001 al 2009 en comparación con la especie *Penaeus monodon* la cual solo aumento un 14% en el mismo periodo.

En México la producción de camarón ha aumentado de 2 mil toneladas en el año 2000 a más de 120 mil toneladas para el 2009 (FAO, 2011). Para llegar a tales cantidades de producción, los acuicultores han forzado la intensidad de las granjas, con altas densidades de siembra, esto requiere de una buena calidad del alimento, que es una gran influencia sobre los factores que determinan el estado final de la operación acuícola.

El cultivo de camarón está constantemente amedrentado por brotes de enfermedades virales, bacterianas y parasitarias, además de enfermedades relacionadas con problemas ambientales y nutricionales, una de las cuales es el consumo de alimentos contaminados con toxinas de origen fúngico, que a menudo estimula a causar infecciones secundarias. La intensa búsqueda de fuentes proteicas alternativas que replacen los ingredientes de origen animal, debido a sus escasas y altos costos de producción, han incrementado los

niveles de inclusión de ingredientes de origen vegetal en la dieta. Las Aflatoxinas (AF) son micotoxinas de los hongos *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*, de los cuales se conocen 4 tipos principales que son AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂, siendo la AFB₁ la más tóxica y carcinógena. Las AF aparecen en productos agrícolas antes, después e incluso durante el almacenamiento o transporte, siendo un fenómeno recurrente en la historia de la humanidad. En animales terrestres se ha observado que reduce el crecimiento y el consumo de alimento además de causar mortalidades, así como una disminución en la producción de carne y huevo. Experimentos realizados en camarón blanco *L. vannamei* que recibieron la AFB₁ en forma pura ya sea inyectada o añadida al alimento, se ha observado que se disminuye la tasa de crecimiento, el consumo de alimento y la sobrevivencia, además de ocasionar necrosis en el hepatopáncreas, sin embargo se ha categorizado que los alimentos contaminados naturalmente son más tóxicos que los que contienen una cantidad similar de micotoxinas en formas puras debido a debido al efecto aditivo, sinérgico o antagónico. Por otro lado, las estrategias utilizadas durante el cultivo de los granos y monitoreo en toda la cadena de elaboración del alimento ha sido una estrategia para poder garantizar la no contaminación de micotoxinas en el alimento. Sin embargo, existen productos que tienen la capacidad de secuestrar o mitigar estas micotoxinas, evitando su absorción por la pared intestinal o metabolizándola a nivel celular a un producto menos tóxico para el organismo, en animales terrestres estos productos han dado buenos resultados, mitigando los efectos de las AF. Para alimentos acuícolas existe muy poca información acerca de la utilización de estos remediadores, por lo que mostrar información sobre el uso de estos remediadores en alimento para camarón *L. vannamei* será de mucha ayuda para implementar su uso. Por lo tanto en el presente proyecto de tesis se brinda información acerca de los efectos de las AF a diferentes niveles de contaminación, así como el uso de diferentes productos remediadores de AF como aluminosilicatos (Novasil Plus[®], Zeolex Extra[®], Mycofix Select[®] y Fixat[®]), mezclas remediadoras (Aflabalan[®], Mycofix Plus[®] y Mycosorb[®]) e ingredientes antioxidantes (Curcumina, harina de alga *Ulva* y ácido linoleico conjugado), que ayudan a mitigar los efectos negativos de las AF. Además se analizó el efecto del consumo de AF, sobre la expresión diferencial de 292 genes en el hepatopáncreas de camarón, con la finalidad de relacionar estos resultados con los obtenidos en las pruebas in vivo.

Los resultados en el presente estudio muestran que la inclusión de ingredientes naturalmente contaminados con AF disminuye los parámetros de rendimiento, además de ocasionar daños a nivel histológico. El uso de algunos productos secuestrantes o remediadores utilizados comercialmente en animales terrestres o la incorporación de ingredientes con capacidad antioxidante, pueden ayudar a mitigar los efectos negativos ocasionados por estas micotoxinas

2. HIPÓTESIS.

1. El consumo de alimentos contaminados con AF reduce significativamente el rendimiento de juveniles de camarón blanco de *L. vannamei*, además de causar daños tisulares.
2. El camarón tiende a acumular muy pequeñas cantidades de AFB₁ cuando consume alimentos contaminados con AF.
3. El uso de adsorbentes como quelantes orgánicos e inorgánicos, biotransformadores o antioxidantes en alimentos para camarón mitiga los efectos negativos causados por el consumo de alimentos contaminados con AF.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general.

Evaluar el efecto toxicológico de la presencia de AF en alimento y la utilización de productos remediadores en juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

3.2. Objetivos particulares.

- I. Evaluar el efecto toxicológico del consumo de alimentos contaminados con AF sobre el rendimiento del camarón.
- II. Describir los cambios histopatológicos en el camarón producidos por el consumo de alimentos contaminados con AF.
- III. Analizar la posible acumulación de AFB₁ en músculo de camarón alimentados con dietas contaminadas con AF.
- IV. Evaluar los efectos de algunos aluminosilicatos utilizados en animales terrestres como posibles secuestrantes de AF sobre los parámetros de rendimiento en el camarón.
- V. Evaluar los efectos de inclusión en la dieta de algunas mezclas remediadoras de AF sobre los parámetros de rendimiento del camarón.
- VI. Evaluar los efectos remediadores de algunos antioxidantes (CLA, Curcuminas y el alga *Ulva clathrata*) en dietas contaminadas con AF sobre el rendimiento del camarón.
- VII. Evaluar de los efectos de la mezcla remediadora Mycofix Plus a dosis crecientes solo o en combinación con el Alga *Ulva clathrata* en dietas contaminadas con AF en camarón.
- VIII. Determinar la expresión diferencial de 292 genes de hepatopáncreas de camarón bajo consumo de una dieta contaminada con 1000 ppb de AFT y una dieta libre de AF.

4. ANTECEDENTES.

4.1. Aspectos generales de la biología y del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

El camarón blanco del pacífico, *Litopenaeus vannamei*, es la especie más cultivada en el mundo. Es un crustáceo decápodo de la familia de los penéidos, nativo de la costa oriental del Océano Pacífico, desde Sonora, México al Norte, hacia Centro y Sudamérica hasta Tumbes en Perú, en aguas cuya temperatura es normalmente superior a 20 °C durante todo el año (FAO, 2006).

Como características morfológicas tiene un rostro moderadamente largo con 7–10 dientes dorsales y 2–4 dientes ventrales. En el caso de los adultos, los machos maduran a partir de los 20 g presentando un petasma simétrico y semi abierto con espermatóforos complejos (masa espermática encapsulada), mientras que las hembras maduras, a partir de los 28 g, tienen el télico abierto ambos en una edad de 6 a 7 meses. Cuando *L. vannamei* pesa entre 30 y 45 g libera entre 100 000 y 250 000 huevos de aproximadamente 0,22 mm de diámetro. La incubación ocurre aproximadamente 16 horas después del desove y la fertilización. En la primera etapa, la larva, denominada nauplio, nada intermitentemente y es fototáctica positiva. Los nauplios no requieren alimentación, sino que se nutren de su reserva embrionaria. Las siguientes etapas larvarias (tres etapas de protozoa, tres de mysis y postlarva) continúan siendo planctónicas por algún tiempo, se alimentan del fitoplancton y del zooplancton, y son transportados a la costa por las corrientes mareales. Las postlarvas cambian sus hábitos planctónicos unos 5 días después de su metamorfosis a PL, se trasladan a la costa y empiezan a alimentarse de detritos bénticos, gusanos, bivalvos y crustáceos (FAO, 2006). Los camarones adultos pueden llegar a una talla máxima de 23 cm.

Los principales países productores de *Litopenaeus vannamei* se muestran en el mapa a continuación (Figura 1), mientras que la lista completa de países incluye: China, Tailandia, Indonesia, Brasil, Ecuador, México, Venezuela, Honduras, Guatemala, Nicaragua, Belice, Viet Nam, Malasia, P.C. de Taiwán, Islas del Pacífico, Perú, Colombia, Costa Rica, Panamá, El Salvador, Estados Unidos de América, India, Filipinas, Camboya, Surinam, Saint Kitts, Jamaica, Cuba, República Dominicana y Bahamas (FAO 2006).

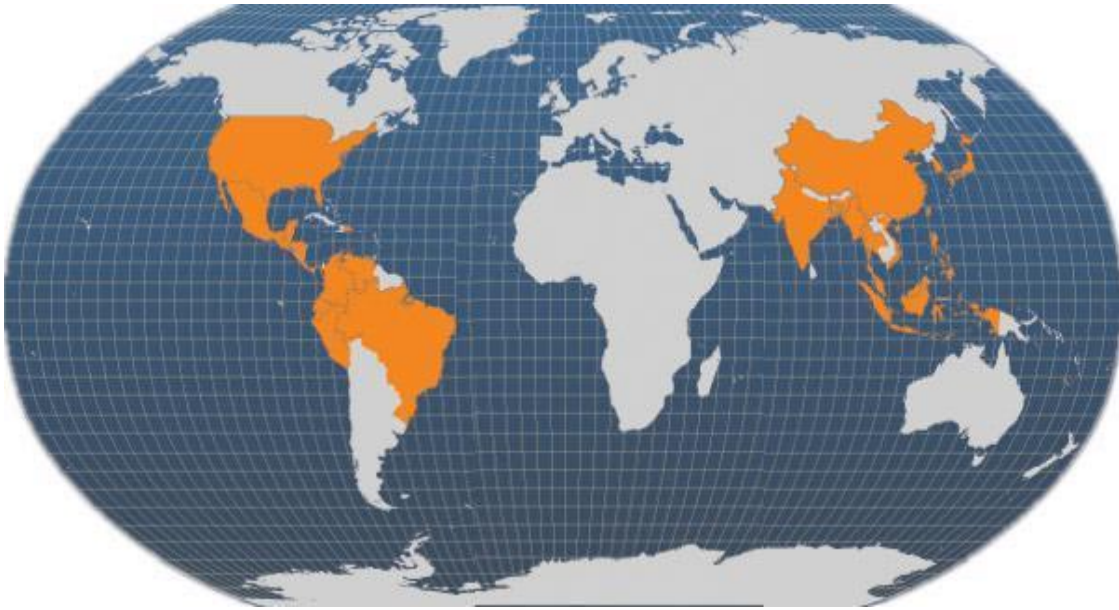


Figura 1. Principales países productores de *Litopenaeus vannamei* (Estadísticas Pesqueras de la FAO, 2006)

Los sistemas de cultivo de camarón se pueden clasificar según el grado de tecnificación así como de densidad de siembra en los estanques (Parker *et al.*, 1974; FAO, 1988). En la actualidad, todo el ciclo de cultivo se lleva a cabo de forma controlada desde la reproducción hasta las cosecha del camarón (Figura 2).

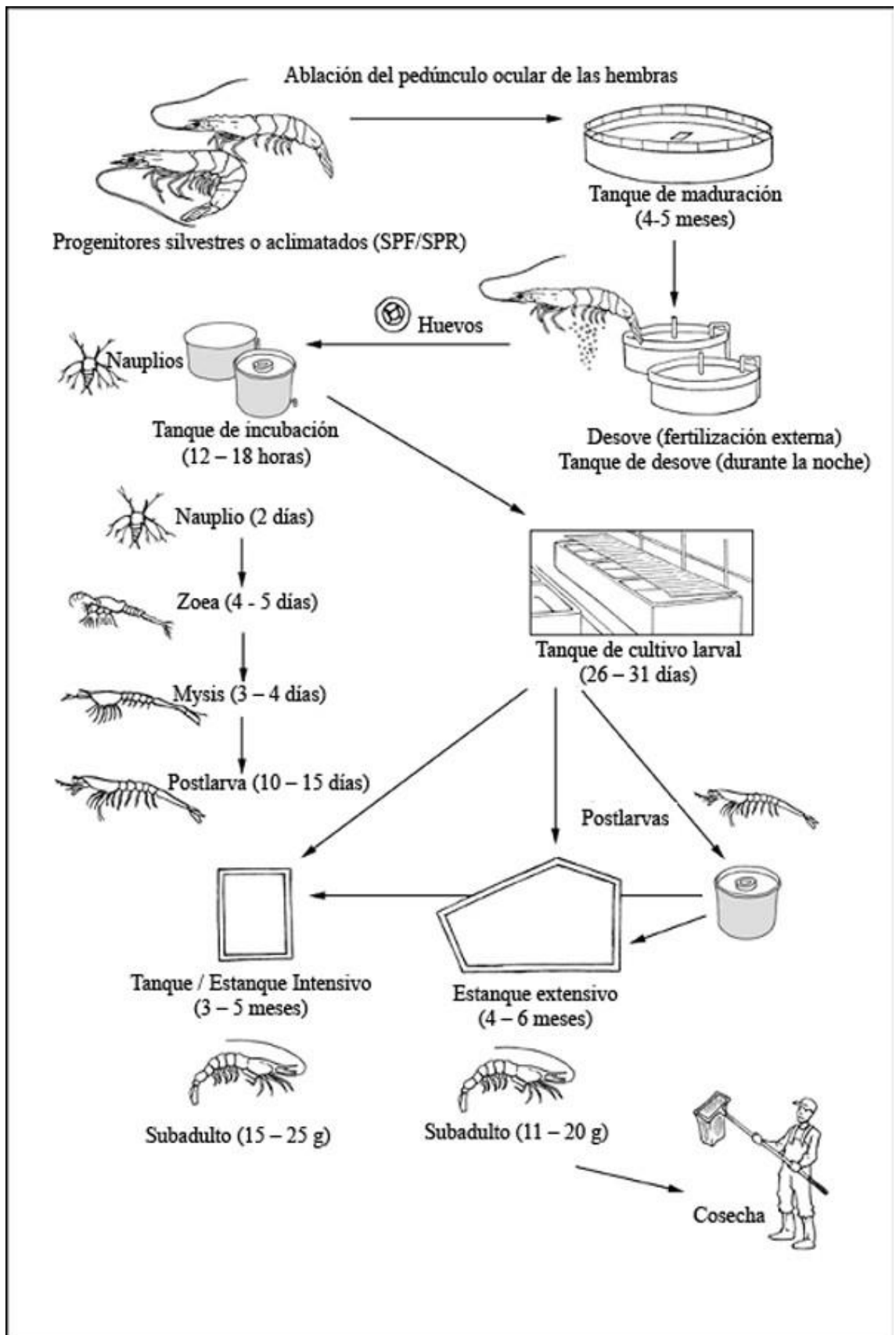


Figura 2. Ciclo de producción de *L. vannamei* (FAO, 2006)

4.2. Aspectos generales de las Micotoxinas.

Los mohos crecen sobre los materiales vegetales produciendo el deterioro de los mismos. Forman metabolitos secundarios que actúan como antibióticos favoreciendo la prevalencia del moho frente a otros microorganismos, muchos de los cuales son tóxicos para plantas y/o animales. Estos metabolitos que enferman o matan a los animales que los consumen se conocen como micotoxinas y la afección se llama micotoxicosis (Swanson, 1987).

Las micotoxinas son compuestos ubicuos que difieren mucho en sus propiedades químicas, biológicas y toxicológicas. Una micotoxicosis primaria se produce al consumir vegetales contaminados, y secundaria al ingerir carne o leche de animales que comieron forrajes con micotoxinas (Lillehoj *et al.*, 1991).

Las características de una micotoxicosis son las siguientes (Lillehoj *et al.*, 1991):

- No es una enfermedad transmisible
- El tratamiento con drogas o antibióticos tiene poco o ningún efecto
- En los brotes observados en el campo, el problema es estacional debido a que las condiciones climáticas afectan al desarrollo del hongo
- El brote está comúnmente asociado a un alimento o forraje específico
- El examen del alimento o forraje sospechoso revela signos de actividad fúngica

La presencia de las micotoxinas en los vegetales puede deberse (Swanson 1987):

- A la infección de la planta en el campo por el hongo patógeno o a la colonización por los saprobios.
- Al crecimiento de los mohos saprobios o patógenos post-cosecha sobre los frutos y granos almacenados.
- Al desarrollo fúngico saprobio durante el almacenamiento de los materiales ya procesados.

Los hongos adquiridos en el campo son *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Verticillium*, además de otros fitopatógenos, y las especies difieren según el vegetal, el clima y la región geográfica (Lacey 1989, Widstrom 1992). Requieren generalmente una humedad relativa entre el 90 y 100% y un contenido de agua en las semillas de 22 a 23% para crecer, con un amplio rango de temperatura entre 0 y 30°C, aunque algunos pueden desarrollarse a 35°C o más (Christensen, 1987).

El metabolismo primario de los mohos es similar al de la mayoría de los organismos eucarióticos. Los metabolitos secundarios son formados a partir de unos pocos intermediarios del metabolismo primario, bajo condiciones sub-óptimas y de estrés (Swanson, 1987). Durante la biosíntesis de estos metabolitos, la cantidad producida depende no sólo de los parámetros nutricionales y ambientales, sino también de la historia del desarrollo del moho. La formación de las micotoxinas refleja que el hongo ha alcanzado cierto grado de diferenciación bioquímica, fisiológica y morfológica (Moss, 1991) (Tabla 1). Se conocen aproximadamente 400 metabolitos secundarios de extensas diferencias tanto estructurales como modos de acción (Abdel-Wahhab y Kholif, 2008), algunas causan afectaciones en el hígado, riñones o el sistema inmune y algunas otras son carcinógenas (Krska, 2009) (Tabla 2).

Tabla 1. Principales micotoxinas agrupadas según su origen (adaptado de Carrillo, 2003)

Micotoxina	Algunas especies productoras
Ácido	
ciclopiazónico	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. tamaritii</i> , <i>Penicillium commune</i>
Ácido penicílico	<i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Penicillium simplicissimum</i>
Ácido secalónico	
D	<i>Penicillium oxalicum</i> , <i>Claviceps purpurea</i>
Ácido tenuazoico	<i>Alternaria arborescens</i> , <i>A. tenuissima</i>
AF	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. nomius</i> , <i>A. parasiticus</i>
Alcaloides del	
ergot	<i>Claviceps purpurea</i>
Alternariol	<i>Alternaria alternata</i>
Bovericina	<i>Fusarium proliferatum</i> , <i>F. subglutinans</i> , <i>F. verticilloides</i>
Citocalasinas	<i>Aspergillus terreus</i> , <i>Phoma medicaginis</i>
Citrinina	<i>Penicillium citrinum</i> , <i>P. verrucosum</i>
Citroviridina	Citroviridina <i>Aspergillus terreus</i> , <i>Penicillium citreonigrum</i>
Eslaframina	<i>Macrophomina phaseolina</i>
Esterigmatocistina	<i>Aspergillus versicolor</i> , <i>Eurotium amstelodami</i> <i>Fusarium nygamai</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>F. verticilloides</i> ,
Fumonisinias	<i>Alternaria arborescens</i>
Fusaproliferina	<i>Fusarium proliferatum</i> , <i>F. subglutinans</i>
Luteoskirina	<i>Penicillium islandicum</i>
Moniliformina	<i>Fusarium nygamai</i> , <i>F. tamsinum</i> , <i>F. proliferatum</i>
Ocratoxinas	<i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Penicillium verrucosum</i>
Paspalinina	<i>Claviceps paspali</i>
Patulina	<i>Penicillium expansum</i> , <i>P. griseofulvum</i> , <i>P. roqueforti</i>
Penitrem A	<i>Penicillium crustosum</i>
Roquefortinas	<i>Penicillium roqueforti</i>
Rubratoxinas	<i>Penicillium purpurogenum</i> <i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. sporotrichoides</i> , <i>F. poae</i> ,
Tricotecenos	<i>Myrothecium roridum</i> , <i>Stachybotrys chartarum</i>
Zearalenona	<i>Fusarium equiseti</i> , <i>F. graminearum</i>

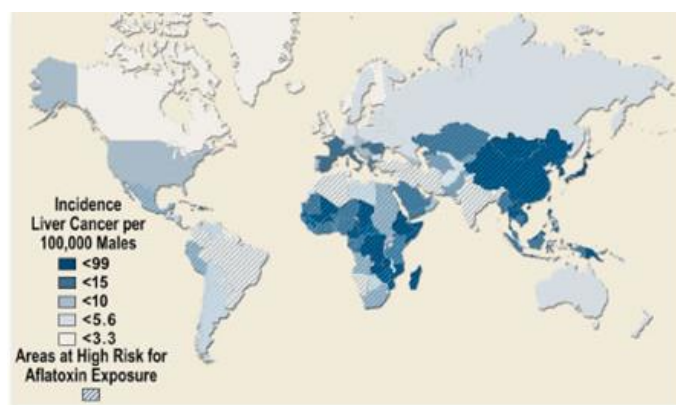
Tabla 2. Trastornos ocasionados por las diferentes Micotoxinas (adaptado de Carrillo, 2003)

Micotoxinas	Trastornos
Ácido ciclopiazónico	Desórdenes gastrointestinales y neurológicos; cambios degenerativos y necrosis en vísceras.
Ácido penicílico	Hepatotóxico y cancerígeno
Ácido secalónico D	Teratogénico
Ácido tenuazónico	Baja eficiencia de la alimentación, pérdida de peso; congestión y hemorragias de estómago e intestino, agrandamiento de riñones
Aflatoxinas (AF)	Daño hepático agudo, cirrosis, inducción de tumores, eratógenosis; excreción por leche, acumulación en tejidos
Alternariol-metiléter	Mutagénica
Beauvericina	Afecta la contractilidad del músculo liso de mamíferos
Citocalasinas	Inhibe la división celular, la función tiroidea y la secreción de amilasa
Citrinina	Toxicidad renal en monogástricos
Desoxinivalenol (DON)	Rechazo del alimento, vómitos; inmunosupresión en cerdos y otros animales
Esterigmatocistina	Cambios patológicos en hígado, inducción de tumores
Fumomisina	Leucoencefalomalacia equina; edema pulmonar en cerdos; cáncer hepático en ratas; excreción por leche
Ocratoxina A	Nefropatía en cerdos y aves; acumulación en riñón, hígado y músculo
Rizonina A	Gastroenteritis, afecta hígado y riñones
Patulina	Trastornos gastrointestinales y neurológicos; inducción de tumores
Tremórgenos (fumitremógeno, paspalinina, penitrem A, territrem B y otros)	Daño del sistema nervioso central, temblores
Zeralenona	Síndrome estrogénico en cerdos y ganado de cría; excreción por leche junto con α y β -zearalenol

4.3. AF efectos, tipo e incidencia.

4.3.1. Historia de las aflatoxinas.

El descubrimiento de las AF empezó inmediatamente después de presentarse el brote de una enfermedad en pavos en Inglaterra en el año de 1960, la cual presentaba una etiología desconocida, y fue llamada “La Enfermedad X del Pavo”; la cual fue eventualmente atribuida a harina de cacahuate contaminada e importada de Brasil, que estaba contaminada con el hongo *Aspergillus flavus* (Jay *et al.*, 2005; Josephs *et al.*, 2005) en donde se encontraron además productos hepatotóxicos, tales como las AF las cuales fueron relacionadas con sustancias carcinogénicas y la presencia de enfermedades en humanos (Figura 3) y animales (Richard, 2008). Los primeros estudios toxicológicos de las AF se enfocaron a una toxicidad aguda en animales, aunque tiempo después se descubrió que al administrar las AF a bajas dosis sobre largos periodos de tiempo podía inducir a la aparición de tumores, particularmente en el hígado (Bennett *et al.*, 2007).



Liver cancer data from the GLOBOCAN 2002 database
(http://www-dep.iarc.fr/GLOBOCAN_frame.htm)

Aflatoxin data from Williams *et al.*, Human Aflatoxicosis in Developing Countries,
Am J Clin Nutr 80:1106–22, 2004.

Figura 3. Correlación entre la población con altas tasas de cáncer en hígado y el riesgo de exposición crónica a AF.

4.3.2. Tipos de AF.

De todas las micotoxinas conocidas, las AF son las más estudiadas y de ellas, solo cuatro han sido extensamente estudiadas debido a su importancia al producir enfermedades, son llamadas AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ (Figura 4) esto en base a su fluorescencia azul o verde (B o G por sus iniciales en inglés) emitida bajo luz ultravioleta y la relativa movilidad cromatografía durante una cromatografía de capa fina de gel de

sílice. Además de estas cuatro principales AF producidas por el metabolismo del hongo, se producen una docena de otras AF como los son por ejemplo P₁, Q₁, B_{2a}, G_{2a} entre otras (Bennett & Klich, 2003; WHO, 1980).

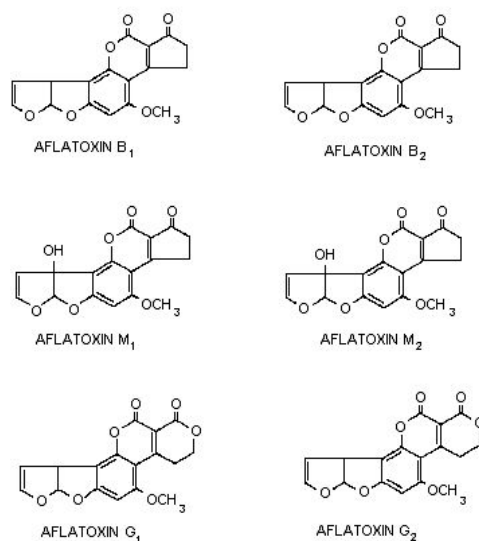


Figura 4. Estructura de las principales formas de AF

De las AF que producen los hongos, se ha demostrado que la AFB₁ es el más potente y letal carcinógeno hepático conocido y es activada por el B,-2,3-epoxide esto depende de la reacción del citocromo P450 (Williams y Buhler, 1983). En animales productores de leche, este compuesto es metabolizado a aflatoxina M₁ (Battacone *et al.*, 2009) gracias a la metabolización de la AFB₁ por las enzimas hepáticas microsomales de la familia citocromo P450 (Kuilman *et al.*, 2000).

4.1.3. Incidencia de las AF.

Las AF son un grupo de micotoxinas que son de gran importancia para la seguridad en alimentos y sus derivados, ya que se puede encontrar en productos básicos de la agricultura (como los con cereales, semillas de aceite, especias y nueces) los cuales entran directamente a la cadena alimenticia (Josephs *et al.*, 2005), o en productos de origen animal como la leche (Diaz *et al.*, 2004), carne o huevos (Wolzack *et al.*, 1985; Wolzack *et al.*, 1986). Los grandes riesgos para la salud recaen sobre países en desarrollo

localizados en regiones tropicales, en partes del mundo donde existen pobres métodos de manejo y de almacenamiento de alimentos, donde la mal nutrición es un problema y donde las regulaciones alimentarias son pobres (Bennett y Klich, 2003). La insuficiencia o la falta de diversidad sustancial de estos productos alimenticios, contribuye a la susceptibilidad de una contaminación con AF (WHO, 2005).

4.1.4. Factores que favorecen a la producción de AF.

Muchos factores afectan el crecimiento del hongo *Aspergillus* y el nivel de contaminación de AF en el alimento. La contaminación por AF puede ocurrir antes, durante y después de la cosecha (Bryden, 2007), algunos los factores que contribuyen con la presencia de micotoxinas incluyen el clima de la región, genotipo, tipo de semilla, máximo y mínimo de temperatura diaria y evaporación neta (Payne y Brown, 1998; Ono *et al.*, 1999; Brown *et al.*, 1999). La contaminación por estos metabolitos es también promovida por el estrés o daño en el cultivo debido a la sequía anterior a la cosecha, infestación de insectos, mala sincronización de cosecha, lluvias fuertes en cosecha o posterior a estas (Pier, 1992; Hell *et al.*, 2000; Vieira, 2003; Miller, 2008; Turner *et al.*, 2005).

La humedad crítica contenida para el crecimiento de *A. flavus* en frijol de soya es de 15 a 15.5% y en cacahuete es de 8 a 9%. El límite superior es cerca del 30%. *A. flavus* tiene un crecimiento lento a los 13°C y tiene un crecimiento rápido a los 37°C pero no produce AF a temperaturas menores a los 13°C o mayores a los 42°C. La contaminación por AF es expresada generalmente como la suma de AFB₁ + AFB₁ + AFG₁ + AFG₁, de las cuales la AFB₁ es la más tóxica (Coppock y Jacobsen, 2009). La incidencia de micotoxinas alrededor del mundo varía año con año, dependiendo de las condiciones ambientales (Figura 5).

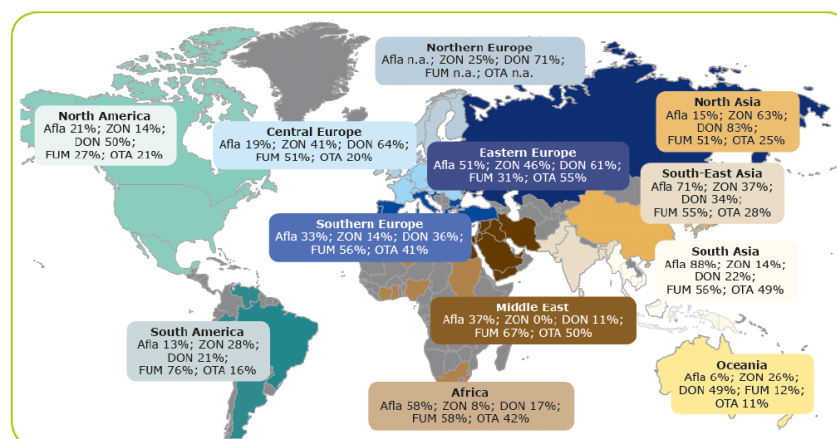


Figura 5. Incidencia de AF al rededor del mundo en el año 2011 (http://www.mycotoxins.info/myco_info/Hottopic/2012/HT4_2012_Biomin%20mycotoxin%20survey%202011.pdf).

4.2. Toxicidad en animales terrestres.

Ying Hua *et al.* (2007) consideraron que el hígado es el principal órgano afectado por el consumo de estos metabolitos secundarios, dado que en un estudio realizado con cerdos alimentados con dietas contaminadas con 0.11mg de AF/kg de alimento observaron que el órgano hepático aumentó un 8% en comparación a los cerdos alimentados con la dieta control, asimismo observaron un incremento en el peso de otros órganos como los son el riñón, páncreas y bazo, además el consumo de estas toxinas ocasionaron una reducción de los niveles de proteína total (TP), albumina (ALB), nitrógeno e incrementar los niveles de γ -glutamyl-transferasa y fosfatasa alcalina (ALP) en suero, los cuales son indicadores de daño hepático.

Las alteraciones histológicas en el hígado incluyen fibrosis interlobular, lipidosis periportal, hiperplasia de conductos biliares e inflamación de linfocitos periportales (Harvey *et al.*, 1988) y desde 200 μ g de AF/Kg de alimento se produce daño parámetros de rendimiento, como los son disminución del peso final de los animales, decremento en la ganancia de peso diario, una baja en el consumo de alimento y una disminución en la eficiencia alimenticia (Schell *et al.*, 1993; Nguyen *et al.*, 2008). En ganado bovino Keyl y Booth (1971) reportan daño de riñones e hígado, siendo este último el más afectado teniendo una textura fibrosa, a nivel de actividad enzimática la ALP y la málico deshidrogenasa se incrementaron mientras que la actividad de la lactato deshidrogenasa disminuía. Se ha reportado también un incremento en los niveles de total de bilirrubina

y bilirrubina directa (Lynch *et al.*, 1972). En aves se ha observado que a una dosis de 0.7mg/kg de alimento reduce el rango de crecimiento en pavos pero no afecta a aves de postura (Arafa *et al.*, 1981). Çelyk *et al.* (2003) reportaron que la alimentación de dietas conteniendo 200 ppb de AFB₁ a aves causa inflamación del hígado y hemorragias, además observaron un patrón histológico caracterizado por lesión en los hepatocitos y necrosis acompañado con un grado variado de inflamación lobular y porta. A una dosis de 2.5mg/kg de alimento se ha reportado un decremento significativo en los niveles de hematocrito, hemoglobina, hemoglobina corpuscular media, conteo de trombocitos, porcentaje de conteo de linfocitos y monocitos, así como un incremento en el conteo de glóbulos blancos y el porcentaje de conteo de heterófilos; además de una disminución en suero del TP, ALB.

En ratas a dosis de 400 µg de AF /kg de dieta se presentan alteraciones en la estructura hepática. Estas alteraciones indican daño en las paredes capilares como una desorganización celular aunado a que los hepatocitos muestran signos de degeneración, retención de pigmentos y necrosis sin observarse alteraciones en el consumo, ganancia de peso y alteración en la actividad enzimática (Baptista *et al.*, 2008), además se ha visto que el nivel de las enzimas hepato-específicas en suero como lo son glutamato piruvato transferasa (GPT), glutamato oxalacetato transferasa (GOT), ALP y bilirrubina total se incrementan en hígado (Sharmila Banu *et al.*, 2009).

4.2.1. Biotransformación de las AF.

El metabolismo de las micotoxinas es complejo y envuelve diferentes vías de bioactivación y detoxificación en animales y humanos. La detoxificación ocurre vía biotransformación mediante la participación de enzimas provenientes de las células huésped y de flora microbiana presente en el tracto digestivo (Abdel-Wahhab y Kholif, 2008). A nivel de DNA Clifford y Rees (1967) sugirieron algunas estrategias de activación biológica de las AF en células hepáticas de ratón, y cada paso es consecuencia al anterior: primeramente existe una interacción de las AF con el DNA y la inhibición de la polimerasa responsable de la síntesis del RNA y DNA, supresión de la síntesis del DNA, reducción de la síntesis de RNA e inhibición del RNA mensajero, alteración en la morfología celular y reducción de la síntesis de proteína.

En pavos, una especie extremadamente susceptible a las AF, Rawal *et al.* (2011), mencionan que esta sensibilidad se debe a la eficiencia de la bioactivación hepática del citocromo P450 y la deficiente detoxificación por parte de la glutatión S-transferasa (GST). El citocromo P450 pertenece a la enorme superfamilia de enzimas envueltas en el metabolismo de compuestos xenobioticos (Belloc *et al.*, 1996), y por consecuencia es el responsable del metabolismo de las AF, incrementando el perjudicial efecto de este metabolito (Van Vleet *et al.*, 2001), ya que la AFB₁ por sí sola no es toxica, si no que requiere de una bioactivación enzimática para alcanzar una actividad carcinógena (y toxica). Esta toxina tiene varias rutas de metabolización (Figura 6): 1) puede ser metabolizada por el citocromo P450 en las células microsomal hepáticas y convertida a un reactivo electrofilico exo-aflatoxin B1-8,9-epoxide (AFBO) el cual es altamente inestable, y este reacciona con el DNA para formar aductos N⁷ guanina por interacción del AFBO entre las pares de bases y allí es cuando expresa su toxicidad (Rawal y Coulombe Jr, 2011; Kuilman *et al.*, 2000). 2) Una vez formado el AFBO, este puede ser conjugado con el glutatión (GSH) para su eliminación, esto con la ayuda de la enzima GST que es el paso de desintoxicación más importante para la protección contra la genotoxicidad de la AFB₁ (Yarru *et al.*, 2009), por consecuencia la actividad de la GTS es un factor importante en la determinación de la resistencia de una especie. 3) En dado caso de no ser eliminada por la GST, la AFB₁ puede ser hidrolizada, catalizada o espontáneamente forma el producto AFB1-8,9-dihydrodiol (AFB₁dhd) (Lozano y Díaz, 2006). Esta forma se reorganiza como un dialdehído el cual es capaz de unirse a las proteínas en residuos de lisina. Sin embargo ha sido identificada una AF aldehído reductasa el cual protege contra los dialdehídos, catalizando su reducción a dialcohol (Judah *et al.*, 1993). 4) Otra vía de desactivación y eliminación de la AFB₁ es produciendo metabolitos hidroxilados, esto se realiza metabolizando la AFB₁ por las enzimas citocromo P450 en las células microsomales hepáticas dando como resultado metabolitos menos tóxicos, entre los más importantes se encuentran AFM₁, AFP₁, AFQ₁, Aflatoxicol (AFL), estos pueden ser eliminados en la leche, huevo, orina o heces (Hayes *et al.*, 1993; Gallagher y Eaton 1995; Johnson *et al.*, 2008; Battacone *et al.*, 2009).

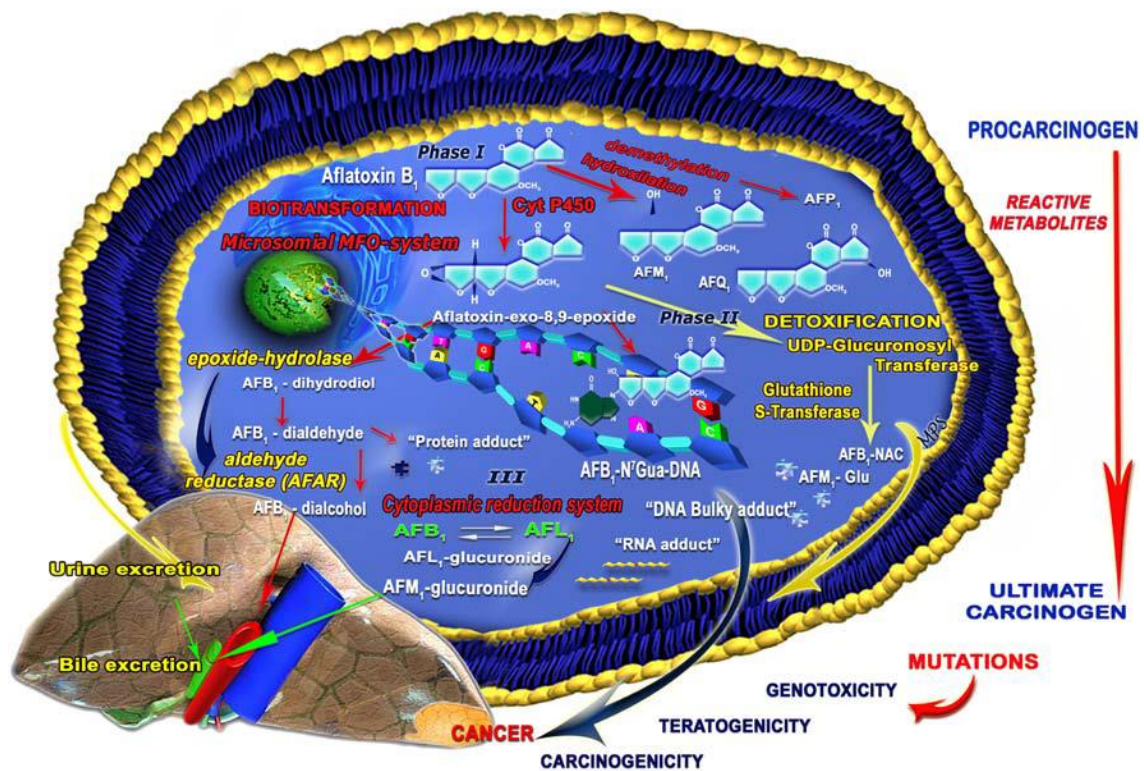


Figura 6. Metabolismo de la AFB₁ al ser metabolizada por las células hepáticas (Santacroce *et al.*, 2008).

4.2.2. Propiedades oxidativas de las AF.

La formación de los aductos AFB₁-DNA es resultado del paso crítico en la iniciación de una hepatocarcinogenesis. Aunque el mecanismo subyacente de la hepatotoxicidad de las AF no está completamente entendido, diferentes estudios sugieren que la toxicidad puede surgir a través de la generación intracelular de especies de oxígeno reactivas (EOR) como el anión superóxido (O₂⁻), radical hidroxilo (HO[·]) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) durante el proceso metabólico de la AFB₁ por el citocromo P450 en el hígado (Towner *et al.*, 2003) (Figura 7). El estrés oxidativo ocurre cuando la producción de EOR excede la capacidad antioxidante natural del organismo, causando daño en macromoléculas como DNA, proteínas y lípidos. (Vandana *et al.*, 2006). Por lo tanto existe un decremento significativo de los niveles de los antioxidantes no enzimáticos (Vitamina C, Vitamina E, GHS) y antioxidantes enzimáticos (Superóxido Dismutasa (SOD), Glutatión Peroxidasa (GPx) y Catalasa) los cuales son los principales mecanismos de defensa antioxidante de la célula (Kayanoki *et al.*, 1996; Verma, 2004).

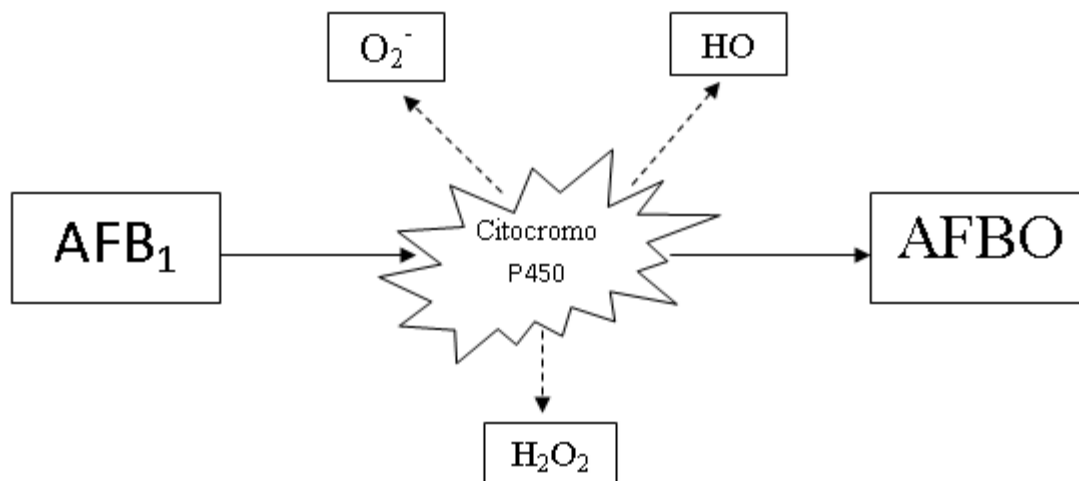


Figura 7. Generación de EOR durante el metabolismo del AFB₁ por el Citocromo P450

Enzimas antioxidantes como SOD y GPx forman la primera línea de defensa ante el EOR y su actividad se ve disminuida cuando se administra AFB₁, lo anterior fue demostrado por Eraslan, *et al.* (2005) en eritrocitos de aves de engorda alimentados con dietas contaminadas con AF (0.5 y 1 ppm) por 45 días, observando un decremento de dichas enzimas a partir del día 30. Estos resultados coinciden con Alpsoy *et al.*, (2009) ya que al administrar AFB₁ (5 µM) produce un marcado impacto oxidativo en linfocitos humanos dando como evidencia una peroxidación de lípidos, ya que la administración de dicha toxina disminuye significativamente los niveles de GSH y la actividad de la SOD y GPx.

4.2.3. Excreción de las AF en animales terrestres.

Algunas de las toxinas o sus metabolitos pueden fijarse en tejidos de animales o humanos, sin embargo la mayoría son eliminadas en la orina, en las heces, leche o huevo (Trucksess *et al.*, 1983; Abdel-Wahhab y Kholif, 2008). Uno de los metabolitos mayormente investigados en la industria lechera es la AFM₁, dado que es de interés en la salud pública. Siguiendo la ingestión de alimentos contaminados con AF, una parte de la ingestión de la AFB₁ es degradada en el rumen, resultando la formación de AFL, la fracción restante es absorbida en el tracto digestivo por difusión pasiva y es hidrolizada en el hígado a AFM₁ (Kuilman *et al.*, 2000). La AFM₁ es conjugada por el ácido glucurónico y subsecuentemente excretado vía biliar, o enteramente en sistema circulatorio. La AFM₁ circulante puede ser excretada en la orina o aparecer en la leche

(Fink-Gremmels, 2008). La transformación y excreción de la AFB₁ en bovinos productores de leche es relativamente rápida, esto fue demostrado por Megalla *et al.* (1981) quienes al alimentar vacas con dietas contaminadas con AFB₁ (3.245 mg AFB₁/kg de alimento) encontraron AFM₁ un días después al ser ordeñadas (0.07 µ/ml) y al retirar el alimento contaminado notan una disminución notable y a partir del 5° día la eliminación completa de este metabolito. Por otro lado, la producción de huevo es otra industria en la que se puede encontrar la excreción de AFB₁ y/o sus metabolitos. Estudios realizados por Bintvihok *et al.* (1993) determinando solo la concentración de AFB₁, encontraron niveles menores de 0.01 µg/kg en huevo después de 12 semanas de alimentación con 50, 100 y 200 µg AFB₁ /kg. Por su parte estudios realizados por Oliveira *et al.* (2003) alimentaron por 90 días codornices ponedoras con raciones de 25, 50 y 100 µg de AFB₁/Kg de alimento, encontraron en huevos niveles de 0.01 a 0.08 µg /Kg de AFB₁ y 0.01 a 1.03 µg /Kg de AFB_{2a} a partir del primer día de alimentación, para el 10° día 0.03 a 0.37 µg /Kg de AFM₁, y hasta el día 20 detectaron 0.01 a 0.03 µg /Kg de AFL; resultados similares fueron encontrados por Wolzak *et al.* (1985) y Micco *et al.* (1987) solo observaron niveles detectables de AFM₁ en huevo de gallinas después del día 4 y 7, respectivamente, sin embargo en contradicción Micco *et al.* (1987) encontraron una rápida conversión de AFB₁ a AFL después del 2 al 7° día en los pools de huevo. En otros estudios con huevos de gallinas ponedoras, expresando los resultados en una relación *n*:1, donde *n* es la concentración de AFB₁ necesaria para recuperar 1 unidad residual de AFB₁ y/o su metabolito en productos comestibles, se han reportado algunas diferencias en el promedio de transición como 325:1 (Jacobson y Wiseman, 1974), 55 000–125 000:1 (Lotzsch y Leistner, 1976), 40 000:1 (Trucksess *et al.*, 1983), 66 200:1 (Wolzak *et al.*, 1985), 2200:1 (Park y Pohland, 1986) y 5000:1 (Oliveira *et al.*, 2000). Al igual que la acumulación en huevo, diferentes investigaciones han mostrado que la exposición de AF dietarias en la industria avícola deja como resultados la deposición de AFB₁ y sus metabolitos en tejidos, Trucksess *et al.* (1983), encontraron residuos de AF en todos los tejidos comestibles de gallinas de ponedoras alimentadas con 8 ppm durante 7 días, con altos niveles de AFB₁ encontrados en hígado y AFM₁ en riñones. Esto coincide con lo encontrado por Micco *et al.* (1988), que al alimentar a pollos de engorda y gallinas ponedoras por largos periodos de tiempo con dietas contaminadas que contenían 50 ppb de AFB₁, observaron residuos de AFB₁ y AFM₁ en hígado riñones y tejido muscular en ambas especies de aves. Gargees y Shareef (2009) encontraron en pollos de engorda alimentados con dietas contaminadas

con 2.5, 3.5 y 5 ppm de AF (81, 14, 4 y 1% de AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ respectivamente) residuos de AFM₁ en el hígado de 12.3, 17.1 y 22.1 ppb respectivamente. La velocidad en la incorporación de la AFB₁ y/o sus metabolitos al tejido de las aves es relativamente rápida, esto fue demostrado por investigaciones realizadas por Guarisco *et al.* (2008), quienes utilizando administración oral de AFB₁ radiomarcada, se observó la aparición de residuos de AFB₁ en la pechuga de pollos de engorda, encontrando una señal radioactiva 2 horas después del consumo. Sin embargo la detección de residuos de AFB₁ y/o sus metabolitos son difíciles de encontrar en tejido para otros investigadores, Wood y Pohland (1992) mencionan no haber detectado residuo alguno de AF en hígado de ovejas, ganado bovino ni pollos usando métodos capaces de detectar niveles de 0.05 mg/kg de AFB₁ y AFM₁. Por su parte Kurata (1990) menciona que la AFM₁ es ocasionalmente encontrada en productos cárnicos. Esto coincide con Hsieh y Wong (1993) quienes mencionan que las AF difícilmente son transmitidas a tejido, sin embargo la exposición repetida o prolongada puede dejar daños permanentes en los órganos. Estudios realizados en ratas, se ha observado que la AFB₁ es hidrolizada y posteriormente eliminada, parte de la biotransformación de la AFB₁ es gracias a su microflora, esto se ha demostrado utilizando modelos gastrointestinales, encontraron que parte del metabolismo de la AFB₁ da como resultado AFL en las heces (Wei *et al.*, 1981). Por otro lado se ha encontrado que la AFM₁ es el principal metabolito urinario encontrado en roedores tratados con AFB₁ y ha sido detectado a niveles que representan un nivel de 1-2% de la dosis administrada (Johnson *et al.*, 2008). Estos metabolitos de la AFB₁ en la orina pueden ser encontrados 30 min. después de su consumo (Hsieh y Wong, 1993). Gan *et al.* (1988), mencionan que estos modelos utilizados en ratas en los cuales se obtienen resultados de la metabolización de la AFB₁, son apropiados como sustitutos de modelos humanos. Investigaciones realizadas en regiones primordialmente en vías de desarrollo, donde la mayoría de la población, no solo son desnutridos crónicos, sino que también están expuestas a la ingesta de alimentos contaminados con AF (Gong *et al.*, 2002), se pueden encontrar niveles de AFM₁ en orina basados en volumen con en promedio de 4.2 ng/ml en Zimbabue (Nyathi *et al.*, 1987), un rango de 0.17 a 5.2 ng/ml en Shanghai (Groopman *et al.*, 1992) y en Ghana se encontró desde no detectable hasta de 17.2 ng/ml. las diferencias en los niveles de AFM₁ en la orina son dependientes a factores tales como el tamaño de la muestra, dieta, nivel de exposición de la AF, método de colección de la orina, análisis de la AF, concentración de orina, susceptibilidad genética, salud y estatus

nutricional del individuo. Sin embargo, el consumo de la AF en la dieta es el determinante crucial para el nivel de AFM₁ en la orina (Jolly *et al.*, 2006).

4.3. Efectos de las AF en peces.

La presencia de las AF en granjas piscícolas y su impacto son todavía subestimados. Comparados con los animales terrestres, existe muy poca información relacionada con su toxicidad para especies acuáticas. El primer reporte de AF en peces fue en Estados Unidos Americanos en el año 1960, cuando se observó una elevada mortalidad en truchas arcoíris y después de realizar análisis de contaminantes se encontró metabolitos de esta micotoxinas además de observarse hepatomas en análisis post-mortem (Bunton, 1996). La causa fue finalmente atribuida a la presencia de hongos en harina de semilla de algodón y que resulto que estaba contaminada con AF. Después de este episodio las AF fueron reconocidas, por primera vez, como carcinógenas para peces (Bailey *et al.*, 1996). Poco después se elaboraron muestreos y condiciones similares fueron encontradas en Europa y Oriente. A partir de esta fecha se han reportado brotes de aflatoxicosis en peces en Alemania, México, Dinamarca y Chile (Ellis *et al.*, 2000).

Existe un rango amplio de susceptibilidad a las AF en peces, por ejemplo la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) es considerado la especie más susceptible a este metabolito (DL₅₀ 0.81mg/kg VI), mientras otras especies como el bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) son afectados solo a altas dosis (11.5mg/kg VI) (Bauer *et al.*, 1969; Jantrarotai *et al.*, 1990). Una intoxicación aguda por AF da lugar generalmente a una pobre salud, pero los mayores hallazgos clínicos incluyen pérdida en productividad, reducción de la ganancia de peso y fertilidad además de inmunodepresión. Otros signos patológicos más serios ocurren como una consecuencia a una prolongada exposición (crónica), causando efectos tóxicos a nivel genómico, incidencia de tumores y efectos teratogénicos como los observados en animales terrestres y humanos (Santacroce *et al.*, 2008).

La alta incidencia de tumores hepáticos en la trucha arcoíris causada por el consumo de las AF sido reportada por Schoenhard, *et al.* (1981), Breinholt, *et al.* (1995), Ottinger y Kaattari, (2000) durante los últimos 30 años esta especie ha sido utilizada como un modelo alternativo para la predicción de procesos carcinógenos ambientales, lo cual incluye costos relativamente bajos, un estado vida temprano,

sensibilidad a muchas clases de carcinógenos, buena perspectiva para la descripción del tumor, respuesta a promotores e inhibidores de tumores y un estado comparativo mecánicamente informativo no mamífero (Bailey *et al.*, 1996). Las AF son extremadamente cancerígenas para la trucha, Bailey *et al.* (1994) sometieron a huevos embrionados sumergiéndolos en agua que contenía 0.5 ppm de AF en forma pura por 1 hora y observo que se produjo carcinomas hepáticos en un 80%. También investigaron la relativa carcinogénesis de la AFB₁ y el AFL en alevines, observando que ambos metabolitos producían una respuesta fenotípica similar además de carcinomas hepatocelular. Por su parte Breinholt, *et al.* (1995) utilizando la misma especie encontraron una incidencia de tumores hepáticos un 32.7% alimentados con dietas que contenían 160 ppb de AFB₁. Ngethe *et al.* (1992) investigaron por medio de autoradiografía y actividad de centelleo la ruta de tritio de AF (H³ AF) administrada tanto intravenosa como oralmente en trucha arcoíris por un periodo de 8 días y encontraron que la más alta concentración en tejido fue en el hígado, seguida del órgano biliar, riñones, apéndice pilórico, ojos y roseta olfativa. Por su parte Horsberg *et al.* (1994), utilizando el mismo método (H³ AF) encontraron deposición en riñones de trucha arcoíris al igual que en tilapia después de administración oral o intramuscular, además mostraron que la acumulación hepática de AF fue más en trucha arcoíris que en tilapia, revelando variaciones en la acumulación entre diferentes especies.

La tilapia es también reconocida como una especie susceptible a las AF, sin embargo existen resultados contradictorios relacionado con su tolerancia, El-Banna *et al.* (1992), revelaron que la alimentación durante 10 semanas con una dieta que contenía 100 ppb de AFB₁ redujo significativamente el crecimiento y a una dosis de 200 ppb se observó una mortalidad de 16.7%. Cagauan *et al.* (2004) mostraron en un experimento de 90 días, tasas de sobrevivencias del 67% en tilapias que fueron alimentadas con dietas contaminadas con rangos de inclusión de 5 a 38.6 ppb de AF totales. Sin embargo Anh Tuan *et al.* (2002) demostraron que no existe efecto adverso en tilapias que fueron alimentadas durante 8 semanas con dietas que contenían 250 ppb de AF y que solo a dosis altas como 2.5 ppm afectaría el nivel de hematocrito y la ganancia de peso. Chávez-Sánchez *et al.* (1994) sugirieron que las tilapias pueden tolerar dietas que contengan 30 ppm de AFB₁ sin afectar la sobrevivencia, no obstante añaden que existen afectaciones severas en el hígado relacionado con las AF, tales como hígado graso, hipertrofia celular, atrofia nuclear, infiltración celular, hiperemia entre otros; además observaron cambios en el riñón como congestión, contracción de glomérulos y

melanosis. Por su parte Deng (2010), realizó un experimento en tilapias con una duración de 20 semanas utilizando dosis crecientes de AFB₁ (0, 85, 245, 638, 793 y 1641 ppb) en el alimento y observo que solamente al final del experimento se redujo la ganancia en peso a partir de un nivel de inclusión de 245 ppb de AFB₁ sin llegar a afectar la sobrevivencia (arriba del 98% en todos los grupos). En el aspecto reproductivo Diab *et al.* (1998), mencionaron que existe una efecto negativo, ya sea en hembras o machos de esta especie, tanto en índice gonadosomatico, fecundidad, conteo y actividad espermática a partir de 1 ppm de AFB₁ y señala que esto puede haberse debido a que los metabolitos de AF pueden reducir la capacidad para satisfacer las demandas energéticas para el crecimiento y reproducción del sistema reproductivo.

Una especie que es reconocida por su tolerancia a las AF es el bagre de canal (*Ictalurus punctatus*), Jantrarotai *et al.* (1990) no encontraron diferencias significativas en la ganancia de peso en peces que fueron alimentados con 2150 ppb de AFB₁ por un periodo de 10 semanas, mientras que la AFB₁ redujo el crecimiento en un 24% cuando fueron alimentados con 10000 ppb de AFB₁. Aunado a lo anteriormente mencionado, Plakas *et al.* (1991) mencionan que existe muy poco potencial de acumulación de AF en tejido comestible en bagre de canal alimentado con dietas contaminadas con AF (250 µg/Kg de peso).

Para entender más afondo la relativa tolerancia del bagre se realizó un ensayo Cometa, el cual se utiliza para demostrar si existe una oxidación o un daño del DNA (Fairbairn *et al.*, 1995), Abd-Allah *et al.* (1999) observaron que los movimientos de la cola del DNA (representados como DNA dañado) en las células de todos los tejidos muestreados (sangre, hígado y riñones) de los peces que fueron inyectados con 0.5 mg de AFB₁/kg de peso son similares a los peces alimentados con una dieta sin contaminar. Los autores explican que esto se puede deber a la rápida conversión de AFB₁ a AFL un metabolito más polar que la AFB₁, el cual no comparte directamente la genotoxicidad de la AF y esto puede contribuir a la aparente resistencia del bagre en sus resultados.

Según la FAO (2013) la carpa común (*Cyprinus carpio*) es una de las especies más consumidas en todo el mundo, además de tener una gran importancia comercial, es por ello que Akter *et al.* (2010) realizaron un experimento en el que alimentaron alevines de esta especie con 0, 50 y 100 ppb de AFB₁ en un periodo de 30 días, no encontrando diferencias significativas en los parámetros de rendimiento entre los alevines alimentados con 0 y 50 ppb, sin embargo en los organismos alimentados con 100 ppb observaron una disminución en la ganancia de peso en un 59.2% y un aumento

de la TCA en un 123%. Por su parte Svobodova y Piskac (1980), alimentando carpas comunes con dietas contaminadas con 2 µg de AF/Kg de dieta no encontraron acumulación alguna en el musculo. Akter *et al.* (2010) Observaron en carpas alimentadas con dietas contaminadas con 100 ppb un gran índice de deposición en el hígado, además menciona que el hígado es el sitio funcional donde se realiza el metabolismo y detoxificación de las AF en peces, por consecuente la concentración de AFB₁ y o sus metabolitos en este órgano siempre serán más altos que en tejido muscular, sin embargo la acumulación de las AF dependerá de cada especie la carpa gibel (*Carassius auratus gibelio*) es una especie muy resistente a diferencia de la carpa común, esto fue demostrado por Huang *et al.* (2011), que sometieron a esta especie a niveles crecientes de AFB₁ (0, 10, 20, 50, 100, 200, 1000 ppb) en un bioensayo con una duración de 12 semanas y no observaron daño alguno en los parámetros de crecimiento, incluso las dietas con 50 y 1000 ppb tuvieron la mayor ganancia de peso (65.5 y 61.9 g respectivamente), inclusive por encima de la dieta control (53.5 g). Resultados similares fueron obtenidos por Han *et al.* (2010), quienes utilizaron la misma especie reportaron que la ganancia de peso en los peces alimentados con dieta suplementadas con 40 ppb de AFB₁ (valor determinado de AFB₁ fue de 17.9 ppb) durante 3 meses fue 13% mayor que los que consumieron la dieta control y agregaron que no existe diferencias en el hepatopáncreas a nivel histológico en ninguno de los animales muestreados. Por su parte la carpa Rohu (*Labeo rohita*), una de las carpas más importantes de la India (FAO 2012) es también sensible a estos metabolitos, provocando una alteración en el perfil sanguíneo, esto fue demostrado por Sahoo y Mukherjee (2001), quienes al administrar la AFB₁ de forma intraperitoneal observaron una disminución en la proteína total, albumina y globulina en un 60, 24, 71% respectivamente.

4.4. Efectos de las AF en crustáceos.

Wiseman *et al.* (1982) realizaron ensayos de AFB₁ en camarones peneidos, en un experimento se tomaron juveniles de *Penaeus stylirostris*, las cual fueron inyectados con una solución salina fisiológica con AFB₁ a diferentes concentraciones (25, 70, 115, y 160 µg de AFB₁ por g peso corporal) y se encontró que la DL₅₀ a las 24 y 96 horas fue de 100.5 mg/Kg (95% de intervalo de confianza: 78.8 a 129) y 49.5 mg/kg (95% de intervalo de confianza: 29.8 a 82.3) respectivamente, además de mostrar a nivel histológico daños en hepatopáncreas, órgano mandibular y órgano hematopoyético; en

un segundo experimento, juveniles de *Litopenaeus vannamei* fueron alimentados con dietas contaminadas con AFB₁; de 50 a 300 ppm de AFB₁ y se encontró que murieron a las 4 semanas encontrando daños a nivel histológico en el hepatopáncreas, órgano mandibular y órgano hematopoyético.

Lightner *et al.* (1982), investigaron la toxicidad aguda y sub-aguda a nivel histológico en las mismas dos especies, para esto utilizaron camarones *P. stylirostris* con un peso promedio de 3 g los cuales fueron expuestos a una concentración de AF de 2 a 160 µg de AFB₁/g de peso por medio de inyección intramuscular y a *L. vannamei* con un promedio de peso de 0.5 g los cuales fueron alimentados con diferentes dosis que van desde los 53 a 300 ppb; las alteraciones histológicas causadas por la exposición a la AFB₁ fueron dependientes a las dosis recibidas en hepatopáncreas, órgano mandibular y en órgano hematopoyético. En aflatoxicosis sub-aguda se observa una marcada inflamación de los hemocitos intertubulares seguida por una encapsulación y fibrosis en los túbulos afectados, aunque no es tan desarrollado el daño como una aflatoxicosis aguda.

Boonyaratpalin *et al.* (2001) estudiaron el efecto de las AFB₁ a varios niveles de inclusión en la dieta (0, 50, 100, 500, 1000, 2500 ppb) por un periodo de 8 semanas en juveniles de camarón tigre *Penaeus monodon* (1-2 g) y en adultos (10-12 g). Al termino del experimento se observó una reducción en el peso final del 20.4 y 58% en los camarones que consumieron la dieta contaminada con 1000 y 2500 ppb respectivamente en comparación con los de la dieta control y la sobrevivencia disminuyo hasta 26.3% en la dieta con 2500 ppb. A la cuarta y sexta semana se tomaron muestras para detectar posibles residuos de AFB₁ y analizarlas por medio de cromatografía de capa fina y se observó que en musculo fue más la concentración que en cabeza o cutícula (4.1-14.2 vs 2.4-9.1 ppb respectivamente) después de la cuarta semana de alimentación, sin embargo, a la sexta semana, los residuos encontrados en el musculo fueron decreciendo al igual que la mezcla de cabeza y cutícula (0.1-0.7 vs 0.4-6.8 ppb respectivamente). Las alteraciones histológicas en los camarones alimentados con las dietas de 100 a 2500 ppb de AFB₁ fueron caracterizadas por atrofas, seguidos de necrosis de los túbulos epiteliales de las células, aunque fueron más comunes en los camarones que consumieron las dietas más altas, de igual manera se apreció una infiltración del tejido conectivo dentro del tejido intersticial del hepatopáncreas además de observarse encapsulación tanto de tejido como células necróticas.

Bautista *et al.* (1994), observaron que la alimentación con dietas contaminadas con 78.3 ppb de AFB₁ a pre-adultos de *Penaeus monodon* (peso promedio de 17.5 ±0.6 g) durante 62 días presentaron una menor tasa de crecimiento, a nivel histológico se observaron alteraciones en el hepatopáncreas en todos los camarones expuestos a esta micotoxina y su grado de alteración esta correlacionado al nivel de AFB₁ en la dieta. Los autores concluyen que basándose en los parámetros de rendimiento que los pre-adultos de *P. monodon* pueden tolerar las AFB₁ a niveles de 52.3 ppb en el alimento, aunque los cambios histológicos son evidentes en el tejido cuando los camarones consumieron las dietas contaminadas con 26.5 ppb. Después de los 62 días de exposición a las AFB₁ en la dieta no fueron detectados por medio de HPLC restos de la toxina en el canal del camarón, indicando un bajo potencial de la transmisión de esta toxina en camarones a consumo humano. Por su parte Gopinath y Raj (2009), investigaron los cambios histopatológicos en la misma especie a las 4 y 8 semanas y observaron cambios significativos en los diferentes tratamientos (50, 100, 150, 500, 1000 y 2000 ppb), mencionan que la severidad de los cambios histopatológicos en el hepatopáncreas fueron proporcionales al incremento de AFB₁ en la dieta de los camarones y se caracterizó por la pérdida de estructura de las células y túbulos, formación de nódulos, elongación de las células, descamación, fibrosis, necrosis, inflamación hemocítica e inflamación celular.

Divakaran y Tacon (2000) observaron que la alimentación durante 8 semanas con dietas contaminadas con AFB₁ (300, 400 y 900 ppb) en juveniles de *L. vannamei* no fueron detectados en heces, camarón completo o musculo por medio de cromatografía de afinidad de anticuerpos monoclonales con una detección límite de 2 ppb.

4.5. Legislación de AF.

4.5.1. Legislación de AF en el mundo (FAO 2004).

El número de países que tienen ciertas regulaciones sobre las micotoxinas ha crecido sostenidamente y desde el 2003 se conocen aproximadamente 100 países con este tipo de normas que representa el 87% de la población mundial (FAO 2004) (Figura 8). En 1995, el 23% de la población mundial viva en regiones donde no se conocía regulación alguna sobre las micotoxinas. Este porcentaje ha disminuido en un 13% para el 2003, debido a un ligero incremento en la cobertura en Latino América y Europa y un incremento más significativo en África y Asia/Oceanía (Figura 9).

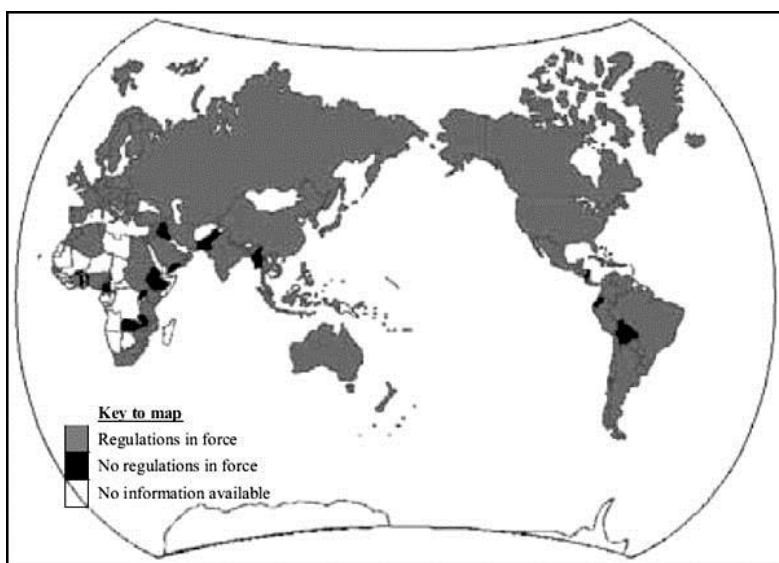


Figura 8. Países con y sin regulación de micotoxinas (FAO 2004)

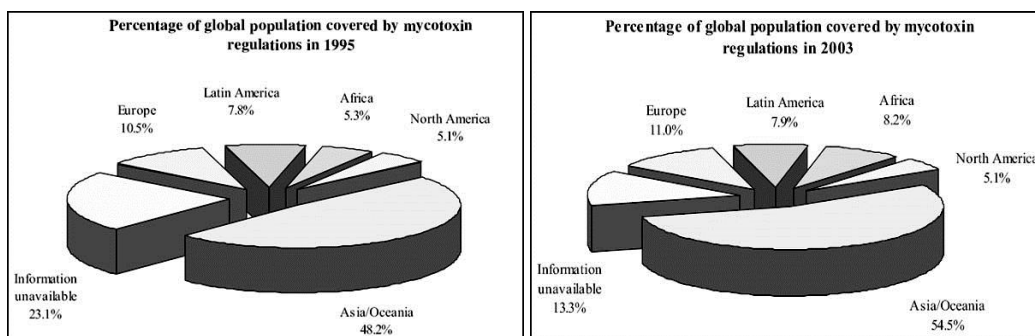


Figura 9. Cobertura de regulaciones de micotoxinas de habitantes a nivel mundial en 1995 y 2003 (FAO 2004).

Actualmente las regulaciones de micotoxinas se refieren principalmente a las AF y el número de países con este tipo de normas han incrementado significativamente en los últimos años. La regulación de AF es a menudo detallada y específica para varios productos alimenticios, productos lácteos y alimento para animales (Tabla 3).

Tabla 3. Media y rangos de niveles máximos tolerables (mg/kg) para algunas (o grupos de ellas) AF en el 2003 y número de países en los cuales es regulado (FAO 2004)

AF o combinación	Media	Rango	Países
AFB ₁ en productos alimenticios	5	1 - 20.	61
AF B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂ en productos alimenticios	10	0-35	76
AFM ₁ en leche	0.05	0.05-15	60
AFB ₁ en alimentos para animales	5	5 - 50.	39
AFB ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂ en alimentos para animales	20	0-50	21

A nivel mundial para el año 2003 el límite obligado en al menos 29 países fue de 2 mg/kg (Figura 10). La mayoría de estos países están regidos por la Unión Europea. Le siguen 21 países con un límite de 5 mg/kg, los cuales están distribuidos en África, Asia/Oceanía, Latino América y Europa. Los Estados Unidos Americanos y Canadá no cuentan con un límite para AFB₁

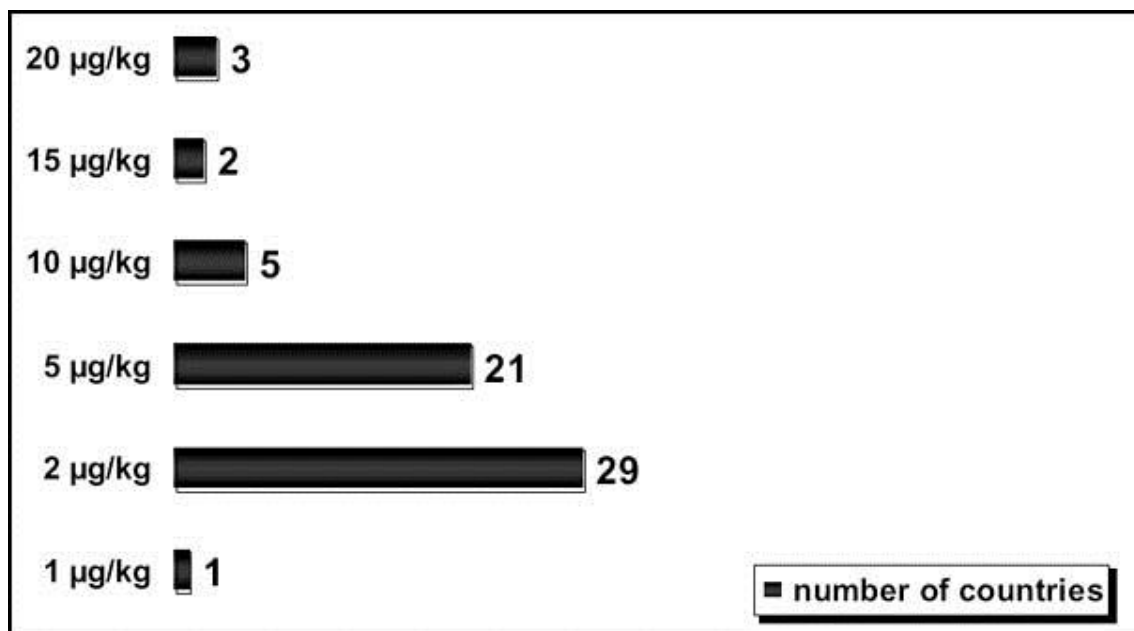


Figura 10. Límite a nivel mundial de AF en el alimento (FAO 2004).

Para el año 2003 muchos países regularon las AF con un límite basado en la suma de AF B1, B2, G1 y G2, a veces en combinación para un límite específico para la AFB₁. El límite más frecuente es de 4 mg /kg (establecido en 29 países). Le sigue el límite de 20 mg/kg, aplicado en 17 países, la mitad de ellos los distribuidos en Latino América y varios en África. Con los años la “popularidad” de un límite para el total de AF en alimentos se ha mantenido, resultando en 76 países que aplicaron esta regulación en el 2003 (comparados con los 61 países con límite específico de solamente AFB₁) (Figura 11).

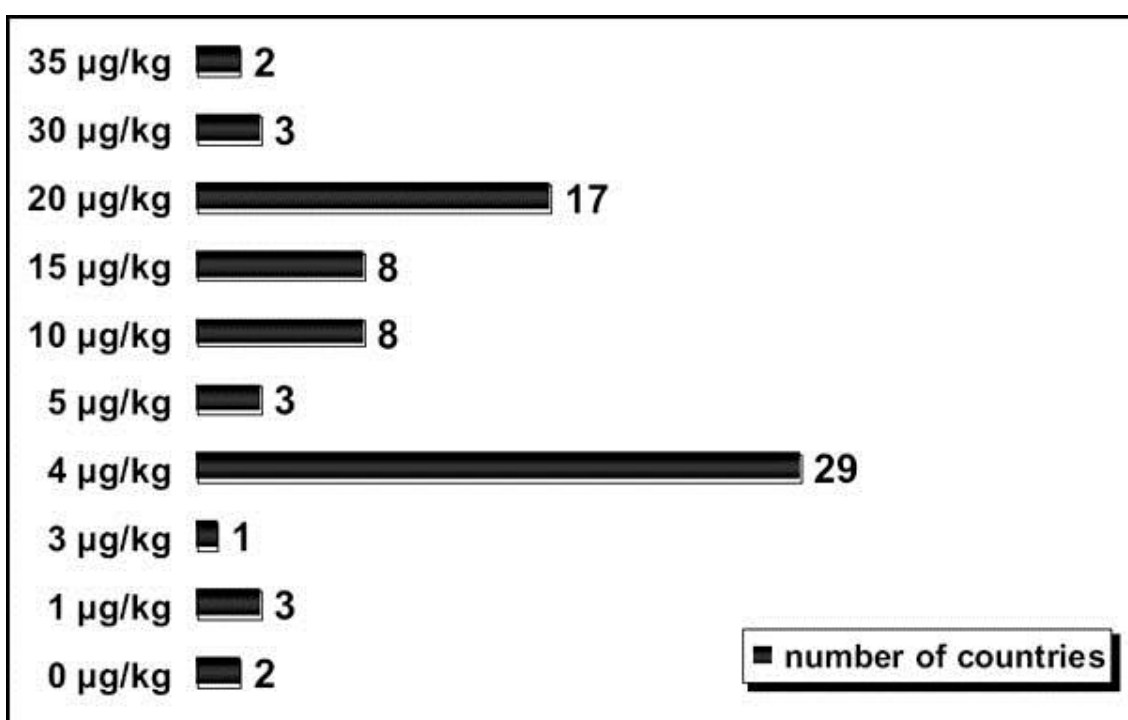


Figura 11. Límite a nivel mundial de total de AF en el alimento (FAO 2004)

4.5.2. Legislación de en México (Norma oficial Mexicana)

Según la Norma oficial Mexicana (NOM-188-SSA1-2002) en el apartado de Especificaciones Sanitarias menciona que los cereales para consumo humano no deben exceder de 20 µg/kg de AF totales y en el caso de observarse concentraciones desde 21 y hasta 300 µg/kg, el cereal únicamente podrá utilizarse para consumo animal (Tabla 4).

Tabla 4. Límites permitidos en diferentes etapas de producción animal.

Especie/etapa de producción	Límite Máximo ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Aves (excepto pollos de engorda)	100
Cerdos en engorda:	
Entre 25 y 45 Kg	100
Mayores de 45 Kg	200
Maduros destinados a reproducción	100
Rumiantes:	
Maduros destinados a reproducción	100
En engorda en etapa de finalización	300

4.6. Métodos de control y/o prevención contra las micotoxinas.

4.6.1. Métodos de adsorción física de las micotoxinas.

Las pérdidas económicas por la contaminación por micotoxinas han sido considerables en todo el mundo. La contaminación de las dietas por AF y el arrastre de los residuos tóxicos de estos metabolitos a la cadena alimenticia pueden ser controladas (Ramos y Hernández, 1997). De acuerdo con la FAO cualquier proceso de descontaminación para reducir los impactos tóxicos y económicos de las micotoxinas necesitan de los siguientes requerimientos (Piva *et al.*, 1995; Rustom, 1997; Bata y Lásztity, 1999):

- 1) Deben ser destruidas, inactivadas o remover las micotoxinas;
- 2) No deben producir o dejar residuos tóxicos y/o carcinogénicos/mutagénicos al final de la producción o en productos alimenticios obtenidos a partir de los animales alimentados con dicho producto;
- 3) No debe provocar efectos adversos en propiedades tanto físicas como sensoriales en el producto;
- 4) Debe de ser técnica y económicamente factible.

Existen varios métodos con los cuales se pueden prevenir o controlar la contaminación o crecimiento de hongos productores de micotoxinas, entre las que destacan las buenas prácticas agrícolas, el uso de agentes antifúngicos como son tales como amonio (Weng *et al.*, 1994) uso de ácidos o álcalis (Anguiano-Ruvalcaba *et al.*,

2005), ozono (McKenzie *et al.*, 1998) selección de semillas resistentes al ataque de hongos y formación de toxinas (el-Kady *et al.*, 1991) y/o la desintoxicación e inactivación de las micotoxinas en los ingredientes y/o alimentos contaminados. Para la desintoxicación de alimentos contaminados existen métodos que incluyen el uso de adsorbentes o agentes secuestrantes los cuales son añadidos al alimento y actúan ligando la AF (o la combinación de varias micotoxinas) para reducir su absorción en el tracto digestivo los cuales han logrado obtener buenos resultados en animales terrestres, además de no poner en riesgo al animal al ser introducido en el alimento. Las sustancias usadas como secuestrantes incluyen material inorgánico como carbón activado, aluminosilicatos (arcillas, bentonitas, montmorillonita, zeolita, filosilicatos, etc.), carbohidratos indigeribles complejos (celulosa, polisacáridos de paredes celulares, levaduras y bacterias como glucomanano, peptidoglucano, entre otros) y polímeros sintéticos como colessterinas y polivinilpirrolidona y derivados (Diaz *et al.*, 2003; Diaz *et al.*, 2004).

4.6.1.1. Material Inorgánico.

El carbón activado (AC) es conocido por ser uno de las más efectivos adsorbentes no tóxicos y ha mostrado ser un tenaz agente de adsorción de una amplia variedad de drogas y toxinas, además ha sido utilizado como tratamiento médico para varias intoxicaciones desde el siglo 19 (Huwig *et al.*, 2001). El AC es un polvo no soluble formado por la pirolisis de ciertos componentes de materia orgánica y también puede ser manufacturado para su proceso de activación y así desarrollar una alta porosidad en su estructura (Galvano *et al.*, 2001). Las propiedades secuestrantes del AC dependen de muchos factores, incluyendo el tamaño del poro, área de superficie, estructura de la micotoxina y dosis. Existen modificaciones del AC dando como resultado el carbón súper activado. Este difiere del AC en que la partícula es reducida, por consecuencia, incrementa la superficie de contacto y la base del carbón activado se modifica químicamente durante el proceso de fabricación (Edrington *et al.*, 1997)

La mayoría de los estudios desarrollados para aminorar los efectos de la micosis con el uso de adsorbentes están enfocados a la utilización de aluminosilicatos, principalmente zeolitas y aluminosilicatos de sodio y calcio hidratados (HSCAS) y arcillas que contengan aluminosilicato, todas consisten en aluminatos silicatos y algunos iones intercambiados, principalmente de metales alcalinos y iones de metal de tierras

alcalinas (Barrer, 1989; Mumpton, 1999), las zeolitas están compuestas de tetraedros de SiO_4 y AlO_4 como dos bloques fundamentales con un átomo de metal en el centro de cada tetraedro. La fórmula química común es $\text{AlSi}_3\text{O}_8^-$. Mientras que la unidad SiO_4^- es eléctricamente neutral, la unidad AlO_4^- lleva una carga negativa la cual tiene que ser compensada por una carga positiva. Las zeolitas son similares a tamices moleculares adquiriendo una resina de intercambio molecular la cual es adecuada para la distribución de diferentes moléculas ya sea por tamaño, forma y carga.

Desde el punto de vista clásico, se define a las arcilla como aquel componente mineral del suelo cuyo diámetro de partícula es inferior a $2 \mu\text{m}$. Sin embargo, esta definición, es de escaso valor cuando se considera a la arcilla como una amplia clase de minerales con aplicaciones industriales (Castaing, 1998). Las arcillas están formadas principalmente de silicatos aluminicos con material coloidal y trozos de fragmentos de rocas, que se han formado mediante la desintegración química de las rocas aluminicas, este es el grupo más abundante de los minerales formadores de rocas donde el anión está formado por grupos silicatos del tipo $(\text{SiO}_4)^{4-}$. Más del 90% de los minerales que forman las rocas son silicatos, compuestos de silicio y oxígeno y uno o más iones metálicos. Cada uno de los silicatos tiene como compuesto básico, un ion complejo de forma tetraédrica; este tetraedro consiste en una combinación de un ion de silicio con cuatro átomos de oxígeno (Tapia-Salazar *et al.*, 2010) (Figura 12). Los silicatos son una larga clase de agentes secuestrantes de micotoxinas y la mayoría de los estudios para la reducción de los efectos negativos de las AF han sido enfocadas a los aluminosilicatos. En este grupo existen seis subclases (Figura 13) de las cuales dos son de mayor importancia: en la subclase de los filosilicatos se encuentran las bentonitas, montmorillonita, esméctica, caolinita e illitas, y en la subclase de los tectosilicatos encontramos a las Zeolitas (Boudergue *et al.*, 2009).

- Las bentonitas son originalmente creadas del desgaste de ceniza volcánica in situ (Ramos y Hernandez, 1996). Estos pertenecen al grupo de los filosilicatos y son agentes adsorbentes con una microestructura cristalina en capas y constitución variable. Las bentonitas son generalmente arcillas impuras que consisten principalmente de montmorillonita. Debido al contenido de montmorillonita, las bentonitas se hinchan y forman geles tixotrópicos (Diaz y Smith, 2004).
- La montmorillonita es una capa de silicato la cual adsorbe sustancias orgánicas ya sea en la superficie externa o en los espacios interlaminales (Ramos y Hernandez, 1996). Existe una montmorillonita nanocompuesta (MMN) la cual tiene una

adsorción aditiva, la cual fue desarrollada con técnicas de nano modificación, MMN tiene una superficie considerable, alta porosidad y una fuerte actividad de intercambio de cationes junto con muchos sitios activos los cuales hacen a la nanopartícula fácil de extenderse y como resultado la eficacia de adsorción mejorada (Shi *et al.*, 2006).

- HSCAS contiene iones de calcio y protones los cuales son intercambiados con los iones de sodio presentes en la naturaleza. Son un tipo de montmorillonita pertenecientes a los filosilicatos los cuales están compuestos por una para de aluminio y silicón conectados en una estructura de 1:1 o 2:1 (Huwig *et. al.*, 2001).
- Zeolitas son cristales hidratados de aluminosilicatos de álcali o cationes de tierras alcalinas caracterizadas por una estructura tridimensional. Las zeolitas son un grupo que consisten en tetraedros entrelazados de SiO_4 y AlO_4^- (Ramos y Hernández, 1997).

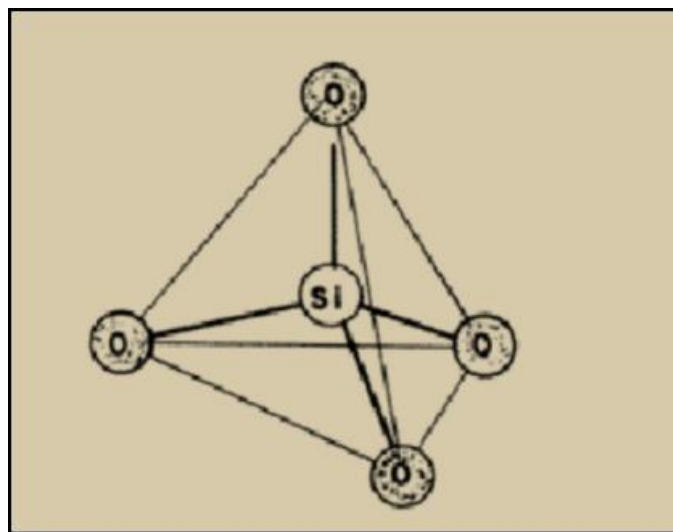


Figura 12. Estructura básica de silicatos (Mitchell, 1993)

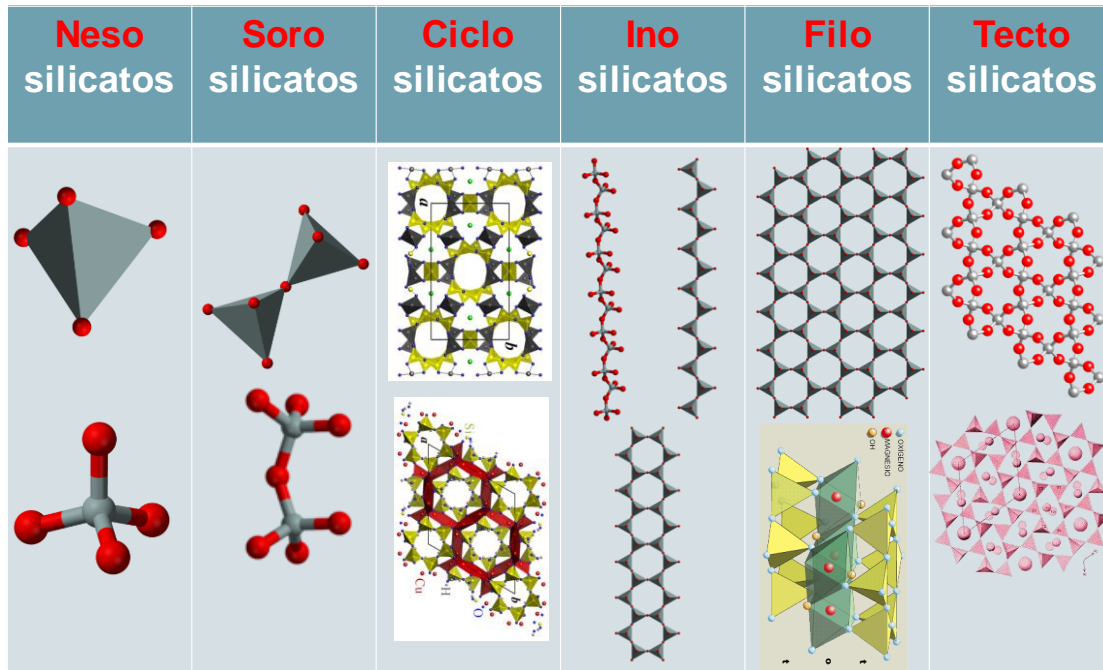


Figura 13. Estructura de los diferentes silicatos (adaptado de Mitchell, 1993)

4.6.1.2. Carbohidratos Indigeribles Complejos.

Una de las nuevas estrategias para la desintoxicación de AF es el uso de adsorbentes orgánicos y uno de los más reconocidos es la levadura panadera. La levadura ha sido utilizada como alimento para animales por más de 100 años, y existen líneas comerciales de productos de levadura específicos para alimentación animal (Çelýk *et al.*, 2003). Pocas especies de levadura son usadas comercialmente, *Saccharomyces cerevisiae* es una de las especies ampliamente comercializadas y un efectivo adsorbente, el cual es rico en proteínas (40-45%) además de ser rico en vitaminas del complejo B (Reed y Nagodawithana, 1991). Stanley *et al.*, (1993) observaron que añadiendo la sepa de la levadura *S. cerevisiae* a la dieta contaminada con AF protegía a aves de engorda de los efectos de la aflatoxicosis. Después Stanley *et al.* (1995) investigaron el efecto del residuo de paredes celulares en el rendimiento de las aves y encontró que estas neutralizaban los efectos producidos por las AF.

La fracción de la pared celular de *S. cerevisiae* está principalmente compuesta de polisacáridos (80 a 90%), el cual forma del 15 al 30% del peso seco de toda la célula. Una causa de la resistencia mecánica de la pared celular es debido a una capa interior compuesta de cadena de α -D-glucano (50 al 60% de la pared celular en base seca), el cual consiste en un complejo de redes de α -(1,3)-D-glucano con alto grado de

polimerización (2 kDa para formas solubles; arriba de 35 kDa para formas insolubles) ramificado con cadenas laterales lineales de α -(1,6)-D-glucano estos componentes tienen la habilidad de formar complejos con las micotoxinas, esto permite que una parte de la toxina pase a través del tubo digestivo sin ningún efecto negativo en los animales o arrastrando la toxina a productos de origen animal como lo es la leche huevo o carne (Yiannikouris *et al.*, 2004; Jouany *et al.*, 2005). Otro componente del residuo de las paredes celulares es el manan encontrado en el exterior de la pared celular de la levadura (Stanley *et al.*, 2004). Los oligosacáridos de manano es un producto diseñado para influir en la ecología microbiana y consiste primordialmente en glucomanos fosforilados, los cuales tienen dos modos de acción (1) Se liga a las lectinas en las paredes celulares de ciertas bacterias indeseables. Estas lectinas bacterianas normalmente se ligan a las células epiteliales del intestino y ayuda a la colonización bacteriana intestinal. Sin embargo si las lectinas se unen a los oligosacáridos de manano, estas bacterias no se podrán unir a las células epiteliales y por consiguiente son eliminados del lumen intestinal. (2) Además mejora ciertas acciones del sistema inmune. Estos modos de acción permiten que los oligosacáridos de manano ayuden a proteger a los animales de patógenos (Çelýk *et al.*, 2003).

4.6.1.3. Polímeros sintéticos.

Las colestiramina es una resina soluble de intercambio anionico, la cual es usada para ligar ácidos biliares en el tracto gastrointestinal y para la reducción de baja densidad de lipoproteínas y colesterol tiene una buena capacidad *in vitro* para ocratoxinas A y zeralenona, pero tiene poca eficacia en estudios *in vivo* y debido a su costo su uso es cuestionable (Avantaggiato *et al.*, 2005).

La polivinilpirrolidona (PVPP) es uno de los compuestos de monoamidas y es una forma articulada de la forma soluble en agua polivinilpirrolidona (PVP), así que el PVPP es insoluble en agua (Nogami *et al.*, 2010). Kiran *et al.* (1998) citan que la adsorción de las micotoxinas por el PVPP está basada en la hidratación de complejo formado por el adsorbente, la partícula debe ser polar para ser atraída y consecuentemente ser capturada por el adsorbente. Las propiedades del PVPP, en particular los espacios de los huecos en sus partículas, permite que adsorba micotoxinas que contengan suficientes grupos polares, como las AF. La micotoxina permanece fijada a la PVPP y este conjunto, de adsorbente y micotoxina, es excretado en las heces.

4.6.2. Biotransformadores:

Una estrategia para desactivar las micotoxinas en alimentos para animales es la incorporación de microorganismos o sistemas enzimáticos a la dieta que tienen la capacidad de detoxificar estas micotoxinas por medio del metabolismo o la degradación antes de su reabsorción en el tracto gastrointestinal. El efecto de esta estrategia es irreversible y una manera amigable con el ambiente, dado que no deja algún residuo tóxico o producto indeseable (Boudergue *et al.*, 2009; Qinghua *et al.*, 2009). Estos incluyen bacterias, levaduras, hongos y enzimas. Estos biotransformadores pueden estar constituidos de microorganismos o de la extracción de algunas enzimas de ellos y que posteriormente son incluidas en el alimento. Para el caso de bacterias se pueden emplear bacterias anaeróbicas Gram-positivas, bacterias aeróbicas Gram-negativas y bacterias aeróbicas Gram-negativas (Tapia-Salazar *et al.*, 2010).

4.6.3. Productos Antioxidantes como protectores contra las AF

Como se mencionó anteriormente el estrés oxidativo ocurre cuando la producción de EOR excede los mecanismos antioxidantes del cuerpo (Alpsoy *et al.*, 2009). Con el fin de superar el daño oxidativo, el uso de substitutos naturales como remedios a base de hierbas o extractos de plantas han demostrado tener una amplia efectividad sin conexiones fisiopatológicas acordes a la medicina moderna (Madhusudhanan *et al.*, 2006), los antioxidantes se encuentran entre los productos más populares para la protección a la salud (Villanueva y Kross, 2012) y se ha observado que la suplementación de estos aditivos aminoran los efectos de las AF en animales terrestres, inhibiendo la biotransformación a sus metabolitos epóxidos, los cuales son más genotóxicos que los compuestos originales (Lee *et al.*, 2001).

La Cúrcuma (*Cúrcuma longa Linn*) (Figura 14), es una especia que confiere un color amarillo a los alimentos y la cual contiene el compuesto activo curcumina, la cual representa el 3% de la cúrcuma. Desde hace tiempo ha sido un importante constituyente de la medicina tradicional de la India (Nayak y Sashidhar, 2010). Existen una gran variedad de estudios tanto en animales, como células cancerígenas en humanos en las cuales se ha encontrado un efecto protector de la curcumina contra toxinas y cáncer (Lin y Lin-Shiau, 2001; Aggarwal *et al.*, 2005; Duvoix *et al.*, 2005; Aggarwal *et al.*, 2007). Sin embargo pocos estudios han llevado a cabo la relación benéfica del efecto de las curcuminas contra la toxicidad de la AF (Lee *et al.*, 2001; Gowda *et al.*, 2008; Rangsz

y Ahangaran, 2011). Yarru *et al.* (2009) evaluaron la eficacia del polvo de cúrcuma como antioxidante contra los efectos negativos de las AFB₁ y encontraron que la adición del polvo de cúrcuma a la dieta contaminada, ayuda a aminorar los efectos negativos encontrados en las aves alimentadas con dietas contaminadas en ganancia de peso y además de disminuir el peso relativo del hígado aumentado por las AFB₁. A nivel de expresión genética el polvo de cúrcuma aumenta los niveles de SOD, GST y del gen epóxido hidrolasa, además de observaron un incremento en interleucinas-6, citocromo P450 1A1 y 2H1 disminuido por las AFB₁, demostrando que los efectos protectores del polvo de cúrcuma en expresión antioxidante, biotransformación y genes de sistema inmune en aves alimentadas con AFB₁.



Figura 14. Raíz de cúrcuma (*Cúrcuma longa* Linn) (imagen de 21food.com)

El ácido linoléico conjugado (CLA por sus siglas en inglés Conjugated linoleic acids) es un término que se utiliza llamar a un grupo de isómeros posicional (c8, c10; c9, c11; c10, c12, y c11, c13) y geométrico (cis, cis; cis, tras; trans, cis; y trans, trans) de octadecadienoico linoléico (ácido linoléico) con sistemas de enlaces dobles. El CLA ha mostrado tener varios efectos biológicos. Los mayores efectos del CLA en la salud son las cualidades anti-cancerígenas, anti-oxidativas, anti-ateroescleróticas y mejora la respuesta inmune (Ip *et al.*, 1995; Belury *et al.*, 1996), esto podría derivarse (o parcialmente) a que el CLA después de ser consumido altera el metabolismo de los

lípidos (Passi *et al.*, 1984; Hur *et al.*, 2007). Diferentes estudios han reportado que el CLA tiene una actividad antioxidante, dado que regula el estrés oxidativo con la síntesis de GSH (Ha *et al.*, 1990; Du *et al.*, 2001; Joo *et al.*, 2002; Denli *et al.*, 2004; Arab *et al.*, 2006), sin embargo, esta actividad sigue en controversia ya que estudios realizados por Banni *et al.*, (1998) indican que la presencia de este CLA en carne es muy estable y no participa en procesos de oxidación (como el provocado por las AF), dado que no existe cambio en la estructura del CLA durante el almacenamiento de la carne. Por su parte Denli *et al.*, (2004; 2005) investigaron el efecto del CLA incorporado a la dieta para prevenir los efectos tóxicos de las AF en aves y notaron que el CLA aumentaba significativamente la ganancia de peso y mejoraba la eficiencia alimenticia, además de disminuir el peso relativo del hígado, la disminución de la concentración en suero de lipoproteínas de alta densidad, así como daños en el hígado a nivel histológico provocado por las AF es prevenido por la incorporación del CLA (2 o 4g CLA/kg) a la dieta.

Las algas marinas son conocidas por contar con una amplia gama de compuestos bioactivos, muchos de los cuales tienen aplicación comercial en la rama de la farmacéutica, médica, cosmética, nutraceutica, alimenticia e industria agropecuaria (Kelman *et al.*, 2012). Se han identificado cerca de 6000 especies de algas clasificadas en tres grupos tradicionalmente conocidos como Chlorophyta (alga verde), Rhodophyta (alga roja) y Phaeophyta (alga café) que producen compuestos con actividades biológicas diversas (Smit, 2004). Investigaciones dentro de la química de los productos naturales y de las defensas químicas de las algas en los últimos 40 años han resultado en el aislamiento de cerca de 15,000 componentes (Cardozo *et al.*, 2007). Los antioxidantes naturales encontrados en diferentes tipos de algas juegan un papel importante contra varias enfermedades y procesos de envejecimiento de la célula ocasionados por el daño oxidativo (Tabla 5), los cuales varían según la especie, estatus fisiológico y condiciones medioambientales (Cornish y Garbary, 2010; Khaled *et al.*, 2012). Existen diferentes estudios, tanto *in vivo* como *in vitro*, en los que se ha demostrado los efectos antioxidantes de las alga contra diversos procesos degenerativos tales como aterogénesis (Kang *et al.*, 2003), diferentes tipos de cáncer (Yamamoto y Maruyama, 1985; Funahashi *et al.*, 2001; Mayer y Gustafson, 2003), procesos virales (Béress *et al.*, 1993; Talarico *et al.*, 2004; Yasuhara-Bell y Lu, 2010), desordenes neurodegenerativos (Luo *et al.*, 2009), deficiencia de retinol (Sangeetha *et al.*, 2009) osteoartritis (Shin *et al.*, 2006) infecciones bacterias (Nagayama *et al.*, 2002) etc. Sin

embargo, existen pocos estudios en los que se han evaluado las propiedades antioxidantes de las algas contra la toxicidad producidas por las AF. Estudios realizados por Abdel- Wahhab *et al.* (2006) observaron que al incorporar extractos de algas (*Laurencia obtusa* [Rhodophyta] y *Caulerpa prolifera* [Chlorophyta]) a dietas contaminadas con AF (3 mg de AF totales/kg de dieta por 6 días, posteriormente fueron tratados por administración oral con 200 µg de AFB₁ en forma pura/kg de alimento por 4 días) en ratas disminuía significativamente los efectos negativos de dichas toxinas principalmente en el consumo de alimento y ganancia de peso. Además los autores agregaron que al alimentar con los extractos de algas a ratas que estaban anteriormente sometidas a una dieta con AFB₁ se observaba una rápida recuperación en la ganancia de peso, además del perfil hemático disminuido por los efectos de las AF, a lo que concluyen que los extractos de algas tienen una acción quimio-protectora contra la carcinogénesis hepática inducida por las AFB₁ y además puede estimular el sistema de defensa antioxidante regenerando las células hepáticas. Lo antes mencionado coincide con Manoharan *et al.* (2008), quienes al alimentar ratas por 30 días con una dieta contaminada con AFB₁ (1 ppb) observaron una disminución en la ganancia de peso corporal y peso del hígado, así como la disminución total de proteína, albumina y aumento del total de bilirrubina en sangre. Estos efectos negativos ocasionados por las AFB₁ fueron contrarrestados por la administración del extracto acuoso de *Gracilaria corticaria* (250 mg/kg de peso corporal) a la dieta contaminada e incluso similares estadísticamente ($P < 0.05$) a la dieta control.

Tabla 5. Compuestos antioxidantes de las diferentes especies de macro-algas.

Categoría general de antioxidante	Especie	Alga Fuente	Referencia
Carotenoides	Rhodophyta	<i>Chondrus crispus</i>	Lohrmann <i>et al.</i> , 2004
Carotenoides	Rhodophyta	<i>Mastocarpus stellatus</i>	Lohrmann <i>et al.</i> , 2005
Carotenoides	Phaeophyceae	-----	Sachindra <i>et al.</i> , 2004
Carotenoides	Phaeophyceae	<i>Turbinaria ornata</i>	Kelman <i>et al.</i> , 2012
Carotenoides	Rhodophyta	<i>algas en general</i>	Schubert <i>et al.</i> , 2006
Carotenoides	Chlorophyta	<i>Ulva lactuca</i>	Abd El-Baky <i>et al.</i> , 2010
Pigmentos	Chlorophyta	<i>Ulva lactuca</i>	Abd El-Baky <i>et al.</i> , 2009
Polifenoles	Phaeophyceae	<i>Eisenia bicyclis</i>	Kang <i>et al.</i> , 2003
Polifenoles	Phaeophyceae	<i>Ecklonia Stolonifera</i>	Kang <i>et al.</i> , 2003
Polifenoles	Phaeophyceae	<i>Ecklonia cava</i>	Kang <i>et al.</i> , 2003
Polifenoles	Phaeophyceae	<i>Ecklonia kurome</i>	Kang <i>et al.</i> , 2003
Polifenoles	Chlorophyta	<i>Ulva fasciata</i>	Premalatha <i>et al.</i> , 2011
Polifenoles	Chlorophyta	<i>Chaetomorpha antennina</i>	Premalatha <i>et al.</i> , 2011
Polifenoles	Rhodophyta	<i>Gelidiella acerosa</i>	Davi <i>et al.</i> , 2008
Polifenoles	Chlorophyta	<i>Caulerpa racemosa var. macrophysa</i>	Yangthong <i>et al.</i> , 2009
Polifenoles	Rhodophyta	<i>Gracilaria tenuistipitata var. Tenuistipitata</i>	Yangthong <i>et al.</i> , 2009
Polifenoles	Chlorophyta	<i>Ulva lactuca</i>	Abd El-Baky <i>et al.</i> , 2009
Polifenoles	Phaeophyceae	<i>Sargassum sp.</i>	Yangthong <i>et al.</i> , 2009
Polifenoles	Chlorophyta	<i>Ulva lactuca</i>	Yangthong <i>et al.</i> , 2009
Polifenoles	Rhodophyta	<i>Palmaria palmata</i>	Yuan <i>et al.</i> , 2005
Polisacáridos Sulfatados	Phaeophyceae	<i>Turbinaria conoides</i>	Chattopadhyay <i>et al.</i> , 2010
Polisacáridos Sulfatados	Phaeophyceae	<i>Laminaria japonica</i>	Luo <i>et al.</i> , 2009
Polisacáridos Sulfatados	Phaeophyceae	<i>Sargassum pallidum</i>	Ye <i>et al.</i> , 2008
Polisacáridos Sulfatados	Phaeophyceae	<i>Fucus vesiculosus</i>	Rupérez <i>et al.</i> , 2002
Vitaminas	Rhodophyta	<i>Chondrus crispus</i>	Lohrmann <i>et al.</i> , 2004
Vitaminas	Phaeophyceae	<i>Sargassum sp.</i>	García-Casal <i>et al.</i> , 2009
Vitaminas	Chlorophyta	<i>Ulva sp.</i>	García-Casal <i>et al.</i> , 2007
Vitaminas	Rhodophyta	<i>Kappaphycus alvarezii</i>	Kumar <i>et al.</i> , 2008

Existen otros compuestos antioxidantes encontrados en diferentes plantas, los cuales se han demostrado tener una actividad protectora ante el consumo de AF, la ortiga (planta *Urtica*) (Figura 15) ha sido usada como medicina popular contra el tratamiento de varias enfermedades y además como alimento saludable en Europa (Watt y Breyer-Brandwisk, 1962). Pieroni *et al.* (2002) encontraron que *Urtica dioica* presenta una actividad antioxidante inhibiendo (>50%) la peroxidación de lípidos, el cual juega un rol muy importante en la biosíntesis de las AF (Passi *et al.*, 1984). Por su parte Abdel-Wahhab *et al.* (2005) encontraron que el mayor componente del extracto *Urtica urens* L. es el Patuletin y utilizo este principio activo para aminorar los efectos del consumo de AFB₁ (2mg/kg de peso corporal) y observo que la inclusión de dosis de 7.5 mg de Patuletin/ kg de peso corporal es un eficiente antioxidante en estos animales de laboratorio, ya que restaura los niveles de GPx y SOD disminuidos durante la aflatoxicosis. En adición los autores mencionan que el Patuletin encontrado en la *Urtica urens* además es biológicamente activo como antiinflamatorio, analgésico, antimicrobial y posee un efecto protector en el hígado y riñones. Otro compuesto que se ha demostrado que mitiga el daño hepático provocado por las AFB₁ es el “árbol de la laca” (*Rhus verniciflua*) (Figura 16), el cual ha sido tradicionalmente utilizado como planta herbolaria y aditivo alimenticio en Corea, esta planta es conocida por sus varios activos biológicos como antioxidante, antiinflamatorio y efectos anticancerígenos (Lee *et al.*, 2001). Estudios realizados por Choi *et al.* (2010) encontraron que la fracción cloroformo-metanol de *Rhus verniciflua* posee un efecto protector ante el daño hepático en ratones provocado por la administración de AFB₁ (0.75 mg/Kg de peso administrado cada 3er día, durante 30 días), los principales resultados fueron un aumento de los niveles de GSH, SOD y GST disminuidos por el consumo de dichas toxinas. Los autores concluyen que la fracción cloroformo-metanol de *Rhus verniciflua* tiene un efecto potencial antioxidante, ya que estimula tanto del sistema antioxidante enzimático como el no-enzimático del organismo.



Figura 15. Planta *Urtica* (imagen de Wikimedia Commons)



Figura 16. *Rhus verniciflua* (imagen de Wikimedia Commons)

4.7. Expresión de genes en Camarón.

Existen tecnologías eficaces, que nos pueden ayudar a examinar los patrones de expresión génica y las clases funcionales importantes para las respuestas en el estrés, nutrición, toxicología, y la función inmune en el organismo (Tilton *et al.*, 2005). La aplicación de recientes técnicas desarrolladas para la expresión génica en estudios toxicológicos (toxicogenómica) facilita la interpretación del modo de acción de un

compuesto tóxico y además puede predecir los efectos del tóxico seleccionado basados en los cambios en la expresión de genes (Ellinger-Ziegelbauer *et al.*, 2005). El nuevo enfoque llamado toxicogenómica, surge del proyecto del genoma humano. En lugar de utilizar la patología animal para identificar enfermedades, esta utiliza sondas de material genético humano o animal impreso en placas llamadas microarreglos (Lovett, 2000). La ventaja que tiene los microarreglos radica en que permite al investigador monitorear los niveles de expresión de miles de genes diferentes a la vez. Para la investigación en toxicogenómica es un importante avance, ya que esta herramienta permite identificar los riesgos ambientales y sus efectos en el ADN (Medlin, 1999). Existen trabajos de toxicogenómica donde se averigua el modo de acción de carcinógenos mayoritariamente en animales terrestres (Ellinger-Ziegelbauer *et al.*, 2004; Ellinger-Ziegelbauer *et al.*, 2005; Yarru *et al.*, 2009; Yarru *et al.*, 2009), pero también en diversas especies de organismos acuáticos, tales como trucha (Gallagher, 2006; Tilton *et al.*, 2005)

Los microarreglos contienen secuencias únicas que han sido construidas sobre una base de información de las secuencias EST (estos derivan de librerías de cDNA y SSH clones construidos de varios tejidos o de postlarvas completas, hepatopáncreas, hemocitos y órgano linfóide) (Aoki *et al.*, 2011) y para el caso del camarón se han utilizado para investigar el perfil de expresión génica después de la exposición a un patógeno i. e. WSSV, YHV y bacterias como *Vibrio* (Robalino *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008; Pongsomboon *et al.*, 2008), tratamientos con antibióticos i. e. peptidoglucanos, ácido oxolínico, oxitetraciclina (Fagutao *et al.*, 2008; Fagutao *et al.*, 2009) y estrés del ambiente i. e. hipoxia, hipertermia y respuestas hipoosmóticas (de la Vega *et al.*, 2007).

Hasta el momento según Tassanakajon *et al.* (2013) la información actualmente disponible para peneidos es muy reducida en comparación a otros invertebrados como los insectos y consta de 216,436 secuencias EST, siendo esto solamente 0.3% del número total de EST's, encontradas en el GenBank, y de estas compuestas de 161241 EST's para *L. vannamei*, 39,397 EST's para *P. monodon*, 10,446 EST's para *Fenneropenaeus chinensis* y 5352 para otros camarones peneidos (Tassanakajon *et al.*, 2006; O'Leary *et al.*, 2006; Xiang *et al.*, 2008). Los estudios realizados con microarreglos en animales acuáticos tratados con AF, se ha basado en salmónidos, debido a que es un modelo de investigación de excelencia para el estudio de hepatocarcinogenesis inducida por la AFB₁ (Bailey *et al.*, 1996), y los resultados obtenidos sugieren que el número de genes asociados con el metabolismo de lípidos,

glucosa y retinol son reprimidos por el cancerígeno, además de observarse el mismo efecto en proteínas específicas del hígado involucradas en la vitalogénesis, acompañado de una alteración en los genes involucrados en la asociación de la matriz-membrana, migración celular y metástasis lo que puede indicar una potencial invasión tumoral (Tilton *et al.*, 2005; Gallagher, 2006). Para el caso de crustáceos y específicamente para camarón no existe información al respecto.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Área de trabajo:

Los diferentes experimentos en los que se evaluaron los efectos de las AF en dietas de camarón *L. vannamei* así como los diferentes productos remediadores fueron realizados en la sala de bioensayos del programa de Maricultura, que forma parte del departamento de Ecología, de la Universidad Autónoma de Nuevo León (Figura 17). La cual consta de un sistema de recirculación marina sintética (Fritz, Dallas, TX), cuatro tanques centrales de 500 L cada uno con doble fondo y con un sistema de recirculación de aire (“air lift”), dos tanques colectores que funcionan como tanques de sedimentación de 1500 L que se encuentran en la parte inferior del sistema, y un tercer tanque de succión que se encuentra entre los dos colectores y reciben agua de ellos, en la parte superior se encuentran dos tanques reservorios (1500 L cada uno) con un sistema de regulación de temperatura por intercambio y que suministra de agua al sistema por medio de gravedad, además de contar con un filtro (contactor) biológico, filtro de perlas, filtro de luz UV, filtro de carbón activado, filtro de cartucho de 50 micras y fraccionadores de espuma.

Los parámetros de calidad del agua marina fueron registrados diariamente para temperatura y salinidad, y semanalmente el pH, Amonio, Nitratos y Nitritos durante los bioensayo realizados. Los parámetros de calidad fueron medidos utilizando los siguientes kits FasTest, Aquarium Systems, France. Los parámetros de calidad para cada experimento se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Parámetros de calidad de agua para cada uno de los experimentos

N de Bioensayo	Temperatura (°C)	Salinidad (g/L)	pH	Amoniaco total (mg/L)	Nitritos (mg/L)	Nitratos (mg/L)
Bioensayo 1	24-29	34-37	8.0-8.2	0-0.2	0-0.04	10
Bioensayo 2	29-30	32-38	8.0-8.2	0-0.2	0-0.03	50
Bioensayo 3	29-30	32-37	8.0-8.2	0-0.2	0-0.03	40
Bioensayo 4	27-30	32-37	8.0-8.2	0-0.2	0-0.03	50
Bioensayo 5	27-29	30-33	8.0-8.2	0	0-0.03	40
Bioensayo 6	27-29	33-35	8.0-8.2	0.25	0-0.02	40
Bioensayo 7	27-30	33-35	8.0-8.2	0-0.2	0-0.02	40

Las unidades experimentales de los distintos bioensayos constan de acuarios de 60 y 120 L de fibra de vidrio (con una tasa de recirculación de 300% al día), conectados al sistema de recirculación del agua marina y un sistema de recirculación de aire interno (“air lift”). El fotoperiodo durante los experimentos fue de 12:12 h luz:oscuridad.



Figura 17. Sala de bioensayos del programa Maricultura de la facultad de Ciencias Biológicas de la UANL

5.2. Material biológico

5.2.1. Origen y manejo de los camarones:

Todos los camarones utilizados en los diferentes experimentos, fueron juveniles de la especie *Litopenaeus vannamei*. El origen y el peso promedio de los camarones utilizados para cada experimento se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7. Peso promedio (g) y origen de los camarones utilizados en cada uno de los experimentos.

	Peso promedio (g)	Origen
Bioensayo 1	0.12	Laboratorio de Langostinos y Camarones en Boca del Río, Veracruz, México
Bioensayo 2	0.6	Laboratorio de Langostinos y Camarones en Boca del Río, Veracruz, México
Bioensayo 3	0.34	Laboratorio de Langostinos y Camarones en Boca del Río, Veracruz, México
Bioensayo 4	0.29	Laboratorio de Langostinos y Camarones en Boca del Río, Veracruz, México
Bioensayo 5	0.4	Laboratorio de Langostinos y Camarones en Boca del Río, Veracruz, México
Bioensayo 6	0.51	Laboratorio de Langostinos y Camarones en Boca del Río, Veracruz, México
Bioensayo 7	6.5	Maricultura del Pacifico, Mazatlán, Sinaloa, México

Los juveniles de camarón eran enviados por vía aérea, en bolsas de plástico con 15 L de agua marina saturada de oxígeno, colocadas en hieleras de polietileno bien cerradas y protegidas con cajas de cartón, hasta el aeropuerto internacional de Monterrey, posteriormente eran traídos al laboratorio para su aclimatación. Una vez en las instalaciones de la UANL, los camarones se aclimataban a las condiciones de pH, salinidad, y temperatura dentro de los acuarios centrales de 500 L. una vez aclimatados, los organismos eran alimentados con dietas comerciales hasta antes del inicio de los experimentos.

5.2.2. Granos contaminados.

Para los diferentes experimentos se utilizaron granos de maíz y cacahuete contaminados naturalmente por la empresa Nutek, Tehuacán, Puebla, México. El proceso de contaminación utilizado fue el descrito por Shotwell *et al.* (1966). De forma breve, se preparó un inóculo fungal a partir de cultivos de esporas únicas de *Aspergillus parasiticus* y se cultivó durante 5 días a 25°C en un medio de agar papa dextrosa comercial (en placas). Los granos se incubaron con esporas de *A. parasiticus* (1×10^6) durante 7 días a 28°C. Posteriormente la muestra contaminada se esterilizó durante 30 min a 121°C y se dejó secar durante 4 días a temperatura ambiente con circulación de aire. La muestra de granos contaminados se molió hasta alcanzar un tamaño de partícula promedio de 850 μm (malla #20). La concentración de AF B1, B2, G1 y G2 en los ingredientes fue determinado por el laboratorio de Nutek por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés) y empleando el método 2005.08 First Action 2005, AOAC 2006).

5.2.3. Ingredientes utilizados.

Los ingredientes utilizados para las dietas experimentales y su procedencia se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8. Ingredientes utilizados para la elaboración de las dietas experimentales.

Ingrediente (% de proteína)	Origen
Harina de pescado (67)	Inual-Tepual (Chile)
Pasta de soya (43.5%)	RAGASA
Harina de trigo (11.3%)	MANITOVA
Harina de camarón (42%)	Inual-Tepual (Chile)
Harina de maíz libre de AF (7.7%)	NUTEK
Harina de maíz contaminado con AF (12.7%)	NUTEK
Harina de Cacahuete contaminado (12.2%)	NUTEK
Aceite de pescado	Inual-Tepual (Chile)
Lecitina de soya	Proteínas Naturales S. A
Vitamina C, stay C	CostaMar
¹ Mezcla mineral	CostaMar
² Mezcla vitamínica	CostaMar
Antifúngico	CostaMar
Antioxidante	CostaMar
Vitamina E	CostaMar

¹La composición de la mezcla de minerales fue: Co, 2 g kg⁻¹; Mn, 16 g kg⁻¹; Zn, 40 g kg⁻¹; Cu, 20 g kg⁻¹; Fe, 1 mg kg⁻¹; Se, 100 mg kg⁻¹; I, 2 g kg⁻¹.

²La composición de vitaminas fue: retinol, 4000 IU g⁻¹; tiamina, 24 g kg⁻¹; riboflavina, 16 g kg⁻¹; DL Ca pantotenato, 30 g kg⁻¹; piridoxina, 30 g kg⁻¹; cianocobalamina, 80 mg kg⁻¹; ácido ascórbico, 60 g kg⁻¹; menadiona, 16 g kg⁻¹; colecalciferol, 3200 IU g⁻¹; tocoferol, 60 g kg⁻¹; biotina, 400 mg kg⁻¹; niacina, 20 mg kg⁻¹; ácido fólico, 4 g kg⁻¹.

5.3. Dietas experimentales.

5.3.1 Formulación y elaboración de dietas experimentales.

Las dietas experimentales fueron elaboradas en el laboratorio de Maricultura, se realizaron a partir de una fórmula de referencia la cual fue utilizada como dieta control (elaborada con la misma fuente de ingredientes en todos los bioensayos). Esta fórmula fue elaborada utilizando el programa Nutrion 5, la cual fue modificada ligeramente de acuerdo con las necesidades para cada experimento. Para la elaboración de las dietas experimentales, se molieron todos los ingredientes a un mismo tamaño de partícula (500 µm) en un molino Cyclotec modelo 1093. Todos los ingredientes fueron pesados por separado, posteriormente fueron mezclados en una batidora Kitchen Aid de 5L. Los ingredientes de mayor proporción se mezclaron durante 10 min. Separadamente se mezclaron los microingredientes a mano durante 5 minutos agitando constantemente el contenedor donde se encontraban estos ingredientes; posteriormente los microingredientes fueron incorporados a los macroingredientes y se mezclaron durante 10 min; después se adicionó el aceite de pescado y la lecitina de soya, estos últimos ingredientes fueron previamente puestos a baño maría con la finalidad de aumentar su fluidez, y se mezcló por 10 min. Después se adicionaron alrededor de 30% de agua tibia, para lograr una masa que posteriormente se pasara a través de un molino de carne TOR-REY con un dado de 1.6 mm de diámetro, al salir del barril del molino se tomó la temperatura que alcanzó durante el peletizado (la cual osciló entre 70 °C al inicio del peletizado a 90 °C al final del mismo). Posteriormente los pellet, fueron colocados en una malla de 3300 micras con dimensiones de 20 X 20 X 2.5 cm las cuales se cubrieron con una doble tapa de papel aluminio, estas charolas fueron colocadas en la autoclave una sobre otra, se cerró la olla y se dejó en esterilización por 5 min a una presión de 18.5 psi, posteriormente las muestras de alimento fueron envueltas en una bolsa de plástico y fueron colocadas en el refrigerador durante 5 min y finalmente fueron secados en un horno de convección a 100°C durante 8 minutos o más para obtener una humedad menor a 10% y finalmente se dejaron enfriar toda la noche y posteriormente fueron guardadas en bolsas Ziplo y colocadas en el refrigerador hasta su utilización.

5.3.2. Análisis físicos de las dietas experimentales.

Se determinó la estabilidad de las dietas experimentales en términos de pérdida de materia seca (PMS) y pérdida de proteína (PP); se realizaron las pruebas de lixiviación de los alimentos, con tres replicados, utilizando el método Ricque *et al.*, (2006), en el horno eléctrico de flujo de aire se calienta a 130°C por 20 min una malla metálica de acero inoxidable #40 (apertura de malla 435 µm), después se colocan en el desecador de vidrio dejándolo enfriar hasta que alcance la temperatura ambiente (aprox. 5 min) y se pesa la malla para posteriormente moldearse en el embudo de bunchner; en un recipiente de capacidad de 250 ml se añadió 3 g de muestra, después se agregan 200ml de agua salina de 35 g/L; el recipiente se coloca en un agitador con baño maría a una temperatura de 26 a 29°C con una agitación de 30 rpm. Después de una hora se retira el recipiente para ser filtrado con la ayuda de vacío en el embudo de buchner con las mallas previamente taradas en el horno electrónico. Después se deja escurrir por 15 min y se toma el peso de la malla (malla más muestra húmeda), posteriormente se deja secar en el horno a 130°C por 2 horas, concluyendo el tiempo se toma el peso final (malla más muestra seca) y se realiza el siguiente cálculo:

- %PMS= [(Peso del alimento en base seca antes de lixiviar- Peso del alimento en base seca después de lixiviar)/ Peso del alimento en base seca antes de lixiviar]* 100
- %PP= [(% de proteína en el alimento*100-(% de proteína en el alimento lixiviado)*(100-% pérdida de materia seca en el alimento)] / % proteína en el alimento

El porcentaje de absorción de agua (Abs. H₂O) de las dietas experimentales fue determinado siguiendo la metodología de Nieto-López *et al.* (2011): se pesaron 3 g de muestra y se dejaron sumergidos en una hora en 200 ml de agua a 35 g/L, posteriormente la muestra fue filtrada en una malla de acero inoxidable #40 y se tomó el peso, el porcentaje de absorción de agua se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Abs. H}_2\text{O} = 100 * [(\text{Peso de la muestra después de sumergirla en agua destilada} - \text{Peso de la muestra antes de humedecer}) / \text{Peso de la muestra antes de humedecer}] * 100$$

5.3.3 Análisis bromatológicos y de micotoxinas en ingredientes y dietas experimentales.

Los análisis bromatológicos se realizaron en el laboratorio de bromatología del programa de Maricultura de la UANL. La composición bromatológica de los ingredientes y dietas experimentales se analizaron utilizando los siguientes métodos: Dumas (equipo LECO) para proteína, Soxhlet para lípidos (Tecator, 1983), AOAC 942.05 (1997) para ceniza, AOAC 962.09 (1997) para fibra, y AOAC 930.15 (1997) para humedad y el extracto libre de nitrógeno (ELN) se calculó por diferencia. La energía bruta (Kcal/g) se determinó con el método de calorimetría a volumen constante en una bomba calorimétrica modelo Parr 1425 (Parr Instrument Co., Moline, IL, USA). La concentración de AF (B₁, B₂, G₁, G₂) de los ingredientes y las dietas experimentales fueron analizadas por HPLC (método 999.07; AOAC, 2006) en Trilogy Analytical Laboratories en Washington, MO. Las dietas control también fueron analizadas para Deoxinavalenol (MacDonald *et al.*, 2005), Fumonisina B₁, B₂ y B₃ (método 49.5.02; AOAC Int., 2002); Ocratoxina A (método 2000.03; AOAC Int. 2002) y toxina T-2 (Croteau *et al.*, 1994).

5.4. Parámetros zootécnicos.

Los parámetros zootécnicos evaluados en cada uno de los experimentos (si aplica) cada 7 o 14 días y al final del bioensayo fueron:

Peso individual (PI): los camarones fueron pesados individualmente en una balanza digital con precisión de un miligramo, después de haber sido ligeramente secado con una toalla húmeda.

Tasa de sobrevivencia: el número final de camarones en cada acuario en porcentaje del número inicial. Tasa de sobrevivencia = (número final / número inicial) X 100.

Consumo de alimento (CA): el consumo de alimento se estimó cada día, a partir de la cantidad de alimento suministrado en cada acuario, del porcentaje de restos de alimento estimado al día siguiente y del número de camarones presentes ese día en el acuario. Para cada acuario el consumo fue la suma del consumo individual diario estimado a lo largo de toda la duración del bioensayo. Consumo individual = \sum_1^x (consumo en el acuario al día i / número de camarones del día i).

Tasa de crecimiento (TC): es el porcentaje de crecimiento por camarón con respecto al peso inicial. TC = (ganancia de peso (g) / peso inicial promedio) X 100.

Índice Hepatosomático (IHS): se define como el aumento de peso del hepatopáncreas con relación al peso completo del camarón $IHS = (\text{hepatopáncreas (g)}/\text{peso individual (g)}) \times 100$.

Tasa de crecimiento específico (TCE): se define como el aumento de peso o masa con respecto a una unidad de tiempo. $TCE = 100(\text{In peso promedio final} - \text{In peso promedio inicial}) / \text{número de días}$.

Tasa de conversión alimenticia (TCA): es el alimento artificial (base húmeda) consumido por unidad de peso ganado. $TCA = \text{consumo individual estimado en un acuario} / \text{incremento en peso individual promedio en este mismo acuario}$.

Eficiencia de retención de nitrógeno (ERN): es la deposición de nitrógeno con respecto al nitrógeno consumido. Esta variable es calculada para cada tratamiento del nitrógeno inicial contenido en el camarón y el nitrógeno final contenido en el camarón. $ERN: [((\text{peso promedio final (g)} * \text{proteína cruda contenida en el carcás (g)}) - (\text{peso promedio inicial (g)} * \text{proteína cruda contenida en el carcás (g)}) / \text{proteína cruda consumida (g)}) * 100$.

5.5. Análisis histológico.

Al final del experimento se tomaron 3 camarones por acuario y se fijaron en solución Davidson (solución AFA [alcohol, formalina y ácido acético]) para el análisis histológico realizado en el Laboratorio de Patología Acuícola de la Universidad de Arizona, en Tucson. Las muestras se procesaron según las técnicas convencionales para la incrustación en parafina y cortes. Las secciones longitudinales del cefalotórax y secciones transversales del primer segmento del abdomen de los juveniles fueron teñidas con Hematoxilina/eosina-Floxina (H&E) de Mayer-Bennet y se examinaron con un microscopio de luz para su evaluación diagnóstica. La evaluación del daño histológico se realizó mediante el método cualitativo. La cantidad de reservas lipídicas se evaluó en una escala de 0 a 4, donde L4= el citoplasma de la mayoría de la células R completamente lleno de vacuolas o gotas de lípidos (76-100% de la supuesta capacidad de las células R del hepatopáncreas); L3= el citoplasma de la mayoría de las células R con muchas vacuolas o gotas de lípidos (51-75% del nivel L4); L2= se observa una mezcla de células R sin o con una cantidad pequeña o moderada de vacuolas o gotas de lípidos (26-50 de L4); L1= células R con gotas de lípidos pequeñas o escasamente distribuidas (10-25 de L4); y L0= células R sin vacuolas o gotas de lípidos o focos

dispersos de células R con solo unas cuantas gotas (<10% de L4). El grado de severidad del daño celular en el hepatopáncreas se determinó con una escala de 0 a 4 donde 0 indica ausencia de daño, 1 indica daño disperso (pocos núcleos anómalos, la mayoría de los túbulos del hepatopáncreas no afectados, ausencia de descamación de células epiteliales hacia el lumen), 2 indica daño frecuente (frecuentes núcleos anómalos en numerosos túbulos del hepatopáncreas, alguna separación de las células infectadas de sus vecinos, descamación epitelial poco frecuentes), 3 indica daño abundante (la mayoría de los túbulos del hepatopáncreas con muchos núcleos anómalos, separación de un gran número de células infectadas de sus células vecinas, poca descamación de células infectadas hacia el lumen, algunos túbulos degenerados), y 4 indica daño severo (la mayoría de los túbulos del hepatopáncreas con células con muchos núcleos anómalos, separación y apoptosis aparente de un gran número de células infectadas, descamación de un gran número de células epiteliales en el lumen, degeneración de túbulos, frecuentemente involucrando las células epiteliales del intestino medio). La actividad mitótica de las células E se estimó considerando el total de células en metafase observadas en la sección apical de los túbulos del hepatopáncreas, usando el número de células en metafase encontrados en camarones normales y saludables como referencia (100%). La actividad de las células B se estimó considerando el número relativo de estas en todo el hepatopáncreas expresado como porcentaje en la máxima abundancia observada en camarones normales y saludables.

5.6. Estrategia experimental.

5.6.1. Efecto de la inclusión de AF en dietas a dosis altas en parámetros zootécnicos del camarón (Experimento 1).

Se llevó a cabo un bioensayo con 28 días de duración para observar los efectos de las AF a dosis altas en el alimento sobre los parámetros zootécnicos del camarón blanco, se formularon cuatro dietas con 0, 500, 1000, 2000 ppb de AF totales. Para la elaboración de estas dietas se utilizó harina de maíz libre de AF y para las dietas contaminadas se sustituyó por maíz contaminado dependiendo el nivel de contaminación requerido en las dietas (Tabla 9). Se utilizaron 6 replicados (acuarios de 60L con doble fondo) por dieta; se distribuyeron 15 camarones juveniles *L. vannamei* por acuario, con un peso promedio inicial de 121 ± 16 mg. Los camarones fueron alimentados a saciedad en 2 raciones diarias (9:00 y 17:00h). Se evaluaron los parámetros zootécnicos de los camarones cada 7 días y al final del experimento, se

tomaron 3 camarones por acuario para realizar análisis histológico, 3 más para análisis de AF en carcas y el resto de ellos se analizaron para el contenido de proteína en carcas para evaluar la ERN, además se realizó análisis bromatológico y físico a las dietas experimentales.

Tabla 9. Formulación para las dietas experimentales del experimento 1.

Ingrediente (%)	Dieta Control (DCL)	Dieta 2 (500 µg/kg)	Dieta 3 (1000 µg/kg)	Dieta 4 (2000 µg/kg)
Harina de pescado	388.6	387.5	386.4	384.2
Harina de Trigo	381.17	382.28	383.40	385.57
Harina de maíz limpio	52.63	39.46	26.3	0
Harina de maíz contaminado	0	13.16	26.3	52.63
Harina de camarón	40	40	40	40
Harina de soya	80	80	80	80
Aceite de pescado	20	20	20	20
Lecitina de soya	20	20	20	20
Arginato	10	10	10	10
Mezcla vitamínica	3.5	3.5	3.5	3.5
Mezcla mineral	2.5	2.5	2.5	2.5
Antioxidante	0.5	0.5	0.5	0.5
Antifungico	0.5	0.5	0.5	0.5
Vitamina C	0.2	0.2	0.2	0.2
Colesterol	0.2	0.2	0.2	0.2
Vitamina E	0.2	0.2	0.2	0.2
Total g	1000	1000	1000	1000

5.6.2. Efecto de la inclusión de AF en dietas a dosis bajas en parámetros zootécnicos del camarón (Experimento 2).

Para determinar el efecto del alimento contaminado con AF en dosis bajas sobre los parámetros zootécnicos en camarón blanco *L. vannamei*, se llevó a cabo un

bioensayo con una duración de 64 días donde se formularon 6 dietas que contenían 0, 10, 20, 40, 60 y 120 ppb de AF totales. Para la elaboración de las dietas contaminadas se agregó harina de cacahuete contaminada (se ajustó el nivel de inclusión con la harina de trigo y harina de pescado) (Tabla 10). Cada dieta se evaluó en 3 replicados (acuarios de 60L con doble fondo) que contenían 10 camarones con un peso promedio de 614 ± 7 mg. Los camarones fueron alimentados a saciedad en 2 raciones diarias (9:00 y 17:00h). Se evaluaron los parámetros zootécnicos de los camarones cada 7 días y al final del experimento se tomaron 3 camarones por acuario para realizar el análisis histológico, y el resto de ellos se analizaron para el contenido de proteína en carcas para evaluar ERN, además de realizar análisis bromatológico y físico a las dietas experimentales.

Tabla 10. Formulación para las dietas experimentales del experimento 2.

Ingrediente	Dieta 1 control	Dieta 2 10 µg/kg	Dieta 3 20 µg/kg	Dieta 4 40 µg/kg	Dieta 5 60 µg/kg	Dieta 6 120 µg/kg
Harina de pescado	384.62	384.53	384.39	384.16	383.70	382.77
Harina de Trigo	439.828	439.69	439.483	439.139	438.450	437.074
Harina de camarón	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0
Harina de soya	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0
Aceite de pescado	19.0	19.0	19.0	19.0	19.0	19.0
Lecitina de soya	19.0	19.0	19.0	19.0	19.0	19.0
Arginato	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Mezcla vitaminica	3.5.0	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Mezcla mineral	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Antioxidante	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Antifungico	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Vitamina C	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Colesterol	0.146	0.147	0.147	0.148	0.149	0.150
Vitamina E	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Harina de Cacahuete contaminado	0.0	0.23	0.575	1.149	2.298	4.597
Total (g)	1000	1000	1000	1000	1000	1000

5.6.3. Capacidad de reducción de aflatoxicosis en camarones alimentados con dietas contaminadas con AF y suplementadas con aluminosilicatos (experimento 3)

En la tabla 11 se muestra los productos secuestrantes a base de aluminosilicatos evaluados en dietas para camarón blanco *L. vannamei* por 42 días.

Tabla 11. Producto, composición y procedencia de los productos secuestrantes a base de aluminosilicatos evaluados en el presente bioensayo.

Producto	Procedencia	Propiedades Fisicoquímicas
Novasil Plus®	Trouw Nutrition	<ul style="list-style-type: none"> • HSCAS • Montmorillonita de Ca • 62.4–73.5% SiO₂ • 14.8–18.2% Al₂O₃ • 3.2–4.8% CaO • 4.0–4.5% MgO • 5.4–6.5% Fe₂O₃ • 0.5–0.9% K₂O • 0.1–0.3% Na₂O • 0.01–0.03% MnO
Zeolex Extra®	Altech	<ul style="list-style-type: none"> • Organoaluminosilicato químicamente activado • 57–64% SiO₂ • 10–17% Al₂O₃ • 3.3–4.9% CaO • 0.3–1.8% MgO • 0.6–1.4% Fe₂O₃ • 1.8–2.8% K₂O • 1.6–2.9% Na₂O
Mycifix Select®	Biomin	<ul style="list-style-type: none"> • Tierra de diatomeas 30% • Caolinita 50% • Sustancias fitofíticas 10% • Extractos herbales 10%
Fixat®	Süd-Chemie	<ul style="list-style-type: none"> • Bentonita montmorillonita • 50–65% SiO₂ • 15–25% Al₂O₃ • 3–6% CaO • 3–6% MgO • 3–6% Fe₂O₃ • <5% Na₂O y K₂O

Para el presente bioensayo se elaboraron dos dietas controles, una dieta libre de micotoxinas y otra dieta contaminada con 75 ppb de AF totales, a partir de estas se elaboraron 8 dietas más conteniendo uno de los secuestrantes a un nivel de 2.5 a 5.0

g/kg de acuerdo con el nivel recomendado para cada producto (Tabla 12). Para la elaboración de las dietas contaminadas se utilizó harina de maíz contaminado (reemplazando a la harina de trigo) y las arcillas fueron incorporadas junto con los micronutrientes al momento de la elaboración de la dieta. Cada tratamiento se evaluó en 3 replicados (acuarios de 60L con doble fondo) con una densidad de 10 camarones por acuario con un peso promedio inicial de 592 ± 6 mg. Los camarones fueron alimentados a saciedad en 2 raciones diarias (9:00 y 17:00h). Se evaluaron los parámetros zootécnicos de los camarones cada 7 días y al final del experimento se analizó el contenido de proteínas en carcas de camarón para evaluar ERN, además de realizar análisis bromatológico y físico a las dietas experimentales.

Tabla 12. Formulación para las dietas experimentales del experimento 3.

Ingredientes	control		Zeolex Extra®		Micofix Select®		Novasil Plus®		Fixat®	
	AF	control	AF + Zeolex Extra®	Zeolex Extra®	AF + Micofix Select®	Micofix Select®	AF + Novasil Plus®	Novasil Plus®	AF + Fixat®	Fixat®
Harina de Trigo	427.9	439.8	424.9	436.8	425.4	437.3	422.9	434.8	423.9	435.8
Harina de pescado	384.4	384.6	384.4	384.6	384.4	384.6	384.4	384.6	384.4	384.6
Harina de Soya	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80
Harina de Camarón	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
Lecitina de soya	19	19	19.9	19	19.9	19	19.9	19	19.9	19
Aceite de pescado	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19
Harina de maíz contaminado	11.1	-	11.1	-	11.1	-	11.1	-	11.1	-
Arginato	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Mezcla vitamínica	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Mezcla Mineral	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Antioxidante	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Antifúngico	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Colesterol	0.2	0.14	0.2	0.14	0.2	0.14	0.2	0.14	0.2	0.14
Vitamina C	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Vitamina E	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Zeolex extra®	-	-	3	3	-	-	-	-	-	-
Micofix select®	-	-	-	-	2.5	2.5	-	-	-	-
Novasil plus®	-	-	-	-	-	-	5	5	-	-
Fixat®	-	-	-	-	-	-	-	-	4	4
Total (g)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

5.6.4. Capacidad de reducción de aflatoxicosis en camarones alimentados con dietas contaminadas con AF y suplementadas con mezclas de aluminosilicatos con paredes de levadura y otros productos (Experimento 4)

En la tabla 13 se muestra las mezclas de aluminosilicatos con enzimas/extractos de plantas/paredes de levaduras o microorganismos como posibles remediadores de AF en alimentos para camarón blanco *L. vannamei* evaluados por 42 días.

Tabla 13. Producto, procedencia y composición de las mezclas remediadoras evaluadas en el presente bioensayo.

Producto	Procedencia	Propiedades Fisicoquímicas
Aflabalan [®]	Técnica Mineral	<ul style="list-style-type: none"> • Zeolita • Paredes celulares de levadura
Mycosorb [®]	Altech	<ul style="list-style-type: none"> • Glucomanano de paredes de levadura de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> • Aluminosilicato de calcio y sodio hidratado
Mycifix Plus [®]	Biomin	<ul style="list-style-type: none"> • Bentonita • Levadura <i>Trichosporon mycotoxinivorans</i> • Epoxidasa • Lactonasa

Para esto elaboraron dos dietas controles, una libre de AF y otra contaminada con 75 ppb de AF totales, a partir de estas se elaboraron 6 dietas más conteniendo una de las mezclas remediadoras a un nivel de 2.5 a 5 g/kg de acuerdo con el nivel recomendado para cada producto (Tabla 14). Para la elaboración de las dietas contaminadas se utilizó harina de maíz contaminado (reemplazando a la harina de trigo) y las mezclas remediadoras fueron incorporadas junto con los micro-nutrientes al momento de la elaboración de la dieta. Cada tratamiento se evaluó en 4 replicados (acuarios de 60 L sin doble fondo) con una densidad de 10 camarones por acuario con un peso promedio inicial de 210±4mg. Los camarones fueron alimentados a saciedad en 2 raciones diarias (9:00 y 17:00h). Se evaluaron los parámetros zootécnicos de los camarones cada 7 días y al final del experimento se analizó el contenido de proteínas en carcas de camarón para evaluar ERN, además de realizar análisis bromatológico y físico a las dietas experimentales.

Tabla 14. Formulación para las dietas experimentales del experimento 4.

Ingrediente	control		Aflabalan®		Micofix Plus®		Mycosorb®	
	AF	control	AF + Aflabalan®	Aflabalan®	AF + Mycofix plus®	Mycofix plus®	AF + Mycosorb®	Mycosorb®
Harina de trigo	427.9	439.8	425.9	437.8	425.4	437.3	425.9	437.8
Harina de pescado	384.4	384.6	384.4	384.6	384.4	384.6	384.4	384.6
Pasta de soya	80	80	80	80	80	80	80	80
Harina de camarón	40	40	40	40	40	40	40	40
Lecitina de soya	19.9	19	19.9	19	19.9	19	19.9	19
Aceite de pescado	19	19	19	19	19	19	19	19
Maíz contaminado	11.1	-	11.1	-	11.1	-	11.1	-
Alginato	10	10	10	10	10	10	10	10
Mezcla vitamínica	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Mezcla mineral	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Antioxidante	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Antifungico	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Solvay	0.2	0.146	0.2	0.146	0.2	0.146	0.2	0.146
Vitamina C	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Vitamina E	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Aflabalan®	-	-	2.0	2.0	-	-	-	-
Mycofix plus®	-	-	-	-	2.5	2.5	-	-
Mycosorb®							2.0	2.0
Total (g)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

5.6.5. Capacidad de reducción de aflatoxicosis en camarones alimentados con dietas contaminadas con AF y suplementadas con diferentes fuentes de antioxidantes (Experimento 5)

En la tabla 15 se muestran los productos antioxidantes como posibles bio-remediadores de AF en alimentos para camarón blanco *L. vannamei* evaluados por 42 días

Tabla 15. Producto, procedencia y propiedades de los Antioxidantes evaluados en el presente bioensayo.

Producto	Procedencia	Descripción
Harina de Alga	Algalimentos	<i>Ulva clathrata</i>
Curcumina	SIGMA	Polvo con 70% de pureza N de Catalogo 1386-106 N de lote 081M1611V
Ácido Linoleico Conjugado (CLA)	Nutra Manufacturing Inc.	CLA (55%) de aceite de Girasol (<i>Helianthus annuus</i>)

Para esto se elaboraron 2 dietas, una libre de AF y otra contaminada con 120 ppb de AF totales, a partir de estas se elaboraron 6 dietas más conteniendo uno de los antioxidantes a evaluar. Los niveles de inclusión para la *Ulva*, curcumina y CLA fueron de 40.0, 0.14 y 4.0 g/kg respectivamente (Tabla 16). Para la elaboración de las dietas contaminadas se utilizó harina de maíz contaminado (reemplazando a la harina de trigo), en el caso de las dietas que contenían alga, esta fue incorporada como harina junto con los macro-ingredientes durante la elaboración del alimento y para el caso de la curcumina y el CLA se incorporaron junto con los micro-ingredientes. Cada tratamiento se evaluó en 3 replicados (acuarios de 60L sin doble fondo) con una densidad de 12 camarones por acuario con un peso promedio inicial de 326 ± 3 mg. Los camarones fueron alimentados a saciedad en dos raciones diarias (9:00 y 17:00). Se evaluaron los parámetros zootécnicos de los camarones cada 7 días y al final del experimento se analizó el contenido de proteínas en carcas de camarón para evaluar ERN, además de realizar análisis bromatológico y físico a las dietas experimentales.

Tabla 16. Formulación para las dietas experimentales del experimento 5.

Ingrediente	Controles		Harina de Alga		Curcuminas		CLA	
	AF	control	AF + alga	Alga	AF + Curcuminas	Curcuminas	AF + CLA	CLA
Harina de trigo	427.9	439.8	387.9	399.83	427.8	439.6	427.9	439.8
Harina de pescado	384.4	384.6	384.4	384.63	384.4	384.6	384.4	384.6
Pasta de soya	80	80	80	80	80	80	80	80
Harina de camarón	40	40	40	40	40	40	40	40
Lecitina de soya	19.9	19	19.9	19	19.9	19	17.9	17
Aceite de pescado	19	19	19	19	19	19	17	17
Maíz contaminado	11.1	-	11.1	-	11.1	-	11.1	-
Alginato	10	10	10	10	10	10	10	10
Mezcla vitamínica	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Mezcla mineral	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Antioxidante	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Antifungico	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Solvay	0.2	0.15	0.2	0.15	0.2	0.15	0.2	0.15
Vitamina C	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Vitamina E	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Harina de alga	-	-	40	40	-	-	-	-
Curcuminas 70% pureza	-	-	-	-	0.14	0.14	-	-
CLA	-	-	-	-	-	-	4.00	4.00
Total (g)	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00

5.6.6. Efectividad de diferentes niveles de Mycofix-plus® solo o en combinación con *U. clathrata* para reducir la aflatoxicosis en juveniles de camarón (Experimento 6)

Para este experimento se evaluó durante 42 días la efectividad de la inclusión de diferentes niveles de inclusión de Mycofix Plus® sólo o en combinación con *U. clathrata* para reducir la aflatoxicosis a diferentes concentraciones solo o en combinación con la *Ulva* en alimentos contaminados con AF en juveniles de camarón blanco. Para esto se formularon 2 dietas, una libre de AF y otra dieta contaminada con 120 ppb de AF totales. A partir de estas se prepararon dos dietas más con la inclusión de 2% de Alga *U. clathrata*, posteriormente tomando como base la dieta contaminada con AF se prepararon 3 pares de dietas, con 2.5, 3.0 y 5.0 g/kg de Mycofix Plus® solo y en combinación con el Alga (Tabla 17). Para la elaboración de las dietas contaminadas se utilizó harina de maíz contaminado (reemplazando a la harina de pescado y en mayor proporción a la harina de trigo), en el caso de las dietas que contenían alga, esta fue incorporada como harina junto con los macro-ingredientes durante la elaboración del alimento y para el caso del Mycofix Plus®, se incorporó a la dieta junto con los micro-nutrientes. Cada tratamiento se evaluó en 3 replicados (acuarios de 60L sin doble fondo) con una densidad de 12 camarones por acuario con un peso promedio inicial de 310 ± 4 mg. Los camarones fueron alimentados a saciedad en dos raciones diarias (9:00 y 17:00). Se evaluaron los parámetros zootécnicos de los camarones cada 14 días, además de realizar análisis bromatológico y físico a las dietas experimentales.

Tabla 17. Formulación para las dietas experimentales del experimento 6.

Ingrediente	AF	Control	AF + Alga	Alga	AF+2.5g/k g Mycofix plus®	AF+2.5 g/kg Mycofix plus® + 2% Alga	AF+ 3.0 g/kg Mycofix plus®	AF+ 3.0 g/kg Mycofix plus® + 2% Alga	AF + 5.0 g/kg Mycofix plus®	AF+5.0 g/kg Mycofix plus® + 2% Alga
Harina de trigo	427.9	438.6	411.6	421.1	424.9	408.6	424.3	408	421.9	405.5
Harina de pescado	384.4	384.8	381.6	382.3	384.9	382.2	385.04	382.3	385.4	382.7
Pasta de soya	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80
Harina de camarón	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
Lecitina de soya	19.9	19.9	19	20	19.9	19	19.9	19	19.9	19
Aceite de pescado	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19
Maíz contaminado	11.11	-	11.11	-	11.11	11.11	11.11	11.11	11.11	11.11
Alginato	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Mezcla vitamínica	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Mezcla mineral	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Antioxidante	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Antifúngico	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Solvay	0.14	0.15	0.15	0.14	0.14	0.15	0.14	0.15	0.14	0.15
Vitamina C	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Vitamina E	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Harina de alga <i>U. clathrata</i>	-	-	20	20	-	20	-	20	-	20
Mycofix plus®	-	-	-	-	2.5	2.5	3	3	5	5
Total	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

5.6.7. Expresión diferencial de genes en hepatopáncreas de camarón alimentados con dietas contaminadas con diferentes niveles de AF (Experimento 7)

Este bioensayo se realizó en colaboración con el laboratorio de Biotecnología Marina del CIAD en Hermosillo Sonora para analizar por medio de microarreglos las modificaciones de algunos genes que codifican proteínas relacionados con la respuesta inmune y metabolismo de reacción ante compuestos xenobioticos de camarón blanco alimentados con dietas con 0 y 1000 ppb de AFT (dietas tomadas del Experimento 1). Los juveniles de camarón *L. vannamei* utilizados en este experimento tenían un peso promedio de 6.5 ± 0.09 g. Los animales fueron alimentados 15 días con una densidad de 14 camarones por acuario. Se utilizaron 4 replicados (acuarios de 120 L sin doble fondo) por dieta. Se ofreció alimento 2 veces al día (10:00 y 17:00 hrs)

5.6.7.1. Toma de muestras para extracción de mRNA

Al final del Bioensayo se tomaron tres camarones por acuario de cada tratamiento en estadio C de muda a los que se les extrajo el hepatopáncreas entero y de forma individual se coloraron en tubos eppendorf debidamente marcados con solución RNA *later* (Figura 18 a y b) y posteriormente se refrigeró a 4°C. La solución RNA *later* se utilizó a razón de 5 volúmenes con respecto a la muestra. Después de una noche en refrigeración, se congelaron las muestras a -80°C y se almacenaron a esta temperatura durante una semana para después ser aviadas vía aérea en hielo seco al Laboratorio de Biotecnología Marina del CIAD en Hermosillo Sonora para su posterior análisis.

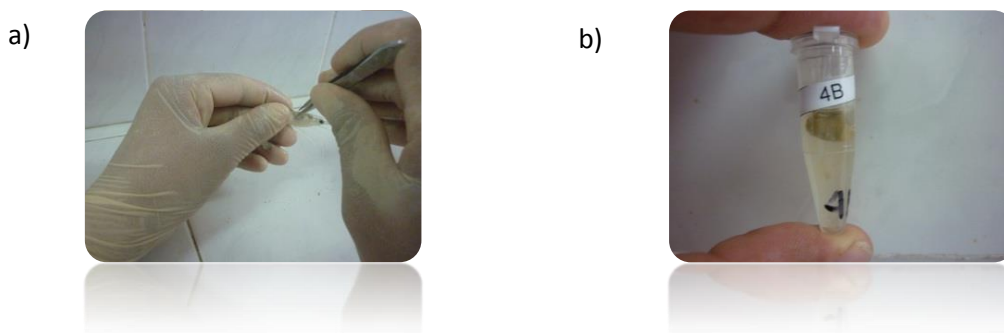


Figura 18. a) Extracción de hepatopáncreas de camarón; b) Hepatopáncreas en RNA *later* para preservar el RNA de las muestras.

5.6.7.2. Protocolo de microarreglos (CIAD, Hermosillo Son.)

La expresión génica se evaluó utilizando microarreglos, con un número de 291 genes de camarón (Figura 19). El microarreglo se preparó en el laboratorio de Biotecnología Marina del Dr. Francisco Vargas, el cual fue impreso en un equipo QArray2 (Genetix). Las sondas se prepararon a partir de del mRNA purificado del hepatopáncreas de los camarones que consumieron las diferentes dietas (0y 1000 ppb de AFT) por medio de la técnica de Trizol (invitrogen) siguiendo el procedimiento recomendado. El marcaje con fluoróforos se realizó durante la síntesis del cDNA con la transcriptasa reversa Superscript III RT (invitrogen), utilizado el Kit AlexaFluor (invitrogen). Los microarreglos se hibridizaron en un SlideBooster SB401/800 (Advanlytix) y se leyeron en un scanner Scan Array Gx PLUS (PerkinElmer). El análisis se realizó con el apoyo del software TM4 suite (Microarray Data Analysis System, TIGR Spotfinder, MultiExperiment Viewer, MicroArray DAta Manager).

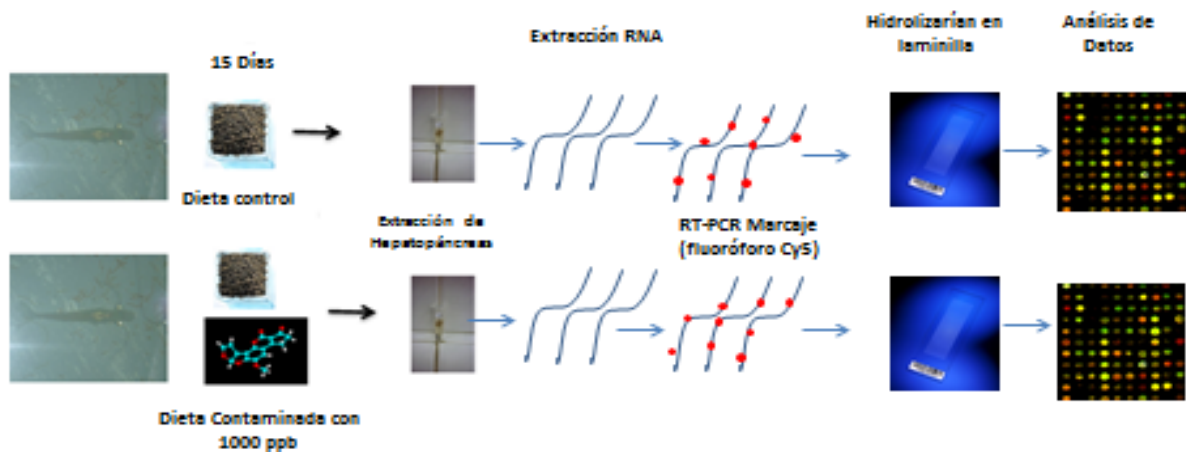


Figura 19. Estrategia general de análisis de expresión génica por medio de microarreglos en camarón.

5.7. Analisis estadísticos.

En cada bioensayo, los parámetros zootécnicos evaluados para cada replicado (acuario) se sometieron a un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA); en los casos en los que se presentaron diferencias significativas, se realizó una comparación múltiple de medias por el método de Tukey a un nivel de significancia de 0.05. Para los bioensayos 1, 2 y 7 se realizó una ANOVA de una vía y una comparación múltiples de medias Tuckey a un nivel de significancia de 0.05. En el caso de los experimentos 4, 5 y 6 se realizó un ANOVA y una comparación múltiple de medias por producto a evaluar.

Para valorar los análisis histológicos se utilizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para determinar si existieran diferencias entre grupos; posteriormente se usó la prueba U de Mann-Whitney para analizar dos grupos consecutivamente.

En el caso de los análisis bromatológicos de las diferentes dietas, los resultados fueron sometidos a un ANOVA; en caso de presentarse diferencias significativas, se realizó una comparación múltiple de medias Tukey a un nivel de significancia de 0.05.

Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el programa SPSS versión 15.0. (SPSS. Inc., Chicago IL, USA).

En el caso de los microarreglos, se tomó el \log_2 de la diferencia entre los diferentes tratamientos, los valores negativos indican supresión mientras que los positivos indican estimulación del gen, tomando valores entre -1.2 y 1.2 como sin cambio de expresión (+/-20%)

6. RESULTADOS

6.1. Composición bromatológica y análisis de micotoxinas de los ingredientes utilizados

En la Tabla 18 se enlistan todos los ingredientes utilizados para elaborar las dietas utilizadas durante todo el proyecto de tesis, además su composición química y contenido de micotoxinas

Tabla 18. Composición química y contenido de micotoxinas en los ingredientes utilizados en la formulación de todas las dietas experimentales

Ingrediente	Composición química (%)						Cantidad de AF en el ingrediente (ppb)				
	Humedad	Proteína	Grasa	Ceniza	Fibra	ELN	AFB ₁	AFB ₁	AFG ₁	AFG ₁	AFT
Pasta de Soya	11,8	43,5	1,6	6,2	4,1	32,5	2	2	2	4	10
Harina de trigo	11,2	11,3	1,5	0,6	0,4	63,8	2	2	2	4	10
Maíz Libre de AF	9,8	7,7	3,2	1,0	2,3	75,7	1.9	ND	ND	ND	0
Maíz contaminado con AF	11	12,2	2,8	0,8	4,4	68,5	32503	4368	1027	100	38000
Harina de cacahuete	12,8	7,7	40,4	1,8	5,4	31,7	68425	4857	13717	ND	87000
Maíz contaminado con AF	10,7	13,3	1,5	1,0	4,3	68,9	70694	11297	5008	ND	18000
Harina de pescado	10	64.8	9.9	13.1	0.1	2.1	ND	ND	ND	ND	0
Harina de camarón	9.3	39.3	11.8	23.9	10.1	5.6	ND	ND	ND	ND	0

6.2. Efecto de la inclusión de altas dosis de AF en juveniles de camarón blanco *L. vannamei* (Experimento 1).

6.2.1. Composición química, contenido de micotoxinas y parámetros de estabilidad en las dietas experimentales.

La composición proximal, cantidad de micotoxinas y estabilidad en el agua de las dietas experimentales para este bioensayo se presentan en la Tabla 19. De manera general la composición proximal de las dietas fue muy similar, a excepción del contenido de fibra la cual se incrementó con el nivel de inclusión del grano contaminado. La estabilidad del alimento en el agua fue similar en todas las dietas oscilando entre el 8.3 al 9.2% y del 17.5 al 19.9 % para PMS y PP respectivamente.

El contenido de micotoxinas en la dieta sin contaminar (dieta control) fue menor al límite de detección. Para el caso de las dietas contaminadas, las concentraciones de AF totales obtenidas fueron comparables con los valores esperados. Las AFB₁ y AFB₂ fueron predominantes en el alimento contaminado (alrededor de 85% y 11% de las AF totales), seguidas por las AFG₁ y AFG₂ (< 2.5% de AFT).

Tabla 19. Composición proximal en base húmeda (%), cantidad de micotoxinas totales y estabilidad en el agua de alimentos experimentales con diferentes niveles de inclusión de AF del experimento 1.

	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3	Dieta 4
	DCL	(500 ppb)	(1000 ppb)	(2000 ppb)
Composición química				
Humedad	7.88±0.01	7.75±0.12	7.15±0.18	7.01±0.19
Proteína cruda	37.64±0.40	36.79±0.17	37.09±0.37	36.73±0.05
Lípidos	8.34±0.15	7.86±0.38	8.20±0.09	7.77±0.61
Ceniza	7.84±0.04	7.51±0.03	7.78±0.10	7.74±0.01
Fibra cruda	0.89±0.10	0.86±0.19	0.99±0.00	1.13±0.00
ELN	37.41	39.23	38.79	39.62
Energía (cal/100 g)	4558	4919	4718	4475
Cantidad de Micotoxinas totales en las dietas				
Deoxinivalenol (ppm)	ND	NA	NA	NA
Fumomisina B ₁ (ppb)	ND	NA	NA	NA
Fumomisina B ₂ (ppb)	ND	NA	NA	NA
Fumomisina B ₃ (ppb)	ND	NA	NA	NA
Ochratoxin A (ppb)	ND	NA	NA	NA
Toxina T-2 (ppb)	ND	NA	NA	NA
AF B ₁ (ppb)	ND	533	1067	1511
AF B ₂ (ppb)	ND	71	144	204
AF G ₁ (ppb)	ND	18	32	47
AF G ₂ (ppb)	ND	ND	5	7
AF totales (ppb)	0	622	1248	1769
Estabilidad de dietas experimentales				
PMS (%)	9.21±0.51	9.08±0.81	8.30±0.64	9.00±0.68
PP (%)	17.5±2.6	18.0±2.1	19.9±0.7	19.2±2.5
Abs. H ₂ O (%)	108.5±6.81	120.8±2.03	119.4±5.25	109.9±6.05

Probabilidades para ANOVA, PMS, PP y Abs. H₂O fue $P=0.484$, $P=0.528$, $P=0.087$ respectivamente.

6.2.2. Parámetros de crecimiento en camarones alimentados con las diferentes dietas experimentales.

Los parámetros zootécnicos evaluados sobre los camarones alimentados con las diferentes dietas experimentales se muestran en la Tabla 20. A partir de los primeros 7 días se observó una reducción significativa ($P > 0.05$) para el consumo de alimento y la ganancia en peso, además de un incremento en la tasa de conversión alimenticia y estos resultados fueron más evidentes con el nivel de inclusión de las AF. La sobrevivencia fue disminuida significativamente por las dietas contaminadas a partir del día 21 hasta el final del experimento, siendo los camarones que consumieron las dietas contaminadas con 1000 y 2000 ppb los que obtuvieron la menor supervivencia (72% y 62%) en comparación con los alimentados con la dieta control limpia y 500 ppb (94% y 88%). El IHS fue significativamente mayor para los camarones alimentados con la dieta que contenían 2000 ppb de AF totales que para los organismos alimentados con el resto de las dietas experimentales. La eficiencia de retención de nitrógeno fue estadísticamente similar para los camarones alimentados con las dietas control, 500 y 1000 ppb (43-45%) en contraste, los camarones alimentados con la dieta con 2000 ppb de AFT mostraron una retención significativamente ($P = 0.007$) menor (36%) (Figura 19).

Tabla 20. Parámetros zootécnicos de los camarones alimentados con las diferentes dietas experimentales durante 28 días (Experimentos 1).

Días	DCL	Dieta 2 (500 ppb)	Dieta 3 (1000 ppb)	Dieta 4 (2000 ppb)	Significancia
Peso promedio (g)					
PI	0.12±0.001a	0.12±0.001a	0.12±0.001a	0.12±0.001a	0.157
7 días	0.18±0.007c	0.167±0.004b	0.164±0.01ab	0.155±0.01a	0.000
14 días	0.249±0.01c	0.212±0.013b	0.201±0.02ab	0.181±0.01a	0.000
21 días	0.336±0.009c	0.278±0.017b	0.246±0.028a	0.22±0.015a	0.000
28 días	0.45±0.02c	0.37±0.03b	0.33±0.03ab	0.3±0.05a	0.000
TC (%)					
7 días	48±6c	37±4b	36±7ab	28±4a	0.000
14 días	104±9c	74±12b	67±18ab	50±12a	0.000
21 días	175±7c	127±16b	104±23ab	82±14a	0.000
28 días	268±13c	203±28b	172±26ab	145±43a	0.000
CA (g/org)					
7 días	0.09±0.002b	0.08±0.01ab	0.08±0.003a	0.08±0.005a	0.002
14 días	0.19±0.006b	0.17±0.009a	0.16±0.015a	0.16±0.009a	0.000
21 días	0.31±0.01b	0.267±0.018a	0.245±0.02a	0.238±0.01a	0.000
28 días	0.45±0.018c	0.39±0.032b	0.34±0.04ab	0.33±0.01a	0.000
TCA					
7 días	1.58±0.15a	1.91±0.19a	1.97±0.44a	2.5±0.28b	0.000
14 días	1.52±0.12a	1.92±0.26a	2.12±0.51a	2.77±0.49b	0.000
21 días	1.44±0.08a	1.73±0.11ab	2.01±0.34b	2.45±0.40c	0.000
28 días	1.38±0.08b	1.59±0.16ab	1.69±0.21ab	2.08±0.62a	0.014
Sobrevivencia (%)					
7 días	99±3a	99	99	99	1.000
14 días	99±3a	98±5a	96±8a	92±7a	0.264
21 días	97±4a	94±5ab	83±10ab	80±14b	0.011
28 días	94±5b	88±8b	72±11ab	62±25a	0.003
IHS (%)					
28 días	6.25±0.76a	5.93±0.9a	6.03±1.27a	7.13±1.47b	.002
ERN (%)					
28 días	43.5±0.7a	45.3±1.1a	43.0±2.7a	36.0±3.0b	0.007

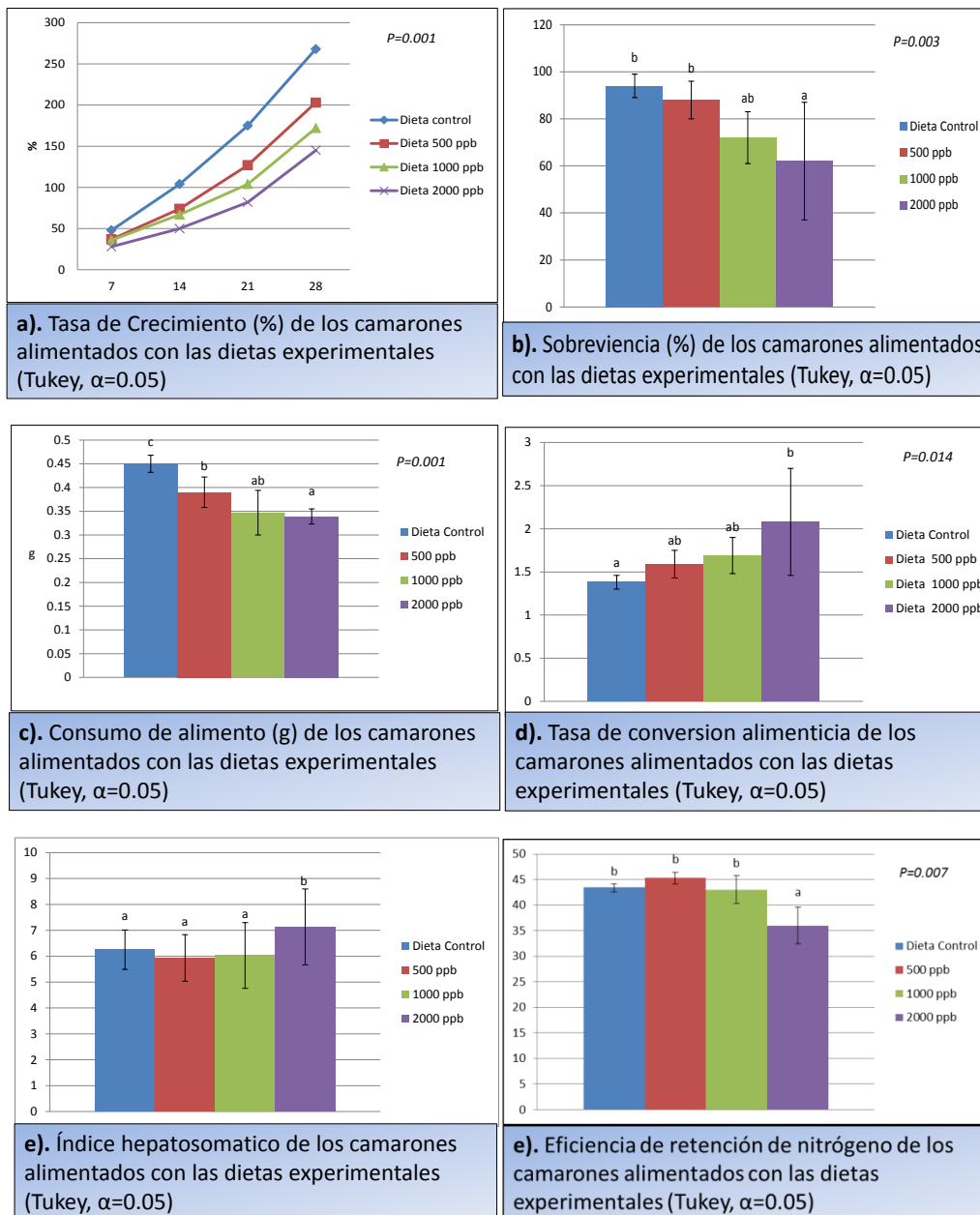


Figura 20. Principales parámetros zootécnicos de los camarones alimentados con las dietas experimentales en el en el experimento de dosis altas de AFT. a) TC, b) sobrevivencia, c) CA d) TCA, e) IHS y e) ERN.

6.2.3. Análisis histológicos

Los resultados a nivel histológico de los camarones alimentados con las diferentes dietas experimentales se muestran en la Tabla 21. En el presente experimento se observó que los camarones alimentados con la dieta libre de AF no presentaron daños a nivel histológico, observándose las diferentes células con una morfología normal (Figura 21). En contraste la presencia de AF en el alimento disminuyó

significativamente ($P < 0.05$) la actividad de las células B (52 a 60%) en comparación con los camarones alimentados con la dieta control (78%). De igual manera se observó la misma tendencia para la actividad de las células mitóticas, a medida que el nivel de AF era mayor en el alimento; la actividad de estas disminuía. La atrofia de los túbulos epiteliales así como descamación de las células epiteliales fue significativamente mayor conforme el nivel de inclusión de AFT. El grado de vacuolización lipídica en el hepatopáncreas en los camarones alimentados con la dieta libre de AF no presentaron alteración alguna, sin embargo el grado de vacuolización lipídica decreció significativamente ($P < 0.05$) según incrementaron los niveles de inclusión de AF (2.7, 1.2, 0.7 y 0.5 para los camarones que consumieron 0, 500, 1000 y 2000 ppb (Figura 22a, b, c, d y e).

Tabla 21. Actividad a nivel histológico de los camarones alimentados con las diferentes dietas experimentales del bioensayo de dosis altas de AF. Los valores dentro del paréntesis indica el grado de severidad basado en una escala entre 1 a 4.

	DCL	Dieta 2 (500 ppb)	Dieta 3 (1000 ppb)	Dieta 4 (2000 ppb)	Significancia
Actividad de Células B (%)	78b	60a	53a	52a	0.006
Actividad Mitótica de las células E (%)	68c	55bc	49ab	34a	0.001
Atrofia de túbulos Epiteliales (%)	35 (0.6)a	100 (2.3)b	79 (2.2)b	79 (1.8)b	0.000
Descamación de células epiteliales (%)	9 (0.13)ab	4 (0.04)a	27 (0.79)c	38(0.59)bc	0.008

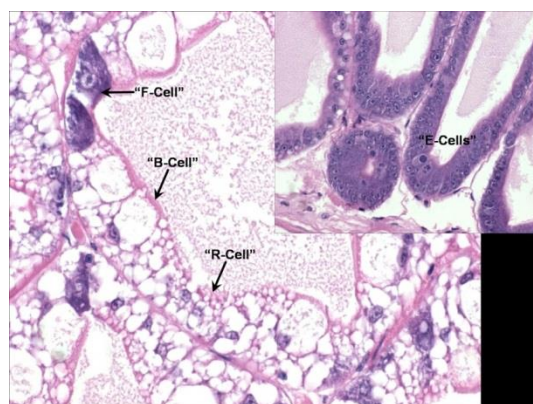
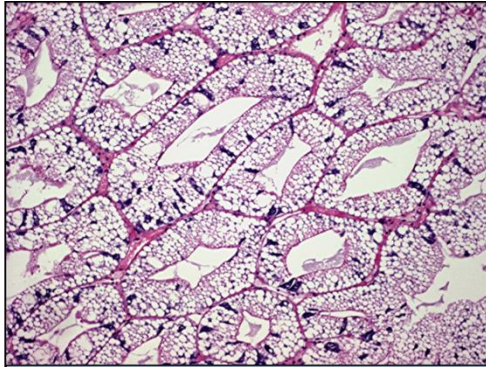
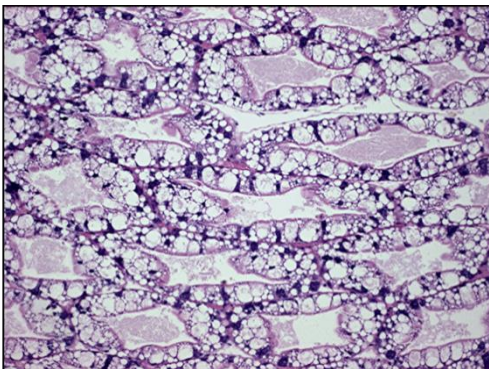


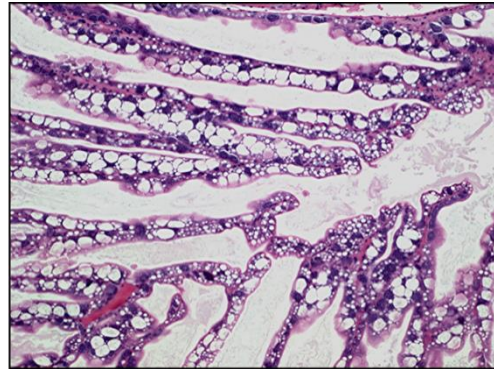
Figura 21. Morfología de las diferentes células del hepatopáncreas



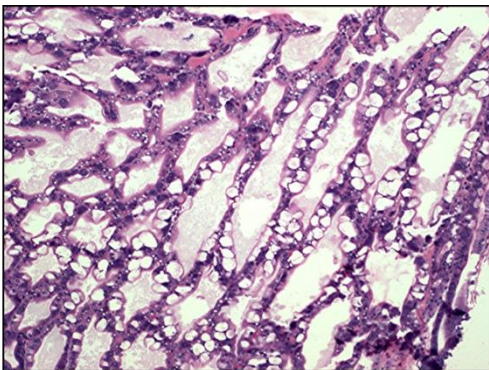
a) Nivel de vacuolización encontrado generalmente en los camarones alimentados con la dieta libre de AF



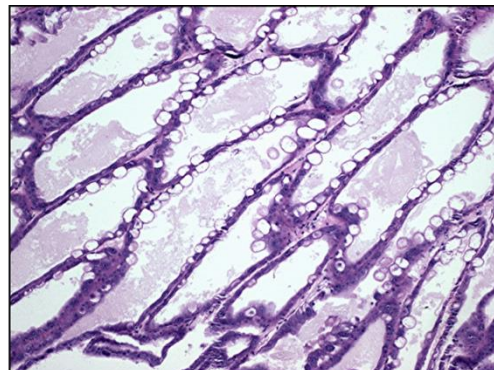
b) Nivel de vacuolización encontrado generalmente en los camarones alimentados con las dietas con 500 ppb de AFT



c) Nivel de vacuolización encontrado generalmente en los camarones alimentados con las dietas con 500 y 1000 ppb de AFT



d) Nivel de vacuolización encontrado generalmente en los camarones alimentados con las dietas con 1000 y 2000 ppb de AFT



e) Nivel de vacuolización encontrado generalmente en los camarones alimentados con las dietas con 2000 ppb de AFT

Figura 22. Niveles de vacuolización encontrados en los camarones alimentados con los diferentes niveles de AF.

6.2.4. Deposición de AF en tejido.

En el presente estudio como lo muestra la figura 23 observamos que la concentración de AF en (base húmeda) en las muestras del tejido de camarón varió entre 1.09 a 1.51 $\mu\text{g}/\text{kg}$, y no fue significativamente diferente en los camarones alimentados con las diferentes dietas.

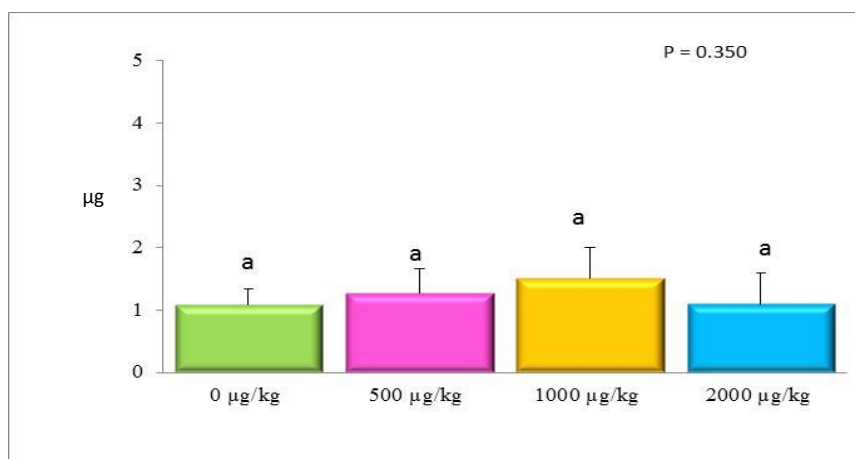


Figura 23. Contenido de AF en tejido completo de camarones de *L. vannamei* alimentados con dietas contaminadas con 500, 1000 y 2000 ppb.

6.3. Efecto de la inclusión de AF en dietas a dosis bajas en parámetros zootécnicos del camarón (Experimento 2).

6.3.1. Composición química, contenido de micotoxinas y estabilidad de las dietas experimentales

La composición proximal, cantidad de micotoxinas y estabilidad en el agua de las dietas experimentales para este bioensayo se presentan en la Tabla 22. La composición química fue similar entre las dietas experimentales. La PMS fue mayor en la dieta #2 (13.4%) que el resto de las dietas (8.9 - 10.3), sin embargo la PP fue similar entre todas ellas (13.6 al 18.7%). La Abs. H_2O fue mayor para la dieta # 2 (115.2%) que para el resto de las dietas (89.7 - 105.3%). El contenido de micotoxinas en la dieta control fueron menores al límite de detección; las concentraciones de micotoxinas obtenidas de las dietas experimentales fueron principalmente de AFB_1 y AFB_2 (72 al 90.5%), seguidas AFG_1 y AFG_2 (9.5 al 28%) y se obtuvieron contaminaciones a nivel de 0, 10, 20, 40, 60 y 120 ppb de AFT.

Tabla 22. Composición proximal en base húmeda (%), cantidad de micotoxinas totales y estabilidad en el agua de alimentos experimentales con diferentes niveles de inclusión de AF del experimento 2.

	Dieta 1 DCL	Dieta 2 10 ppb	Dieta 3 20 ppb	Dieta 4 40 ppb	Dieta 5 60 ppb	Dieta 6 120 ppb
composición química						
Humedad	9.7±0.03	9.9±0.12	9.71±0.04	10.7±0.12	9.6±0.14	9.86±0
Proteína cruda	36.3±0.1	36.9±0.7	36.6±0.2	36±0.6	36.5±0.4	37.6±1.3
Lípidos	8.17±0.9	7.98±0.02	7.81±0.32	8.04±0.11	7.04±0.58	7.59±1.39
Ceniza	8.18±0	8.07±0.02	8.04±0.04	8.14±0.04	8.03±0	8±0.04
Fibra cruda	0.93±0.3	1.27±0.57	0.9±0.19	1.1±0.29	1.1±0.12	1.1±0.28
ELN	37.65	35.88	36.94	36.02	37.73	35.85
Energía (Cal)	5228±169	4891±0.7	4578±505	4926±49	4749±33	4988±287
Cantidad de Micotoxinas totales en las dietas						
Deoxinivalenol (ppm)	ND	NA	NA	NA	NA	NA
Fumomisina B1 (ppb)	ND	NA	NA	NA	NA	NA
Fumomisina B2 (ppb)	ND	NA	NA	NA	NA	NA
Fumomisina B3 (ppb)	ND	NA	NA	NA	NA	NA
Ocratoxina A (ppb)	ND	NA	NA	NA	NA	NA
Toxina T-2 (ppb)	ND	NA	NA	NA	NA	NA
AF B1 (ppb)	ND	7.2	16.5	32.3	48.6	92.4
AF B2 (ppb)	ND	ND	1.1	2.1	5.7	9.2
AF G1 (ppb)	ND	2.8	2.4	5.6	5.7	18.4
AF G2 (ppb)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
AF totales (ppb)	0	10	20	40	60	120
Estabilidad de las dietas						
PMS (%)	10.3±0.31a	13.4±0.42b	9.2±0.5a	9.9±0.5a	10.2±0.3a	8. ±0.11 a
PP (%)	15.5±1.1a	18.72±0.9a	14.3±1.2a	13.7±1.5a	14.0±2.03a	15.3±3.2a
Abs. H ₂ O (%)	105.3±2.8ab	115.2±1.5b	102.1±2.7ab	99.2±1.4ab	89.7±3.2a	104.3±0.4ab

Probabilidades para ANOVA de PMS, PP y Abs. H₂O fue $P=0.484$, $P=0.414$, $P=0.012$ respectivamente.

6.3.2. Parámetros de crecimiento en camarones alimentados con bajos niveles de AF en juveniles de camarón blanco *L. vannamei*.

Los parámetros zootécnicos evaluados sobre los camarones alimentados con las diferentes dietas experimentales son mostrados en la Tabla 23. A partir de los 42 días de alimentación observamos que el consumo de alimento y la ganancia en peso fueron afectadas significativamente ($P < 0.05$), los camarones alimentados con la dieta suplementada con los niveles de 60 y 120 ppb presentaron un menor CA así como un menor crecimiento. Se observó un incremento en el CA y la ganancia en peso para los camarones alimentados con las dietas suplementadas con 10 ppb. Las dietas suplementadas con 10, 60 y 120 ppb tuvieron las mayores TCA. La sobrevivencia no fue afectada por ninguno de los tratamientos, al final del experimento vario entre 85 a 70% entre los diferentes tratamientos (Figura 24).

Tabla 23. Parámetros zootécnicos de los camarones alimentados con las diferentes dietas experimentales durante 64 días (Experimentos 2).

	Dieta 1 DCL	Dieta 2 10 ppb	Dieta 3 20 ppb	Dieta 4 40 ppb	Dieta 5 60 ppb	Dieta 120 ppb	Sig.
Peso Promedio (g)							
PI	0.6±0.01a	0.6±0.01a	0.6±0.01a	0.6±0.01a	0.6±0.01a	0.6±0.01a	0.333
7 días	0.9±0.05a	0.9±0.03a	0.9±0.06a	0.9±0.05a	0.9±0.03a	0.97±0.1a	0.433
14 días	1.2±0.05a	1.2±0.02a	1.21±0.1a	1.3±0.1a	1.2±0.07a	1.27±0.1a	0.364
21 días	1.64±0.1a	1.68±0.1a	1.6±0.11a	1.69±0.1a	1.5±0.02a	1.7±0.12a	0.142
28 días	2.1±0.1ab	2.19±0.1b	2.1±0.1ab	2.2±0.1ab	1.9±0.01a	2.1±0.1ab	0.053
35 días	2.6±0.16a	2.87±0.1a	2.68±0.1a	2.8±0.06a	2.5±0.04a	2.73±0.1a	0.122
42 días	3.4±0.2ab	3.6±0.04b	3.4±0.1ab	3.5±0.1ab	3.2±0.08a	3.4±0.2ab	0.035
49 días	4.3±0.2ab	4.61±0.1b	4.3±0.1ab	4.65±0.2b	3.9±0.02a	4.08±0.2a	0.002
56 días	5.29±0.1b	5.4±0.01b	5.1±0.2ab	5.6±0.2b	4.66±0.2a	4.69±0.1a	0.000
64 días	6.03±0.1b	6.15±0.1b	5.78±0.1b	6.13±0.1b	5.12±0.2a	5.27±0.2a	0.000
TC (%)							
7 días	51.5±8a	59±7a	46.1±9a	53.3±9a	45.7±5a	60.4±18a	0.456
14 días	102±8a	107±2a	96±13a	112±18a	91±12a	109±11a	0.339
21 días	168±17a	172±5a	159±16a	175±18a	146±5a	182±17a	0.097
28 días	243±12ab	253±12b	238±15ab	253±6b	222±3a	245±8ab	0.036
35 días	268±16a	286±12a	268±8a	279±6a	258±4a	273±17a	0.127
42 días	457±35a	482±7a	457±9a	481±12a	419±16a	457±38a	0.049
49 días	602±43abc	644±10bc	608±12abc	656±32c	543±4a	571±36ab	0.002
56 días	733±31bc	775±11cd	734±26bc	812±40d	655±25a	671±12ab	0.000
64 días	887±1bc	898±1c	838.5±12b	897±15c	729±26a	766±21a	0.000
CA (g/org)							
7 días	0.50±0.01bc	0.50±0.0c	0.5±0.1abc	0.5±0.1abc	0.48±0.1ab	0.48±0.01a	0.011
14 días	0.8±0.01bc	0.8±0.01c	0.8±0.1abc	0.8±0.1abc	0.86±0.1ab	0.86±0.1a	0.011
21 días	1.3±0.01b	1.3±0.01b	1.36±0.1ab	1.37±0.1ab	1.35±0.1ab	1.35±0.01a	0.013
28 días	2.1±0.01bc	2.12±0.1c	2.1±0.1abc	2.1±0.1abc	2.11±0.1ab	2.1±0.01a	0.011
35 días	3.02±0.1ab	3.1±0.02b	3.1±0.01ab	3.03±0.04b	2.9±0.02ab	2.97±0.01a	0.026
42 días	4.3±0.02ab	4.5±0.04b	4.3±0.08ab	4.43±0.1ab	4.21±0.11a	4.29±0.1ab	0.019
49 días	6.1±0.02b	6.69±0.1c	5.8±0.1ab	5.92±0.1ab	5.74±0.2ab	5.5±0.1a	0.000
56 días	7.5±0.1b	8.7±0.05c	7.2±0.1b	7.45±0.1ab	7.1±0.28ab	6.81±0.2b	0.000
64 días	9.16±0.4c	10.7±0.1d	8.34±0.1ab	8.96±0.1bc	8.4±0.1abc	8.1±0.4a	0.000
TCA							
7 días	1.6±0.2a	1.4±0.2a	1.77±0.3a	1.53±0.2a	1.72±0.2a	1.3±0.4a	0.454
14 días	1.2±0.05a	1.3±0.3a	1.22±0.12a	1.06±0.14a	1.3±0.24a	1.5±1.01a	0.85
21 días	1.4±0.1a	1.4±0.1a	1.43±0.1a	1.52±0.1a	1.3±0.05a	1.57±0.5a	0.664
28 días	1,43±0.1ab	1,35±0.8a	1,44±0.1ab	1,3±0.04ab	1,53±0.02b	1,4±0.04ab	0.049
35 días	1.1±0.08a	1.1±0.04a	1.13±0.03a	1.08±0.01a	1.15±0.02a	1.08±0.07a	0.232
42 días	1.5±0.12a	1.5±0.01a	1.52±0.1a	1.49±0.03a	1.65±0.07a	1.54±0.11a	0.289
49 días	1.6±0.12a	1.6±0.03a	1.55±0.1a	1.46±0.1a	1.71±0.1a	1.6±0.14a	0.096
56 días	1.6±0.1abc	1.8±0.01c	1.59±0.1ab	1.49±0.1a	1.74±0.1bc	1.6±0.1abc	0.004
64 días	1.6±0.05ab	1.9±0.01c	1.61±0.02a	1.62±0.04a	1.87±0.1bc	1.73±0.1bc	0.001

Continuación:

	Dieta 1 DCL	Dieta 2 10 ppb	Dieta 3 20 ppb	Dieta 4 40 ppb	Dieta 5 60 ppb	Dieta 120 ppb	Sig.
Sobrevivencia (%)							
7 días	100±0a	100±0a	100±0a	100±0a	96.6±6a	96.6±6a	0.571
14 días	100±0a	96.6±6a	100±0a	100±0a	96.6±6a	93.3±6a	0.315
21 días	100±0a	93±11a	100±0a	100±0a	96.6±6a	93.3±6a	0.476
28 días	100±0a	90±10a	100±0a	97±6a	93.3±6a	93.3±6a	0.44
35 días	100±0a	90±10a	100±0a	96.6±6a	90±10a	93.3±6a	0.372
42 días	100±0a	90±10a	100±0a	90±10a	86.6±6a	90±0a	0.146
49 días	95±7ab	86.6±5ab	96.6±6b	83.3±6ab	80±0a	86.6±6ab	0.024
56 días	85±7a	83.3±6a	93.3±12a	83.3±6a	73.3±6a	76.6±15a	0.235
64 días	85±7a	80±0a	83.3±6a	80±0a	70±0a	73.3±15a	0.252
ERN (%)							
64 días	31±1a	27.5±2.1a	33.3±1.1a	33.6±3.2a	30±1.7a	30.3±0.5a	0.056

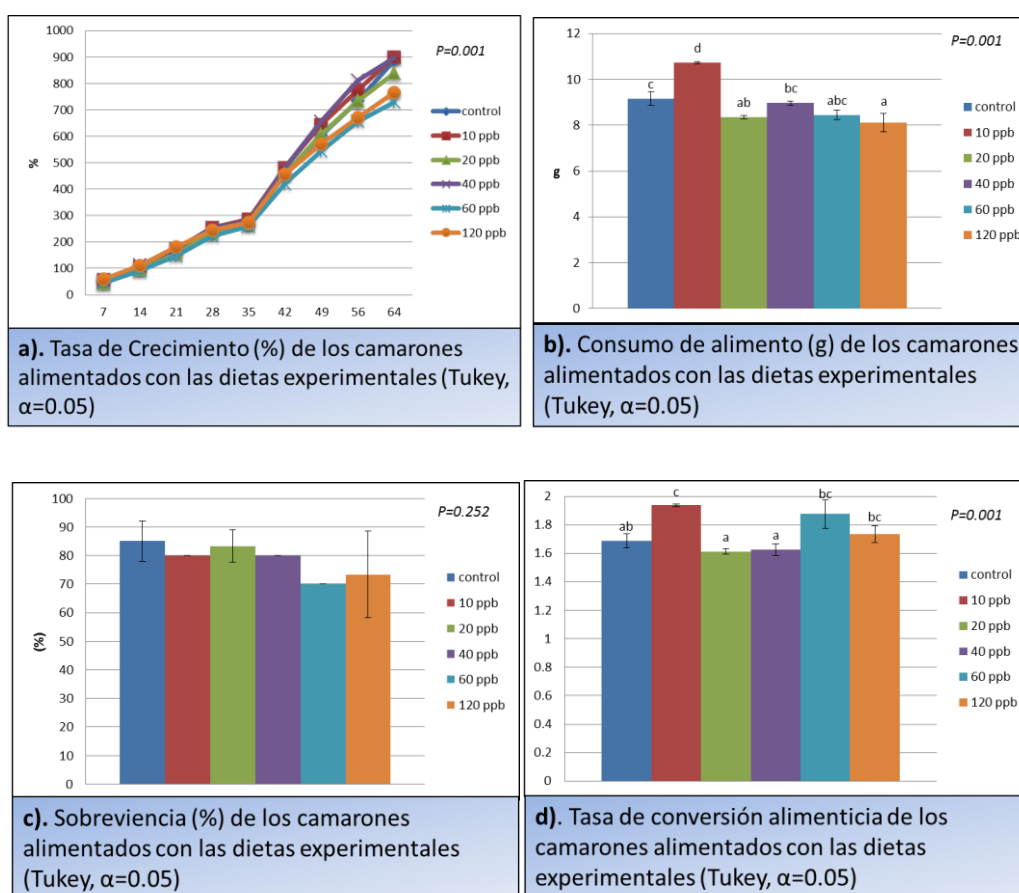


Figura 24. Principales parámetros zootécnicos de los camarones alimentados con las diferentes dietas experimentales a los 64 días en el bioensayo de dosis bajas a) TC, b) CA c) sobrevivencia y d) TCA.

6.3.3. Resultados de análisis histológicos en camarones alimentados con bajos niveles de AF en juveniles de camarón blanco *L. vannamei*

Los resultados a nivel histológico de los camarones alimentados con las diferentes dietas experimentales se muestran en la Tabla 24. Los camarones alimentados con las dietas contaminadas tuvieron una menor actividad de las células B y actividad mitótica de las células E, y fueron en relación al nivel de AFT en el alimento. La atrofia de los túbulos fue más evidente en los camarones que consumieron las dietas contaminadas a partir de 20 ppb, ya que más del 90% de los organismos analizados presentaron un grado de severidad de 2.0 a 2.4. Aunque en los camarones que consumieron las dietas contaminadas con AF se observó un aumento en la descamación de las células del hepatopáncreas, estas no fueron significativas entre los tratamientos.

Tabla 24. Actividad a nivel histológico de los camarones alimentados con las diferentes dietas experimentales del bioensayo de dosis bajas de AF. Los valores dentro del paréntesis indica el grado de severidad basado en una escala entre 1 a 4

	Dieta 1 DCL	Dieta 2 10 ppb	Dieta 3 20 ppb	Dieta 4 40 ppb	Dieta 5 60 ppb	Dieta 120 ppb	Sig.
Actividad de Células B (%)	83c	66bc	67bc	40a	56ab	54ab	0.000
Actividad Mitótica de células E (%)	77b	45a	57ab	43a	42a	50ab	0.014
Atrofia de túbulos Epiteliales (%)	33(0.7)a	33(1.0)a	92(2.1)b	100(2.2)b	100(2.0)b	100(2.4)b	0.000
Descamación de células epiteliales (%)	33(0.5)a	50(0.8)a	50(0.6)a	75(1.0)a	50(0.8)a	92(1.1)a	0.117

6.4. Efecto de la inclusión de arcillas secuestrantes de micotoxinas en dietas contaminadas sobre parámetros zootécnicos del camarón (Experimento 3)

6.4.1. Composición química, contenido de micotoxinas y estabilidad de las dietas experimentales

La composición proximal, contenido de micotoxinas y estabilidad de las dietas experimentales utilizadas en el presente bioensayo son presentados en la Tabla 25. La composición química de las dietas experimentales fue muy similar entre ellas. La concentración de AFT en las dietas contaminadas fue de alrededor de 75 ppb, la AF

predominante fue la B₁ (60.7 ppb) seguido por la B₂ (9.7 ppb) y G₁ (4.3 ppb). El resto de las concentraciones de micotoxinas en las dietas contaminadas fue por debajo del límite de detección. La concentración de micotoxinas en las dietas limpias fue por debajo del límite de detección. La inclusión de Mycofix Select[®] y el Fixat[®] tanto a la dieta control limpia (DCL) como en la dieta control contaminada (DCC) presentaron un menor PMS (aproximadamente 12 a 16%), mientras que Novasil Plus[®] y Zeolex Extra[®] mejoraron la estabilidad de la dieta solo cuando fueron añadidos a la DCC y a la DCL respectivamente. Las dietas con Mycofix Select[®] y Fixat[®] mostraron una capacidad de Abs. H₂O significativamente alta (7 a 17%) que las dietas que no se les añadió algún secuestrante; en contraste el Novasil Plus[®] y Zeolex Extra[®] incrementaron significativamente este parámetro (de 12 a 16%) cuando fueron incluidas solo a la DCC.

Tabla 25. Composición proximal en base húmeda (%), cantidad de micotoxinas totales y estabilidad en el agua de alimentos experimentales con diferentes niveles de inclusión de AF del experimento 3.

	DCC	DCL	DCC + Novasil P [®]	DCL + Novasil P [®]	DCC + Zeolex E [®]	DCL + Zeolex E [®]	DCC + Mycofix S [®]	DCL + Mycofix S [®]	DCC + Fixat [®]	DCL + Fixat [®]
Composición química										
Humedad	8.5±0.04	8.7±0.2	9.3±0.07	9.2±0.04	8.7±0.07	8.5±0.13	9.4±0.41	8.9±0.06	8.5±0.014	8.5±0.1
Proteína	36.69±0.5	35.9±0.24	36.5±0.85	36.12±0.59	36.8±0.26	36.93±0.33	36.9±0.17	36.9±0.3	37.02±0.1	37.1±0.17
Lípidos	7.83±0.19	7.7±0.09	7.9±0.1	7.8±0.14	8.05±0.2	8.08±0.17	7.62±0.5	8.1±0.17	7.9±0.28	8.14±0.19
Fibra	0.99±0	0.81±0.1	1.1±0.11	1.06±0.23	1.1±0.07	1.2±0.2	0.93±0.01	0.91±0.01	0.9±0.00	0.72±0.02
Ceniza	8.2±0.5	8.09±0.1	8.03±0.03	8.1±0.007	8.06±0.01	8.1±0.007	8.04±0.007	8.14±0.05	8.26±0.02	8.31±0.04
ELN	33.35	34.41	31.61	33.7	31.83	31.88	33.26	32.81	33.47	33.19
Energía Cal	4702±32	4663±12	4662±134	4788±61	4656±73	4790±91	4617±147	4757±141	4697±32	4637±56
Cantidad de Micotoxinas totales en las dietas										
Deoxivalenol (ppm)	ND	ND	-	-	-	-	-	-	-	-
Fumomisina B1 (ppb)	ND	ND	-	-	-	-	-	-	-	-
Fumomisina B2 (ppb)	ND	ND	-	-	-	-	-	-	-	-
Fumomisina B3 (ppb)	ND	ND	-	-	-	-	-	-	-	-
Ochratoxin A (ppb)	ND	ND	-	-	-	-	-	-	-	-
Toxina T-2 (ppb)	ND	ND	-	-	-	-	-	-	-	-
AF B1 (ppb)	60.7	ND	-	-	-	-	-	-	-	-
AF B2 (ppb)	9.7	ND	-	-	-	-	-	-	-	-
AF G1 (ppb)	4.3	ND	-	-	-	-	-	-	-	-
AF G2 (ppb)	ND	ND	-	-	-	-	-	-	-	-
AF totales (ppb)	74.7	0	-	-	-	-	-	-	-	-
Estabilidad de las dietas										
PMS (%)	10.2±0.1d	10.3±0.1d	8.1±0.3a	10.4±0.1e	13.2±0.7f	9.3±0.2bc	8.4±0.3ab	8.9±0.4abc	8.6±0.2abc	9.4±0.3cd
PP (%)	15,97bc	14,49ab	15,34b	15,76b	14,31ab	14,9433ab	18,46c	14,15ab	14,1433ab	12,4a
Abs. H ₂ O (%)	99±2a	99±2a	111±2cde	101±1ab	115±4de	105±5abc	109±1cd	114±1de	116±1e	106±2bc

Probabilidades para ANOVA de PMS, PP y Abs. H₂O fue $P=0.000$

6.4.2. Parámetros de crecimientos de camarones alimentados con dietas contaminadas con micotoxinas y suplementadas con diferentes tipos de arcillas.

Los parámetros zootécnicos evaluados sobre los camarones alimentados con las diferentes dietas experimentales son mostrados en las Tablas 26, 27, 28 y 29.

La contaminación con AFT en el alimento para camarón reduce significativamente la tasa de crecimiento y el consumo de alimento de los camarones en un 22 y 20% respectivamente.

La adición del de Novasil Plus[®] a la DCL no afecto el CA, sin embargo mejoro la TC en un 8%, cuando fue añadido a la DCC aumento la TC en un 12%, no obstante fue incapaz de compensar la reducción en el CA y producir una ganancia de peso similar a camarones alimentados con DCL (Figura 25).

La suplementación del Zeolex Extra[®] a la DCL redujo el CA en un 12%, sin afectar la ganancia de peso; cuando este secuestrante fue añadido a la DCC aumento el consumo de alimento en un 23% (Figura 26).

La inclusión de Mycofix Select[®] a la DCL redujo el CA en un 10%, además de afectar la TC en un 5%, este último sin diferencias significativas; y cuando este secuestrante fue incorporado a la DCC el CA y la TC no presento diferencias significativas comparadas con la DCC (Figura 27).

La inclusión del Fixat[®] a la DCL redujo el CA en un 12% y la TC en un 4% y cuando fue añadido a la DCC fue incapaz de mejorar el consumo de alimento y la tasa de crecimiento (Figura 28).

La inclusión de Novasil Plus[®], Zeolex Extra[®] y Fixat[®] no afectaron la TCA así como la sobrevivencia que vario entre 83 al 100%.

Ninguno de los productos adicionados a las dietas experimentales no afecto la ERN (Figura 29), los valores variaron entre un 40 a 47%.

Tabla 26. Parámetros zootécnicos de los camarones alimentados con las diferentes dietas experimentales durante 42 días divididos por Aluminosilicato (Experimento 3).

	Novasil Plus [®]				
	Peso (g)	CA (g/org)	TC (%)	TCA	Sobrevivencia (%)
	Día 7				
DCC	0.8± 0.04a	0.23 ± 0.004a	49. ± 6a	1.23± 0.1a	100 ± 0a
DCL	0.8 ± 0.02a	0.22 ± 0.01a	47 ± 4a	1.23 ± 0.1a	100 ± 0a
DCC+Novasil Plus [®]	0.8 ± 0.01a	0.21 ± 0.01a	45 ± 1a	1.23 ± 0.1a	100 ± 0a
DCL+Novasil Plus [®]	0.8 ± 0.01a	0.23 ± 0.002a	51 ± 3a	1.27 ± 0.1a	100 ± 0a
Sig.	0.547	0.115	0.517	0.96	1.000
	Día 14				
DCC	1.38±0.07b	0.71 ± 0.02b	133±13b	1.92±0.06a	96.6 ± 5.7a
DCL	1.29±0.03ab	0.69 ± 0.02b	118±6ab	1.84±0.05a	93.3 ± 5.7a
DCC+Novasil Plus [®]	1.22 ± 0.06a	0.63 ± 0.03a	106 ± 7a	1.91±0.01a	100 ± 0a
DCL+Novasil Plus [®]	1.35±0.01ab	0.72 ± 0.01b	128 ± 3b	1.85±0.01a	100 ± 0a
Sig.	0.025	0.005	0.02	0.142	0.219
	Día 21				
DCC	1.79 ± 0.03a	1.31 ± 0.06ab	203 ± 6a	1.35±0.04a	96.6 ± 5.7a
DCL	1.79 ± 0.07a	1.34 ± 0.04b	202±13a	1.32±0.05a	93.3 ± 5.7a
DCC+Novasil Plus [®]	1.71 ± 0.1a	1.2 ± 0.05a	188±17a	1.4 ± 0.04a	100 ± 0a
DCL+Novasil Plus [®]	1.86 ± 0.03a	1.41 ± 0.18b	215 ± 5a	1.3 ± 0.01a	93.3 ± 5.7a
Sig.	0.186	0.005	0.136	0.097	0.363
	Día 28				
DCC	2.36 ± 0.1a	1.98 ± 0.1ab	299±18a	1.12±0.06a	96.6 ± 5.7a
DCL	2.34 ± 0.1a	2.2 ± 0.01bc	296±26a	1.26 ± 0.1a	90 ± 10a
DCC+Novasil Plus [®]	2.21 ± 0.1a	1.9 ± 0.07a	273±10a	1.17±0.02a	100 ± 0a
DCL+Novasil Plus [®]	2.52 ± 0.1a	2.29 ± 0.09c	327±26a	1.18±0.08a	86.6 ± 15a
Sig.	0.097	0.002	0.086	0.280	0.366
	Día 35				
DCC	2.84 ± 0.1a	2.9 ± 0.1ab	380±23a	1.28±0.08a	93.3 ± 5.7a
DCL	2.97 ± 0.2a	3.25 ± 0.06bc	402±35a	1.37 ± 0.1a	90 ± 10a
DCC+Novasil Plus [®]	2.84 ± 0.18a	2.81 ± 0.09a	377±23a	1.25±0.06a	100 ± 0a
DCL+Novasil Plus [®]	3.2 ± 0.3a	3.4 ± 0.2c	439±51a	1.32 ± 0.1a	86.6 ± 15.2a
Sig.	0.200	0.003	0.203	0.556	0.418
	Día 42				
DCC	3.31±0.12a	3.84±0.19a	460±24a	1.41±0.08a	93±5.7a
DCL	3.96±0.01b	4.69±0.09b	572±1bc	1.39±0.02a	95±7.07a
DCC+Novasil Plus [®]	3.68±0.02b	4.045±0.06a	515±7ab	1.31±0.01a	100±0a
DCL+Novasil Plus [®]	4.26±0.04c	5.025±0.19b	620±14c	1.37±0.06a	85±21.2a
Sig.	0.000	0.002	0.001	0.468	0.598

Tabla 27. Parámetros zootécnicos de los camarones alimentados con las diferentes dietas experimentales durante 42 días divididos por Aluminosilicato (Experimento 3).

	Zeolex Extra [®]				
	Peso (g)	CA (g/org)	TC (%)	TCA	Sobrevivencia (%)
	Día 7				
DCC	0.88 ± 0.4a	0.2±0.01a	49 ± 6a	1.23±0.1a	100 ± 0a
DCL	0.87 ± 0.02a	0.2±0.01a	47 ± 4a	1.23±0.1a	100 ± 0a
DCC+Zeolex Extra [®]	0.89 ± 0.02a	0.2±0.01a	49 ± 3a	1.24±0.1a	96.6±5.7a
DCL+Zeolex Extra [®]	0.86 ± 0.03a	0.2±0.01a	47 ± 3a	1.25±0.1a	100 ± 0a
Sig.	0.893	0.304	0.909	0.995	0.441
	Día 14				
DCC	1.38 ± 0.07a	0.71 ± 0.02a	133 ± 13a	1.92±0.1a	96.6 ± 5.7a
DCL	1.29 ± 0.03a	0.69 ± 0.02a	118 ± 7a	1.84±0.1a	93.3 ± 5.7a
DCC+Zeolex Extra [®]	1.29 ± 0.1a	0.71 ± 0.02a	116 ± 23a	1.78±0.1a	100 ± 0a
DCL+Zeolex Extra [®]	1.28 ± 0.02a	0.67 ± 0.02a	117 ± 1a	1.9±0.03a	100 ± 0a
Sig.	0.492	0.199	0.467	0.256	0.219
	Día 21				
DCC	1.79 ± 0.03a	1.31 ± 0.06a	203 ± 6a	1.3±0.04a	96.6 ± 5.7a
DCL	1.79 ± 0.07a	1.34 ± 0.04a	202 ± 13a	1.3±0.05a	93.3 ± 5.7a
DCC+Zeolex Extra [®]	1.74 ± 0.09a	1.36 ± 0.05a	193 ± 15a	1.2±0.02a	90 ± 10a
DCL+Zeolex Extra [®]	1.78 ± 0.05a	1.30 ± 0.06a	200 ± 6a	1.3±0.02a	100 ± 0a
Sig.	0.815	0.635	0.733	0.112	0.330
	Día 28				
DCC	2.36 ± 0.1a	1.98 ± 0.1a	299 ± 18a	1.12±0.1a	96.6 ± 5.7a
DCL	2.34 ± 0.13a	2.20 ± 0.01a	296 ± 26a	1.26±0.1a	90 ± 10a
DCC+Zeolex Extra [®]	2.3 ± 0.13a	2.21 ± 0.08a	287 ± 21a	1.29±0.1a	83.3 ± 15a
DCL+Zeolex Extra [®]	2.29 ± 0.05a	2.02 ± 0.1a	287 ± 6a	1.2±0.04a	100 ± 0a
Sig.	0.887	0.049	0.83	0.081	0.227
	Día 35				
DCC	2.84 ± 0.1a	2.9 ± 0.1a	380 ± 23a	1.28±0.08	93.3 ± 5.7a
DCL	2.97 ± 0.1a	3.25 ± 0.06a	402 ± 35a	1.37±0.1a	90 ± 10a
DCC+Zeolex Extra [®]	2.94 ± 0.1a	3.28 ± 0.12a	395 ± 25a	1.4±0.06a	83.3 ± 15.2a
DCL+Zeolex Extra [®]	2.83 ± 0.08a	2.95 ± 0.21a	378 ± 10a	1.3±0.04a	100 ± 0
Sig.	0.583	0.033	0.616	0.324	0.270
	Día 42				
DCC	3.3±0.12a	3.84±0.2a	460±24a	1.41±0.1a	93.3±5.7a
DCL	3.9±0.01a	4.7±0.1b	572±1b	1.39±0.2a	95±7a
DCC+Zeolex Extra [®]	3.8±0.3a	4.74±0.2b	548±60ab	1.46±0.1a	80±20a
DCL+Zeolex Extra [®]	3.5±0.19a	4.05±0.3a	492±26ab	1.4±0.01a	100±0a
Sig.	0.049	0.003	0.040	0.690	0.264

Tabla 28. Parámetros zootécnicos de los camarones alimentados con las diferentes dietas experimentales durante 42 días divididos por Aluminosilicato (Experimento 3).

	Mycofix Select [®]				
	Peso (g)	CA (g/org)	TC (%)	TCA	Sobrevivencia (%)
Día 7					
DCC	0.88±0.04a	0.23± 0.004a	49 ± 6a	1.23 ± 0.1a	100 ± 0a
DCL	0.87±0.02a	0.22 ± 0.01a	47 ± 4a	1.23 ± 0.1a	100 ± 0a
DCC+ Mycofix S [®]	0.82±0.01a	0.22± 0.005a	39 ± 3a	1.04 ± 0.1a	100 ± 0a
DCL+Mycofix S [®]	0.85±0.07a	0.22± 0.006a	45 ± 13a	1.21 ± 0.3a	100 ± 0a
Sig.	0.392	0.081	0.473	0.637	1.000
Día 14					
DCC	1.38±0.07b	0.71 ± 0.02c	133±13b	1.92±0.06a	96.67 ± 5.7a
DCL	1.29±0.03ab	0.7 ± 0.02bc	118±7ab	1.84±0.05a	93.3 ± 5.7a
DCC+ Mycofix S [®]	1.19 ± 0.02a	0.62 ± 0.02a	101±3a	1.9 ± 0.1a	96.6 ± 5.7a
DCL+Mycofix S [®]	1.31±0.03ab	0.649 ± 0.02ab	123±7ab	2.01±0.01a	100 ± 0a
Sig.	0.008	0.004	0.013	0.130	0.487
Día 21					
DCC	1.79 ± 0.03a	1.31 ± 0.06b	203 ± 7a	1.35±0.04a	96.6 ± 5.7a
DCL	1.79 ± 0.07a	1.34 ± 0.04b	202.8±13a	1.32±0.05a	93.3 ± 5.7a
DCC+ Mycofix S [®]	1.66 ± 0.1a	1.15 ± 0.03a	182 ± 15a	1.43 ± 0.1a	93.3 ± 5.7a
DCL+Mycofix S [®]	1.85 ± 0.1a	1.25 ± 0.04ab	214 ± 23a	1.46±0.04a	93.3 ± 5.7a
Sig.	0.137	0.007	0.161	0.171	0.859
Día 28					
DCC	2.36 ± 0.1a	1.98 ± 0.1ab	299 ± 18a	1.12±0.06a	96.6 ± 5.7a
DCL	2.34 ± 0.1a	2.2 ± 0.01b	296 ± 26a	1.26 ± 0.1a	90 ± 10a
DCC+ Mycofix S [®]	2.2 ± 0.07a	1.89 ± 0.02a	275 ± 12a	1.16±0.05a	93.3 ± 5.7a
DCL+Mycofix S [®]	2.4 ± 0.1a	2.01 ± 0.1ab	315 ± 23a	1.08±0.04a	86.6 ± 11.5a
Sig.	0.194	0.013	0.212	0.089	0.557
Día 35					
DCC	2.84 ± 0.1ab	2.9 ± 0.18a	380±23ab	1.28±0.08ab	93.3 ± 5.7a
DCL	2.97 ± 0.2ab	3.25 ± 0.06b	402±35ab	1.37±0.09b	90 ± 10a
DCC+ Mycofix S [®]	2.66 ± 0.1a	2.79 ± 0.02a	350 ± 13a	1.35±0.05ab	86.6 ± 5.7a
DCL+Mycofix S [®]	3.1 ± 0.1b	2.96 ± 0.1ab	427 ± 34b	1.18 ± 0.01a	86.6 ± 11.5a
Sig.	0.030	0.012	0.051	0.040	0.752
Día 42					
DCC	3.3±0.12a	3.84±0.2a	460±24a	1.41±0.08b	93.3±5.7a
DCL	3.9±0.01b	4.69±0.1b	572±1b	1.39±0.2ab	95±7a
DCC+ Mycofix S [®]	3.4±0.1a	3.8±0.03a	489±11a	1.34±0.03	83.3±5.7a
DCL+Mycofix S [®]	3.9±0.16b	4.16±0.18a	564±39b	1.25±0.02a	83.3±5.7a
Sig.	0.001	0.002	0.003	0.036	0.109

Tabla 29. Parámetros zootécnicos de los camarones alimentados con las diferentes dietas experimentales durante 42 días divididos por Aluminosilicato (Experimento 3).

	Fixat [®]				
	Peso (g)	Consumo (g/org)	TC (%)	TCA	Sobrevivencia (%)
	Día 7				
DCC	0.88 ± 0.04a	0.23 ± 0.01b	49 ± 6a	1.23 ± 0.1a	100 ± 0a
DCL	0.87 ± 0.02a	0.22 ± 0.01ab	47 ± 4a	1.23 ± 0.1a	100 ± 0a
DCC + Fixat [®]	0.84 ± 0.02a	0.21 ± 0.01a	42 ± 4a	1.16 ± 0.1a	100 ± 0a
DCL + Fixat [®]	0.89 ± 0.01a	0.22 ± 0.01ab	50 ± 3a	1.34 ± 0.1a	100 ± 0a
Sig.	0.226	0.061	0.256	0.494	1.000
	Día 14				
DCC	1.38 ± 0.07a	0.71 ± 0.02b	133 ± 13a	1.92 ± 0.06a	96.6 ± 5.7a
DCL	1.29 ± 0.03a	0.69 ± 0.02b	118 ± 7a	1.84 ± 0.05a	93.3 ± 5.7a
DCC + Fixat [®]	1.21 ± 0.003a	0.62 ± 0.01a	105 ± 1a	1.92 ± 0.02a	100 ± 0a
DCL + Fixat [®]	1.31 ± 0.01a	0.65 ± 0.03ab	123 ± 20a	2.01 ± 0.2a	100 ± 0a
Sig.	0.100	0.010	0.145	0.380	0.219
	Día 21				
DCC	1.79 ± 0.03a	1.31 ± 0.06ab	203 ± 6a	1.35 ± 0.04a	96.6 ± 5.7a
DCL	1.79 ± 0.07a	1.34 ± 0.04b	202 ± 13a	1.32 ± 0.05a	93.3 ± 5.7a
DCC + Fixat [®]	1.68 ± 0.01a	1.19 ± 0.01a	184 ± 4a	1.4 ± 0.008a	100 ± 0a
DCL + Fixat [®]	1.74 ± 0.02a	1.24 ± 0.01ab	194 ± 6a	1.39 ± 0.05a	100 ± 0a
Sig.	0.042	0.021	0.093	0.216	0.219
	Día 28				
DCC	2.36 ± 0.1a	1.98 ± 0.1a	299 ± 18a	1.12 ± 0.06a	96.6 ± 5.7a
DCL	2.34 ± 0.1a	2.2 ± 0.01b	296 ± 26a	1.26 ± 0.1a	90 ± 10a
DCC + Fixat [®]	2.2 ± 0.03a	1.9 ± 0.01a	272 ± 6.3a	1.18 ± 0.02a	100 ± 0a
DCL + Fixat [®]	2.32 ± 0.12a	2 ± 0.03a	293 ± 23a	1.15 ± 0.006a	96.6 ± 5.7a
Sig.	0.327	0.006	0.381	0.214	0.349
	Día 35				
DCC	2.84 ± 0.1a	2.9 ± 0.18a	380 ± 23a	1.28 ± 0.08a	93.3 ± 5.7a
DCL	2.97 ± 0.2a	3.25 ± 0.06b	402 ± 35a	1.37 ± 0.1a	90 ± 10a
DCC + Fixat [®]	2.73 ± 0.1a	2.8 ± 0.09a	363 ± 20a	1.3 ± 0.05a	100 ± 0a
DCL + Fixat [®]	2.86 ± 0.1a	2.94 ± 0.15ab	384 ± 34a	1.29 ± 0.03a	93.3 ± 5.7a
Sig.	0.381	0.015	0.468	0.486	0.349
	Día 42				
DCC	3.31 ± 0.1a	3.8 ± 0.2a	460 ± 24a	1.41 ± 0.08a	93.3 ± 5.7a
DCL	3.96 ± 0.01b	4.7 ± 0.9b	572 ± 1b	1.39 ± 0.02a	95.3 ± 7a
DCC + Fixat [®]	3.42 ± 0.15ab	3.9 ± 0.1a	478 ± 26ab	1.38 ± 0.03a	100 ± 0a
DCL + Fixat [®]	3.69 ± 0.3ab	4.08 ± 0.1a	524 ± 60ab	1.32 ± 0.08a	90 ± 10a
Sig.	0.036	0.003	0.051	0.464	0.394

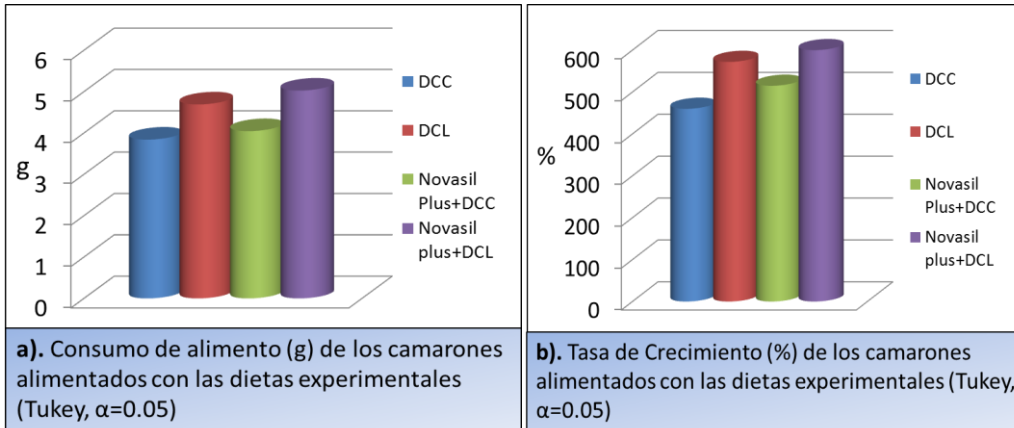


Figura 25. a) Consumo de alimento y b) Tasa de crecimiento de los camarones alimentados con las dietas controles y Novasil Plus[®]

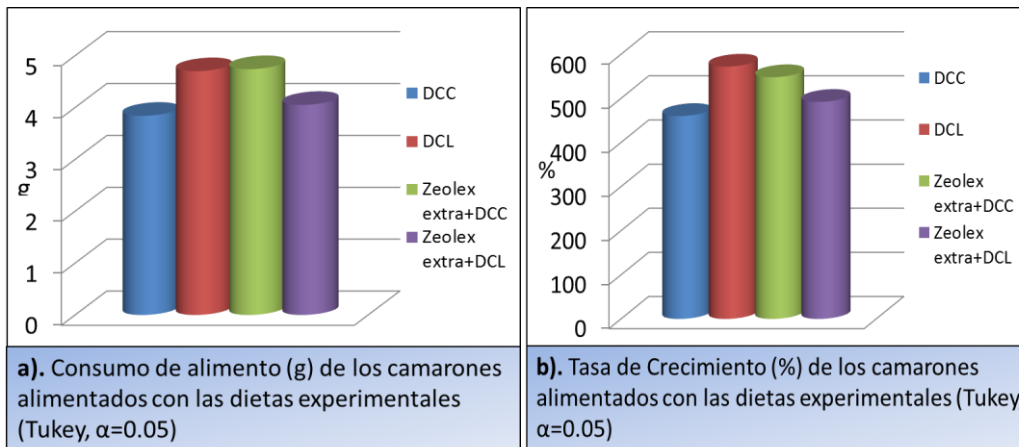


Figura 26. a) Consumo de alimento y b) Tasa de crecimiento de los camarones alimentados con las dietas controles y Zeolex Extra[®]

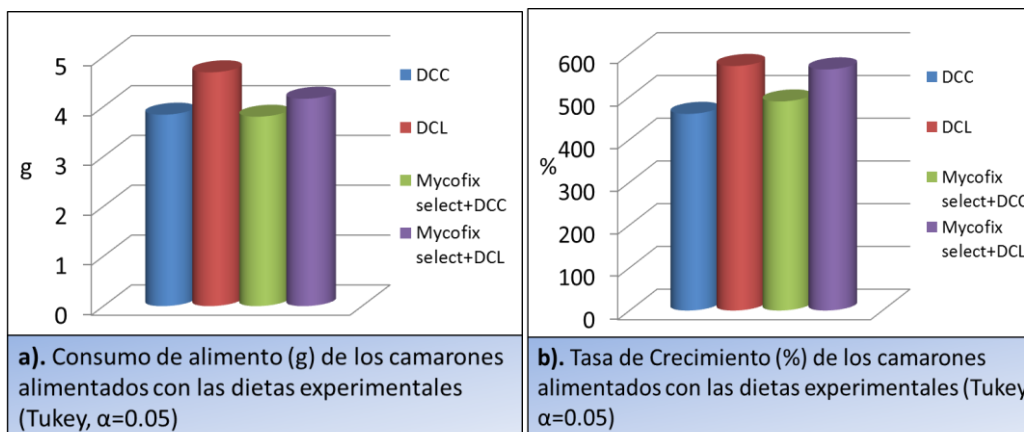


Figura 27. a) Consumo de alimento y b) Tasa de crecimiento de los camarones alimentados con las dietas controles y Mycofix Select[®]

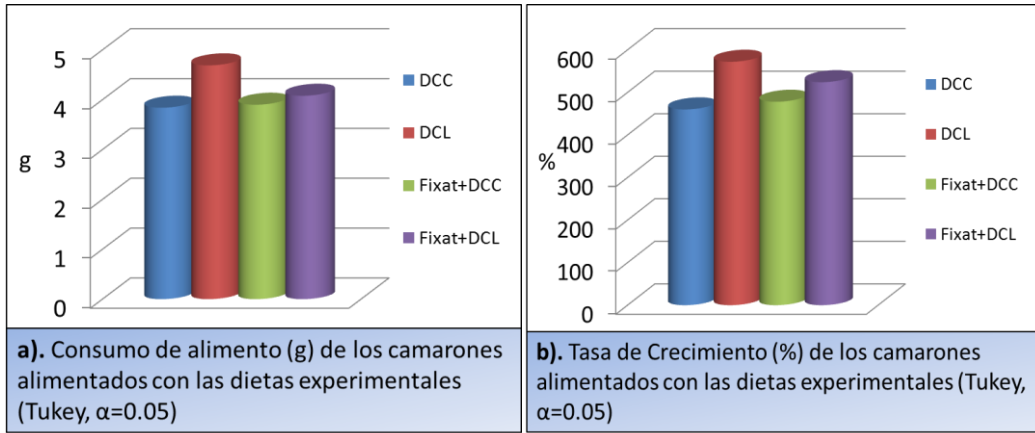


Figura 28. a) Consumo de alimento y b) Tasa de crecimiento de los camarones alimentados con las dietas controles y Fixat[®]

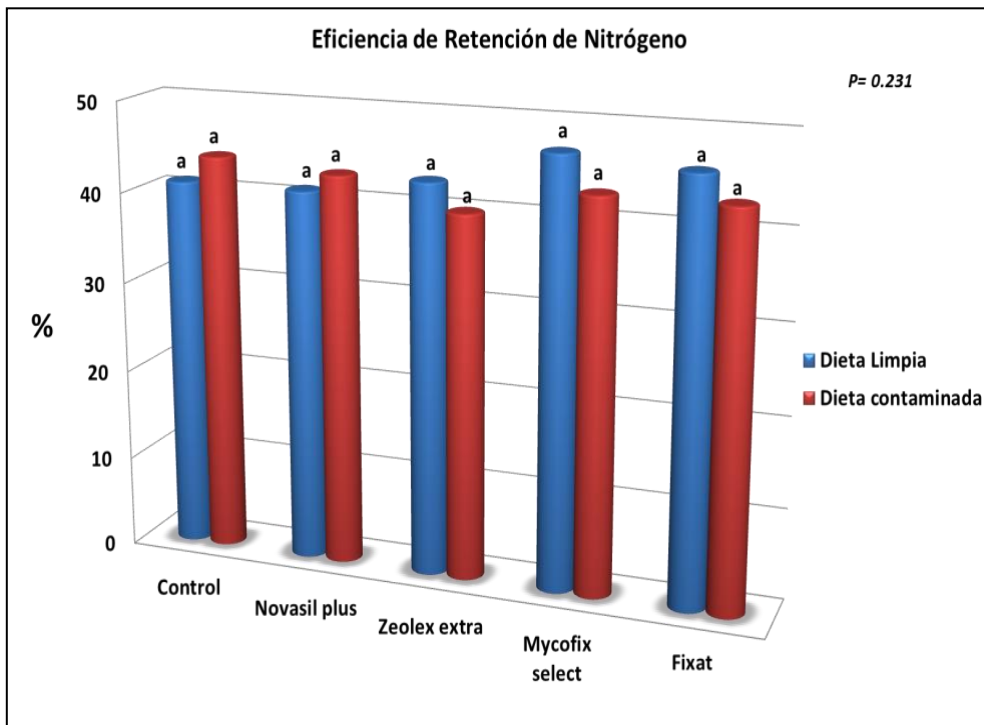


Figura 29. ERN de los camarones alimentados con las diferentes dietas a base de aluminosilicatos a los 42 días (Tukey $\alpha=0.05$)

6.5. Efecto de la inclusión de mezclas remediadoras de dietas contaminadas con AF sobre los parámetros zootécnicos del camarón (Experimento 4).

6.5.1. Composición química, contenido de micotoxinas y estabilidad de las dietas experimentales

La composición proximal y estabilidad de las dietas experimentales utilizadas en el presente bioensayo son presentadas en la Tabla 30. La composición química de las dietas fue muy similar entre ellas. La concentración de AF totales en las dietas contaminadas fue de alrededor de 75 ppb, la AF predominante fue la B₁ (60.7 ppb) seguido por la B₂ (9.7 ppb) y G₁ (4.3 ppb). El resto de las concentraciones de micotoxinas en las dietas contaminadas fue por debajo del límite de detección. La concentración de micotoxinas en las dietas no contaminadas fue menor a los límites de detección. La PMS de las dietas controles oscilaron entre el 10.2 y 10.3% y la suplementación de las mezclas remediadoras mejoro la estabilidad de las dietas reduciendo la PMS de un 19 a un 38%. La Abs. H₂O de las dietas experimentales se mantuvieron sin diferencias significativas oscilando entre 87.7 y 108.7%.

Tabla 30. Composición proximal en base húmeda (%), cantidad de micotoxinas totales y estabilidad en el agua de alimentos experimentales con diferentes niveles de inclusión de AF del experimento 4.

	DCC	DCL	DCC + Aflabalan®	DCL + Aflabalan®	DCC + Mycofix Plus®	DCL + Mycofix Plus®	DCC + Mycosorb®	DCL + Mycosorb®
Composición química								
Humedad	8.5±0.04	8.7±0.1	9.2±0.06	8.7±0.1	8.9±0.1	9.2±0.1	9.6±0.2	9.6±0.1
Proteína	36.6±0.5	35.9±0.2	36.7±0.5	36.7±0.5	36.7±0.5	36.8±0.9	36.5±0.7	36.5±0.1
Fibra	0.99±0	0.81±0.1	0.83±0.12	0.92±0.21	1.09±0.01	0.94±0.05	1.01±0.14	0.97±0.09
Lípidos	7.8±0.2	7.7±0.09	8.05±0.1	8.1±0.2	8.18±0.08	8.18±0.4	8.05±0.2	7.45±0.4
Ceniza	8.2±0.5	8.1±0.1	7.9±0.2	8.5±1.0	8.01±0.2	7.9±0.1	7.8±0.06	7.9±0.1
ELN	37.7	38.6	37.2	36.9	37.1	36.8	36.9	37.5
Energía Cal	4702±32	4663±12	4380±217	4461±217	4787±136	4727±142	4985±27	4827±112
Cantidad de Micotoxinas totales en las dietas								
Deoxinivalenol (ppm)	ND	ND	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Fumomisina B1 (ppb)	ND	ND	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Fumomisina B2 (ppb)	ND	ND	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Fumomisina B3 (ppb)	ND	ND	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Ochratoxin A (ppb)	ND	ND	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Toxina T-2 (ppb)	ND	ND	NA	NA	NA	NA	NA	NA
AF B1 (ppb)	60.7	ND	NA	NA	NA	NA	NA	NA
AF B2 (ppb)	9.7	ND	NA	NA	NA	NA	NA	NA
AF G1 (ppb)	4.3	ND	NA	NA	NA	NA	NA	NA
AF G2 (ppb)	ND	ND	NA	NA	NA	NA	NA	NA
AF totales (ppb)	74.7	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Estabilidad de las dietas								
PMS (%)	10.2±0.03c	10.3±0.01c	6.3±0.5a	6.5±0.5a	7.2±0.7ab	8.2±0.6ab	8.8±1.06bc	7.8±0.6ba
PP (%)	15.9±0.06ab	14.49±0.6a	17.7±1.5b	16.2±1.6ab	16.8±0.9ab	15.9±1.2ab	17.1±1.2ab	14.2±0.5a
Abs. H ₂ O (%)	101.6±1	103.2±2.7	102.2±8	96.3±8	108.7±3	87.7±6.9	94.19±11.4	92.6±11.1

Probabilidades para ANOVA de PMS, PP y Abs. H₂O fue $P=0.115$

6.5.2. Resultados de los parámetros de crecimiento de camarones alimentados con dietas contaminadas con AF y suplementados con productos elaborados a base de arcillas y otros compuestos.

Los parámetros zootécnicos evaluados sobre los camarones alimentados con las diferentes dietas experimentales son mostrados en las Tablas 31, 32, 33. La inclusión de AF en los alimentos para camarón redujo significativamente el CA y la TC sin afectar la TCA ni la sobrevivencia. La inclusión del Aflabalan[®] y el Mycosorb[®] a la DCL redujo el CA en un 38 y 20% y la TC en un 34 y 12% respectivamente. En contraste al ser añadidos a la DCC mejoran ligeramente estos mismos parámetros (CA en 6.2 y 18.5%; y para la TC 13 y 24.6% respectivamente) (Figura 30 y 31). Por su parte al incluir el Mycofix Plus[®] a la DCL no altero de manera significativa ningún parámetro e inclusive al ser incorporado a la DCC se pudo observar un aumento en el CA de un 6.2% además de incrementar la TC de un 29.7%, este ultimo de manera significativa ($P < 0.05$) (Figura 32).

La ERN para los camarones alimentados con la DCL fue de 42%, resultando con el mayor índice en este parámetro ($P < 0.05$). En contraste, al incluir Aflabalan[®] a la DCL disminuye hasta un 25%. Tanto el Mycosorb[®] como el Mycofix Plus[®] resultaron en un 31 y 38% respectivamente. Por su parte en DCC resulto con una retención del 29% y la inclusión de las diferentes mezclas remediadoras a la DCC oscilo entre los 30 a 32% (Figura 33).

Tabla 31. Parámetros zootécnicos de los camarones alimentados con las diferentes dietas experimentales durante 42 días divididos por mezcla remediadora (Experimento 4).

	Peso (g)	CA (g/org)	Aflabalan [®]		Sobrevivencia (%)
			TC (%)	TCA	
Día 7					
DCC	0.33±0.01a	0.14 ± 0.00a	51 ± 8a	1.3 ± 0.2a	100 ± 0a
DCL	0.33±0.02a	0.15 ± 0.01a	53 ± 12a	1.3 ± 0.2a	100 ± 0a
DCC+Aflabalan [®]	0.32±0.02a	0.14 ± 0.00a	52 ± 9a	1.3 ± 0.2a	95 ± 10a
DCL+Aflabalan [®]	0.3 ± 0.02a	0.14 ± 0.00a	46 ± 11a	1.4 ± 0.3a	100 ± 0a
Sig	0.348	0.379	0.793	0.68	0.426
Día 14					
DCC	0.47±0.02ab	0.31 ± 0.02ab	115 ± 12a	2.2 ± 0.2a	100 ± 0a
DCL	0.52±0.04b	0.35 ± 0.03b	137 ± 18a	1.9 ± 0.1a	97.5 ± 5a
DCC+Aflabalan [®]	0.45±0.05ab	0.3 ± 0.03ab	113 ± 23a	2.4 ± 0.6a	95 ± 10a
DCL+Aflabalan [®]	0.41 ± 0.46a	0.29 ± 0.01a	96 ± 21a	2.9 ± 0.6a	100 ± 0a
Sig	0.032	0.052	0.075	0.063	0.552
Día 21					
DCC	0.65±0.06ab	0.51 ± 0.03ab	196 ± 28a	1.2 ± 0.1a	95 ± 10a
DCL	0.79±0.09b	0.61 ± 0.06b	261± 40b	1.08±0.07a	90 ± 14a
DCC+Aflabalan [®]	0.68±0.03ab	0.52 ± 0.06ab	219±13ab	1.1 ± 0.1a	92.5 ± 15a
DCL+Aflabalan [®]	0.59 ± 0.06a	0.48 ± 0.03a	185 ± 31a	1.2 ± 0.2a	97.5 ± 5a
Sig	0.012	0.021	0.018	0.222	0.794
Día 28					
DCC	0.97 ± 0.07a	0.86 ± 0.06a	342 ± 36a	1.15 ± 0.1a	90 ± 8.1a
DCL	1.13 ± 0.1a	1.07 ± 0.12b	418 ± 63a	1.17±0.07a	90 ± 14a
DCC+Aflabalan [®]	0.94 ± 0.05a	0.88 ± 0.08a	344 ± 21a	1.2 ± 0.1a	92.5 ± 15a
DCL+Aflabalan [®]	0.93 ± 0.09a	0.79 ± 0.04a	346 ± 47a	1.1 ± 0.1a	87.5 ± 5a
Sig	0.048	0.005	0.096	0.597	0.941
Día 35					
DCC	1.2 ± 0.09ab	1.21 ± 0.7a	444 ± 44a	1.2 ± 0.1a	83.3 ± 5.7a
DCL	1.5 ± 0.1b	1.69 ± 0.1b	582±34b	1.3 ± 0.03a	90 ± 17a
DCC+Aflabalan [®]	1.1 ± 0.7a	1.28 ± 0.1a	457±37ab	1.3 ± 0.15a	87.5 ± 19a
DCL+Aflabalan [®]	1.19 ± 0.1a	1.16 ± 0.1a	467±89ab	1.2 ± 0.1a	80 ± 8.16a
Sig	0.034	0.000	0.052	0.473	0.785
Día 42					
DCC	1.47±0.1a	1.62±0.06a	569±47a	1.25±0.1a	80±10a
DCL	2.1±0.2b	2.3±0.28b	842±70b	1.3±0.04a	93.3±11.5a
DCC+Aflabalan [®]	1.5±0.2a	1.7±0.12a	610±104a	1.2±0.2a	82.5±23.6a
DCL+Aflabalan [®]	1.3±0.1a	1.4±0.03a	609±52a	1.2±0.09a	73.3±11.5a
Sig	0.004	0.000	0.015	0.958	0.537

Tabla 32. Parámetros zootécnicos de los camarones alimentados con las diferentes dietas experimentales durante 42 días divididos por mezcla remediativa (Experimentos 4).

	Peso (g)	CA (g/org)	Mycosorb®		Sobrevivencia (%)
			TC (%)	TCA	
Día 7					
DCC	0.33±0.01a	0.14 ± 0.00a	51 ± 8a	1.3 ± 0.2a	100 ± 0a
DCL	0.33±0.02a	0.15 ± 0.01a	53 ± 12a	1.3 ± 0.2a	100 ± 0a
DCC+Mycosorb®	0.33±0.01a	0.14 ± 0.0a	57 ± 9a	1.2 ± 0.1a	100 ± 0a
DCL+Mycosorb®	0.3 ± 0.02a	0.14 ± 0.0a	46 ± 1a	1.5±0.28a	97.5 ± 5a
Sig	0.179	0.542	0.560	0.327	0.426
Día 14					
DCC	0.47±0.02a	0.31 ± 0.02a	115 ± 12a	2.2 ± 0.2a	100 ± 0a
DCL	0.52±0.04a	0.35 ± 0.03a	137 ± 18a	1.9 ± 0.1a	97.5 ± 5a
DCC+Mycosorb®	0.5 ± 0.04a	0.32 ± 0.02a	138 ± 18a	1.9 ± 0.3a	97.5 ± 5a
DCL+Mycosorb®	0.45±0.04a	0.31 ± 0.02a	119 ± 17a	2.1 ± 0.3a	90 ± 8.1a
Sig	0.147	0.163	0.182	0.457	0.103
Día 21					
DCC	0.65±0.06a	0.51 ± 0.03a	196 ± 28a	1.2 ± 0.1a	95 ± 10a
DCL	0.79±0.09a	0.61 ± 0.06a	261 ± 40a	1.08±0.07a	90 ± 14a
DCC+Mycosorb®	0.68 ± 0.1a	0.57 ± 0.05a	221 ± 69a	1.3 ± 0.4a	97.5 ± 5a
DCL+Mycosorb®	0.67±0.04a	0.54 ± 0.05a	224 ± 16a	1.1 ± 0.07a	87.5 ± 12a
Sig	0.182	0.111	0.253	0.591	0.517
Día 28					
DCC	0.97±0.07a	0.86 ± 0.06a	342 ± 36a	1.15 ± 0.1a	90 ± 8.1a
DCL	1.13 ± 0.1a	1.07 ± 0.12b	418 ± 63a	1.17±0.07a	90 ± 14a
DCC+Mycosorb®	1.03±0.11a	0.94 ± 0.1ab	384 ± 53a	1.1 ± 0.07a	92.5 ± 5a
DCL+Mycosorb®	0.99±0.03a	0.93 ± 0.1ab	377± 8.9a	1.2± 0.08a	82.5 ± 15a
Sig	0.158	0.062	0.196	0.939	0.639
Día 35					
DCC	1.2 ± 0.09a	1.21 ± 0.7a	444 ± 44a	1.2 ± 0.1a	83.3 ± 5.7a
DCL	1.5 ± 0.1b	1.69 ± 0.1b	582 ± 34b	1.3 ± 0.03a	90 ± 17a
DCC+Mycosorb®	1.4 ± 0.1ab	1.4 ± 0.1ab	565 ± 60b	1.1 ± 0.05a	87.5 ± 5a
DCL+Mycosorb®	1.35±0.08ab	1.4 ± 0.1ab	548±40ab	1.2 ± 0.05a	77.5 ± 15a
Sig	0.044	0.006	0.019	0.313	0.538
Día 42					
DCC	1.5±0.1a	1.62±0.06a	569±26a	1.2±0.1a	80±10a
DCL	2.1±0.2b	2.3±0.28b	842±84b	1.3±0.4a	93.3±11.5a
DCC+Mycosorb®	1.7±0.18ab	1.92±0.2ab	709±78ab	1.2±0.08a	87.5±5a
DCL+Mycosorb®	1.7±0.2ab	1.84 ±0.1a	737±102b	1.3±0.09a	80±17.3a
Sig	0.013	0.009	0.015	0.441	0.435

Tabla 33. Parámetros zootécnicos de los camarones alimentados con las diferentes dietas experimentales durante 42 días divididos por mezcla remedidora (Experimentos 4).

	Mycofix Plus [®]				
	Peso (g)	CA (g/org)	TC (%)	TCA	Sobrevivencia (%)
	Día 7				
DCC	0.33±0.01a	0.14 ± 0.00a	51 ± 8a	1.3 ± 0.2a	100 ± 0
DCL	0.33±0.02a	0.15 ± 0.01a	53 ± 12a	1.3 ± 0.2a	100 ± 0a
DCC+Mycofix P [®]	0.32±0.03a	0.14 ± 0.0a	50 ± 16a	1.5 ± 0.7a	100 ± 0a
DCL+Mycofix P [®]	0.33±0.02a	0.14 ± 0.0a	56 ± 8a	1.2 ± 0.1a	100 ± 0a
Sig	0.748	0.652	0.907	0.716	0.000
	Día 14				
DCC	0.47±0.02a	0.31 ± 0.02ab	115±12a	2.2 ± 0.2a	100 ± 0a
DCL	0.52±0.04a	0.35 ± 0.03b	137±18a	1.9 ± 0.1a	97.5 ± 5a
DCC+Mycofix P [®]	0.45±0.06a	0.3 ± 0.01a	114±28a	2.3 ± 0.4a	95 ± 5.7a
DCL+Mycofix P [®]	0.5 ± 0.01a	0.33 ± 0.01ab	134±10a	2.03 ± 0.2a	100 ± 0a
Sig	0.178	0.041	0.240	0.335	0.248
	Día 21				
DCC	0.65±0.06ab	0.51 ± 0.03ab	196±28a	1.2 ± 0.1a	95 ± 10a
DCL	0.79±0.09b	0.61 ± 0.06c	261±40a	1.08±0.07a	90 ± 14a
DCC+Mycofix P [®]	0.6 ± 0.1a	0.5 ± 0.05a	184±53a	1.3 ± 0.3a	92.5 ± 5a
DCL+Mycofix P [®]	0.75±0.04ab	0.6 ± 0.02bc	249±17a	1.1 ± 0.06a	100 ± 0a
Sig	0.029	0.008	0.030	0.268	0.376
	Día 28				
DCC	0.97 ± 0.07a	0.86 ± 0.06ab	342±36a	1.15 ± 0.1a	90 ± 8.1a
DCL	1.13 ± 0.1a	1.07 ± 0.12c	418±63a	1.17±0.07a	90 ± 14a
DCC+Mycofix P [®]	0.91 ± 0.1a	0.82 ± 0.1a	330±77a	1.2 ± 0.1a	90 ± 8.1a
DCL+Mycofix P [®]	1.12 ± 0.01a	1.04 ± 0.03bc	418±15a	1.15±0.03a	95 ± 10a
Sig	0.057	0.004	0.067	0.904	0.873
	Día 35				
DCC	1.2 ± 0.09a	1.21 ± 0.7a	444±44a	1.2 ± 0.1a	83.3 ± 5.7a
DCL	1.5 ± 0.1b	1.69 ± 0.1b	582±34b	1.3 ± 0.03a	90 ± 17a
DCC+Mycofix P [®]	1.32±0.06ab	1.31 ± 0.03a	520±18ab	1.1 ± 0.02a	86 ± 11a
DCL+Mycofix P [®]	1.49±0.04b	1.58 ± 0.03b	589±29b	1.24±0.07a	85 ± 17a
Sig	0.004	0.000	0.001	0.359	0.945
	Día 42				
DCC	1.47±0.1a	1.6±0.06a	569±26a	1.29±0.1b	80±10a
DCL	2.07±0.2b	2.3±0.2b	842±84b	1.2±0.04ab	93.3±11.5a
DCC+Mycofix P [®]	1.79±0.3b	1.7±0.05b	738±3b	1.13±0.03a	86.6±11.5a
DCL+Mycofix P [®]	1.96±0.07b	2.1±0.05b	805±41b	1.2±0.06ab	77.5±18.9a
Sig	0.010	0.000	0.000	0.613	0.511

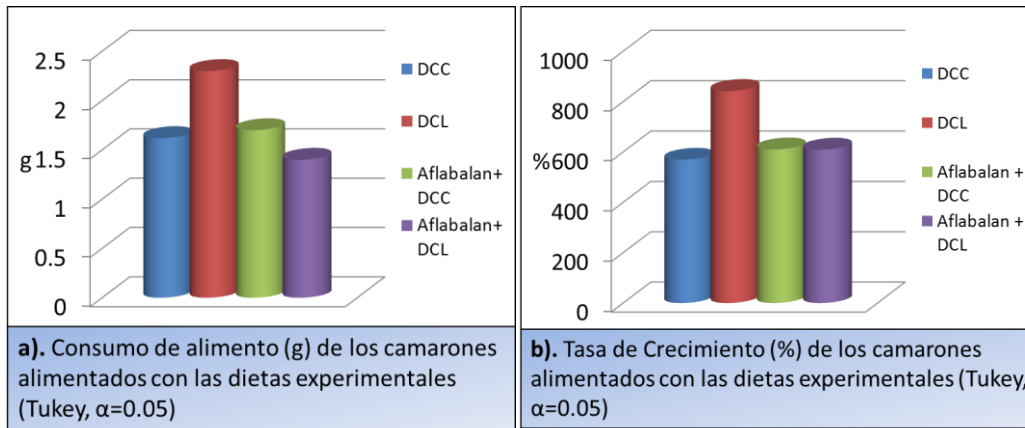


Figura 30. a) CA y b) TC de los camarones alimentados con las dietas controles y Aflabalan[®]

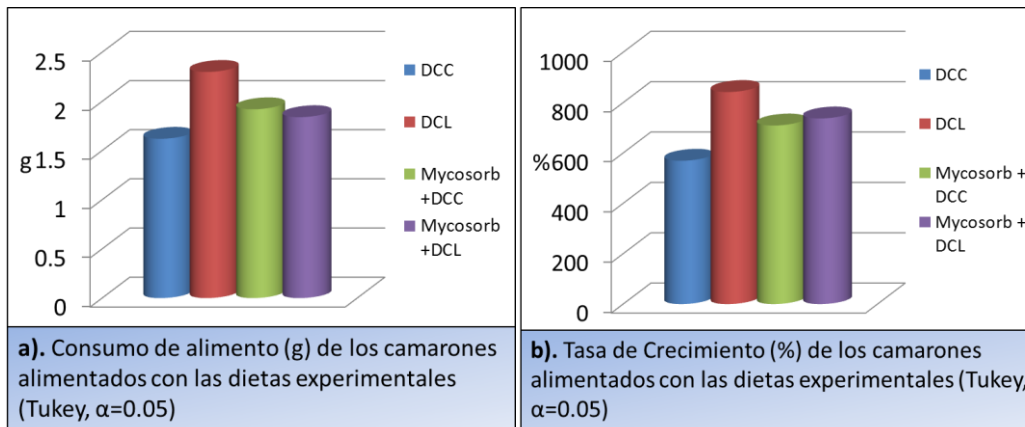


Figura 31. a) CA y b) TC de los camarones alimentados con las dietas controles y Mycosorb[®]

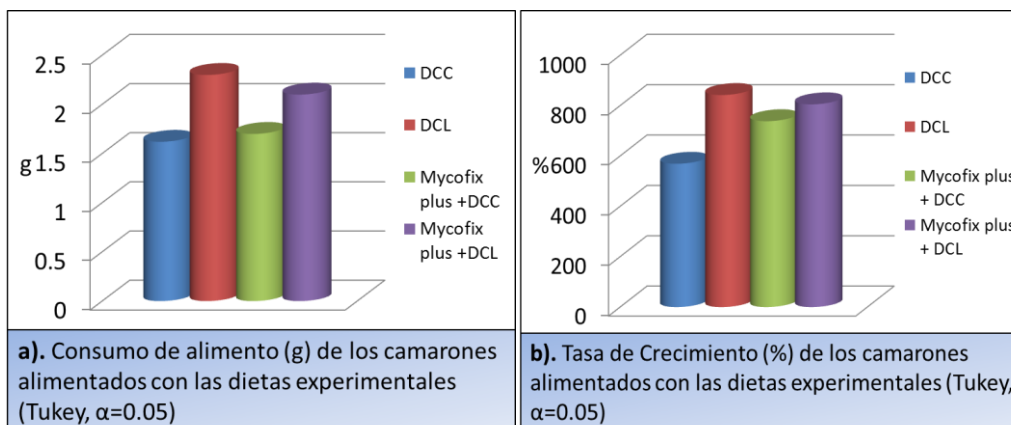


Figura 32. a) CA y b) TC de los camarones alimentados con las dietas controles y Mycofix plus[®]

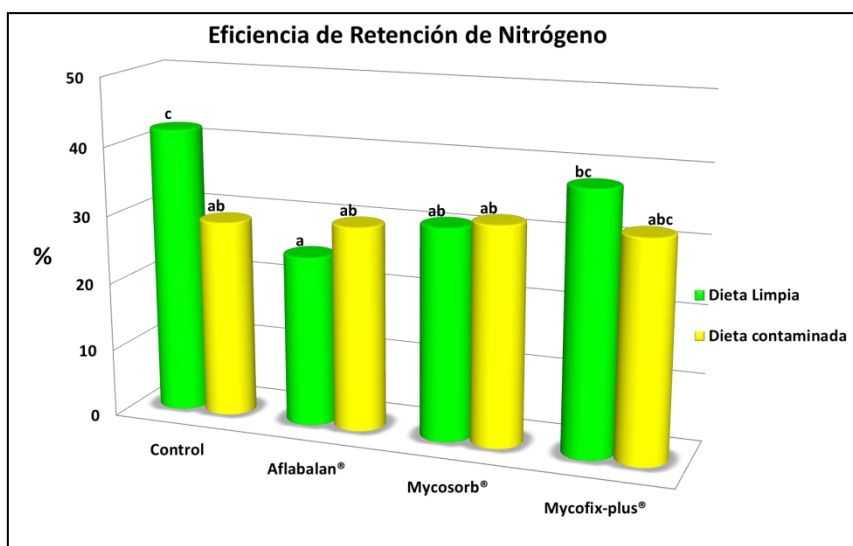


Figura 33. ERN de los camarones alimentados con las diferentes dietas a base de mezclas remediadoras a los 42 días (Tukey $\alpha=0.05$)

6.6. Efectos de la inclusión de antioxidantes en dietas contaminadas con AF sobre los parámetros zootécnicos del camarón (Experimento 5).

6.6.1. Composición química, contenido de micotoxinas y estabilidad de las dietas experimentales

La composición proximal, contenido de micotoxinas y parámetros de calidad de las dietas experimentales utilizadas en el presente bioensayo son presentados en la Tabla 34. La humedad de las dietas vario de 8.04 a 10.3% y el porcentaje de proteína fue de 36.8 a 38.7% este último sin observarse diferencias significativas ($P > 0.05$); el porcentaje de ceniza se vio incrementado en las dietas a las que se les agregó la harina de alga, resultado la DCC y la DCL con harina de alga en un 8.9 y 9.01% respectivamente ($P < 0.05$). La concentración de AF totales en las DCC's oscilo entre 118.4 y 127 ppb siendo la AF predominante la AFB₁ (96.4 a 103 ppb) seguido de la AFB₂ (14.4 a 15.7) y AFG₁ (7.6 a 8.3); el resto de las concentraciones de micotoxinas en las dietas contaminadas fue por debajo del límite de detección. La concentración de micotoxinas en las dietas limpias estuvo por debajo del límite de detección. La PMS de las dietas controles oscilaron entre 7.42 a 10.9%. Al añadir la curcumina ya sea a la DCL como a la DCC se mantuvo la misma tendencia (7.06 a 8.6%), sin embargo al agregar tanto el CLA como la harina de alga se pudo observar un aumento significativo en este parámetro de 11.7 al 12.8% y de 12.3 al 12.5% respectivamente. La PP oscilo entre 8.1 y 14.4% siendo en la DCC + CLA con el mayor porcentaje de manera

significativa ($P < 0.05$). La Abs. H₂O en la DCC y la DCL resulto en un 82.8 y 74.8% respectivamente. Por su parte la inclusión de harina de alga tanto a la DCC como la DCL resulto con la mayor índice (104.7 y 117.5% respectivamente), seguidas por la inclusión del CLA oscilando entre 90.9 y 97.3% y para la inclusión de curcumina los resultados variaron entre 77.8 a 77.1%.

Tabla 34. Composición proximal en base húmeda (%), cantidad de micotoxinas totales y estabilidad en el agua de alimentos experimentales con diferentes niveles de inclusión de AF del experimento 5.

	DCC	DCL	DCC + Algas	DCL + Algas	DCC+Curc	DCL+Curc	DCC+CLA	DCL+CLA
Composición química								
Humedad	10.3±0.5	10.05±0.6	9.6±1.04	10.02±0.5	10.1±0.4	8.4±0.3	8.3±0.4	8.04±0.3
Proteína	38.1±0.63	37.3±0.36	37.4±0.8	36.84±0.2	37.5±0.8	38.2±0.6	38.3±0.37	38.7±0.12
Fibra	1.6±0.02	1.45±0.12	1.5±0.07	1.51±0.12	1.3±0.24	1.57±0.04	1.44±0.007	1.5±0.17
Lípidos	7.19±0.46	7.61± 0.27	7.4±0.25	7.57±0.25	7.6±0.14	7.5 ± 0.36	7.3 ± 0.014	7.2 ± 0.07
Ceniza	7.96±0.03	7.8± 0.02	8.9± 0.06	9.01 ± 0.03	7.6 ± 0.01	8.1 ± 0.05	8.6 ± 1.09	8.2± 0.49
ELN	34.4	34.4	33.01	34.4	33.9	36.6	36.1	36.02
Energía (Cal)	4766±120	4590±11	4848±67	4479±971	4589±384	4952±502	4683±70	4759±214
Cantidad de Micotoxinas totales en las dietas								
Deoxinivalenol (ppm)	0.1	ND	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Fumomisina B1 (ppb)	ND	ND	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Fumomisina B2 (ppb)	ND	ND	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Fumomisina B3 (ppb)	ND	ND	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Ochratoxin A (ppb)	ND	ND	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Toxina T-2 (ppb)	ND	ND	NA	NA	NA	NA	NA	NA
AF B1 (ppb)	99	ND	96.4	ND	97.5	ND	103	ND
AF B2 (ppb)	15.1	ND	14.4	ND	14.7	ND	15.7	ND
AF G1 (ppb)	7.9	ND	7.6	ND	7.6	ND	8.3	ND
AF G2 (ppb)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
AF totales (ppb)	122	0	118.4	0	119.8	0	127	0
Estabilidad de las dietas								
PMS (%)	10.9±0.8ab	7.42±0.57a	12.3± 0.02b	12.5±2.02b	8.6±0.2ab	7.06±1.4a	11.7±1.9b	12.8 ± 1.1b
PP (%)	9.23±0.6a	8.1±1.3a	12.6±1.4bc	12.3±0.4bc	8.87±1.3a	10.2±0.7ab	14.4±0.5c	12.6±1.1bc
Abs. H ₂ O (%)	82.8±3.2ab	74.8±2.7a	104.7±12.1cd	117.5±12.3d	77.8±3.8ab	77.1±4.81ab	97.3±4.7bcd	90.9±10abc

Probabilidades para ANOVA de PMS, PP y Abs. H₂O fue $P=0.000$

6.6.2. Parámetros de crecimiento en camarones alimentados con dietas suplementadas con AF y suplementadas con compuestos antioxidantes.

Los parámetros zootécnicos evaluados sobre los camarones alimentados con las diferentes dietas experimentales son mostrados en las Tablas 35, 36 y 37. La contaminación con AF en el alimento para camarón disminuyó el peso final, el CA, la TC, en un 61, 17.6 y un 83.5% respectivamente, además de aumentar la TCA de un 61% comparado con la dieta control. Al incorporar tanto la curcumina como el CLA a la DCC no observaron diferencias significativas, sin embargo existen un aumento en el peso promedio, CA y la TC en un 14.2, 10.3, 25.9% para la curcumina y en un 16.6, 15.2 y 28% para el CLA respectivamente. La inclusión de la curcumina a la dieta DCL disminuyó el peso final en un 15.7% y la TC en un 15.9% aunque sin diferencias significativas (Figura 34), por su parte el CLA mantuvo los parámetros de rendimiento cuando fue añadido a la DCL (Figura 35). Al agregar las algas a la DCL no se observaron alteraciones el peso final y la TC, no obstante el CA fue significativamente mayor en un 24% y al agregar las algas a la DCC aumento en un 22% el peso promedio, 39.1% el CA y 30.1% la TC, aunque sin diferencias significativas (Figura 36).

Tabla 35. Parámetros zootécnicos de los camarones alimentados con las diferentes dietas experimentales durante 42 días divididos por mezcla remedidora (Experimentos 5).

	Curcumina				
	Peso (g)	CA (g/org)	TC (%)	TCA	Sobrevivencia (%)
Día 7					
DCC	0.53±0.01a	0.31 ± 0.01a	63 ± 2a	1.5±0.04a	100 ± 0a
DCL	0.51±0.03a	0.30 ± 0.004a	55± 9a	1.7 ± 0.2a	100 ± 0a
DCC+ curcumina	0.51±0.02a	0.3 ± 0.008a	58 ± 8a	1.6 ± 0.21a	97.2 ± 4.8a
DCL+ curcumina	0.52±0.01a	0.3 ± 0.005a	62 ± 6.2a	1.4 ± 0.11a	100 ± 0a
Sig.	0.574	0.223	0.535	0.501	0.441
Día 14					
DCC	0.68±0.06a	0.66 ± 0.027a	109 ± 19a	1.88±0.26a	97.2 ± 4.8a
DCL	0.72±0.05a	0.66 ± 0.02a	120 ± 18a	1.7 ± 0.2a	100 ± 0a
DCC+ curcumina	0.7 ± 0.07a	0.65± 0.04a	117 ± 22a	1.7 ± 0.33a	97.2 ± 4.8a
DCL+ curcumina	0.72±0.07a	0.65 ± 0.03a	121 ± 21a	1.6 ± 0.25a	100 ± 0a
Sig.	0.887	0.884	0.888	0.795	0.596
Día 21					
DCC	0.87±0.07a	1.05 ± 0.04a	168±21a	1.8 ± 0.2a	94.4 ± 9.6a
DCL	0.9 ± 0.08a	1.1 ± 0.05a	175 ± 26a	1.7 ± 0.2a	100 ± 0a
DCC+ curcumina	0.86±0.08a	1.09 ± 0.04a	166 ± 25a	1.7 ± 0.33a	97.2 ± 4.8a
DCL+ curcumina	0.92±0.07a	1.07 ± 0.05a	185 ± 26a	1.6 ± 0.25a	94.4 ± 4.8a
Sig.	0.777	0.647	0.79	0.795	0.627
Día 28					
DCC	1.06±0.17a	1.54 ± 0.06a	224 ± 58a	2.2 ± 0.47a	91.6 ± 8.3a
DCL	1.11±0.07a	1.76 ± 0.1a	240 ± 20a	2.2 ± 0.16a	100 ± 0a
DCC+ curcumina	1.05±0.13a	1.67 ± 0.17a	225 ± 40a	2.3 ± 0.36a	97.2 ± 4.8a
DCL+ curcumina	1.11±0.12a	1.73 ± 0.09a	243 ± 42a	2.2 ± 0.28a	91.6 ± 8.3a
Sig.	0.897	0.066	0.911	0.943	0.344
Día 35					
DCC	1.02±0.21a	2.17 ± 0.14a	230 ± 53a	3.3 ± 1a	80.5 ± 12a
DCL	1.56 ± 0.1b	2.53 ± 0.18ab	377 ± 5b	2.04 ± 0.1a	94.4 ± 4.8a
DCC+ curcumina	1.3±0.14ab	2.39 ± 0.17ab	300 ± 42ab	2.4 ± 0.2a	91.6 ± 0a
DCL+ curcumina	1.42±0.2ab	2.63 ± 0.16b	336 ± 71ab	2.4 ± 0.3a	83.3 ± 8.3a
Sig.	0.029	0.046	0.034	0.074	0.184
Día 42					
DCC	1.19 ± 0.2a	2.89 ± 0.3a	265 ± 66a	3.43±0.6b	70 ± 12.7a
DCL	1.92±0.14b	3.4 ± 0.2ab	486 ± 47b	2.13 ± 0.2a	88.8 ± 4.8a
DCC+ curcumina	1.4±0.17ab	3.24 ± 0.34ab	334 ± 52ab	3 ± 0.2ab	83.3 ± 14a
DCL+ curcumina	1.65±0.3ab	3.62 ± 0.23b	409±100ab	2.8 ± 0.4ab	75 ± 16.6a
Sig.	0.018	0.06	0.023	0.023	0.33

Tabla 36. Parámetros zootécnicos de los camarones alimentados con las diferentes dietas experimentales durante 42 días divididos por mezcla remediadora (Experimentos 5).

	CLA				
	Peso (g)	CA (g/org)	TC (%)	TCA	Sobrevivencia (%)
Día 7					
DCC	0.53 ± 0.01a	0.3 ± 0.01a	63 ± 2.67a	1.5 ± 0.04a	100 ± 0a
DCL	0.51 ± 0.03a	0.3 ± 0.004a	55 ± 9a	1.7 ± 0.2a	100 ± 0a
DCC+CLA	0.54 ± 0.03a	0.28 ± 0.03a	68 ± 8.6a	1.3 ± 0.2a	100 ± 0a
DCL+CLA	0.54 ± 0.03a	0.29 ± 0.03a	65 ± 10.5a	1.38 ± 0.3a	100 ± 0a
Sig.	0.502	0.687	0.341	0.345	1.000
Día 14					
DCC	0.68 ± 0.06a	0.66 ± 0.03ab	109 ± 19a	1.88 ± 0.3a	97.2 ± 4.8a
DCL	0.72 ± 0.05a	0.66 ± 0.02ab	120 ± 18a	1.7 ± 0.2a	100 ± 0a
DCC+CLA	0.71 ± 0.02a	0.63 ± 0.06a	120 ± 7.2a	1.6 ± 0.2a	97.2 ± 4.8a
DCL+CLA	0.81 ± 0.06a	0.66 ± 0.04ab	147 ± 16.5a	1.3 ± 0.13a	94.4 ± 4.8a
Sig.	0.088	0.763	0.098	0.093	0.487
Día 21					
DCC	0.87 ± 0.07a	1.05 ± 0.04a	168 ± 21.3a	1.8 ± 0.2a	94.4 ± 9.6a
DCL	0.9 ± 0.08a	1.1 ± 0.05abc	175 ± 26a	1.7 ± 0.2a	100 ± 0a
DCC+CLA	0.86 ± 0.01a	1.08 ± 0.07ab	169 ± 44a	1.6 ± 0.2a	94.4 ± 4.8a
DCL+CLA	1.06 ± 0.1a	1.1 ± 0.07abc	223 ± 28.4a	1.3 ± 0.13a	94.4 ± 4.8a
Sig.	0.135	0.487	0.176	0.093	0.596
Día 28					
DCC	1.06 ± 0.17a	1.54 ± 0.06a	224 ± 58.8a	2.2 ± 0.47a	91.6 ± 8.3a
DCL	1.11 ± 0.07a	1.76 ± 0.1ab	240 ± 20a	2.2 ± 0.16a	100 ± 0a
DCC+CLA	1.06 ± 0.17a	1.71 ± 0.08ab	231 ± 57a	2.3 ± 0.5a	88.8 ± 12.7a
DCL+CLA	1.33 ± 0.06a	1.8 ± 0.12b	307 ± 17.6a	1.8 ± 0.07a	94.4 ± 4.8a
Sig.	0.11	0.055	0.131	0.287	0.418
Día 35					
DCC	1.02 ± 0.21a	2.17 ± 0.14a	230 ± 53.7a	3.3 ± 1a	80.5 ± 12a
DCL	1.56 ± 0.1ab	2.53 ± 0.2ab	377 ± 5.7b	2.04 ± 0.1a	94.4 ± 4.8a
DCC+CLA	1.26 ± 0.3ab	2.5 ± 0.17ab	292 ± 81ab	2.7 ± 0.6a	83.3 ± 8.3a
DCL+CLA	1.69 ± 0.12a	2.7 ± 0.18b	415 ± 40b	2.03 ± 0.3a	83.3 ± 8.3a
Sig.	0.008	0.022	0.01	0.074	0.256
Día 42					
DCC	1.2 ± 0.21 a	2.9 ± 0.3a	265 ± 66.5a	3.43 ± 0.6b	70 ± 12.7a
DCL	1.9 ± 0.14b	3.4 ± 0.2ab	486 ± 47.8b	2.13 ± 0.2a	88.8 ± 4.8a
DCC+CLA	1.4 ± 0.22ab	3.37 ± 0.29ab	339 ± 68ab	3.1 ± 0.4ab	83.3 ± 8.3a
DCL+CLA	1.93 ± 0.18b	3.92 ± 0.25b	488 ± 60b	2.5 ± 0.4ab	88.8 ± 4.8a
Sig.	0.004	0.01	0.005	0.024	0.064

Tabla 37. Parámetros zootécnicos de los camarones alimentados con las diferentes dietas experimentales durante 42 días divididos por mezcla remedidora (Experimentos 5).

	Peso (g)	CA (g/org)	Algas		Sobrevivencia (%)
			TC (%)	TCA	
Día 7					
DCC	0.53 ± 0.01a	0.31 ± 0.01ab	63 ± 2a	1.5 ± 0.04a	100 ± 0a
DCL	0.51 ± 0.03a	0.31 ± 0.004a	55 ± 9a	1.7 ± 0.2a	100 ± 0a
DCC + Alga	0.53 ± 0.03a	0.32 ± 0.01c	61 ± 10a	1.6 ± 0.24a	100 ± 0a
DCL + Alga	0.52 ± 0.06a	0.32 ± 0.02bc	62 ± 21a	1.7 ± 0.4a	97.2 ± 4.8a
Sig.	0.902	0.008	0.888	0.845	0.441
Día 14					
DCC	0.68 ± 0.06a	0.66 ± 0.027a	109 ± 19a	1.8 ± 0.26a	97.2 ± 4.8a
DCL	0.72 ± 0.05a	0.66 ± 0.02a	120 ± 18a	1.7 ± 0.2a	100 ± 0a
DCC + Alga	0.71 ± 0.05a	0.73 ± 0.01b	116 ± 17a	1.9 ± 0.2a	94.4 ± 4.8a
DCL + Alga	0.67 ± 0.11a	0.72 ± 0.02b	108 ± 37a	2.2 ± 0.5a	94.4 ± 4.8a
Sig.	0.874	0.006	0.912	0.452	0.363
Día 21					
DCC	0.87 ± 0.07a	1.05 ± 0.04a	168 ± 21a	1.8 ± 0.2a	94.4 ± 9.6a
DCL	0.90 ± 0.08a	1.13 ± 0.05ab	175 ± 26a	1.7 ± 0.2a	100 ± 0a
DCC + Alga	0.97 ± 0.03a	1.25 ± 0.06bc	196 ± 9a	1.9 ± 0.25a	88.8 ± 12a
DCL + Alga	0.91 ± 0.17a	1.27 ± 0.07c	182 ± 55a	2.2 ± 0.5a	91.6 ± 8.3a
Sig.	0.746	0.006	0.767	0.452	0.512
Día 28					
DCC	1.06 ± 0.17a	1.54 ± 0.06a	224 ± 58.8a	2.17 ± 0.4a	91.6 ± 8.3a
DCL	1.11 ± 0.07a	1.76 ± 0.1ab	240 ± 20a	2.2 ± 0.16a	100 ± 0a
DCC + Alga	1.14 ± 0.12a	2.05 ± 0.1bc	248 ± 38a	2.5 ± 0.4a	88.8 ± 12a
DCL + Alga	1.16 ± 0.15a	2.21 ± 0.19c	257 ± 49a	2.6 ± 0.25a	88.8 ± 9.6a
Sig.	0.824	0.001	0.81	0.284	0.432
Día 35					
DCC	1.02 ± 0.21a	2.17 ± 0.14a	230 ± 53a	3.3 ± 1ab	80.5 ± 12a
DCL	1.56 ± 0.1b	2.53 ± 0.18ab	377 ± 5b	2.04 ± 0.1a	94.4 ± 4.8a
DCC + Alga	1.26 ± 0.1ab	2.98 ± 0.12bc	284 ± 35ab	3.2 ± 0.5b	86.1 ± 9.6a
DCL + Alga	1.5 ± 0.2b	3.27 ± 0.35c	362 ± 68b	2.8 ± 0.4ab	75 ± 16.6a
Sig.	0.015	0.001	0.016	0.057	0.29
Día 42					
DCC	1.19 ± 0.02a	2.89 ± 0.3a	265 ± 66a	3.4 ± 0.6b	69.4 ± 12a
DCL	1.9 ± 0.14c	3.4 ± 0.2ab	486 ± 47c	2.1 ± 0.17a	88.8 ± 4.8a
DCC + Alga	1.5 ± 0.05ab	4.02 ± 0.14bc	345 ± 16ab	3.5 ± 0.2b	86.1 ± 9.6a
DCL + Alga	1.79 ± 0.1bc	4.49 ± 0.47c	451 ± 49 bc	3.1 ± 0.4ab	66.6 ± 15a
Sig.	0.001	0.001	0.002	0.009	0.085

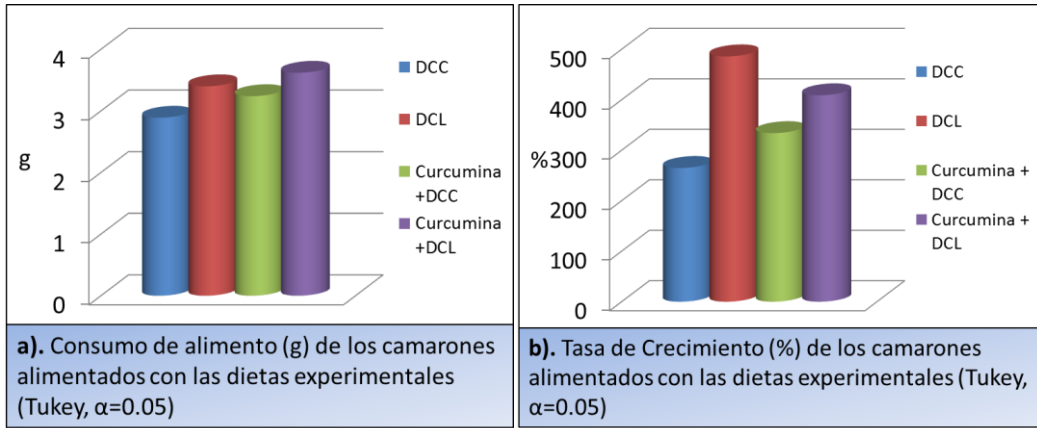


Figura 34. a) Consumo de alimento y b) Tasa de crecimiento de los camarones alimentados con las dietas controles y Curcumina

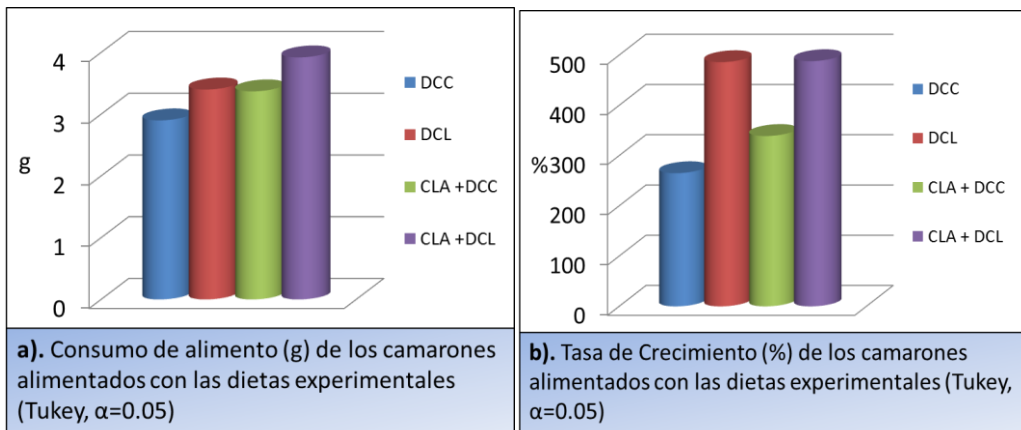


Figura 35. a) Consumo de alimento y b) Tasa de crecimiento de los camarones alimentados con las dietas controles y CLA

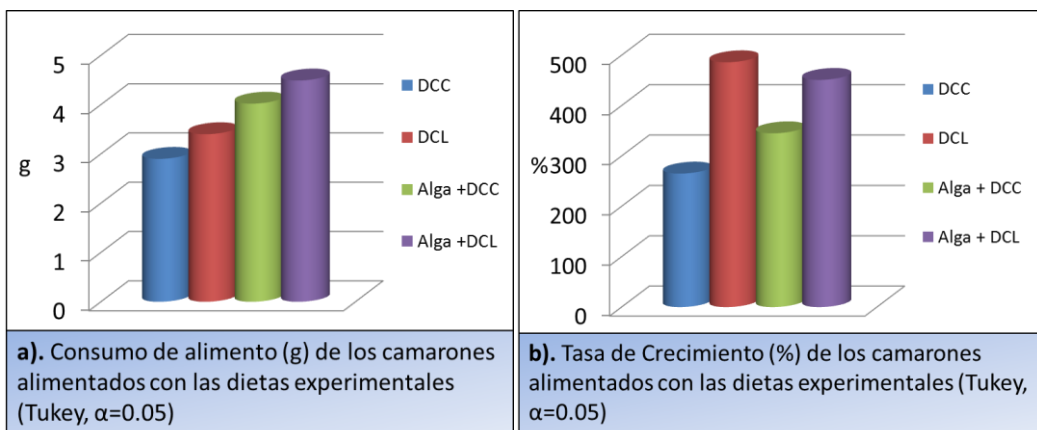


Figura 36. a) Consumo de alimento y b) Tasa de crecimiento de los camarones alimentados con las dietas controles y harina de alga

6.7. Efectos de la inclusión de niveles crecientes de Mycofix Plus® solo o en combinación con harina de alga *U. clathrata* en dietas contaminadas con AF sobre parámetros zootécnicos del camarón (Experimento 6)

6.7.1. Composición química, contenido de micotoxinas y estabilidad de las dietas experimentales

La composición proximal y estabilidad de las dietas experimentales utilizadas en el presente bioensayo son presentadas en la Tabla 38. La composición química de las dietas fue muy similar entre ellas. La concentración de AF totales para la DCC fue de 78.2 ppb, siendo la AFB₁ la AF predominante (63.7 ppb) seguida de la AFB₂ y la AFG₂ (13 y 1.5 ppb respectivamente); el resto de las concentraciones de micotoxinas en las dietas contaminadas fue por debajo del límite de detección. La concentración de micotoxinas en la DCC fue por debajo del límite de detección. La PMS se mantuvo en un rango entre 5.31 y 6.6 %, siendo las dietas que contenían 5 g de Mycofix Plus® ya sea solo o en combinación con la harina de alga las más altas en este parámetro. La pérdida de proteína de las diferentes dietas oscilo entre 17.8 a 21.8%, aunque el ANOVA muestra una $P=0.013$, el análisis estadístico realizado por Tukey mantiene los valores englobados en un solo grupo. Para la absorción de agua se pudo observar que la inclusión de Mycofix Plus a la DCC obtuvo los resultados más altos, de estas dietas, la inclusión de 0.25 g a la DCC obtuvo la mayor capacidad de absorción (137.6%), seguida por la inclusión de 0.25 g a la DCC más harina de alga, en contraste, la DCL con o sin harina de alga obtuvieron la menor Abs. H₂O oscilando entre un 116.5 a 118.8%. para la DCC se observó una capacidad de absorción de 120% y al agregar la harina de alga esta aumenta ligeramente a un 126%. Para las dietas con 3 y 5 g de Mycofix Plus® con o sin harina de alga, los valores oscilaron entre 129.1 a 132.1%.

Tabla 38. Composición proximal en base húmeda (%), cantidad de micotoxinas totales y estabilidad en el agua de alimentos experimentales con diferentes niveles de inclusión de AF del experimento 6.

	DCC	DCL	DCC + Alga	DCL + Alga	DCC + 2.5My [®]	DCC + 2.5 My [®] +Alga	DCC + 3 My	DCC + 3 My [®] +Alga	DCC + 5 My [®]	DCC + 5 My [®] +Alga
Composición química										
Humedad	7.6±0.02	7.5 ±0.03	7.8±0.02	7.8±0.12	7.5±0.07	7.9±0.02	7.1 ±0.05	7.5±0.13	7.9 ±0.08	7.5 ±0.2
Proteína	37.5±0.4	37.3±0.5	37.6±0.3	37.2±0.4	37.7±1.6	37.9±0.3	37.3±0.2	38.2±0.4	37.25±0.4	38.2±0.9
Fibra	1.26±0.1	1.36±0.3	1.37±0.01	1.2±0.1	1.1±0.02	1.42±0.36	1.7±0.6	1.62±0.16	1.2±0.26	1.2±0.07
Lípidos	7.5±0.27	7.5±0.41	7.18±0.6	7.13±0.6	7.2±0.37	7.81±0.09	7.21±0.14	7.22±0.04	7.4±0.47	8.03±0.2
Ceniza	8.2±0.07	8.1±0.06	8.8±0.06	8.7±0.09	8.3±0.07	8.9 ±0.09	8.3±0.02	9.02±0.09	8.52±0.01	9.2±0.06
ELN	37.735	38.1344	37.1142	37.7494	37.9836	35.8856	38.2638	36.4579	37.6745	35.84
Energía (Cal)	4275±212	4395±211	4696±164	4853±79	4871±43	5039±110	4917±78	4701±452	4902±367	4701±212
Cantidad de Micotoxinas totales en las dietas										
Deoxinivalenol (ppm)	0.1	ND	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Fumomisina B1 (ppb)	ND	ND	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Fumomisina B2 (ppb)	ND	ND	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Fumomisina B3 (ppb)	ND	ND	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Ochratoxin A (ppb)	ND	ND	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Toxina T-2 (ppb)	ND	ND	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
AF B1 (ppb)	63.7	ND	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
AF B2 (ppb)	13	ND	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
AF G1 (ppb)	1.5	ND	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
AF G2 (ppb)	ND	ND	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
AF totales (ppb)	78.2	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Estabilidad de las dietas										
PMS (%)	6.05±0.2ab	6.63±0.6b	6.25±0.15ab	6.64±0.4b	5.31±0.14a	6.42±0.14ab	6.47±0.17ab	6.45±0.31ab	6.6±0.16b	6.63±0.54b
PP (%)	17.8±1.1	19.4±0.5	19.2±1	21.8±1	17.8±1.5	19.9±2	19.1±0.7	21.6±0.6	21.1±0.9	20.6±2.5
Abs. H ₂ O (%)	120±7.6ab	118.8±9.7abc	126.7±9.5abc	116.5±4.5a	137.6±7.1c	137±12bc	129.1±8.8abc	130.6±9.7abc	132.1±4.2abc	130±11abc

Probabilidades para ANOVA de PMS $P=0.006$, PP $P=0.013$ y Abs. H₂O fue $P=0.003$

6.7.2. Parámetros de crecimiento de camarones alimentados con dietas contaminadas con AF y suplementadas con diferentes niveles de Mycofix Plus[®] y harina de ulva.

Los parámetros zootécnicos evaluados sobre los camarones alimentados con las diferentes dietas experimentales son mostrados en la Tabla 39. La contaminación con AF en la dieta disminuyó de manera significativa ($P < 0.05$) el peso promedio, CA y la TC en un 45, 29 y 46% respectivamente, además de aumentar la TCA en un 23.8%. La adición 4% de alga a la DCC mejora de manera significativa ($P < 0.05$) el peso promedio en un 60% y disminuyó la TCA en un 19.2%. Además de mejorar el CA, la TC en un 23 y 57.7% respectivamente aunque no se de manera significativa ($P > 0.05$). Al añadir las algas a la DCL se puede observar una ligera disminución en el peso promedio, CA, TC (22, 9, 27% respectivamente) y un aumento en TCA de un 22%, sin embargo, estos valores no tuvieron diferencias significativas comparados con los de la DCL ($P > 0.05$). Por su parte, al final del experimento, la adición de Mycofix Plus[®] a la DCC (en cualquiera de sus niveles) disminuye la TCA, la TC y CA (este último de manera significativa [$P < 0.05$]). La mezcla de 2.5 g Mycofix Plus[®] más el alga en la DCC en forma general mejoro los parámetros de rendimiento comparándolos con los de la DCC, aunque no de manera significativa ($P > 0.05$), se observó un aumento en el peso promedio, TC, y disminución de la TCA, y aumento significativamente ($P < 0.05$) el CA, y conforme se aumentó los niveles de Mycofix Plus[®] se observó una ligera disminución de estos parámetros (Figura 37).

Tabla 39. Parámetros zootécnicos de los camarones alimentados con las diferentes dietas experimentales durante 42 días (Experimentos 6).

	DCC	DCL	DCC+ alga	DCL + alga	DCC + 2.5 Mycofix plus	DCC + 2.5 Mycofix plus + alga	DCC + 3 Mycofix	DCC + 3 Mycofix + alga	DCC + 5 Mycofix	DCC + 5 Mycofix + alga	Significancia
Peso Promedio (g)											
inicial	0.31±0.05	0.31 ±0.1	0.31±0.1	0.308 ± 0.05	0.31 ± 0.05	0.309 ± 0.06	0.311 ± 0.05	0.31 ± 0.05	0.309 ± 0.05	0.311 ± 0.06	1
14 días	0.61±0.06a	0.73±0.04a	0.68±0.06a	0.64 ± 0.05a	0.7 ± 0.03a	0.67 ± 0.04a	0.64 ± 0.05a	0.72 ± 0.03a	0.67 ± 0.03a	0.68 ± 0.02a	0.112
28 días	1.0 ± 0.1a	1.2 ± 0.05a	1.23 ± 0.2a	1.1 ± 0.2a	1.26±0.07a	1.23 ± 0.1a	1.08 ± 0.14a	1.25 ± 0.06a	1.14 ± 0.05a	1.13 ± 0.2a	0.358
42 días	1.2 ± 0.2a	2.2 ± 0.2b	1.92±0.2b	1.7 ± 0.2ab	1.9 ± 0.1ab	1.82 ± 0.1ab	1.66 ± 0.2ab	1.75 ± 0.08ab	1.67 ± 0.1ab	1.66 ± 0.3ab	0.019
Consumo de alimento (g/org)											
14 días	0.44±0.04a	0.55±0.01c	0.48±0.02ab	0.53±0.02bc	0.57±0.02c	0.57 ± 0.01c	0.59 ± 0.0c	0.55 ± 0.01c	0.57 ± 0.0c	0.58 ± 0.02c	0
28 días	1.21±0.17a	1.61±0.05b	1.41 ± 0.2ab	1.46 ± 0.1ab	1.6 ± 0.1b	1.65 ± 0.07b	1.6 ± 0.13b	1.59 ± 0.02b	1.59 ± 0.02b	1.57 ± 0.07b	0.005
42 días	2.2 ± 0.2a	3.12 ± 0.0b	2.85 ± 0.5ab	2.84 ± 0.3b	3.12 ± 0.2b	3.32 ± 0.3b	3.21 ± 0.3b	3.09 ± 0.09b	3.18 ± 0.03b	3.12 ± 0.3b	0.017
Tasa de Crecimiento (%)											
14 días	97 ± 19a	137 ± 15a	121 ± 19a	106 ± 20a	127 ± 8a	117 ± 11a	108 ± 17a	132 ± 10a	119 ± 9a	121 ± 5a	0.08
28 días	221 ± 31a	300 ± 15a	297 ± 82a	254 ± 63a	306 ± 24a	300 ± 43a	245 ± 43a	305 ± 20a	270 ± 10a	263 ± 61a	0.307
42 días	331 ± 70a	617 ± 93b	522 ± 83ab	452 ± 77ab	511 ± 60ab	489 ± 59ab	433 ± 68ab	467 ± 27ab	444 ± 48ab	432 ± 117ab	0.044
Tasa de conversión alimenticia											
14 días	1.4 ± 0.1ab	1.3 ± 0.1ab	1.3 ± 0.1ab	1.6 ± 0.2ab	1.4±0.08ab	1.6 ± 0.1ab	1.8 ± 0.3b	1.36 ± 0.1ab	1.5 ± 0.1ab	1.5 ± 0.03ab	0.036
28 días	1.75±0.03a	1.74 ± 0.1a	1.57 ± 0.2a	1.9 ± 0.31a	1.67 ± 0.1a	1.79 ± 0.18a	2.12 ± 0.21a	1.69 ± 0.1a	1.92 ± 0.1a	1.98 ± 0.4a	0.127
42 días	2.85 ± 0.2c	1.9 ± 0.3 ab	1.76 ± 0.05a	2.03±0.08ab	1.97±0.17ab	2.16±0.07ab	2.4 ± 0.17bc	2.14 ± 0.18ab	2.34±0.2abc	2.1 ± 0.5ab	0.001
Sobrevivencia (%)											
14 días	100 ± 0a	100 ± 0a	97.3 ± 4.6a	97.3 ± 4.6a	100 ± 0a	94.6 ± 4.6a	97.3 ± 4.6a	97.3 ± 4.6a	100 ± 0a	100 ± 0a	0.487
28 días	97.2 ± 4.8a	97.2 ± 4.8a	91.6 ± 14.4a	88.8 ± 12.7a	94.4 ± 9.6a	80.5 ± 12.7a	94.4 ± 9.6a	86.1 ± 4.8a	88.8 ± 9.6a	88.8 ± 12.7a	0.627
42 días	80 ± 12a	91.6 ± 0a	80.5 ± 20.9a	80.5 ± 12.7a	91.6 ± 0a	87.5 ± 5.8a	91.6 ± 8.3a	77.7 ± 4.8a	83.3 ± 8.3a	83.3 ± 8.3a	0.698

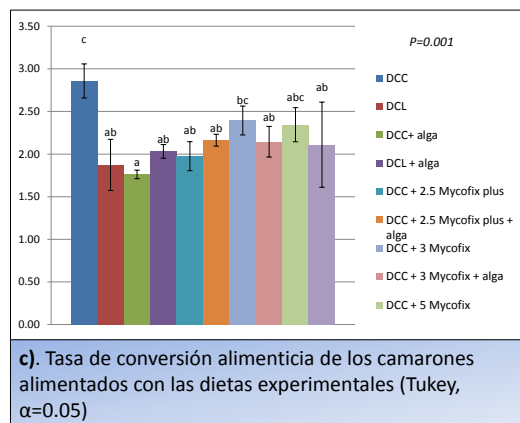
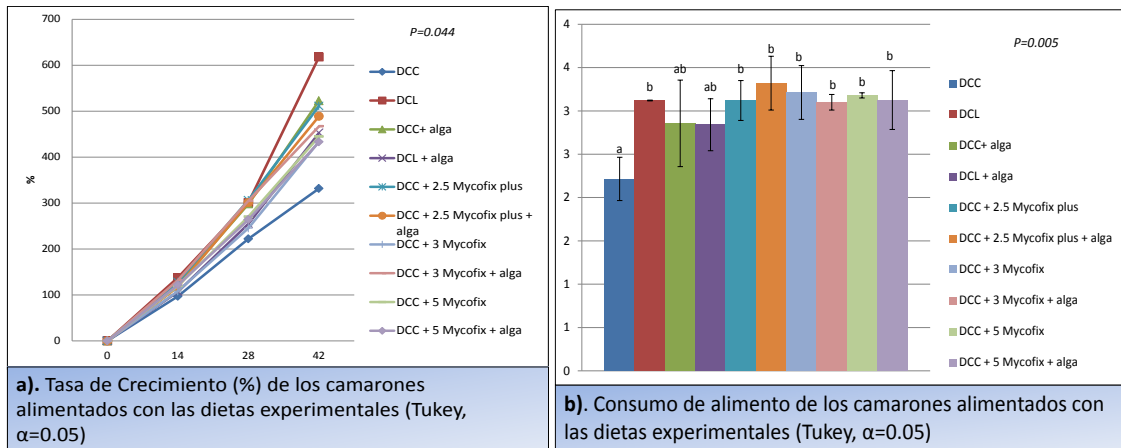


Figura 37. Principales parámetros zootécnicos de los camarones alimentados con las diferentes dietas experimentales a los 42 días en el bioensayo de Mycofix Plus[®]-Algas.
a) TC, b) CA y c) TCA.

6.8. Expresión diferencial de 292 genes en hepatopáncreas de camarón en relación al consumo de diferentes niveles de AF (Experimento 7)

Las Figuras 38 a y b se presentan las imágenes de las laminillas tipo microarreglos obtenidas de las muestras de hepatopáncreas del experimento. La información general de los experimentos expresados diferencialmente en los camarones alimentados con la dieta contaminada con 1000 ppb de AFT y el alimento control se presentan en la Tabla 32.

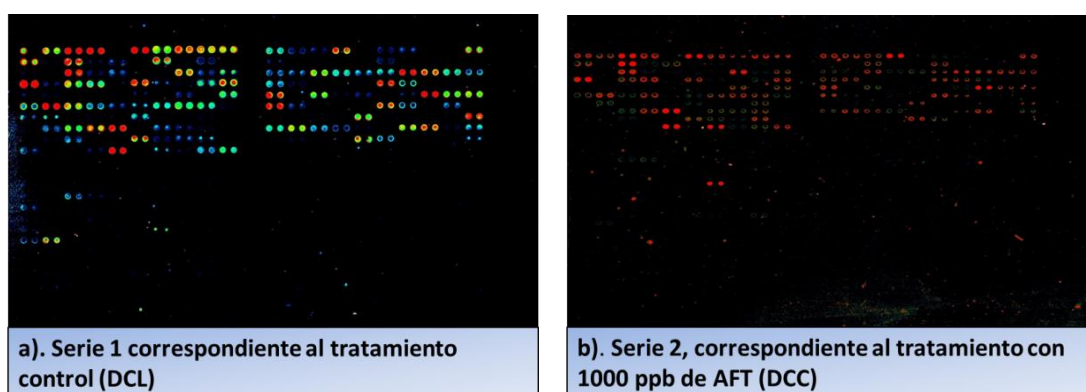


Figura 38. Laminillas de los microarreglos de las los hepatopáncreas de camarones alimentados con la a) DCL y b) la dieta contaminada con 1000 ppb de AFT.

De un total de 292 genes que contenía la laminilla, 157 fueron detectados (expresados), de los cuales 109 presentaron una expresión diferencial entre los tratamientos. De los elementos determinados con una expresión diferencial, 85 fueron sobre estimulados mientras que 24 fueron reprimidos en los camarones alimentados con la DCL y DCC (Tabla 40 y Figura 39). Para los genes sobre-expresados el 20% corresponden al metabolismo y homeostasis del camarón, mientras que el 31% de esta misma categoría correspondían a los genes reprimidos (Figura 40).

Tabla 40. Resultados generales de los análisis con microarreglos.

	N° de Clones	% del total de clones
No detectados	141	46.2
Detectados	151	53.8
Reprimidos	23	8.2
Sobre-expresados	80	29.1
Sin expresión diferencial	48	16.4
Total	292	100

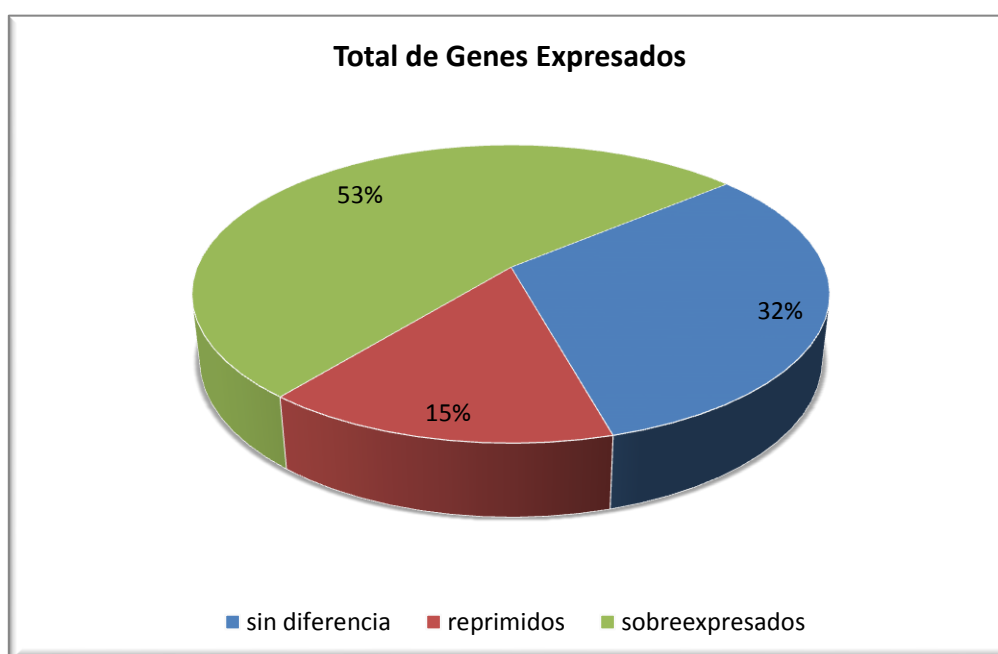


Figura 39. Porcentaje de los genes estimulados, reprimidos y sin diferencia de los genes de hepatopáncreas de los camarones alimentados con la DCL y la DCC.

Los genes sobre-expresados y reprimidos en los hepatopáncreas de los camarones alimentados con la DCL y DCC se enlistan en la Tabla 41. Los genes de las proteínas de estabilase I EST y nucleotide (respuesta inmune), y Tyrosine phosphatase (metabolismo y homeostasis) fueron los genes significativamente más sobre-expresados (Figura 40a), mientras los genes de Programmed cell death 10 (apoptosis), LPS & BG Binding Protein (LBBP) (respuesta inmune), Cystathionine-beta-synthase (metabolismo

y homeostasis), Glyoxalase 1 (proteínas estructurales) resultaron ser los más significativamente reprimidos (Figura 40b).

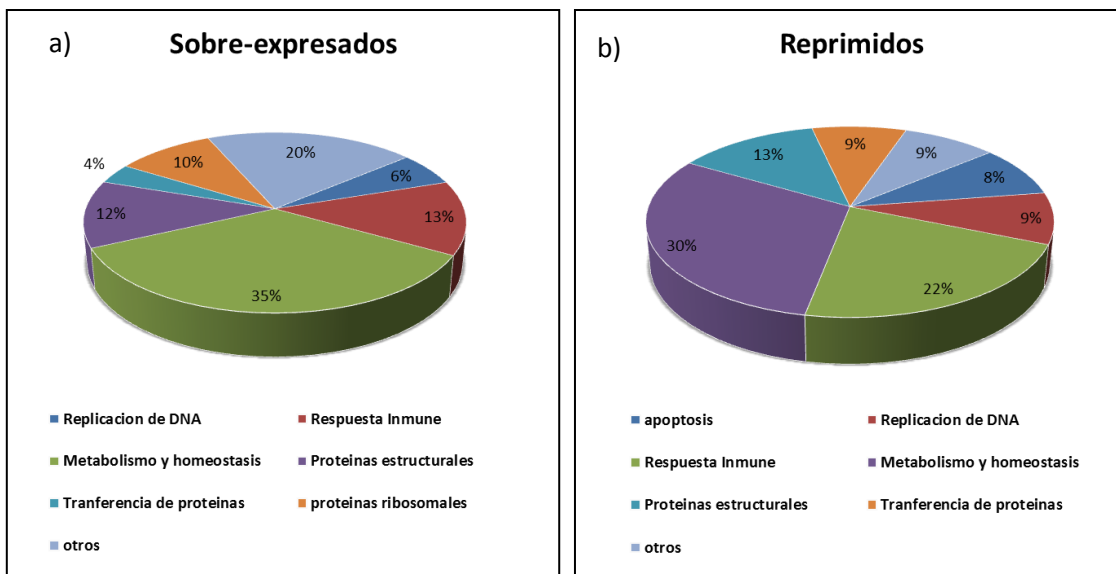


Figura 40. Porcentaje de genes a) Sobre-expresados y b) Reprimidos en los camarones alimentados con la DCL y la DCC con 1000 ppb de AF, englobados de acuerdo a su función biológica

Tabla 41. Expresión diferencial de genes de hepatopáncreas de camarón alimentados con DCL y DCC respecto a camarones alimentados con la DCC

Reprimidos		
ID del gen	Definición	Relación Cy5/Cy3*
Apoptosis		
gi_313	Programmed cell death 10	-11.4149494
SMX-0156	Cathepsin B	-9.70735913
Replicación DNA		
SMX-0211	Mago-nashi_proliferation-associated	-9.2632692
SM1_080	Translation initiation factor 3 subunit	-8.83289001
Respuesta Inmune		
SM1_017	LPS y BG Binding Protein (LBBP)	-10.8772841

Continuación:

SMX-0173	Crustin	-2.79701298
SM1_077	putative antimicrobial peptide	-1.21825936
SM1_010	Lysozyme	-8.95419631
gi_145	fibrosin	-8.44914865

Metabolismo y homeostasis

SM1_027	cMnSOD	-9.96361862
SMX-0206	Malate dehydrogenase_cytosolic	-10.2491135
SMX-0149	Carboxypeptidase A	-10.2550286
SMX-0193	Cystathionine-beta-synthase	-10.7936033
SMX-0277	Fumarate Hydratase	-9.41574177
SMX-0276	Fructose 1_6-bisphosphate Aldolase	-9.97297979
SMX-0099	ADP-Ribosylation Factor 79F_CG8385-P_DROME	-10.0354865

Proteínas estructurales

SMX-0126	Mouse Nidogen	-8.67419227
SMX-0235	Keratin	-9.53915881
SMX-0300	Glyoxalase 1	-10.5343029

Transferencia de proteínas

SMX-0280	GABA-A Receptor Associated Protein	-9.24792751
SM1_074	Probable amino acid transporter protein	-9.89330153

Otros

gi_287	NNN	-10.5201276
gi_511	NNN	-1.72540064

Sobre-expresados

ID del gen	Definición	Relación Cy5/Cy3*
Replicación de DNA		
gi_182	Trans factor E2-alpha	1.29881783
gi_312	Translation factor	1.43889006

Continuación:

gi_115	Transcription initiation Factor TFIID subunit	1.94708724
gi_452	ribonucleoprotein	1.96811594
gi_438	Eukaryotic translation initiatio	1.97671033

Respuesta Inmune

SM1_040	Hemocyanin	1.39444608
gi_448	Proteinase inhibitor Kazal	2.07969447
SM1_005	Chitinase	2.28540909
gi_131	Chelonianin	3.13750352
SM1_004	Cathepsin L	8.55842071
gi_430	HSP-60	10.1686721
SM1_028	destabilase I EST y nucleotide	13.6794251
SM1_049	peroxinectin	8.36413466
SM1_025	Beta Glucano	9.56605404
gi_240	Anti LPS	10.6238815

Metabolismo y homeostasis

gi_159	Acyl carrier prot	1.33384629
SM1_070	Lipase-like	1.35002641
gi_264	mitochondrial processing pept	1.38857268
gi_017	Cytochrome C oxidase polype	1.40807253
gi_433	disulfide isomerase	1.42212238
gi_057	Mak3p	1.72445368
gi_371	glucuronyltransferase	1.38233655
gi_047	fumarate hydrolase	1.92146976
SM1_016	ATPase sub 6	2.13755891
gi_280	NADH dehydrogenase Fe-S	2.27259711
gi_095	ATPase and permease dom	2.49454891
gi_315	F1F0-type ATP synthase	2.59597347
SM1_031	Carboxipeptidase	8.89330153
gi_036	Cytochrome C oxidase subunit	8.99717948

Continuación:

gi_128	Farnesyl pyrophosphate synt	9.04028972
gi_191	N-acetyltransferase	2.10823268
SM1_071	NADH dehydrogenase sub2	9.1176431
gi_158	proPO AF	9.20212382
SM1_044	Glycosyltransferase	9.28655776
gi_225	Acetylesterase	10.1617617
SM1_030	Amylase	10.6325409
gi_318	Tyrosine phosphatase	11.0234078
gi_331	60S ribosomal protein L24	1.83799061
gi_373	SHC (Src homology 2 domain)	2.24666828
SMX-0104	Thioredoxin-Related Protein 14	8.4429435
SMX-0262	F1F0-type ATP Synthase_subunit g	8.92332749
SMX-0129	F1F0-type ATP Synthase_subunit g	9.00422047
SM1_045	keratinocyte associated	9.02652344
SM1_072	NADH quinone oxidoreductase	9.11374217

Proteínas estructurales

gi_300	histone H1	1.30995122
gi_148	microtubule	1.33157826
gi_081	H3	1.33978625
gi_246	Tropomyosin	1.34225678
gi_526	S26	1.35871138
gi_014	Thymosin	2.03788578
gi_656	profilin	2.64594823
gi_563	L27	2.41559744
gi_472	L9	2.90031531
gi_051	keratin associated	2.13398134

Transferencia de proteínas

SMX-0093	Acyl-CoA-Binding Protein	1.25656702
SMX-0269	Fatty Acid-Binding Protein 10	2.37805297
gi_064	DNA-binding transcriptional regulator	2.66961385

Continuación:

SM1_029	Acyl-CoA Binding protein EST and nucleotide	9.27961058
---------	---	------------

Proteínas ribosomales

gi_263	L35	1.41144811
gi_262	S14	1.46801531
gi_379	L8	1.57260458
gi_022	L3	1.69795848
gi_075	S9	1.89443806
gi_426	S3	1.94300871
gi_233	L31	2.0181227
gi_257	L15	2.05080896

Otros

gi_443	EST vannamei	1.48832219
gi_722	EST lymphoid Organ	1.76365909
H1	gi_915	2.19581627
gi_117	similar to antistasin	2.19995298
gi_468	WD40 protein Ciao 1	2.8057786
gi_171	Putative Salivary Cys-Rich Secreted Prot	4.16564901
gi_413	EST vannamei	9.11243951
gi_144	NNN	1.22931051
gi_727	NNN	1.56203991
A1	gi_944	1.68718326
gi_146	NNN	1.89556418
G4	gi_810	2.15607242
gi_175	NNN	10.115694

*log₂ de la diferencias de la señal (expresión) dada en las muestras de hepatopáncreas de camarón alimentado con la DCL y DCC entre los hepatopáncreas de los camarones alimentados con la DCC (1000 ppb de AFT) tomando los valores entre -1.2 y 1.2 como sin cambio de expresión (+/-20%)

7. DISCUSIONES

7.1. Dietas experimentales.

7.1.1. Composición química de los alimentos experimentales.

El contenido de lípidos y proteína en todas las dietas experimentales fue muy similar y su contenido fue a lo esperado. Para el caso del contenido de ceniza solamente se observó un incremento cuando las dietas fueron suplementadas principalmente con harina de alga (8.9 a 9.01%). Este incremento se debe al elevado contenido de ceniza que contiene este ingrediente (Cruz-Suarez *et al.*, 2010). El incremento en ceniza también fue observado en las dietas que contenían los niveles crecientes de Mycofix plus[®] además de la harina de alga *U. clathrata*.

7.1.2. Estabilidad del alimento y absorción de agua.

La manufacturación de alimentos para consumo animal envuelve una serie de procesos que intervienen en la calidad final del pellet, sin embargo, la incorporación de algunos ingredientes tales como arcillas minerales que juegan un papel clave en algunos de los parámetros físicos del alimento (Thomas *et al.*, 1998).

Pfost y Young (1973) encontraron que las bentonitas de sodio tienen efectos beneficiosos en la durabilidad del alimento, en promedio 5% más alta que para las dietas control; aunque no se observaron diferencias significativas en el uso de la bentonita en relación con el tamaño de partícula (fino, medio, grueso) de los ingredientes alimenticios. Las dietas que fueron suplementadas con Mycofix Select[®] y Fixat[®] productos que contenían aluminosilicatos mejoró la PMS (12-16%), mientras que la inclusión de Novasil Plus[®] y Zeolex Extra[®] no presentaron tendencia alguna. Existen evidencias que muestran que la inclusión de montmorillonita y vermiculita incrementan la capacidad de absorción de agua debido a la presencia de espacios intercalados en las moléculas de este productos (Vaught *et al.* 2006). La mayor capacidad de absorción de agua en estas dietas fue para las que contenían Mycofix Select[®] y Fixat[®]: lo que confirma la presencia de montmorillonita.

Se ha reportado también que la inclusión de fibras solubles (arabinosilanos, y pectinas) y β -glucanos mejoran la calidad del pellet (Thomas *et al.*, 1998; Thammakiti *et al.*, 2004; Zechner-Krpan *et al.*, 2009). Por su parte Otero *et al.* (1996) encontraron

que el glucomanano semi-puro, cuando es obtenido de las paredes celulares por tratamiento alcalino, tiende a duplicar su absorción de agua. En el presente estudio, se observó una variación de 14.2% a 17.7% de PP, sin embargo las dietas suplementadas con los diferentes productos presentaron menor PMS con respecto a las dietas sin suplementar (10% contra 6.3 a 8%), confirmando que la inclusión de los productos que tenían productos de levadura (experimento 4) mejoran la calidad del pellet. Para la absorción de agua los resultados oscilaron entre 87.7 y 108.7%, sin observarse diferencias significativas entre las diferentes tratamientos, por lo que para este experimento solamente se modificó la estabilidad de los alimentos.

Se ha reportado que la inclusión de harina de macroalgas mejora la estabilidad de los alimentos para organismos acuáticos: Hashim y Mat-Saat (1992), reportan que la incorporación de 5% *Ulva* ssp. incremento la estabilidad de las dietas para Channidae (*Channa striatus*). De igual manera Peñaflorida y Golez (1996) reportan la buena capacidad de estabilidad de las dietas suplementadas con harina de *Kappaphycus alvarezii* (6-7% de PMS). Por su parte Peña-Rodríguez (2011) encontró una mejor estabilidad de dietas para camarón *L. vannamei* observando que al agregar harina de alga *Ulva clathrata*, disminuida la PMS en un 19.1%. Los valores PMS encontrados en el presente estudio en las dietas que se les añadió harina de alga encuentran similitud a los reportados por Peñaflorida y Golez (1996) donde encontraron una PMS del 12% en dietas que contenían *Gracilaria heteroclada*. Aunque las dietas suplementadas con harina de alga y CLA presentan una mayor PMS en comparación con las dietas sin suplementar y las suplementadas con curcuminas se encuentran dentro de los valores reportados para alimentos para camarón. Diferencias relacionadas a una mayor pérdida en comparación con otros estudios pudiera deberse al tipo de fórmula empleada en este estudio. Se ha reportado que la inclusión de harina de alga incrementa la absorción de agua, Peña-Rodríguez (2011), observó un incremento (28%) en este parámetro cuando incluyó 6% harina de *Ulva clathrata* a dietas para camarón. Cruz-Suárez *et al.* (2009) menciona que la harina de ulva otorga una mayor capacidad de Abs. H₂O gracias a la presencia de grupos sulfatados en fracciones de polisacáridos y/o el efecto sinérgico con los restos sacáridos presentes en la ulva. En el presente experimento observamos que la inclusión de harina de alga *U. clathrata* incrementó este parámetro en un promedio de 42%, confirmándose que la inclusión de este ingrediente modifica este parámetro en el alimento para camarón, mientras que la inclusión de CLA presentó un incremento del 20%. El efecto no encontrado en este parámetro debido a la presencia de curcuminas era

de esperarse por su bajo nivel de inclusión en el alimento. Para el experimento donde se evaluó el efecto de la combinación de Mycofix plus[®] con harina de alga observamos que la PMS y la Abs. H₂O no fue modificada por la presencia de estos dos ingredientes. El cambio nulo en estos parámetros pudiera deberse al efecto combinado de estos productos en el alimento.

7.2. Parámetros zootécnicos.

7.2.1. Efecto de las AF sobre los parámetros de rendimiento del camarón *L. vannamei* (Experimentos 1 y 2).

7.2.1.1. Consumo de alimento y ganancia de peso.

El presente estudio en juveniles de camarón *L. vannamei* demostró que la presencia de AF en la dieta afectan la mayoría de los parámetros de rendimiento. Lo que concuerda con lo encontrado anteriormente por otros autores que han utilizado AF en formas puras (Bautista *et al.*, 1994; Ostrowski- Meissner *et al.*, 1995; Boonyaratpalin *et al.*, 2001). La reducción de la ganancia de peso observada en los camarones alimentados con las dietas contaminadas fue del 13-17% (para dosis bajas) a 26-48% (para dosis altas). En comparación con el presente estudio Ostrowski- Meissner *et al.*, (1995) obtuvo resultados más contundentes al alimentar por 3 semanas juveniles de camarón *L. vannamei* a niveles de 1500 y 3000 ppb de AFB₁ en forma pura, disminuyendo 39 a 45% en comparación a los camarones del tratamiento control. Por otra parte Bautista *et al.* (1994), encontraron una reducción significativa en la tasa de crecimiento en juveniles de camarón tigre *Penaeus monodon* a los que se les proporciono dietas contaminadas con 75 y 100 ppb de AFB₁ puras, en el presente estudio esta reducción fue observada a niveles de 55 y 120 de AFT, en los cuales la presencia de AFB₁ fue de 49 y 92 ppb respectivamente. Este resultado indica un efecto aditivo causado por la presencia de otras AF en la dieta.

Diversos estudios muestran que la presencia de AF pueden afectar el crecimiento a través de un proceso de “hormesis bifásica”, es decir a bajas dosis estimula el crecimiento y altas dosis inhibe el crecimiento (Díaz *et al.*, 2008). A bajas dosis típicamente la estimulación máxima es entre 30 y 40% mayor que el control (Calabrese, 2002). Este fenómeno ha sido descrito anteriormente en carpas gibel, Huang *et al.* (2011) encontraron que el peso final para las carpas alimentada con 50 ppb de AFB₁ fue 12.3% mayor que la dieta control. Han *et al.* (2010) reportaron previamente en la misma especie que la ganancia de peso en organismos alimentados con 40 ppb de AFB₁ fue

112.6% mayor que la dieta control después de 3 meses. En el presente trabajo, los camarones alimentados con las dietas suplementadas con 10 y 40 ppb de AF totales presentaron un mayor peso final (de 1.6 a 2%) que los camarones alimentados con la dieta control, sin embargo no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos.

Un factor ampliamente identificado con la presencia de AF es una disminución en el consumo de alimento. En un gran número de investigaciones se ha observado esta característica ya sea en animales terrestres tales como cerdos (Nguyen *et al.*, 2008; Schell *et al.*, 1993), aves (Arafa *et al.*, 1981; Shi *et al.*, 2006) y en organismos acuáticos como la carpa gibel (Huang *et al.*, 2011), tilapia (Deng *et al.*, 2010) y camarón (Wiseman *et al.*, 1982; Ostrowski-Meissner *et al.*, 1995). En el presente estudio, los camarones alimentados con las dietas contaminadas con AF consumieron menos alimento (2 a 24%) que los camarones alimentados con la dieta control, relacionando este resultado inversamente con los niveles de inclusión de AF en las dietas experimentales, con excepción de los camarones alimentados con la dieta suplementada con 10 ppb de AFT, los cuales mostraron un mayor consumo de alimento (17%) que los organismos a los cuales se les proporciono la dieta no contaminada.

7.2.1.2. Sobrevivencia.

La baja sobrevivencia en camarones alimentados con altos niveles de AFB₁ (15,000 a 300,000 ppb) en formas puras ha sido bien documentada (Wiseman *et al.*, 1982; Ostrowski-Meissner *et al.*, 1995). Sin embargo, existen resultados contradictorios en estudios realizados con menores dosis de inclusión. Ostrowski-Meissner *et al.* (1995) no observaron una reducción significativa de la sobrevivencia de individuos de *L. vannamei* alimentados con dietas suplementadas con 15 a 900 ppb de AFB₁ en forma pura. Bautista *et al.* (1994) concluyeron que la contaminación de las dietas con 25, 50, 75 y 100 ppb de AFB₁ en forma pura causó mortalidades significativas (40-60%) en *P. monodon* después de 60 días de alimentación, por su parte Boonyaratpalin *et al.* (2001) utilizando la misma especie, documentaron una disminución significativa de la sobrevivencia después de ocho semanas de alimentación con dietas suplementadas con 2500 ppb de AFB₁ en forma pura (26%); sin embargo, los camarones alimentados con las dietas suplementadas con 500 y 1000 ppb de AFB₁ mostraron solo una pequeña disminución en la sobrevivencia (89.47 y 86.84% respectivamente). Por su parte

Soonngam y Huatacharon (2007) en acuerdo a lo mencionado anteriormente documentaron que el consumo de dietas suplementadas con 500 ppb de AFB₁ en forma pura no afecta la sobrevivencia en juveniles de *P. monodon*. En el presente estudio, se observó una disminución de la sobrevivencia en los camarones alimentados con las dietas que contenían 1000 y 2000 ppb de AFT desde el día 21 hasta el final del experimento (62-72% vs 88-94%), mientras que la sobrevivencia de los camarones alimentados con bajos niveles de inclusión no se vio afectada. En los dos experimentos donde se realizaron las inclusiones de AFT la sobrevivencia se vio afectada estadísticamente a niveles de 1000 y 2000 ppb, si comparamos estos resultados a los estudios mencionados anteriormente se puede deducir que la presencia de otras micotoxinas producidas durante la contaminación natural de los granos aumenta la mortalidad de dichos organismos.

7.2.1.3. Tasa de Conversión alimenticia.

La TCA es un parámetro que se ha visto alterado por el consumo de AF. En varios estudios se ha observado esta característica en varios tipos de organismos como ratas (Baptista *et al.*, 2008), cerdos (Ying Hua *et al.*, 2007; Nguyen *et al.*, 2008), aves (Bintvihok y Kositcharoenkul, 2006; Yinghua *et al.*, 2009) como organismos acuáticos (Akter *et al.*, 2010). En crustáceos Boonyaratpalin *et al.* (2000) reporto que el incremento de la TCA en el camarón tigre es directamente proporcional al consumo de AFB₁. Suppadit *et al.* (2006) encontraron que la TCA se vio aumentada con el consumo de dietas contaminadas con 500 ppb de AFB₁ esto en *L. vannamei*. Para peces Anh Tuan *et al.* (2002) encontraron que la TCA en tilapia del Nilo era afectada a niveles de 2.5mg de AFB₁/Kg de alimento. En contradicción Chávez-Sánchez *et al.* (1994) utilizando la misma especie encontraron que no afecta este parámetro a niveles de 30mg/kg. Resultados encontrados por Akter *et al.* (2010) alimentando con 100 ppb de AFB₁ a carpas aumenta la TCA 2.23 veces cuando es comparado con los de la dieta control. En el presente estudio encontramos que la TCA para las dosis altas fue de 1.59, 1.69 y 2.08 para los camarones alimentados con 500, 1000 y 2000 ppb de AFT respectivamente (este último con diferencias significativas) y para las dosis bajas las mayores TCA fueron para los camarones alimentados con las dietas que contenían 10, 60 y 120 ppb de AFT, siendo los camarones alimentados con 10 ppb los que obtuvieron la más alta TCA, esto se debe al incremento en el consumo de alimento anteriormente

mencionado. Con esto confirmamos que este parámetro se ve afectado de manera significativa a elevados niveles de inclusión de AF.

7.2.1.4. Daños histológicos.

Una característica histopatológica revelada por la presencia de AF es la disminución tanto de la capacidad de almacenamiento de nutrientes de las células B como de la actividad mitótica de las células E. Los cambios en la actividad celular observada en el presente estudio concuerdan con los descritos anteriormente en otras especies. Gopinath y Raj (2009) observaron en sub-adultos de *P. monodon* una alteración de la función normal de absorción y almacenamiento de nutrientes debido al número reducido de células R (Restzellen), disminución de la producción de enzimas digestivas de las que son encargadas las células F (Fibrillazellen) y alteración en la secreción enzimática llevada a cabo por las células B (Blasenzellen).

La reducción significativa del contenido lipídico de las vacuolas ha sido caracterizada en presencia de AF, Lightner *et al.* (1982) observaron una disminución significativa al inyectar a camarones *L. stylirostris* con 20 ppb de AFB₁ en forma pura. Esto mismo fue reportado por Bautista *et al.* (1994) cuando alimento a juveniles de *P. monodon* con dietas que contenían AFB₁ a partir de un nivel de 75 ppb. En la presente investigación solo los camarones alimentados con 500, 1000 y 2000 ppb de AFT, mostraron una disminución significativa en la vacualización lipídica, la diferencia entre los resultados de los diferentes estudios pudiera deberse a que en los primeros estudios se utilizaron AFB₁ en forma pura y en los estudios realizados en el presente trabajo fue grano contaminado naturalmente; además de la especie de camarón evaluada, peso promedio entre otros.

Varios autores reportan daños histológicos en el hepatopáncreas de camarones alimentados con dietas contaminadas con AF. Lightner *et al.* (1982) y Ostrowski-Meissner *et al.* (1995) mostraron lesiones generales en el hepatopáncreas, órgano mandibular y los órganos hematopoyéticos en los camarones *L. stylirostris* y *L. vannamei* alimentados con dietas suplementadas con AFB₁ en forma puras (50 a 3000,000 ppb). Boonyaratpalin *et al.* (2001), observaron que al final de un periodo de 4 semanas alimentando juveniles de camarón *P. monodon* con 2500 ppb de AFB₁ en forma pura desarrollaba atrofia, acompañado con severa necrosis y degeneración en los túbulos del hepatopáncreas y por su parte, los camarones alimentados con 1000 ppb

desarrollaron una necrosis muy dispersa además de exhibir atrofia de las células en algunas áreas, estos cambios fueron detectados en el 60% de las muestras examinadas. Sin embargo al final de 8 semanas tanto los camarones que recibieron 1000 como 2500 ppb de AFB₁ en forma pura mostraron severos cambios histopatológicos en el tejido hepatopancreático. Además añade que los organismos alimentados con 500 ppb de AFB₁ en forma pura mostraban solo un inicial estado de cambios histológicos, con atrofia de las células del hepatopáncreas y una infiltración menor en los túbulos y solo el 40% de las muestras analizadas presentaban este daño. En contradicción Gopinath y Raj (2009) mencionan que la presencia de AFB₁ en forma pura a niveles de 50 ppb en los camarones de la misma especie podía causar un daño a las células después de 28 días de alimentación y que este daño puede ser incrementado conforme los niveles de inclusión van aumentando. En la presente investigación la atrofia de los túbulos del epitelio concuerda con otros estudios; no obstante a los camarones que se les proporciono las dietas a niveles bajos de AF presentaron mayor tasa de descamación de las células del hepatopáncreas (50 a 92%) que los organismos que recibieron las dosis altas (4 a 38%) e incluso los camarones que fueron alimentados con la DCL en el bioensayo 2 (33%) presentaban mayor daño que los organismos que consumieron la DCL en el bioensayo 1 (9%). Estas lesiones en el hepatopáncreas podrían estar ligadas a alguna infección bacteriana, lo que explica el alto valor de descamación celular encontrado para los camarones alimentados con la DCL el en experimento 2. Sin embargo, si se considera que la infección bacteriana es resultado de la depresión del sistema inmunológico causada por la presencia de micotoxinas, esto explicaría la mayor tasa de descamación de las células del hepatopáncreas obtenida para los camarones que se les proporciono las dosis bajas de AFT, estos animales fueron alimentados durante 64 días en comparación con las dietas que contenían los niveles mayores en el primer experimento, el cual a causas de la elevada mortalidad tuvo una duración de 28 días.

7.2.1.5. Eficiencia de retención de nitrógeno.

La ERN en animales alimentados con dietas contaminadas con AF puede ser relacionado a la reducción en la digestibilidad de nutrientes. En aves ponedoras (Leghorn), se ha observado que el consumo de alimento contaminado con 2000 ppb de AFB₁ reduce este índice en un 8.5% (Galkate y Rokde, 2009). Lim *et al.* (2001) observaron que la inclusión de harina de palmiste contaminada con 100 ppb de AF en tilapias reducía la utilización de nitrógeno proteico en un 30% además de reducir la

digestibilidad de la proteína. Para el caso de otras micotoxinas, Hooft *et al.* (2011) encontró que la que la trucha arcoíris alimentada con dietas contaminadas con 2.6 ppm de DON reducía la retención de nitrógeno en un 26%. Ostrowski-Meinssner *et al.* (1995) observaron que la inclusión de 900 ppb de AFB₁ reduce significativamente la digestibilidad de materia seca (45-53 vs 30%), proteína (68-75% vs 50%) y energía (50-71% vs 46%). Por su parte Gopinath (2006) menciona que la disminución en la digestibilidad de nutrientes como las proteínas, se puede deber al efecto de las AF a nivel histológico en la función de absorción y secreción de las células en los túbulos del hepatopáncreas. Estos resultados son congruentes a los obtenidos en el presente estudio, donde se observó que los camarones alimentados con la dieta con 2000 ppb de AFT mostraron la menor retención de nitrógeno (17% menos comparados con los de la dieta control), esto puede deberse a consecuencia del daño histológico mencionado anteriormente.

7.2.1.6. Depositación de AF en tejido de camarón alimentado con dietas contaminadas con AF.

El hallazgo de residuos de AF en musculo, hepatopáncreas o en todo el camarón alimentados con dietas contaminadas con AF ha sido un tema en el que existen algunas contradicciones. Boonyaratpalin *et al.* (2001) mencionan que los residuos en musculo de *P. monodon* alimentados con 100 ppb de AFB₁ en forma pura fue de 14.2 ppb a las 4 semanas de alimentación, sin embargo, después de este tiempo observó una reducción significativa a 0.6 ppb. Divakaran y Tacon (2000) no encontraron residuos de aflatoxina en tejido de camarón (camarón entero, musculo de la cola) y en heces cuando alimentaron a camarones *L. vannamei* con dietas que contenían 300, 400 y 900 ppb de AFB₁ en forma pura. En el presente estudio los niveles de aflatoxinas en tejido de camarón completo estuvieron cercanos a los niveles de detección de los métodos empleados.

7.2.2. Capacidad de reducción de aflatoxicosis en camarones por la presencia de aluminosilicatos (Experimento 3).

7.2.2.1. Consumo de alimento y ganancia en peso en camarones alimentados con dietas libres de AF y arcillas.

Existen diferentes estudios en donde se han observado una eficiencia de los aluminosilicatos en alimentos inocuos para animales terrestres, esto podría deberse a

que las arcillas ayudan a la lenta transición de los nutrientes en el sistema digestivo y así tener un mejor aprovechamiento de los mismos (Mumpton y Fishman, 1977) dando como resultado un incremento en los parámetros de rendimiento, esto es confirmado por Edrington *et al.* (1997) quienes encontraron que la incorporación de carbón activado a la dieta inocua para aves de engorda aumentaba la ganancia de peso en un 4.3%. Por su parte Denli y Okan (2006), observaron en la misma especie que al añadir HSCAS a una dieta libre de micotoxinas no afectaba la ganancia de peso ni la TCA, sin embargo al integrar carbón activado o diatomita (2.5 g del producto por kg de alimento) disminuía la ganancia de peso en un 4 y 6% y aumentaba la TCA en un 2.8 y 3.4% respectivamente. En animales acuáticos de igual manera existen resultados contradictorios: por ejemplo estudios realizados con alevines de bagres alimentados con dietas que contenían 0.3% y 0.6% de aluminosilicato de calcio y sodio hidratado a dietas libres de micotoxinas redujo el peso final en un 10% y 26% respectivamente (Lopes *et al.*, 2009), mientras que para la trucha arcoíris, se observó un mayor incremento de peso y conversión alimenticia cuando se alimentó con dietas libres de AF suplementadas con bentonita de sodio o mordenita (Eya *et al.*, 1996). En el presente bioensayo, al utilizar cada una de las arcillas con la DCL se observó que los camarones que consumieron Zeolex Extra[®], Mycofix Select[®] y Fixat[®] presentaron una disminución en el consumo de alimento (alrededor de 11-13%) y la tasa de crecimiento (de alrededor de 1.5-14%). En contraste, los individuos alimentados con la DCL+ Novasil Plus[®] mostraron un mayor consumo de alimento (7.1%) y una mejor tasa de crecimiento (8%). Estas diferencias en los resultados según Macháček *et al.* (2010) radica principalmente en el tipo de zeolita utilizada, su pureza, características físicas y químicas y su concentración en la dieta. Otros autores mencionan que la disminución del consumo de alimento es debido que las zeolitas secuestran compuestos nitrogenados (Nguyen y Tanner, 1998) las cuales son atrayentes para el camarón (Suresh *et al.*, 2011).

7.2.2.2. Capacidad de las arcillas para reducir la aflatoxicosis en camarón.

La capacidad de los aluminosilicatos para absorber AF ha sido ampliamente estudiada tanto *in vitro* como *in vivo* (Schell *et al.*, 1993; Keçeci *et al.*, 1998; Diaz *et al.*, 2003; Avantaggiato *et al.*, 2007; Yinghua *et al.*, 2009). Sin embargo, su efectividad para secuestrar las micotoxinas depende de muchos factores tales como la estructura y componentes químicos, tamaño de la partícula, capacidad de unión, área superficial y

propiedades fisicoquímicas (Kolossova y Stroka, 2012). Aunado a lo anterior las arcillas juegan un papel muy importante en su atracción, donde las características principales de absorción es la estructura física del secuestrante *i. e.* el total y distribución de su carga, el tamaño de los poros y su accesibilidad al área superficial. No obstante en el mecanismo de absorción de las arcillas existen algunas contradicciones, autores como Phillips *et al.* (2002) y Kannewischer *et al.* (2006) mencionan que, por medio de difracción por rayos X, las AF son absorbidas dentro de los espacios interlaminales de la arcilla. Por otro lado, Desheng *et al.* (2005) llegaron a una conclusión opuesta, mencionando que las moléculas de AFB₁ son ligadas en el borde de la esmectita por medio de un doble enlace de hidrogeno y que no son capaces de ser absorbidas penetrando el área de la capa intermedia.

Estudios en aves han encontrado que la incorporación de HSCAS y zeolita en dietas contaminadas con AF aumentaban la ganancia de peso y el consumo de alimento, disminuido por el consumo de estas micotoxinas (Oğuz y Kurtoğlu, 2000; Denli y Okan, 2006). Para especies acuáticas, algunos estudios han demostrado que la incorporación de bentonitas y montmorillonita (a trucha arcoíris y tilapia respectivamente) a dietas contaminadas con AF reduce su absorción en el tracto intestinal (Ellis *et al.*, 2000; Hassan *et al.*, 2010). Por otro lado, existen estudios que han mostrado que la inclusión de aluminosilicatos en dietas contaminadas con AF para bagres y trucha arcoíris no produjo una disminución de sus efectos tóxicos (Lopes *et al.*, 2009; Arana *et al.*, 2011). Estudios realizados en camarón por Suppadit *et al.* (2006) y Soonngam y Hutacharoen (2007) encontraron que la inclusión de HSCAS y vermiculita disminuyó los efectos negativos causados por la alimentación de dietas contaminadas con AF en *L. vannamei* y *P. monodon*, pero estas mejoras no eran estadísticamente similares a las dietas sin AF. En el presente experimento solo los camarones alimentados con la DCC adicionada con Zeolex obtuvieron un CA y TC similares a los alimentados con la DCL; al contrario, la incorporación de Novasil Plus[®], Mycofix Select[®] y Fixat[®] a la DCC mejoró ligeramente la TC aunque no mejoro de manera estadística el CA.

La tasa de conversión alimenticia y la eficiencia de retención de nitrógeno en el presente estudio, no fueron afectadas por el consumo de las AF, ni por la inclusión de las arcillas. La tasa de conversión alimenticia es el valor correspondiente del consumo de alimento aunado al aumento de peso, en los organismos que consumieron la DCC se observó una disminución paralela en los dos parámetros antes mencionados. La

inclusión de arcillas en las dietas experimentales no ocasiono efectos adversos en la sobrevivencia, resultados que coinciden con los publicados anteriormente por Soonngam y Hutacharoen (2007) en *P. monodon* alimentando con dietas que incluían HSCAS y vermiculita.

7.2.3. Capacidad de reducción de aflatoxicosis en camarones por la presencia de mezclas de aluminosilicatos con paredes de levadura y otros productos (Experimento 4).

7.2.3.1. Consumo de alimento y ganancia en peso en camarones alimentados con dietas libres de AF y con mezclas de aluminosilicatos con paredes de levadura y otros productos.

La suplementación de carbohidratos indigeribles (como la celulosa, polisacáridos en las paredes celulares de levadura y bacterias tales como el glucomanano y peptidoglicanos entre otros) han servido como un promotor del crecimiento al ser añadidos a dietas inocuas. En aves se ha encontrado un efecto promotor del crecimiento en la suplementación de paredes celulares de levadura de *Saccharomyces cerevisiae* a la dieta, aumentando la ganancia de peso en pollos de engorda de hasta un 5%, el consumo de alimento en un 2%, además de disminuir la TCA en un 4.6% (Arce *et al.*, 2005; Verduzco *et al.*, 2009). Por su parte Parlat *et al.* (2001) encontraron en codorniz japonesa un aumento en la ganancia de peso y consumo de alimento de un 40 y 41% respectivamente comparado con la dieta control. Estos resultados confirman lo publicado por de los Santos *et al.* (2007) quienes señalan que varios promotores nutricionales influyen en la función del intestino, ya que las paredes celulares de levadura de *S. cerevisiae* favorecen la longitud de las vellosidades, ejerciendo un efecto positivo en su tamaño, esto a su vez podría favorecer la superficie de absorción de nutrientes. Por otro lado, se ha observado que el uso de algunos productos como polímeros de glucomanano disminuyen el peso final en aves de engorda en un 2.5 y 4.8% a dosis de 0.5 y 1 g/kg de alimento respectivamente (Basmacioglu *et al.*, 2005). En cerdos de igual manera se observa una ligera reducción del peso promedio al añadir a la dieta 2g del polímero por kg de alimento (Battacone *et al.*, 2007).

En organismos acuáticos, para el caso de la trucha arcoíris, estudios realizados por Staykov *et al.* (2007) muestra que la suplementación en la dieta del 2g/kg de oligosacáridos de manano derivado de paredes celulares de *S. cerevisiae*, incrementa el promedio de peso final en un 12 y 10%; y disminuye la TCA en 9.6 y 11.2%; esto para

organismos mantenidos en jaulas y en raceway respectivamente. Utilizando el mismo producto a una concentración de 2 g /kg de alimento Torrecillas *et al.* (2007) observaron un aumento del 9% en lubina (*Dicentrarchus labrax*) comparados con organismos alimentados con la dieta control. De igual manera se observa un aumento en el peso promedio final (12%) y consumo de alimento (12.3%) en carpa común (*Cyprinus Carpio*) cuando fueron alimentados con una dieta que contenía 1g/kg de levadura. En el presente bioensayo al utilizar las mezclas remediadoras con las DCL se observó que los camarones que consumieron las dietas suplementadas con Aflabalan[®] y Mycosorb[®] disminuyeron el consumo de alimento en un 39 y 20%, además de presentar una menor TC (52 y 23% respectivamente). En contraste, al incorporar Mycofix Plus[®] a la DCL no se encontraron diferencias significativas tanto en CA como en la TC. Para la eficiencia de retención de nitrógeno se pudo observar que la incorporación tanto de Aflabalan[®] como de Mycosorb[®] a la DCL reduce de manera significativa este parámetro en un 40 y 26% respectivamente, y para el caso de Mycofix Plus[®] solo un 9% sin mostrar diferencias significativas, estos valores están sumamente correlacionados a los encontrados para el CA y la TC, esto puede deberse a que algunos productos pueden secuestrar compuestos nitrogenados, o en si nutrientes que provoquen una disminución en la palatabilidad o incorporación de nutrientes esenciales para el camarón (Ramos y Hernández, 1997)

7.2.3.2. Capacidad de reducción de aflatoxicosis en camarones por la presencia de mezclas de aluminosilicatos con paredes de levadura y otros productos.

La capacidad de los polisacáridos indigeribles para disminuir el efecto de las micotoxinas ha sido bien documentada en animales terrestres (Stanley *et al.*, 1993; Raju y Devegowda, 2000; El-Nezami *et al.*, 2000; Parlat *et al.*, 2001; Kamalzadeh *et al.*, 2009). Dentro de este grupo, el uso de la levadura *S. cerevisiae* ha mostrado ser muy útil como secuestrante de micotoxinas, Devegowda *et al.* (1998) observo que el extracto de fracción de paredes celulares de *S. cerevisiae* es capaz de secuestrar *in vitro* micotoxinas. Santin *et al.* (2003) encontraron que las paredes celulares mejoraban la TCA de las aves expuestas a AF; por su parte Basmacioglu *et al.* (20005), utilizando glucomanano esterificado extraído de las paredes celulares, observaron una mejora significativa en la ganancia de peso en un 59% al ser añadido al alimento contaminado con AF. Raju y Devegowda (2000) al añadir glucomanano de levadura (Mycosorb[®]) a una dieta

contaminada reportaron un incremento en el CA y peso promedio final de aves de engorda en un 4.5 y 1.6% respectivamente. Utilizando el mismo producto, Battacone *et al.* (2007) encontraron que los efectos negativos de las AF son disminuidos en cerdos. El modo de acción del glucomanano de levadura no es claro todavía, sin embargo, la hipótesis por la cual los efectos de las AF en el alimento se reducen es gracias a que la molécula es absorbida dentro de la matriz del glucomanano, previniendo su absorción en el tracto gastrointestinal (Kamalzadeh *et al.*, 2009).

En estudios realizados con Mycofix Plus[®] se observa que a partir de un nivel de inclusión de 0.05% disminuye los residuos de AFB₁ y AFM₁ en musculo e hígado de aves alimentadas con dietas contaminadas con AF (Bintvihok y Kositcharoenku, 2003; Gargees y Shareef, 2009). También se ha evidenciado que este producto aminora otros problemas desarrollados por la presencia de AF: Nešić *et al.* (2012) observa que la inclusión de este producto a dietas contaminadas con la toxina T-2 a aves de engorda aumentaba el peso final (+9.4%) pero también redujo las ulceraciones bucales provocadas por la presencia de esta micotoxina. Para el presente bioensayo se observó que al añadir Aflabalan[®] a la DCC no se observó mejora alguna en los parámetros en general, en contraste al añadir Mycosorb[®] y Mycofix Plus[®] se incrementó el consumo de alimento y la TC en un 15.6 y 20% y en un 5% 23% respectivamente, además de mejorar la TCA en un 14%.

7.2.4. Capacidad de reducción de aflatoxicosis en camarones por la presencia de diferentes fuentes de antioxidantes (Experimento 5).

7.2.4.1. Consumo de alimento y ganancia en peso en camarones alimentados con dietas libres de AF y con diferentes fuentes de antioxidantes.

En los últimos años ha incrementado la demanda del consumidor por un camarón de acuicultura con mejor calidad y seguridad para el consumo. Por lo tanto la estrategia de la producción tiene que centrarse en la calidad de la comida a través de higiene de piensos, además de resultados de crecimiento, que a menudo era el único enfoque en el pasado. Esta estrategia ha acelerado la búsqueda en la identificación y desarrollo de suplementos y aditivos dietarios seguros que aumenten la calidad del camarón de granja. Existen diferentes estudios que han encontrado una efectividad en el uso de ingredientes con propiedades antioxidantes para el aumento de los parámetros de rendimiento de organismos tanto terrestres como acuáticos. Chen *et al.* (2013) evaluaron la flor madre selva japonesa (*Lonicera japonica*), (utilizada por la medicina

tradicional China gracias al contenido de polifenoles [Xagorari *et al.*, 2001]), en los parámetros de crecimiento de camarones *Penaeus monodon*, incorporando varios niveles de harina de esta flor (0.1, 0.2, 0.4 y 0.8%) encontraron al final del experimento y comparando con los camarones alimentados con la dieta control, que el CA no era afectado por ninguno de los tratamientos, sin embargo, se observó que la TC era proporcional a la inclusión del madreelva japonesa hasta el tratamiento con 0.4%, aumentando en un 56% la TC, además de disminuir la TCA en un 43.7%. Estudios realizados en peces, Ji *et al.* (2007) utilizaron *Artemisia capillaries* y *Cnidium officinale*, las cuales poseen un alto contenido de polifenoles (Gundidza *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 1993), para comprobar su efecto promotor en el crecimiento en el pargo japonés (*Pagrus major*) y encontraron que la inclusión de harina de estas plantas herbáceas (0.5g/100g de dieta) aumentaba el peso final en un 20.5 y 20.6%, y la eficiencia alimenticia en un 21 y 19.2 respectivamente. Para el caso del CLA, Valente *et al.* (2007) utilizaron diferentes inclusiones (0.5%, 0.75 y 1%) con la finalidad de encontrar un efecto en el crecimiento en trucha arcoíris, no obstante, se pudo observar una disminución de un 2, 12 a 6.3% respectivamente, aunque estas diferencias no eran de manera significativa. Estudios realizados con robalos (*Dicentrarchus labrax*) por Makol *et al.* (2009), quienes alimentando a estos peces con 4 diferentes niveles de CLA (0, 0.5, 1 y 2%), no encontraron diferencias significativas en el peso final, sin embargo se observó una disminución del 9% en el CA para los peces que consumieron el alimento adicionado con 2% de CLA. En aves de engorda Denli *et al.* (2004), al incorporar 2 y 4 g de CLA por kg de alimento, no encontraron diferencias significativas tanto en CA como ganancia de peso. Para la harina de alga *U. clathrata*, Peña-Rodríguez (2011) encontró que la inclusión de 2, 4 y 6% no afectaron la TC ni el CA al ser comparados con la dieta control. Por el contrario, Peñaflorida y Golez (1996) con *Penaeus monodon* reportan que la inclusión de 5% de harina *K. alvarezii* a la dieta control, mejora el peso final en un 11.4%. Para el caso de la curcumina, Sahu *et al.* (2008) evaluó este extracto al incluirlo a la dieta del pez *Labeo rohita* a niveles de 0, 0.1, 0.5, 1.0 y 5.0 g/kg. Al comparar con los peces que consumieron la dieta control, no se encontraron diferencias significativas en la tasa de crecimiento específico ni la TCA. Resultados similares fueron encontrados en aves de engorda por Gowda *et al.* (2008), quienes al incluir 0.5% de curcumina a la dieta, no encontraron diferencias en el CA, ganancia de peso ni TCA. En el presente estudio al añadir la curcumina, el CLA o la harina de alga a la DCL se observó un aumento en el CA de un 6.4, 15.2 y 32%

respectivamente, encontrándose en este último diferencias significativas al comparar con los camarones que consumieron la DCL. Al añadir tanto la curcumina como la harina de alga a la DCL se observó una ligera disminución en la TC de un 15.8 y 7.2%, aunque no de manera significativa, la inclusión del CLA a la DCL no afectó este parámetro, manteniendo la misma TC que los camarones de la dieta control.

7.2.4.1. Capacidad de reducción de aflatoxicosis en camarones alimentados con dietas contaminadas con AF y suplementadas con diferentes fuentes de antioxidantes.

Además de la inclusión de productos secuestrantes y/o biotransformadores en el alimento para los organismos de cultivo, se han utilizado otros ingredientes naturales, como la inclusión de antioxidantes, tales como carotenoides, fenoles, terpenoides y polisacáridos sulfatados; los cuales tienen la capacidad de reducir el proceso de oxidación celular causado por la presencia de AF (Abd El-Baky *et al.*, 2008). Un ingrediente que posee varios tipos de compuestos antioxidantes son las algas marinas, las cuales poseen un sin número de compuestos bioactivos tales como los carotenoides (Peña-Rodríguez *et al.*, 2011), polifenoles (Kang *et al.*, 2003), vitaminas (García-Casal *et al.*, 2007) etc., los cuales exhiben una actividad antioxidante importante. Estudios realizados por Abdel-Wahhab *et al.* (2006) encontraron que al incluir a dietas para ratas contaminadas con AF extractos de *Laurencia obtusa* o *Caulerpa prolifera*, aumentaba el consumo de alimento y la ganancia de peso. Esto coincide con los resultados obtenidos por Manoharan *et al.* (2008), quienes observaron un restablecimiento de la ganancia de peso, peso del hígado, proteína total y niveles de albumina en suero por la presencia de AF en alimentos para ratas cuando se suministraron extractos acuosos de *Gracilaria carticata* (250 mg/kg de alimento).

Por otra parte, diferentes compuestos con actividad antioxidante encontrados en las plantas han sido objeto de investigación, gracias a su efecto inhibitorio en la biotransformación de AF. La curcumina, es otro ingrediente activo, el cual se encuentra ($\approx 3\%$) en *C. longa*, el cual ha demostrado disminuir los efectos negativos de las AF en varios organismos: Gowda *et al.* (2008) encontraron que al incluir 0.5% de extracto tumeric (74 mg de curcumina / kg de alimento) a una dieta contaminada con AF (1mg/kg) en aves de engorda aumentaba la ganancia de peso y el consumo de alimento en un 12.6 y 6% respectivamente; por su parte Rangsz y Ahangaran (2011) utilizando la misma especie encontraron que al incluir la misma cantidad de extracto tumeric a

una dieta contaminada con 3 mg de AF / kg de dieta aumentaba la ganancia de peso y el consumo de alimento en un 26 y 11.5% respectivamente además de disminuir la TCA en un 22%, aunque ninguno de estos parámetros mostro diferencias significativa.

Otro compuesto activo que ha sido reconocido por tener propiedades antioxidantes y anticarcinógenas en ratones es el CLA (Ha *et al.*, 1987). Se ha reportado que este compuesto es un antioxidante muy efectivo, inclusive más potente que el α -tocofenol y casi tan efectivo que el Butilhidroxitolueno (antioxidante sintético procedente de la industria petrolera [Ha *et al.*, 1990]). Diferentes investigadores indican que el CLA posee una elevada actividad anticancerígena (Pariza y Ha, 1990; Ip *et al.*, 1991). Existen pocas investigaciones que han comprobado la efectividad del CLA hacia las AF. Estudios llevados a cabo aves por Denli *et al.* (2004) demostraron que al agregar CLA a 2 o 4g/Kg a dietas contaminadas con AF a una concentración de 200 o 300 μ g/kg aumento la ganancia de peso de 5.5-6.8% a 7.1%. Este mismo autor, en el 2005, utilizando los mismos tratamientos encontró una reducción en los niveles de colesterol (4.2-14.8% a 3-6.7%) y triglicéridos en sangre (18.3-21.9% a 5.9-18.3%) por la inclusión de este antioxidante.

En el presente bioensayo, se observa que la inclusión de curcuminas, CLA y harina de alga ulva a la DCC incrementaron el CA y la TC en un 9.3% y 20.5%, de un 12 y 21% y de 27 y 23%. Aunque los resultados no son equivalentes a una dieta contaminada se observa una ligera mejora para los camarones que fueron alimentados con la dieta contaminada. Se requiere más información para poder establecer el modo de acción de estos compuestos en camarón, por ejemplo estos compuestos modifican las enzimas ligadas a procesos de oxidación celular, etc.

7.2.5. Efectividad de diferentes niveles de Mycofix Plus[®] solo o en combinación con U. clathrata para reducir la aflatoxicosis en juveniles de camarón (Experimento 7).

En el presente bioensayo se pudo observar que al ser comparados con los camarones alimentados solo con la DCC, los camarones que consumieron la DCC + harina de alga, DCC + 2.5g de Mycofix Plus[®] solo y en combinación con la harina de alga, aumentaron la TC en un 57, 54 y 47%; y el CA en un 29, 41.8, 51% además de disminuir la TCA en un 38.2, 30.6 y 24.2% respectivamente, siendo estos los mejores parámetros obtenidos. Asumimos que la disminución de los efectos negativos de las AF en los parámetros de rendimiento causado por la inclusión de Mycofix Plus[®] y de la

harina de alga pudiera deberse al buen funcionamiento, ya sea secuestrando y/o biotransformado la micotoxina en el caso del Mycofix Plus[®] o mediante la hepatoprotección por parte de los antioxidantes del alga.

Para los tratamientos a los que se les agrego niveles de Mycofix Plus[®] los niveles de 3 y 5 g por kg solo o en combinación con la harina de alga, resultaron estadísticamente similares en el CA y la TC a la DCC + harina de alga y a la DCC + Mycofix Plus[®] con o sin harina de alga, sin embargo se puede observar una ligera tendencia en la disminución de la TC (30.2 a 41% y 30.5 a 34.1 para los camarones alimentados con 3 y 5 g de Mycofix Plus[®] con o sin alga respectivamente comparados con la DCC). Lo que nos indica que el uso moderado del secuestrante con o sin la combinación de la harina de alga puede ser benéfico para la incorporación en alimentos acuícolas contaminados con AF. Estos resultados coinciden con los observados por Kiyothong *et al.* (2012), quienes al suplementar con 0, 15, 30 y 45 g de Mycofix Plus[®] por día a vacas alimentadas con una dieta contaminada con diferentes micotoxinas (DON, fumomisinina B₁, zeralenona, ocratoxina A, AFB₁ y T-2) encontraron que el consumo de alimento se mantenía a dosis de 30 y 45 g de Mycofix Plus[®] por día y se observaba que el peso final disminuía ligeramente con la dosis más alta (45 g de Mycofix Plus[®] por día), pero no de manera significativa, al igual que el presente estudio.

La tendencia observada en la disminución de la TC de los camarones conforme se aumenta la inclusión del Mycofix Plus[®] puede deberse a lo mencionado por Ramos y Hernández (1997), quienes sugieren que el uso de aluminosilicatos u otros compuestos absorbentes usados para el control de las micotoxinas pueden secuestrar nutrientes, tales como vitaminas o minerales, los cuales son de suma importancia para el crecimiento del organismo. Por otro lado el efecto sinérgico o antagónico otorgado por la harina de alga en el presente estudio no es muy claro, por lo que medir factores como actividad antioxidante en el camarón o un efecto protector del alimento serian algunos parámetros que nos ayudarían a determinar la factibilidad de su uso en combinación con el secuestrante.

7.3. Expresión diferencial de 292 genes de hepatopáncreas en camarones alimentados con una dieta libre de AF y una contaminada con 1000 ppb de AFT.

El objetivo de este estudio fue investigar los aspectos genotóxicos provocados por el consumo de AF, los cuales conducen a la desregulación de los genes implicados en las vías ordinarias a un punto de tiempo de 15 días de exposición, lo que podría permitir un mayor conocimiento acerca de los mecanismos que conducen a una intoxicación de estos metabolitos secundarios en el camarón blanco comparado con otras especies. De los genes que presentaron una diferenciación en el metabolismo y homeostasis del camarón, pudimos observar que el 80% eran sobre-expresados por el consumo de AF. El incremento en la expresión de estos genes pueden deberse a un esfuerzo del organismo por la desintoxicación y excreción de xenobioticos, como las AF. Esto fue explicado por Ellinger-Ziegelbauer *et al.* (2004) quienes alimentando a ratones con aceite de maíz al cual se le incorporo AFB₁ en forma pura (0.24 mg/kg/día), observaron por medio de microarreglos que los genes sobre-expresados eran Cytochrome P450 1A1, CES2 carboxylesterase, ALDH1A1 aldehyde dehydrogenase 1A, los cuales encuentran similitud con el presente estudio. En contraste, estudios realizados por Tilton *et al.* (2005), comparando por medio de microarreglos hepatocarcinomas celulares de trucha arcoíris provocados por exposición de AFB₁, observaron que la mayoría de los genes correspondientes al metabolismo y homeostasis como por ejemplo el “Cytochrome P450 2K1v2”, “Cytochrome P450 2K3”, “Cytochrome P450 2P2”, “Cytochrome P450 2K1v3”, “Glucose-6-phosphatase”, “Tyrosine aminotransferase” (los cuales presentan cierta relación con el presente estudio) eran reprimidos. Este contraste de resultados puede radicar que la trucha es una especie extremadamente susceptible creando una inhibición de los procesos celulares, provocados por la tumoración hepática (Hendricks 1994). Cabe mencionar que de los genes sobre-expresados encargados del metabolismo y homeostasis en el presente estudio encontramos de vital interés los genes “Cytochrome C oxidase polype” y “Cytochrome C oxidase subunit” los cuales corresponden a la familia de enzimas hepáticas microsomaes Citocromo P450, que se sabe que están regulados por los hidrocarburos aromáticos contenidos en la molécula de las AF (Rushmore y Kong, 2002). Se ha observado que dentro de las alteraciones ocasionadas por el consumo de AF se encuentra la disminución de la respuesta inmune (Boonyaratpalin *et al.*, 2001; Spring y Fegan 2005), por lo que en el presente estudio se esperaba observar algo congruente con estos antecedentes, sin embargo, de los genes involucrados con la

respuesta inmune se pudo observar que solo el 33.7% era reprimido y el 66.3% restante fue sobre-expresados, no obstante, el tejido preferencial de camarón para medir la respuesta inmune por medio de microarreglos son los hemocitos (Fagutao *et al.*, 2008; Pongsomboon *et al.*, 2008), y en el presente estudio nos enfocamos al hepatopáncreas debido a las evidencias existentes relacionadas con daños histológico. De los principales genes reprimidos en los hepatopáncreas de camarón alimentados con la DCC relacionados con la respuesta inmune innata se encuentra el “Crustin”, “lipopolysaccharide y BG Binding Protein”, “Lysozyme” los cuales están relacionados con respuesta antibacterial, sistema de coagulación, la cascada inducida por la profenoloxidasa y la cicatrización de heridas, esto conlleva a causar los enfermedades secundarias por la infección por bacterias oportunistas. Para tener una mejor percepción de los efectos del consumo de AF en el camarón blanco *L. vannamei* a nivel genómico, es necesario realizar más estudios e integrar el conocimiento de un mayor número de genes así como las rutas metabólicas del camarón.

8. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se llevaron a cabo todos los objetivos trazados para conocer de manera generalizada, los efectos causados por las AF en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, así como el uso de algunos productos o ingredientes con la capacidad de aminorar los efectos negativos causados por el consumo de estas micotoxinas.

1. Se evaluó la presencia de AFT en alimentos para camarón blanco en relación al crecimiento, CA, TCA, retención de nitrógeno, deposición de AF en tejido y sobrevivencia así como alteraciones en el hepatopáncreas por el consumo de estos compuestos tóxicos.

- ❖ Se comprobó que los camarones alimentados con las dietas contaminadas con los niveles de 60 y 120 ppb de AFT, presentaron de manera significativa un menor CA así como una menor TC.
- ❖ Se observó un aumento en la TCA en los camarones alimentados con 10, 60 y 120 ppb de AFT
- ❖ Los camarones que consumieron la dieta contaminada con 10 ppb de AFT, aumentaron la TC y el CA en 1.6 y 16.8%, comparados con los camarones de la dieta control.
- ❖ Para las dosis altas, en los tratamientos con 500, 1000 y 2000 ppb de AFT se observó una disminución en el CA y TC.
- ❖ Solamente en la inclusión de 1000 y 2000 ppb de AFT se observa una disminución en la sobrevivencia del camarón.
- ❖ En los camarones alimentados con las dietas que contenían 2000 ppb de AFT, se observa una disminución en la retención de nitrógeno y un aumento en el índice hepatosomático, lo que nos indica una disminución en las reservas de proteína acompañada de una inflamación severa del hepatopáncreas causada por el consumo de AF a altas dosis
- ❖ A nivel histológico se pudo observar que partir de 10 ppb de AFT existe una disminución en la actividad mitótica de las células E, lo que afecta en la producción de nuevas células.
- ❖ A partir de 20 ppb de AFT existe una atrofia de los túbulos epiteliales del hepatopáncreas, lo que produce una deficiencia en la absorción de nutrientes

- ❖ En los camarones que consumieron dietas con contenido de AFT a partir de 40 ppb, presentaron una disminución de la actividad de las células B, las cuales son encargadas del almacenamiento de nutrientes.
 - ❖ A partir de 1000 ppb de AFT en la dieta, existe un desprendimiento de las células del hepatopáncreas lo que provoca una alteración principalmente en el sistema digestivo.
 - ❖ Para las dosis altas, se observó que los niveles de AF en tejido de camarón completo estuvieron cercanos a los niveles de detección de los métodos empleados (1.09 a 1.51 µg/kg, incluyendo los camarones de la dieta control), por lo que existe solo una mínima acumulación de AF en tejido.
2. Se evaluó los cambios físicos en la dieta debido a la incorporación de productos comerciales a base de aluminosilicatos, mezclas de arcillas con otros productos e ingredientes antioxidantes en la estabilidad de las dietas para camarón blanco
- ❖ Se observó que la inclusión de Novasil Plus®, Zeolex Extra®, Mycofix Secure® y el Fixat® a la dieta aumentaron la absorción de agua y que la inclusión de Mycofix Secure® y el Fixat® a la dieta, disminuyen la PMS.
 - ❖ La suplementación de las mezclas remediadoras utilizadas (Aflabalan®, Mycofix Plus®, Mycosorb®), mejoraron la estabilidad de las dietas reduciendo la PMS de un 19 a un 38%.
 - ❖ De los ingredientes antioxidantes utilizados, se observó que la inclusión de harina de alga *Ulva clathrata* a la dieta aumento la absorción de agua y la inclusión de CLA y harina de alga *Ulva clathrata* aumentaron la PMS.
3. Se evaluaron los efectos en los parámetros de rendimiento del camarón blanco *L. vannamei* provocados por la inclusión de productos comerciales a base de aluminosilicatos en dietas para camarón.
- ❖ La inclusión de productos a base de aluminosilicatos como Mycofix Select® y Fixat® reducen el CA y TC cuando son añadidos a la dieta si contaminar y al incorporarlos a la dieta contaminada no disminuyeron los efectos de las AF.

- ❖ La incorporación de Novasil Plus[®] a la dieta sin contaminar aumenta ligeramente el CA, y la TC; y al ser añadido a la dieta contaminada disminuyó algunos de los efectos provocados por las AF, tales como un incremento en el CA en un 5% y la TC en un 12%, aunque no de manera significativa.
 - ❖ La inclusión de Zeolex Extra[®] a la dieta contaminada aumentó el CA y la TC, no obstante, al añadir este secuestrante a la dieta sin contaminar disminuyó el CA y la TC.
4. Se evaluaron los efectos en los parámetros de rendimiento del camarón blanco *L. vannamei* provocados por la inclusión de productos comerciales como mezclas de arcillas con otros productos en dietas para camarón.
- ❖ La inclusión del Aflabalan[®] y el Mycosorb[®] a la dieta contaminada incrementó el CA y la TC, en contraste al incluir estas mezclas a la dieta sin contaminar redujo el CA y la TC.
 - ❖ Al incluir el Mycofix Plus[®] a la dieta sin contaminar no altero de manera significativa ningún parámetro y al ser incorporado a la dieta contaminada se pudo observar un aumento en el CA y la TC.
5. Se evaluaron los efectos en los parámetros de rendimiento del camarón blanco *L. vannamei* provocados por la inclusión de ingredientes antioxidantes en dietas para camarón.
- ❖ La inclusión de 0.4 % de CLA o la inclusión de harina de ulva al 4% a la dieta sin contaminar aumentaron el CA, sin afectar la TC, sin embargo al ser añadido a la dieta contaminada aumento el CA y la TC.
 - ❖ Al incluir 0.14 g de curcumina con 70% de pureza por kg de dieta sin contaminar no altera el CA pero aumento la TC; y al ser añadido a la dieta contaminada aumento el CA y la TC.
6. Se evaluaron diferentes niveles de inclusión de la mezcla remediadora Micofix Plus[®] (2.5, 3 y 5 g/kg) solo o en combinación con la harina de alga *Ulva* en alimentos contaminados con AF para camarón.

- ❖ Al incluir 2.5g de Mycofix Plus[®] solo o en combinación con la harina de alga existe una disminución de los efectos negativos ocasionados por el consumo de AF.
 - ❖ A inclusiones de 3 y 5 g de Mycofix Plus[®] se observa un efecto similar a la inclusión de 2.5 g de Mycofix Plus[®] en el CA, sin embargo se observa que la TC se ve disminuida conforme el nivel de inclusión de Mycofix Plus[®] va en aumento.
7. Se determinó la expresión diferencial en hepatopáncreas en camarones alimentados con una dieta inocua y una dieta contaminada con 1000 ppb de AFT, esto por medio de microarreglos con un total de 292 genes
- ❖ De los 292 genes presentes en el microarreglo, 109 presentaron una expresión diferencial entre los tratamientos.
 - ❖ De los genes sobre-estimulados el 20% corresponden al metabolismo y homeostasis del camarón, mientras que el 31% de esta misma categoría correspondían a los genes reprimidos
 - ❖ De los genes sobre-expresados encontramos el “Cytochrome C oxidase polype” y “Cytochrome C oxidase subunit” encargados de metabolizar las AF
 - ❖ El consumo de la dieta contaminada con 1000 ppb de AFT reprime los genes “Crustin”, “lipopolysaccharide y BG Binding Protein”, “Lysozyme” los cuales están relacionados con respuesta inmune.

9. LITERATURA CITADA

Abd El-Baky H H, El-Baz F K, El-Baroty G S. 2008. Natural preservative ingredient from marine alga *Ulva lactuca* L. *International Journal of Food Science & Technology* 44(9): 1688-1695.

Abd-Allah GA, El-Fayoumi RI, Smith MJ, Heckmann RA, O'Neill KL. 1999. A comparative evaluation of aflatoxin B-1 genotoxicity in fish models using the Comet assay. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 446, 181-188.

Abdel-Wahhab MA, Ahmed HH, Hagazi MM. 2006. Prevention of aflatoxin B1-initiated hepatotoxicity in rat by marine algae extracts. *Journal of Applied Toxicology*, 26(3), 229-238. doi: 10.1002/jat.1127.

Abdel-Wahhab MA, Kholif AM. 2008. Mycotoxins in Animal Feeds and Prevention Strategies: A Review. *Asian Journal of Animal Sciences*, 2, 7-25.

Abdel-Wahhab MA, Said A, Huefner A. 2005. NMR and Radical Scavenging Activities of Patuletin from *Urtica urens* Against Aflatoxin B 1. *Pharmaceutical Biology*, 43(6), 515-525. doi: 10.1080/13880200500220730.

Abirami R G, Kowsalyac S. 2011. Nutrient and Nutraceutical Potentials of Seaweed Biomass *Ulva lactuca* and *Kappaphycus alvarezii*. *Journal of Agricultural Science & Technology (19391250)* 5(1): 109-115

Aggarwal BB, Kumar A, Aggarwal MS, Shishodia S. 2005. Curcumin derived from turmeric (*Curcuma longa*): a spice for all seasons. In: Preuss, H. (Ed.), *Phytopharmaceuticals in Cancer Chemoprevention*. CRC Press, Boca Raton, pp. 349–387.

Aggarwal BB, Surh Y-J, Shishodia S. 2007. The Molecular Target and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease. Series: *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Springer Science + Business Media, USA.

Akter A, Rahman M, Hasan M. 2010. Effects of Aflatoxin B1 on Growth and Bioaccumulation in Common Carp Fingerling in Bangladesh. *Asia-Pacific Journal of Rural Development*, 20(3), 1-13.

Alexandros , Jean-Pierre J. 2002. Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. *Anim. Res.* 51(2): 81-99.

Alpsoy L, Yildirim A, Agar G. 2009. The antioxidant effects of vitamin A, C, and E on aflatoxin B1-induced oxidative stress in human lymphocytes. *Toxicology & Industrial Health*, 25(2), 121-127.

Al-Shawabkeh K, Herzallah S, Al-Fataftah A, Zakaria H. 2009. Effect of Aflatoxin B1 Contaminated Feed on Broiler Chickens Performance and Meat Content of Conjugated Linoleic Acid. in Jordanian Journal of agricultural sciences.

Anguiano-Ruvalcaba GL, Verver y Vargas-Cortina A, Guzmán-de Peña D. 2005. Inactivation of aflatoxin B1 and aflatoxicol through traditional "nixtamalización" of corn and their regeneration by acidification of corn dough. *Salud Publica Mex*, 47(5), 369-375.

Anh Tuan N, Grizzle JM, Lovell RT, Manning BB, Rottinghaus GE. 2002. Growth and hepatic lesions of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets containing aflatoxin B1. *Aquaculture*, 212(1-4), 311-319. doi: 10.1016/s0044-8486(02)00021-2

AOAC. 1997. Official Methods of Analysis (Cunniff, P.,ed.), 16th edn, 3rd revision, vol. 1, Gaithersburg, Maryland, USA.

AOAC. 2002. Official Methods of Analysis. 17th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.

AOAC. 2006. Aflatoxins in corn, raw peanuts, and peanut butter. Liquid chromatography with post-column photochemical derivatization. AOAC Official Method 2005.08 First Action 2005. *J. AOAC Int.* 89: 678.

Aoki T, Wang H-C, Unajak S, Santos M, Kondo H, Hirono I. 2011. Microarray Analyses of Shrimp Immune Responses. *Marine Biotechnology*, 13(4), 629-638. doi: 10.1007/s10126-010-9291-1.

Arab K, Rossary A, Soulère L, Steghens J-P. 2006. Conjugated linoleic acid, unlike other unsaturated fatty acids, strongly induces glutathione synthesis without any lipoperoxidation. *British Journal of Nutrition*, 96(05), 811-819.

Arafa AS, Bloomer RJ, Wilson HR, Simpson CF, Harms RH. 1981. Susceptibility of various poultry species to dietary aflatoxin. *British Poultry Science*, 22, 431-436.

Arana S, Dagli MLZ, Sabino M, Tabata YA, Rigolino MG, Hernandez-Blazquez, FJ. 2011. Evaluation of the efficacy of hydrated sodium aluminosilicate in the prevention of aflatoxin-induced hepatic cancer in rainbow trout. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 31, 751-755.

Arana, S., M. L. Z. Dagli, M. Sabino, Y. A. Tabata, M. G. Rigolino and F. J. Hernandez-Blazquez 2011. Evaluation of the efficacy of hydrated sodium aluminosilicate in the prevention of aflatoxin-induced hepatic cancer in rainbow trout. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 31: 751-755.

Arce MJ, Avila GE, López CC, García EA, García GF. 2005. Efecto de paredes celulares (*Sacharomyces cerevisiae*) en el alimento de pollo de engorda sobre los parámetros productivos. *Tec Pecu Mex*; 43:155-162.

Avantaggiato G, Havenaar R, Visconti A. 2007. Assessment of the multi-mycotoxin-binding efficacy of a carbon/aluminosilicate-based product in an in vitro gastrointestinal model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(12), 4810-4819. doi: 10.1021/jf0702803.

Avantaggiato G, Solfrizzo M, Visconti A. 2005. Recent advances on the use of adsorbent materials for detoxification of *Fusarium* mycotoxins. *Food Additives and Contaminants*, 22(4), 379-388. doi: 10.1080/02652030500058312.

Bailey GS, Loveland PM, Pereira C, Pierce D, Hendricks JD, Groopman JD. 1994. Quantitative carcinogenesis and dosimetry in rainbow trout for aflatoxin B1 and aflatoxicol, two aflatoxins that form the same DNA adduct. *Mutation Research*, 313(1), 25-38.

Bailey GS, Williams DE, Hendricks JD. 1996. Fish models for environmental carcinogenesis: The rainbow trout. *Environmental Health Perspectives*, 104, 5-21.

Banni S, Day BW, Evans RW, Corongiu FP, Lombardi B. 1995. Detection of conjugated diene isomers of linoleic acid in liver lipids of rats fed a choline-devoid diet indicates that the diet does not cause lipoperoxidation. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 6(5), 281-289. doi: 10.1016/0955-2863(95)00049-6.

Baptista A, Abdalla A, Aguiar C, Baptista A, Micheluchi D, Zampronio A, Pires D, Glória E, Calori-Domingues M, Walder J, Vizioli M, Horii J. 2008. Utilization of diets amended with yeast and amino acids for the control of aflatoxicosis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 2547-2554.

Barrer RM. 1989. Shape-selective sorbents based on clay minerals; a review. *Clays and Clay Minerals*, 37(5), 385-395.

Basmacioglu H, Oguz H, Ergul M, Col R, Birdane YO. 2005. Effect of dietary esterified glucomannan on performance, serum biochemistry and haematology in broilers exposed to aflatoxin. *Czech Journal of Animal Science*, 50, 31-39.

Bata Á, Lásztity R. 1999. Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. *Trends in Food Science & Technology*, 10(6-7), 223-228. doi: 10.1016/S0924-2244(99)00050-3.

Battacone G, Carboni GA, Nicolussi P, Ligios C, Pulina G. 2007. Use of a glucomannan polymer to reduce the effects of mycotoxin-contaminated diets in finishing pigs. pp. 673-675.

Battacone G, Nudda A, Palomba M, Mazzette A, Pulina G. 2009. The transfer of aflatoxin M1 in milk of ewes fed diet naturally contaminated by aflatoxins and effect of inclusion of dried yeast culture in the diet. *Journal of Dairy Science*, 92, 4997-5004.

Bauer DH, Lee DJ, Sinnhuber RO. 1969. Acute toxicity of aflatoxins B1 and G1 in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Toxicology and Applied Pharmacology*, 15, 415-419.

Bautista MN, Lavillapitogo CR, Subosa PF, Begino ET. 1994. Aflatoxin B-1 contamination of shrimp feeds and its effect on growth and hepatopancreas of pre-adult *Penaeus-monodon*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 65(1), 5-11. doi: 10.1002/jsfa.2740650103

Belloc C, Baird S, Cosme J, Lecoeur S, Gautier J-C, Challine D, De Waziers I, Flinois J-P, Beaune PH. 1996. Human cytochromes P450 expressed in *Escherichia coli*: production of specific antibodies. *Toxicology*, 106, 207-219.

Belury MA, Nickel KP, Bird CE, Wu Y. 1996. Dietary conjugated Linoleic acid modulation of phorbol ester skin tumor promotion. *Nutrition and Cancer*, 26(2), 149-157. doi: 10.1080/01635589609514471.

Bennett JW, Kale S, Yu J. 2007. *Aflatoxins: Background, Toxicology, and Molecular Biology*. pp. 355-373.

Bennett JW, Klich M. 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3), 497- 516. doi: 10.1128/cmr.16.3.497-516.2003

Béress A, Wassermann O, Bruhn T, Béress L, Kraiselburd EN, Gonzalez LV, de Motta GE, Chavez PI. 1993. A New Procedure for the Isolation of Anti-HIV Compounds (Polysaccharides and Polyphenols) from the Marine Alga *Fucus vesiculosus*. *Journal of Natural Products* 56(4): 478-488.

Bintvihok A, Kositcharoenkul S. 2003. Aflatoxin B1 and its metabolites residues in tissues and fecal excretion levels of aflatoxin B1 and its metabolites of ducklings given feed containing aflatoxin and esterified glucomannan. Bangkok, Thai Veterinary Medical Association: P104-P105

Bintvihok A, Kositcharoenkul S. 2006. Effect of dietary calcium propionate on performance, hepatic enzyme activities and aflatoxin residues in broilers fed a diet containing low levels of aflatoxin B1. *Toxicon*, 47, 41-46.

Bintvihok A, Thiengin S, Patchimasiri T, Thummabood S, Shoya S, Ogura Y, Kumagai S, Doi K, Ingkaninun P, Poomvises P. 1993. Toxic effects of dietary aflatoxin and its residue in tissues and eggs in laying quails. *Proceedings of the 11th International Symposium of the World Association of Veterinary Food Hygienists*, Bangkok, Thailand, pp. 299–307.

Boonyaratpalin M, Supamattaya K, Verakunpiriya V, Suprasert D. 2001. Effects of aflatoxin B₁ on growth performance, blood components, immune function and histopathological changes in black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius). *Aquaculture Research*, 32, 388-398.

Boudergue C, Burel Ch, Dragacci S, Favrot M Ch, Fremy JM, Massimi, C, Prigent P, Debongnie P, Pussemier L, Boudra H, Morgavi D, Oswald I, Perez A, Avantaggiato G. 2009. Review of mycotoxin-detoxifying agents used as feed additives: mode of action, efficacy and feed/food safety. Scientific report submitted to EFSA. 192 p. Reference number of the call for proposal: CFP/EFSA/FEEDAP/2009/01.

Breinholt V, Hendricks J, Pereira C, Arbogast D, Bailey G. 1995. Dietary chlorophyllin is a potent inhibitor of aflatoxin B-1 hepatocarcinogenesis in rainbow-trout. *Cancer Research*, 55(1), 57-62.

Brown RL, Chen ZY, Cleveland TE, Russin JS. 1999. Advances in the Development of Host Resistance in Corn to Aflatoxin Contamination by *Aspergillus flavus*. *Phytopathology*, 89, 113-117.

Bryden WL 2007. Mycotoxins in the food chain: human health implications. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 16, 95-101.

Bunton TE. 1996. Review Article: Experimental Chemical Carcinogenesis in Fish. *Toxicologic Pathology*, 24, 603-618.

Cagauan AG, Tayaban RH, Somga JR, Bartolome RM. 2004. Effect of aflatoxin contaminated feeds in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). In: Remedios, R.B., Mair, G.C., Fitzsimmons, K. (Eds.), *Proceedings of the Sixth International Symposium on Tilapia in Aquaculture*, pp. 172–178.

Calabrese EJ. 2002. Hormesis: Changing view of the dose response, a personal account of the history and current status. *Mutat. Res.* 511: 181–189. Cerecer-Cota EE,

Cardozo KHM, Guaratini T, Barros MP, Falcão VR, Tonon AP, Lopes NP, Pinto E. 2007. Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146(1–2), 60-78. doi: 10.1016/j.cbpc.2006.05.007.

Carrillo L. 2003. *Microbiología agrícola*. Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Salta: [\(http://www.unsa.edu.ar/matbib\)](http://www.unsa.edu.ar/matbib). (02 06 2008).

Castaing J, de Maíz AGDP. 1998. Uso de las arcillas en alimentación animal. *Curso de especialización vances en nutrición y alimentación animal*, 14, 141-158.

Castaing J. 1998. Uso de las arcillas en alimentación animal. *XIV Curso de Especialización FEDNA: Avances en Nutrición y Alimentación Animal*. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Eds.: P.G^a. Rebolgar, C. de Blas y G.G. Mateos. Fira de Barcelona, España. 141-158 p.

Çelýk K, Denlý M, Savas T. 2003. Reduction of toxic effects of aflatoxin B1 by using baker yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in growing broiler chicks diets. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 32, 615-619.

Cerecer-Cota EE, Ricque-Marie D, Mendoza-Cano F, Nieto- Lopez M, Cruz-Suárez LE. (2005) Pellet stability and hardness influence feed consumption of pacific white shrimp. *Global Aquacult. Advocate*, 8, 84–85.

Chattopadhyay N, Ghosh T, Sinha S, Chattopadhyay K, Karmakar P, Ray B. 2010. Polysaccharides from *Turbinaria conoides*: Structural features and antioxidant capacity. *Food Chemistry* 118(3): 823-829.

Chávez-Sánchez MC, Martínez Palacios CA, Osorio Moreno I. 1994. Pathological effects of feeding young *Oreochromis niloticus* diets supplemented with different levels of aflatoxin B1. *Aquaculture*, 127(1), 49-60. doi: 10.1016/0044-8486(94)90191-0.

Chen X, Lin H-Z, Jiang S-G, Wu K-C, Liu Y-J, Tian L-X, Niu J. 2013. Dietary supplementation of honeysuckle improves the growth, survival and immunity of *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish Immunology*, 35(1), 161-169. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2013.04.020>

Choi K-C., Chung W-T, Kwon J-K, Jang Y-S, Yu J-Y, Park S-M, Lee J-C. 2011. Chemoprevention of a flavonoid fraction from *Rhus verniciflua* Stokes on aflatoxin B1-induced hepatic damage in mice. *Journal of Applied Toxicology* 31(2): 150-156.

Christensen CM. 1987. Field and Storage Fungi. pp. 211-232 en: Beuchat LR, ed. *Food and Beverage Mycology*. New York, Van Nostrand Reinhold.

Clifford JI, Rees KR. 1967. The action of aflatoxin B1 on the rat liver. *Biochem. J*, 102, 65-75.

Coppock RW, Jacobsen BJ. 2009. Mycotoxins in animal and human patients. *Toxicology And Industrial Health*, 25, 637-655.

Cornish ML, Garbary DJ. 2010. Antioxidants from macroalgae: Potential applications in human health and nutrition. *Algae*, 25, 155–171

Cruz-Suárez L E, León A, Peña-Rodríguez A, Rodríguez-Peña G, Moll B, Ricque-Marie D. 2010. Shrimp/*Ulva* co-culture: a sustainable alternative to diminish the need for artificial feed and improve shrimp quality. *Aquaculture* 301(1-4):64-68.

Cruz-Suárez LE, Ricque-Marie D, Tapia-Salazar M, Guajardo-Barbosa C. 2000. Uso de harina de kelp (*Macrocystis pyrifera*) en alimentos para camarón. . In: Cruz - Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R., (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán. 1

de la Vega E, Degnan BM, Hall MR, Wilson KJ. 2007. Differential expression of immune-related genes and transposable elements in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) exposed to a range of environmental stressors. *Fish & Shellfish Immunology*, 23(5), 1072-1088. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2007.05.001>.

de los Santos FS, Donoghue AM, Farnell BM, Huff GR, Huff WE, Donoghue DJ. 2007. Gastrointestinal Maturation is Accelerated in Turkey Poults Supplemented with a Mannan-Oligosaccharide Yeast Extract (Alphamune). *Poultry Science* 86(5): 921-930.

Deng S-X, Tian L-X, Liu F-J, Jin S-J, Liang G-Y, Yang H-J, Liu Y-J. 2010. Toxic effects and residue of aflatoxin B1 in tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) during long-term dietary exposure. *Aquaculture*, 307(3/4), 233-240. doi: 10.1016/j.aquaculture.2010.07.029.

Denli M, Okan F, Doran F, Inal T C. 2005. Effect of dietary conjugated linoleic acid (CLA) on carcass quality, serum lipid variables and histopathological changes of broiler chickens infected with aflatoxin B-1. *South African Journal of Animal Science*, 35(2), 109-116.

Denli M, Okan F, Doran F. 2004. Effect of conjugated linoleic acid (CLA) on the performance and serum variables of broiler chickens intoxicated with aflatoxin B-1. *South African Journal of Animal Science*, 34, 97-103.

Denli M, Okan F. 2006. Efficacy of different adsorbents in reducing the toxic effects of aflatoxin B₁ in broiler diets. *South African Journal of Animal Science*, 36, 222-228.

Desheng Q, Fan L, Yanhu Y, Niya Z. 2005. Adsorption of aflatoxin B1 on montmorillonite. *Poultry Science*, 84(6), 959-961.

Devegowda G, Raju MVLN, Afzali N Swamy HVLN. 1998. Mycotoxin picture world wide: Novel solutions for their counteraction, in: LYONS, T.P. & JACQUES, K.A. (Eds) *Biotechnology in the Feed Industry*, pp. 241–255 (Kentucky, Alltech Inc.).

Dhanasekaran D, Panneerselvam A, Thajuddin N. 2009. Evaluation of aflatoxicosis in hens fed with commercial poultry feed. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 33, 385-391.

Diab AS, Abusead SMM, AbouElMagd MM. 1998. Effect of aflatoxin B1 on reproductive traits in *O. niloticus* and *O. aureus* and its control. *Proc. 5th International Symposium on Tilapia in Aquaculture*.

Diaz DE, Hagler WM, Blackwelder JT, Eve JA, Hopkins BA, Anderson KL, Jones FT, Whitlow LW. 2004. Aflatoxin Binders II: Reduction of aflatoxin M1 in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed. *Mycopathologia*, 157, 233-241.

Diaz DE, Hagler WM, Hopkins BA, Whitlow LW. 2003. Aflatoxin binders I: In vitro binding assay for aflatoxin B1 by several potential sequestering agents. *Mycopathologia* 156(3): 223-226

Díaz GJ, Calabrese E, Blain R. 2008. Aflatoxicosis in Chickens (*Gallus gallus*): An Example of Hormesis? *Poultry Science*, 87(4), 727-732. doi: 10.3382/ps.2007-00403.

Dilkin P, Zorzete P, Mallmann CA, Gomes JDF, Utiyama CE, Oetting LL, Corrêa B. 2003. Toxicological effects of chronic low doses of aflatoxin B1 and fumonisin B1-containing *Fusarium moniliforme* culture material in weaned piglets. *Food and Chemical Toxicology*, 41, 1345-1353.

Divakaran S, Tacon AGJ. 2000. Studies on the Toxicity of Shrimp (*Penaeus vannamei*) Fed Diets Dosed with Aflatox B [sub 1] to Humans. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 9(3), 115.

Du M, Ahn DU, Nam KC, Sell JL. 2001. Volatile profiles and lipid oxidation of irradiated cooked chicken meat from laying hens fed diets containing conjugated linoleic acid. *Poultry Science*, 80(2), 235-241.

Duvoix A, Blasius R, Delhalle S, Schnekenburger M, Morceau F, Henry E, Dicato M, Diederich M. 2005. Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin. *Cancer Letters* 223, 181–190.

Edrington TS, Kubena LF, Harvey RB, Rottinghaus GE. 1997. Influence of a superactivated charcoal on the toxic effects of aflatoxin or T-2 toxin in growing broilers. *Poultry Science*, 76(9), 1205-1211.

Edrington TS, Sarr AB, Kubena LF, Harvey RB, Phillips TD. 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 Letters* 89(2): 115-122

Edrington, T. S., Kubena, L. F., Harvey, R. B., & Rottinghaus, G. E. (1997). Influence of a superactivated charcoal on the toxic effects of aflatoxin or T-2 toxin in growing broilers. *Poultry Science*, 76(9), 1205-1211.

El-Banna R, Teleb HM, Fakhry FM. 1992. Performance and tissue residues of tilapias fed dietary aflotoxin. *Vet. Med. J.* 40, 17-23.

el-Kady IA, el-Maraghy SS, Zohri A A. 1991. Mycotoxin production on different cultivars and lines of broad bean (*Vicia faba* L.) seeds in Egypt. *Mycopathologia*. 113(3), 165-169.

Ellinger-Ziegelbauer H, Stuart B, Wahle B, Bomann W, Ahr HJ. 2005. Comparison of the expression profiles induced by genotoxic and nongenotoxic carcinogens in rat liver. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 575(1–2), 61-84. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.02.004>.

Ellinger-Ziegelbauer H, Stuart B, Wahle B, Bomann W, Ahr H-J. 2004. Characteristic Expression Profiles Induced by Genotoxic Carcinogens in Rat Liver. *Toxicological Sciences*, 77(1), 19-34.

Ellis RW, Clements M, Tibbetts A, Winfree R. 2000. Reduction of the bioavailability of 20 μ g/kg aflatoxin in trout feed containing clay. *Aquaculture*, 183, 179-188.

El-Nezami H, Mykkänen H, Kankaanpää P, Salminen S, Ahokas J. 2000. Ability of *Lactobacillus* and *Propionibacterium* Strains to Remove Aflatoxin B1 from the Chicken Duodenum. *Journal of Food Protection* 63(4): 549-552.

Eraslan G, Akdoğan M, Yarsan E, Şahindokuyucu F, Eşsiz D, Altıntaş L. 2005. The effects of aflatoxins on oxidative stress in broiler chickens. *Turk J Vet Anim Sci* 29: 701–707.

Eraslan G, Essiz D, Akdogan M, Sahindokuyucu F, Altintas L, Hismiogullari SE. 2005. Effects of dietary aflatoxin and sodium bentonite on some hormones in broiler chickens. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 49, 93-96.

Eya JC, Parsons A, Haile I, Jagidi P. 2008. Effects of dietary zeolites (bentonite and mordenite) on the performance of juvenile rainbow trout *Onchorhynchus myskis*. *Aust. J. Bas. Appl. Sci.* 2: 961–967.

Fagutao FF, Yasuie M, Caipang C, Kondo H, Hirono I, Takahashi Y, Aoki T. 2008. Gene Expression Profile of Hemocytes of Kuruma Shrimp, *Marsupenaeus japonicus* Following Peptidoglycan Stimulation. *Marine Biotechnology*, 10(6), 731-740. doi: 10.1007/s10126-008-9110-0.

Fagutao FF, Yasuie M, Santos MD, Ruangpan L, Sangrungruang K, Tassanakajon A, Aoki T. 2009. Differential gene expression in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, following administration of oxytetracycline and oxolinic acid. *Developmental & Comparative Immunology*, 33(10), 1088-1092. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2009.05.010>.

Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 339(1), 37-59. doi: 10.1016/0165-1110(94)00013-3.

FAO 2004-2013. Programa de información de especies acuáticas. *Cyprinus carpio*. Programa de información de especies acuáticas. Texto de Peteri, A. In: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO [en línea]. Roma. Actualizado 1 January 2004.

FAO 2008-2013. Fisheries and Aquaculture topics. The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA). Topics Fact Sheets. Text by Jean- Francois

Pulvenis. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome. Updated 9 July 2012

FAO. © 2006-2013. Cultured Aquatic Species Information Programme. *Labeo rohita*. Cultured Aquatic Species Information Programme. Text by Jena, J.K. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome. Updated 21 February 2006. [Cited 3 July 2013]. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Labeo_rohita/en

FAO. © 2006-2011. Programa de información de especies acuáticas. *Penaeus vannamei*. Programa de información de especies acuáticas. In: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO [online]. Rome. Updated 7 April 2006. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Litopenaeus_vannamei/es.

FAO. 1988. Manual para la cría de camarones peneidos. FAO. Roma. 1988.

FAO. 2000. El Estado mundial de la pesca y la acuicultura, 2000. Food & Agriculture Org.

FAO. 2004. Worldwide Regulations for Mycotoxins in Food and Feed in 2003; FAO (Food and agriculture Organization) Food and Nutrition Paper 81, FAO/ UN: Rome, Italy.

Fink-Gremmels J (1999) Mycotoxins: their implications for human and animal health. *The Veterinary Quarterly*, 21, 115-120.

Fink-Gremmels J. 2008. Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: a review. *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 25(2), 172-180.

Fleury N, Lahaye M. 1991. Chemical and physico-chemical characterization of fibres from *Laminaria digitata* (kombu breton): a physiological approach. *J. Sci. Food Agricult.*, 55, 389– 400.

Funahashi H, Imai T, Mase T, Sekiya M, Yokoi K, Hayashi H, Shibata A, Hayashi T, Nishikawa M, Suda N, Hibi Y, Mizuno Y, Tsukamura K, Hayakawa A, Tanuma S. 2001. Seaweed Prevents Breast Cancer? *Cancer Science* 92(5): 483-487.

Galkate UV, Rokde SN, 2009. Effect of dietary aflatoxin on performance and economics in white Leghorn layers. *Indian Journal of Poultry Science* 44(2), 207-211.

Gallagher EP, Eaton DL. 1995. In-vitro biotransformation of aflatoxin B-1 (AFB1) in channel catfish liver. *Toxicology and Applied Pharmacology* 132(1): 82-90.

Gallagher EP. 2006. Using salmonid microarrays to understand the dietary modulation of carcinogenesis in rainbow trout. *Toxicological Sciences*, 90(1), 1-4. doi: 10.1093/toxsci/kfj093.

Galvano F, Piva AA, Ritieni, Galvano G. 2001. Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins: A review. *J. Food Prot.* 64:120–131

Gan L-S, Skipper PL, Peng X, Groopman JD, Chen JS, Wogan GN, Tannenbaum SR. 1988. Serum albumin adducts in the molecular epidemiology of aflatoxin carcinogenesis: correlation with aflatoxin B1 intake and urinary excretion of aflatoxin M1. *Carcinogenesis* 9(7): 1323-1325.

García-Casal MN, Ramírez J, Leets I, Pereira AC, Quiroga MF. 2009. Antioxidant capacity, polyphenol content and iron bioavailability from algae (*Ulva* sp., *Sargassum* sp. and *Porphyra* sp.) in human subjects. *British Journal of Nutrition*, 101(01), 79-85.

Gargees MT, Shareef AM. 2009. Reducing liver aflatoxin M1 residues in chicks with mycofix plus 3.0 during aflatoxicosis. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 23(3), 37-44.

Gong YY, Cardwell K, Hounsa A, Egal S, Turner PC, Hall AJ, Wild CP. 2002. Dietary aflatoxin exposure and impaired growth in young children from Benin and Togo: cross sectional study. *BMJ*, 325.

Gopinath R, Raj RP. 2009. Histological alterations in the hepatopancreas of *Penaeus monodon* Fabricius (1798) given aflatoxin B-1-incorporated diets. *Aquaculture Research*, 40(11), 1235-1242. doi: 10.1111/j.1365-2109.2009.02207.x

Gopinath R. 2006. Aflatoxicosis and its amelioration in black tiger shrimp, *penaeus monodon fabricius* (Doctoral dissertation, Cochin University of Science and Technology).

Gowda NKS, Ledoux DR, Rottinghaus GE, Bermudez AJ, Chent YC. 2008. Efficacy of Turmeric (*Curcuma longa*), Containing a Known Level of Curcumin, and a Hydrated Sodium Calcium Aluminosilicate to Ameliorate the Adverse Effects of Aflatoxin in Broiler Chicks. *Poultry Science*, 87(6), 1125-1130. doi: 10.3382/ps.2007-00313.

Groopman JD, Hasler JA, Trudel LJ, Pikul A, Donahue PR, Wogan GN. 1992. Molecular dosimetry in rat urine of aflatoxin-N7-guanine and other aflatoxin metabolites by multiple monoclonal antibody affinity chromatography and immunoaffinity/high performance liquid chromatography. *Cancer Res.* 52, 267-274.

Guarisco JA, Hall JO, Coulombe Jr RA. 2008. Butylated hydroxytoluene chemoprevention of aflatoxicosis – Effects on aflatoxin B1 bioavailability, hepatic DNA adduct formation, and biliary excretion. *Food and Chemical Toxicology* 46(12): 3727-3731.

Gundidza M. Antifungal activity of essential oil from *Artemisia*. (1993). *Afra. Jacq. Cent. Afr. J. Med*; 39: 140-142.

Ha YL, Grimm NK, Pariza MW. 1987. Anticarcinogens from fried ground beef: Heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis (Lond.)* 8:1881-1887.

Ha YL, Storkson J, Pariza MW. 1990. Inhibition of Benzo(a)pyrene-induced Mouse Forestomach Neoplasia by Conjugated Dienoic Derivatives of Linoleic Acid. *Cancer Research* 50(4): 1097-1101.

Han D, Xie S, Zhu X, Yang Y, Guo Z. 2010. Growth and hepatopancreas performances of gibel carp fed diets containing low levels of aflatoxin B1. *Aquaculture Nutrition*, 16(4), 335-342. doi: 10.1111/j.1365-2095.2009.00669.x

Hanif NQ, Muhammad G, Siddique M, Khanum A, Ahmed T, Gadahai JA, Kaukab G. 2008. Clinico-pathomorphological, serum biochemical and histological studies in broilers fed ochratoxin A and a toxin deactivator (Mycifix® Plus). *British Poultry Science*, 49(5), 632-642. doi: 10.1080/00071660802295183

Harvey RB, Huff WE, Kubena LF, Corrier DE, Phillips TD. 1988. Progression of aflatoxicosis in growing barrows. *American Journal Of Veterinary Research*, 49, 482-487.

Hashim R, Mat-Saat NA, 1992. The utilization of seaweed meals as binding agents in pellet feeds for snakehead (*Channa striatus*) fry and their effects on growth. *Aquaculture*, 108, 299– 308.

Hassan AM, Kenawy AM, Abbas TW Abdel-Wahhab MA 2010. Prevention of cytogenetic, histochemical and biochemical alterations in *Oreochromis niloticus* by dietary supplement of sorbent materials. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73(8): 1890-1895.

Hayes JD, Judah DJ, Neal GE. 1993. Resistance to Aflatoxin B1 Is Associated with the Expression of a Novel Aldo-Keto Reductase Which Has Catalytic Activity towards a Cytotoxic Aldehyde-containing Metabolite of the Toxin. *Cancer Research* 53(17): 3887-3894.

Hell K, Cardwell KF, Setamou M, Poehling HM. 2000. The influence of storage practices on aflatoxin contamination in maize in four agroecological zones of Benin, west Africa. *Journal of Stored Products Research*, 36, 365-382.

Hendricks JD. 1994. Carcinogenicity of aflatoxins in non mammalian organisms. In: Eaton DL, Groopman JD (eds) *The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance*. Academic Press, New York, pp 103–136

Hilton JW, Cho CY, Slinger SJ. 1981. Effect of extrusion processing and steam pelleting diets on pellet durability, pellet water absorption and the physiological response of rainbow trout. *Aquaculture*, 25, 185–194.

Hooft JM, Elmor AEHI, Encarnação P, Bureau DP. 2011. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is extremely sensitive to the feed-borne *Fusarium mycotoxin*

deoxynivalenol (DON). *Aquaculture*, 311(1–4), 224-232. doi:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.11.049>.

Horsberg TE, Ingebrigtsen K, Ngethe S, Mitema E. 1994. Species differences in the disposition of aflatoxin B1 between rainbow trout and tilapia. *International Symposium on Aquatic Animal Health: Program and Abstracts*. Davis, C. A. USA, Univ. of California, School of Veterinary Medicine, pp-69.

Horsberg, T. E., K. Ingebrigtsen, S. Ngethe and E. Mitema. 1994. Species differences in the disposition of aflatoxin B1 between rainbow trout and tilapia. *International Symposium on Aquatic Animal Health: Program and Abstracts*. Davis, C. A. USA, Univ. of California, School of Veterinary Medicine, pp-69

Hsieh DPH, Wong JJ. 1993. *Pharmacokinetics and excretion of aflatoxins*. San Diego, Academic Press: 73-88

Huang Y, Han D, Zhu X, Yang Y, Jin J, Chen Y, Xie S. 2011. Response and recovery of gibel carp from subchronic oral administration of aflatoxin B1. *Aquaculture*, 319(1/2), 89-97. doi: 10.1016/j.aquaculture.2011.06.024.

Hur SJ, Park GB, Joo ST. 2007. Biological activities of conjugated linoleic acid (CLA) and effects of CLA on animal products. *Livestock Science* 110(3): 221-229.

Huwig A, Freimund S, Käppeli O, Dutler H. 2001. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicology Letters*, 122(2), 179-188.

Ip C, Scimeca JA, Thompson H. 1995. Effect of timing and duration of dietary conjugated linoleic acid on mammary cancer prevention. *Nutrition and Cancer* 24(3): 241-247.

Jacela JY, DeRouchey JM, Tokach MD, Goodband RD, Nelssen JL, Renter DG, Dritz SS. 2010. Feed additives for swine: Fact sheets - flavors and mold inhibitors, mycotoxin binders, and antioxidants. *Journal of Swine Health and Production* 18(1): 27-32.

Jacobson WC, Wiseman HG, 1974, The transmission of aflatoxin B1 into eggs. *Poultry Science*, 53, 1743–1745.

Jantrarotai W, Lovell RT, Grizzle JM. 1990. Acute Toxicity of Aflatoxin B1 to Channel Catfish. *Journal of Aquatic Animal Health* 2(4): 237-247

Jay JM, Loessner MJ, Golden DA. 2005. *Mycotoxins Modern Food Microbiology*. Springer US, pp. 709-726.

Ji S-C, Takaoka O, Jeong G-S, Lee S-W, Ishimaru K, Seoka M, Takii K. 2007. Dietary medicinal herbs improve growth and some non-specific immunity of red sea bream *Pagrus major*. *Fisheries Science*, 73(1), 63-69. doi: 10.1111/j.1444-2906.2007.01302.x

Johnson DN, Egner PA, Obrian G, Glassbrook N, Roebuck BD, Sutter TR, Payne GA, Kensler TW, Groopman JD. 2008. Quantification of Urinary Aflatoxin B1 Dialdehyde Metabolites Formed by Aflatoxin Aldehyde Reductase Using Isotope Dilution Tandem Mass Spectrometry. *Chemical Research in Toxicology* 21(3): 752-760

Jolly P, Jiang Y, Ellis W, Awuah R, Nnedu O, Phillips T, Wang JS, Afriyie-Gyawu E, Tang L, Person S, Williams J, Jolly C. 2006. Determinants of aflatoxin levels in Ghanaians: Sociodemographic factors, knowledge of aflatoxin and food handling and consumption practices. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 209(4): 345-358.

Joo ST, Lee JI, Ha YL, Park GB. 2002. Effects of dietary conjugated linoleic acid on fatty acid composition, lipid oxidation, color, and water-holding capacity of pork loin. *Journal of Animal Science*, 80(1), 108-112.

Josephs RD, Ulberth F, Van Egmond HP, Emons H. 2005. Aflatoxin M1 in milk powders: Processing, homogeneity and stability testing of certified reference materials. *Food Additives & Contaminants*, 22, 864-874.

Jouany JP, Yiannikouris A, Bertin G. 2005. The chemical bonds between mycotoxins and cell wall components of *Saccharomyces cerevisiae* have been identified. *Archiva Zootechnica* 8, 25-50.

Jouany, JP. 2007. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. *Animal Feed Science and Technology* 137(3-4): 342-362

Judah DJ, Hayes JD, Yang JC, Lian LY, Roberts GCK, Farmer PB, Lamb JH, Neal GE. 1993. A novel aldehyde reductase with activity towards a metabolite of aflatoxin-B1 is expressed in rat-liver during carcinogenesis and following the administration of an antioxidant. *Biochemical Journal*, 292, 13-18.

Kamalzadeh A, Hosseini A, Moradi S. 2009. Effects of yeast glucomannan on performance of broiler chickens. *Int. J. Agr. Biol*, 11, 49-53.

Kang K, Park Y, Hwang H, Kim S, Lee J, Shin HC. 2003. Antioxidative properties of brown algae polyphenolics and their perspectives as chemopreventive agents against vascular risk factors. *Archives of Pharmacal Research* 26(4): 286-293.

Kannewischer I, Tenorio MG, White GN, Dixon JB. 2006. Smectite clays as adsorbents of Aflatoxin B1: Initial Steps. *Clay Science*, Japan. 12, Supplement 2, 199-204.

Karaman M, Basmacioglu H, Ortatatli M, Oguz H. 2005. Evaluation of the detoxifying effect of yeast glucomannan on aflatoxicosis in broilers as assessed by gross examination and histopathology. *British Poultry Science*, 46, 394-400.

Kayanoki Y, Fujii J, Islam KN, Suzuki K, Kawata S, Matsuzawa Y, Taniguchi N. 1996. The Protective Role of Glutathione Peroxidase in Apoptosis Induced by Reactive Oxygen Species. *Journal of Biochemistry* 119(4): 817-822.

Keçeci T, Oğuz H, Kurtoğlu V, Demet O. 1998. Effects of polyvinylpolypyrrolidone, synthetic zeolite and bentonite on serum biochemical and haematological characters of broiler chickens during aflatoxicosis. *British Poultry Science*, 39, 452-458.

Kelman D, Posner EK, McDermid KJ, Tabandera NK, Wright PR, Wright AD. 2012. Antioxidant Activity of Hawaiian Marine Algae. *Marine Drugs* 10(6): 403-416

Keyl A, Booth A 1971 Aflatoxin effects in livestock. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 48, 599-604.

Khaled N, Hiba M, Asma C. 2012. Antioxidant and Anti fungal activities of *Padina Pavonica* and *Sargassum Vulgare* from the Lebanese Mediterranean Coast. *Advances in Environmental Biology*, 6(1), 42-48.

Kim JS, Lee GD, Kwon JH, Yoon HS. 1993. Antioxidative effectiveness of ether extract in *Crataegus pinnatifida* Bunge and *Terminalia chebula* Rets. *J. Korean Agric. Chem. Soc*; 36: 154–157.

Kiran MM, Demet O, Ortatath M, Oğuz H. 1998. The preventive effect of polyvinylpolypyrrolidone on aflatoxicosis in broilers. *Avian Pathol*, 27(3), 250-255. doi: 10.1080/03079459808419332.

Kiyothong K, Rowlinson P, Wanapat M, Khampa S. 2012. Effect of mycotoxin deactivator product supplementation on dairy cows. *Animal Production Science*, 52(9), 832-841.

Kolosova A, Stroka J. 2012. Evaluation of the effect of mycotoxin binders in animal feed on the analytical performance of standardised methods for the determination of mycotoxins in feed. *Food Additives & Contaminants: Part A* 29(12): 1959-1971.

Krska R. 2009. Mycotoxins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395, 1203-1204.

Kuilman MEM, Maas RFM, Fink-Gremmels J. 2000. Cytochrome P450-mediated metabolism and cytotoxicity of aflatoxin B1 in bovine hepatocytes. *Toxicology in Vitro*, 14, 321-327.

Kurata H. 1990. Mycotoxins and mycotoxicosis: Overview. In *Microbial Toxins in Food and Feeds--Cellular and Molecular Modes of Action*. A E. Pohland, V.R. Dowell Jr. and J.L. Richard (Eds.) pp. 249-259, Plenum Press, New York.

Lacey J. 1989. Pre and post-harvest ecology of fungi causing spoilage of foods and other stored products. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement* 11S–25S.

Lee JC, Kim J, Lim KT, Yang MS, Jang YS. 2001. Ethanol eluted extract of *Rhus verniciflua* Stokes showed both antioxidant and cytotoxic effects on mouse thymocytes depending on the dose and time of the treatment. *J. Biochem. Mol. Biol.* 34: 250–258.

Lightner DV, Redman RM, Price RL, Wiseman MO. 1982. Histopathology of aflatoxicosis in the marine shrimp *Penaeus stylirostris* and *P. vannamei*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 40(2), 279-291. doi: 10.1016/0022-2011(82)90127-6

Lillehoj EB, Cleveland TE, Bhatnagar D. 1991. Mycotoxins in feedstuffs: production in novel substrates. In: J. E. Smith and R. S. Henderson (Ed.) *Mycotoxins in Animal Foods*. pp 399-413. CRC Press, Boca Raton, FL.

Lim HA, Ng WK, Lim SL, Ibrahim CO. 2001. Contamination of palm kernel meal with *Aspergillus flavus* affects its nutritive value in pelleted feed for tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture Research*, 32(11), 895-905.

Lin JK, Lin-Shiau SY. 2001. Mechanisms of cancer chemoprevention by curcumin. *Proceedings of the National Science Council, Republic of China. Part B, Life sciences*, 25(2), 59-66.

Lohrmann NL, Logan BA, Johnson AS. 2004. Seasonal Acclimatization of Antioxidants and Photosynthesis in *Chondrus crispus* and *Mastocarpus stellatus*, Two Co-Occurring Red Algae With Differing Stress Tolerances. *The Biological Bulletin* 207(3): 225-232.

Lopes PRS, Pouey J, Enke DBS, Mallmann CA, Kich HA, Soquetta MB. 2009. Use of adsorbent in diets containing aflatoxin for silver catfish fingerlings. *Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science*, 38(4), 589-595.

Lotzsch R, Leistner L. 1976. Aflatoxin-Rückstände in Huhnereiern und Eiprodukten. *Fleischwirtschaft*, 12, 1777– 1785.

Lovett RA. 2000. Toxicologists Brace for Genomics Revolution. *Science* 289(5479): 536-537.

Lozano MC, Diaz GJ. 2006. Microsomal and cytosolic biotransformation of aflatoxin B1 in four poultry species. *British Poultry Science*, 47, 734-741.

Luo D, Zhang Q, Wang H, Cui Y, Sun Z, Yang J, Zheng Y, Jia J, Yu F, Wang X, Wang X. 2009. Fucoidan protects against dopaminergic neuron death in vivo and in vitro. *European Journal of Pharmacology* 617(1–3): 33-40.

Lynch GP, Covey FT, Smith DF, Weinland BT. 1972. Response of calves to a single dose of aflatoxin. *Journal Of Animal Science*, 35, 65-68.

MacDonald SJ, Chan D, Brereton P, Damant A, Wood R. 2005. Determination of Deoxynivalenol in Cereals and Cereal Products by Immunoaffinity Column Cleanup with Liquid Chromatography: Interlaboratory Study. *Journal of AOAC International* 88(4): 1197-1204

Macháček M, Večerek V, Mas N, Suchý P, Straková E, Šerman V, Herzig I. 2010. Effect of the Feed Additive Clinoptilolite (ZeoFeed) on Nutrient Metabolism and Production Performance of Laying Hens. *Acta Veterinaria Brno*, 79(9), 29-34.

Macháček M, Večerek V, Mas N, Suchý P, Straková E, Šerman V, Herzig I. 2010. Effect of the feed additive clinoptilolite (ZeoFeed) on nutrient metabolism and production performance of laying hens. *Acta Vet. Brno* 79: S29–S34.

Madhusudhanan N, Kavithalakshmi SN, Shanmugasundaram ERB, Shanmugasundaram KR. 2006. Aflatoxin B1-Induced DNA Damage in *Labeo rohita*: Protective Effect of an Antioxidant Supplement, Amrita Bindu. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 98(5), 473-479.

Makol A, Torrecillas S, Fernández-Vaquero A, Robaina L, Montero D, Caballero MJ, Izquierdo M. 2009. Effect of conjugated linoleic acid on dietary lipids utilization, liver morphology and selected immune parameters in sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 154(2), 179-187. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2009.06.001>

Manoharan N, Sampathkumar S, Dheeba B, Sheikabdulla S, Vinothprasanna G, Vinothkannan R, Shanmugasundaram A. 2008. Potential Hepatoprotective Effect of Aqueous Extract of *Gracilaria corticata* in AFB1 Induced Hepatotoxicity in Wistar Rats. *Journal of Biological Sciences*, 8(8), 1352-1355.

Marin DE, Taranu I, Bunaciu RP, Pascale F, Tudor DS, Avram N, Sarca M, Cureu I, Criste RD, Suta V, Oswald IP. 2002. Changes in performance, blood parameters, humoral and cellular immune responses in weanling piglets exposed to low doses of aflatoxin. *Journal of Animal Science*, 80, 1250-1257.

Mayer AMS, Gustafson KR. 2003. Marine pharmacology in 2000: Antitumor and cytotoxic compounds. *International Journal of Cancer* 105(3): 291-299.

McKenzie KS, Kubena LF, Denvir AJ, Rogers TD, Hitchens GD, Bailey RH, Phillips TD. 1998. Aflatoxicosis in turkey poults is prevented by treatment of naturally contaminated corn with ozone generated by electrolysis. *Poult Sci*, 77(8), 1094-1102.

Medlin JF. 1999. Timely toxicology. *Environmental health perspectives*, 107(5), A256.

- Megalla SE, Kamel YY, Abdel-Fattah HM, Hafez AH. 1981. Determining the kinetic behaviour for the secretion of milk toxin as related to dosage level of aflatoxin B1. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft*, 20(3), 216-222. doi: 10.1007/bf02021568.
- Micco C, Brera C, Miraglia, M, Onori R. 1987. HPLC determination of the total content of aflatoxins in naturally contaminated eggs in free and conjugate forms. *Food Additives and Contaminants*, 4(4), 407-414. doi: 10.1080/02652038709373649.
- Miller DM, Crowell WA, Stuart BP. 1982. Acute aflatoxicosis in swine: clinical pathology, histopathology, and electron microscopy. *American Journal Of Veterinary Research*, 43, 273-277.
- Miller JD. 2008. Mycotoxins in small grains and maize: Old problems, new challenges. *Food Additives and Contaminants*, 25, 219-230.
- Mitchell JK. 1993. *Fundamentals of Soil Behavior*. Second edition. New York, John Wiley & Sons, Inc. 437p.
- Mohamed EZ. 2011. Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15, 129-144.
- Moss MO. 1991. En: *Mycotoxins and Animal Foods*. Smith JE, Henderson RS, eds. CRC Press, Boca Ratón, cap. 2
- Mumpton FA, Fishman PH. 1977. The Application of Natural Zeolites in Animal Science and Aquaculture. *Journal of Animal Science*, 45(5), 1188-1203.
- Mumpton FA. 1999. La roca magica: Uses of natural zeolites in agriculture and industry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(7), 3463-3470.
- Mycifix® plus 3.0. 2000. A modular system to deactivate mycotoxins. Biomin® GTI GmbH. Herzogenbeurg, Austria
- Nagayama K, Iwamura Y, Shibata T, Hirayama I, Nakamura T. 2002. Bactericidal activity of phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 50(6): 889-893.
- Nayak S, Sashidhar RB. 2010. Metabolic intervention of aflatoxin B1 toxicity by curcumin. *Journal of Ethnopharmacology*, 127(3), 641-644. doi: 10.1016/j.jep.2009.12.010.
- Nešić V, Radmila R, Marinković D, Ksenija N, Lazarević M, Nešić S, Sanja A-K. 2012. Efficacy of t-2 toxin detoxifying agent in broiler chickens. *EFIKASNOST DETOKSIKUJUĆEG AGENSA KOD T-2 TOKSIKOZE BROJLERA*. 62(2/3): 171-182.
- Ngethe S, Horsberg TE, Ingebrigtsen K. 1992. The disposition of 3H-aflatoxin B1 in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after oral and intravenous

administration. *Aquaculture*, 108(3–4), 323-332. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486\(92\)90116-3](http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486(92)90116-3).

Nguyen ML, Tanner CC. 1998. Ammonium removal from wastewaters using natural New Zealand zeolites. *N. Z. J. Agric. Res.* 41: 427-446.

Nguyen QT, Ogle B, Pettersson H. 2008. Efficacy of bentonite clay in ameliorating aflatoxicosis in piglets fed aflatoxin contaminated diets. *Tropical Animal Health and Production*, 40, 649-656.

Nieto-López M, Tapia-Salazar M, Ricque-Marie D, Villarreal-Cavazos D, Lemme A, Cruz-Suárez LE. 2011. Digestibility of different wheat products in White shrimp *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture* 319: 369–376.

Nogami M, Sugiyama Y, Kawasaki T, Harada M, Morita Y, Kikuchi T, Ikeda Y. 2010. Adsorptivity of polyvinylpyrrolidone for selective separation of U(VI) from nitric acid media. *Journal of Radioanalytical & Nuclear Chemistry*, 283(2), 541-546. doi: 10.1007/s10967-009-0366-2.

Norma Oficial Mexicana NOM-188-SSA1-2002, Productos y servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones sanitarias.

Nyathi CB, Mutiro CF, Hasler JA, Chetsanga CJ. 1987. A survey of urinary aflatoxin in Zimbabwe. *Int. J. Epidemiol.* 6, 516–519.

Oğuz H, Kurtoğlu V. 2000. Effect of clinoptilolite on performance of broiler chickens during experimental aflatoxicosis. *British Poultry Science* 41(4): 512-517.

O'Leary NA, Trent HF, Robalino J, Peck MET, McKillen DJ, Gross PS. 2006. Analysis of multiple tissue-specific cDNA libraries from the Pacific whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Integrative and Comparative Biology* 46(6): 931-939

Oliveira CAF, Kobashigawa E, Reis TA, Mestieri L, Albuquerque R, Correa B. 2000. Aflatoxin B1 residues in eggs of laying hens fed a diet containing different levels of the mycotoxin. *Food Additives and Contaminants*, 17, 459–462.

Oliveira CAF, Rosmaninho JF, Castro AL, Butkeraitis P, Reis TA, Corrêa B. 2003. Aflatoxin residues in eggs of laying Japanese quail after long-term administration of rations containing low levels of aflatoxin B1. *Food Additives And Contaminants* 20(7): 648-653.

Ono E, Sugiura Y, Homechin M, Kamogae M, Vizzoni É, Ueno Y, Hirooka E. 1999. Effect of climatic conditions on natural mycoflora and fumonisins in freshly harvested corn of the State of Paraná, Brazil. *Mycopathologia*, 147, 139-148.

Ostrowski-Meissner HT, LeaMaster BR, Duerr EO, Walsh WA. 1995. Sensitivity of the Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*, to aflatoxin B1. *Aquaculture*, 131(3-4), 155-164. doi: Doi: 10.1016/0044-8486(95)98125-u.

- Otero MA, Vasallo MC, Verdecia O, Fernández V, Betancourt D. 1996. A process for the complete fractionation of baker's yeast. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 67, 67–71.
- Ottinger CA, Kaattari SL. 2000. Long-term immune dysfunction in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed as embryos to aflatoxin B-1. *Fish & Shellfish Immunology*, 10(1), 101-106.
- Pariza M, Ha Y. 1990. Conjugated dienoic derivatives of linoleic acid: A new class of anticarcinogens. *Medical Oncology and Tumor Pharmacotherapy* 7(2-3): 169-171.
- Park DL, Pohland AE. 1986. A rationale for the control of aflatoxin in animal feeds. *Mycotoxins and Phycotoxins*, edited by P. S. Steyn and R. Vleggaar (Amsterdam: Elsevier), pp. 473–482.
- Parker JC, Conte FS, MacGrath WS, Miller BW. 1974. An intensive culture system for penaeid shrimp. *Proceedings of the annual meeting - World Mariculture Society* 5:65-79.
- Parlat SS, Özcan M, Oguz H. 2001. Biological suppression of aflatoxicosis in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) by dietary addition of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Research in Veterinary Science* 71(3): 207-211.
- Passi S, Nazzaro-Porro M, Fanelli C, Fabbri AA, Fasella P. 1984. Role of lipoperoxidation in aflatoxin production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 19(3): 186-190.
- Pasteiner S. 1994. *Mycotoxins in Animal Husbandry*. Biomin GTI Ges (Ed), St. Pölten, Austria.
- Payne GA, Brown MP. 1998. Genetics and physiology of aflatoxin biosynthesis. *Annual Review Of Phytopathology*, 36, 329-362.
- Peña Rodríguez A. 2011. *Uso potencial de la macroalga verde Ulva clathrata en el cultivo de camarón blanco Litopenaeus vannamei [por] Alberto Peña Rodríguez (Doctoral dissertation, UANL)*.
- Peñaflorida VD, Golez NV. 1996. Use of seaweed meals from *Kappaphycus alvarezii* and *Gracilaria heteroclada* as binders in diets for juvenile shrimp *Penaeus monodon*. 143:393-401.
- Pfost HB, Young LR. 1973. Effect of colloidal binders and other factors on pelleting. *Feedstuffs* 45: 21–22.
- Phillips TD, Lemke SL, Grant PG. 2002. Characterization of clay-based enterosorbents for the prevention of aflatoxicosis. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 504, 157-171.

- Pier AC. 1992. Major biological consequences of aflatoxicosis in animal production. *Journal Of Animal Science*, 70, 3964-3967.
- Pieron A, Janiak V, Dürr CM, Lüdeke S, Trachsel E, Heinrich M. 2002. In vitro antioxidant activity of non-cultivated vegetables of ethnic Albanians in southern Italy. *Phytotherapy Research*, 16(5), 467-473. doi: 10.1002/ptr.1243.
- Piva G, Galvano F, Pietri A, Piva A. 1995. Detoxification methods of aflatoxins. A review. *Nutrition Research*, 15(5), 767-776. doi: 10.1016/0271-5317(95)00042-h
- Plakas SM, Loveland PM, Bailey GS, Blazer VS, Wilson GL. 1991. Tissue disposition and excretion of c-14-labeled aflatoxin b-1 after oral-administration in channel catfish. *Food and Chemical Toxicology* 29(12): 805-808
- Pongsomboon S, Tang S, Boonda S, Aoki T, Hirono I, Yasuike M, Tassanakajon A. 2008. Differentially expressed genes in *Penaeus monodon* hemocytes following infection with yellow head virus. *BMB Rep*, 41(9), 670-677.
- Premalatha M, Dhasarathan P, Theriappan P. 2011. Phytochemical characterization and antimicrobial efficiency of seaweed samples, *Ulva fasciata* and *Chaetomorpha antennina*. *Int. J. Pharm. Biol. Sci*; 2:288–293.
- Qinghua W, Jezkova A, Zonghui Y, Pavlikova L, Dohnal V, Kuca K. 2009. Biological degradation of aflatoxins. *Drug Metabolism Reviews*, 41(1), 1-7. doi: 10.1080/03602530802563850.
- Raju MV, Devegowda G. 2000. Influence of esterified-glucomannan on performance and organ morphology, serum biochemistry and haematology in broilers exposed to individual and combined mycotoxicosis (aflatoxin, ochratoxin and T-2 toxin). *British Poultry Science*, 41, 640-650.
- Ramos AJ, Hernández E. 1996. In vitro aflatoxin adsorption by means of a montmorillonite silicate. A study of adsorption isotherms. *Anim. Feed Sci. Technol.* 62, 263-269.
- Ramos AJ, Hernández E. 1997. Prevention of aflatoxicosis in farm animals by Means of hydrated sodium calcium aluminosilicate addition to feedstuffs: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 65(1–4), 197-206. doi: 10.1016/s0377-8401(96)01084-x
- Rangsaz N, Ahangaran MG. 2011. Evaluation of turmeric extract on performance indices impressed by induced aflatoxicosis in broiler chickens. *Toxicology & Industrial Health*, 27(10), 956-960. doi: 10.1177/0748233711401262.
- Rawal S, Coulombe Jr RA. 2011. Metabolism of aflatoxin B1 in Turkey liver microsomes: The relative roles of cytochromes P450 1A5 and 3A37. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 254, 349-354.

Reed G, Nagodawithana TW. 1991. Yeast technology. 2.ed. New York: Van Nostrand Reinhold.

Reza A, Majid RM, Hossein Ch, Rabeeh Z. 2012. Effect of Dietary Mannan Oligosaccharide on Growth Performance, Survival, Body Composition and Some Hematological Parameters of Carp Juvenile (*Cyprinus carpio*). *Journal of Aquaculture Feed Science and Nutrition*, 4: 54-60

Richard JL. 2008. Discovery of aflatoxins and significant historical features. *Toxin Reviews*, 27, 171-201.

Ricque-Marie D, Peña-Rodríguez A, Tapia-Salazar M, Nieto Lopez MG, Villarreal-Cavazos D, Guajardo-Barbosa C, Cruz Suarez LE, Locateli ML. 2006. Effect of pré-prandial nutrient leaching in seawater and different binders on apparent amino acid digestibility coefficients of a practical diet in *Litopenaeus vannamei* juveniles. *International Aquafeed* 9(5), 32-33.

Robalino J, Almeida JS, McKillen D, Colglazier J, Trent HF, Chen YA., Gross PS. 2007. Insights into the immune transcriptome of the shrimp *Litopenaeus vannamei*: tissue-specific expression profiles and transcriptomic responses to immune challenge. *Physiological Genomics*, 29(1), 44-56.

Rupérez P, Ahrazem O, Leal JA. 2002. Potential antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(4), 840–845.

Rushmore TH, Kong AN. 2002. Pharmacogenomics, regulation and signaling pathways of phase I and II drug metabolizing enzymes. *Curr. Drug. Metab.* 3, 481–490.

Rustom IYS. 1997. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food chemistry*, 59(1), 57-67.

Sahoo PK, Mukherjee SC. 2001. Immunosuppressive effects of aflatoxin B1 in Indian major carp (*Labeo rohita*). *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 24(3), 143-149. doi: 10.1016/s0147-9571(00)00017-5.

Sahu S, Das BK, Mishra BK, Pradhan J, Samal SK, Sarangi N. 2008. Effect of dietary *Curcuma longa* on enzymatic and immunological profiles of rohu, *Labeo rohita* (Ham.), infected with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Research*, 39(16), 1720-1730. doi: 10.1111/j.1365-2109.2008.02048.x

Sangeetha R, Bhaskar N, Baskaran V. 2009. Comparative effects of β -carotene and fucoxanthin on retinol deficiency induced oxidative stress in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry* 331(1): 59-67.

Santacroce MP, Conversano MC, Casalino E, Lai O, Zizzadoro C, Centoducati G, Crescenzo G 2008. Aflatoxins in aquatic species: metabolism, toxicity and perspectives. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 18, 99-130.

Santin E, Paulillo AC, Krabbe EL, Alessi AC, Polveiro WJC, Maiorka A. 2005. Low level of aflatoxin in broiler at experimental conditions. Use of cell wall yeast as adsorbent of aflatoxin: Archives of Veterinary Science.

Schell TC, Lindemann MD, Kornegay ET, Blodgett DJ. 1993. Effects of feeding aflatoxin-contaminated diets with and without clay to weanling and growing pigs on performance, liver function, and mineral metabolism. Journal Of Animal Science, 71, 1209-1218.

Schoenhard GL, Hendricks JD, Nixon JE, Lee DJ, Wales JH, Sinnhuber RO, Pawlowski NE. 1981. Aflatoxin-induced hepatocellular-carcinoma in rainbow-trout (*Salmo-gairdneri*) and the synergistic effects of cyclopropenoid fatty-acids. Cancer Research, 41(3), 1011-1014.

Sharmila Banu G, Kumar G, Murugesan A. 2009. Effect of ethanolic leaf extract of *Trianthema portulacastrum* L. On aflatoxin induced hepatic damage in rats. Indian Journal of Clinical Biochemistry, 24, 414-418.

Shi YH, Xu ZR, Feng JL, Wang CZ. 2006. Efficacy of modified montmorillonite nanocomposite to reduce the toxicity of aflatoxin in broiler chicks. Animal Feed Science & Technology, 129, 138-148.

Shin H-C, Hwang H, Kang K, Lee B. 2006. An antioxidative and antiinflammatory agent for potential treatment of osteoarthritis from *Ecklonia cava*. Archives of Pharmacal Research 29(2): 165-171.

Shotwell OL. 1988. Citation classic - production of aflatoxin on rice. Current Contents/Agriculture Biology & Environmental Sciences(2), 16-16.

Smit AJ. 2004. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. 6(4), 245-262.

Soonngam CAL, Hutacharoen R. 2007. Vermiculite and hydrated sodium calcium aluminosilicates as the agent of aflatoxin B1 absorption for black tiger shrimp diets. Environ. Nat. Resour. J. 5: 50–58.

Spring P, Fegan DF. 2005. Mycotoxins—a rising threat to aquaculture. Feedmix, 13, 5-9.

Stanley VG, Ojo R, Woldesenbet S, Hutchinson DH, Kubena LF. 1993. The Use of *Saccharomyces cerevisiae* to Suppress the Effects of Aflatoxicosis in Broiler Chicks. Poultry Science, 72(10), 1867-1872.

Stanley VG, Sefton AE, Chukwe H. 1995. The interaction of temperature, mannoglycocharides and aflatoxin on broiler chicks. Pages 2–7 in Proc. 10th World's Poult. Sci. Assoc. Conf. on Poult. Nutr., Antalya, Turkey.

Stanley VG, Winsman M, Dunkley C, Ogunleye T, Daley M, Krueger WF, Hinton A. 2004. The Impact of Yeast Culture Residue on the Suppression of Dietary Aflatoxin on the Performance of Broiler Breeder Hens. *The Journal of Applied Poultry Research*, 13(4), 533-539.

Staykov Y, Spring P, Denev S, Sweetman J. 2007. Effect of a mannan oligosaccharide on the growth performance and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture International* 15(2): 153-161

Suppadit T, Jaturasitha S, Pripwai N. 2006. Utilization of hydrated sodium calcium aluminosilicate and vermiculite for aflatoxin B-1 adsorption in pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) diets. *Journal of Applied Animal Research*, 29(2), 129-132.

Suresh AV, Kumaraguru-vasagam KP, Nates S. 2011. Attractability and palatability of protein ingredients of aquatic and terrestrial animal origin, and their practical value for blue shrimp, *Litopenaeus stylirostris*, fed diets formulated with high levels of poultry byproduct meal. *Aquaculture* 319: 132–140.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.06.039>

Svobodova Z, Piskac A. 1980. Effect of feeds with a low content of aflatoxin B1 on the health condition of carp (*Cyprinus carpio*). *Zivocisna Vyroba*, 53(11), 809-814.

Swaminathan B, Koehler PE. 1976. Isolation of an Inhibitor of *Aspergillus parasiticus* From White Potatoes (*Solanum tuberosum*). *Journal of Food Science* 41(2): 313-319.

Swanson BG. 1987. *Acta Horticulturae* 207: 49-61.

Taher DM, Shareef AM. 2008. Ameliorative effect of mycofix plus 3.0 in reducing intensity of *Eimeria tenella* infection during aflatoxicosis in broiler chicks. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences* 22(1): Ar39-Ar51.

Talarico LB, Zibetti RGM, Faria PCS, Scolaro LA, Duarte MER, Nosedá MD, Pujol CA, Damonte EB. 2004. Anti-herpes simplex virus activity of sulfated galactans from the red seaweeds *Gymnogongrus griffithsiae* and *Cryptonemia crenulata*. *International Journal of Biological Macromolecules* 34(1–2): 63-71.

Tapia-Salazar M, García-Pérez O D, Velásquez-Soto R A, Nieto-López M G, Villarreal-Cavazos D, Ricque-Marie D, Cruz-Suárez L E. 2012. Growth, feed intake, survival, and histological response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* fed diets containing grains naturally contaminated with aflatoxin. *Ciencias Marinas*, 38(3), 491-504.

Tassanakajon A, Klinbunga S, Paunglarp N, Rimphanitchayakit V, Udomkit A, Jitrapakdee S, Sritunyalucksana K, Phongdara A, Pongsomboon S, Supungul P, Tang S, Kuphanumart K, Pichyangkura R, Lursinsap C. 2006. *Penaeus monodon* gene discovery

project: The generation of an EST collection and establishment of a database. *Gene* 384(0): 104-112.

Tassanakajon A, Somboonwiwat K, Supungul P, Tang S. 2013. Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity. *Fish & Shellfish Immunology* 34(4): 954-967.

Tecator. 1983. Fat extraction on feeds with the Soxtec System HT- The influence of sample preparation and extraction media. Application note AN 67/83 (1983.06.13), Soxtec System HT Manual Tecator, AB Sweden.

Thammakiti S, Suphantharika M, Phaesuwan T, Verduyn C. 2004. Preparation of spent brewer's yeast β -glucans for potential applications in the food industry. *International Journal of Food Science & Technology* 39(1): 21-29

Thomas M, van Vliet T, van der Poel AFB. 1998. Physical quality of pelleted animal feed 3: Contribution of feedstuff components. *Anim. Feed Sci. Tech.* 70: 59–78.

Tilton SC, Gerwick LG, Hendricks JD, Rosato CS, Corley-Smith G, Givan SA, Williams DE. 2005. Use of a Rainbow Trout Oligonucleotide Microarray to Determine Transcriptional Patterns in Aflatoxin B1-Induced Hepatocellular Carcinoma Compared to Adjacent Liver. *Toxicological Sciences*, 88(2), 319-330. doi: 10.1093/toxsci/kfi309.

Torrecillas S, Makol A, Caballero MJ, Montero D, Robaina L, Real F, Sweetman J, Tort L, Izquierdo MS. 2007. Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. *Fish & Shellfish Immunology* 23(5): 969-981.

Towner RA, Qian SY, Kadiiska MB, Mason RP. 2003. In vivo identification of aflatoxin-induced free radicals in rat bile. *Free Radical Biology and Medicine* 35(10): 1330-1340.

Trucksess MW, Stoloff L, Young K, Wyatt RD, Miller BL. 1983. Aflatoxicol and aflatoxins B1 and M1 in eggs and tissues of laying hens consuming aflatoxin-contaminated feed. *Poult Sci.* 62(11), 2176-2182.

Turner PC, Sylla A, Gong YY, Diallo MS, Sutcliffe AE, Hall AJ, Wild CP. 2005. Reduction in exposure to carcinogenic aflatoxins by postharvest intervention measures in west Africa: a community-based intervention study. *Lancet*, 365, 1950-1956.

Valente LMP, Bandarra NM, Figueiredo-Silva AC, Rema P, Vaz-Pires P, Martins S, Nunes ML. 2007. Conjugated linoleic acid in diets for large-size rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effects on growth, chemical composition and sensory attributes. *British Journal of Nutrition*, 97(2), 289-297. doi: 10.1017/s000711450733729x

Van Vleet TR, Klein PJ, Coulombe Jr RA. 2001. Metabolism of aflatoxin B₁ by normal human bronchial epithelial cells. *Journal of Toxicology & Environmental Health: Part A*, 63, 525-540.

Vandana S, Ram S, Ilavazhagan M, Kumar GD, Banerjee PK. 2006. Comparative cytoprotective activity of vitamin C, E and beta-carotene against chromium induced oxidative stress in murine macrophages. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 60(2): 71-76.

Vaught R, Brye KR, Miller DM. 2006. Relationships among coefficient of linear extensibility and clay fractions in expansive, stoney soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 70: 1983–1990. <http://dx.doi.org/10.2136/sssaj2006.0054>.

Verma RJ. 2004. Aflatoxin cause DNA damage. *Int J Hum Genet* 4: 231–236.

Vieira SL. 2003. Nutritional implications of mould development in feedstuffs and alternatives to reduce the mycotoxin problem in poultry feeds. *Worlds Poultry Science Journal*, 59, 111-122.

Villanueva C, Kross RD. 2012. Antioxidant-Induced Stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(2), 2091-2109. doi: 10.3390/ijms13022091.

Wang B, Li F, Dong B, Zhang X, Zhang C, Xiang J. 2006. Discovery of the Genes in Response to White Spot Syndrome Virus (WSSV) Infection in *Fenneropenaeus chinensis* Through cDNA Microarray. *Marine Biotechnology*, 8(5), 491-500. doi: 10.1007/s10126-005-6136-4.

Wang B, Li F, Luan W, Xie Y, Zhang C, Luo Z, Xiang J. 2008. Comparison of Gene Expression Profiles of *Fenneropenaeus chinensis* Challenged with WSSV and *Vibrio*. *Marine Biotechnology*, 10(6), 664-675. doi: 10.1007/s10126-008-9105-x.

Watt JM, Breyer-Brandwijk MG. 1962. *The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa*. 2nd ed. Edinburgh, London E & S. Living Stone Ltd., pp. 1042–1046.

Wei CI, Macy JM, Hsieh DPH. 1981. Biotransformation of Aflatoxin B₁ and Its Conjugated Metabolites by Rat Gastrointestinal Microfloras. *Applied & Environmental Microbiology*, 41(2), 549.

Weng CY, Martinez AJ, Park DL. 1994. Efficacy and permanency of ammonia treatment in reducing aflatoxin levels in corn. *Food Addit Contam.* 11(6), 49-58.

WHO. 1980. Environmental health criteria 11: Mycotoxins: published under the joint sponsorship of the United Nations Environment Programme and the World Health Organization, Geneva, World Health Organization, 1979. 127 pp. S.Fr. 11. *Environment International*, 3, 279.

WHO. 2005. The International Mycotoxin Workshop: Public Health Strategies for Preventing Aflatoxin Exposure, sponsored by United States Centers for Disease Control and Prevention (US CDC) and the World Health Organization (WHO) took place at the WHO Headquarters in Geneva, Switzerland, on 26-28 July 2005

Widstrom NW. 1992. Aflatoxin in developing maize: interactions among involved biota and pertinent economic factors. pp. 23-58 en: *Mycotoxins in Ecological Systems*. Bhatnagar D et al., editores. Marcel Dekker, New York.

Williams DE, Buhler DR. 1983. Purified form of cytochrome-p-450 from rainbow-trout with high-activity toward conversion of aflatoxin-b1 to aflatoxin-B1-2,3-epoxide. *Cancer Research*, 43, 4752-4756.

Wiseman MO, Price RL, Lightner DV, Williams RR. 1982. Toxicity of Aflatoxin B1 to Penaeid Shrimp. *Applied & Environmental Microbiology*, 44(6), 1479.

Wolzack A, Pearson AM, Coleman TH, Pestka JJ, Gray JI, Chen C. 1986. Aflatoxin carryover and clearance from tissues of laying hens. *Food and Chemical Toxicology*, 24, 37-41.

Wolzack A, Pearson AM, Coleman TH, Pestka JJ, Gray JI. 1985. Aflatoxin deposition and clearance in the eggs of laying hens. *Food and Chemical Toxicology*, 23, 1057-1061.

Wood GE, Pohland AE. 1992. *Mycotoxins in Foods and Their Safety Ramifications Food Safety Assessment (Vol. 484, pp. 261-275): American Chemical Society*.

Wu F, Guclu H. 2012. Aflatoxin Regulations in a Network of Global Maize Trade. *PLoS ONE* 7(9): e45151

Xagorari A, Papapetropoulos A, Mauromatis A, Economou M, Fotsis T, Roussos C. 2001. Luteolin Inhibits an Endotoxin-Stimulated Phosphorylation Cascade and Proinflammatory Cytokine Production in Macrophages. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 296(1), 181-187.

Xiang J, Li F, Liu B, Zhou Y, Tong W. 2008. Generation and analysis of 10,443 ESTs from cephalothorax of *Fenneropenaeus chinensis*. In *Bioinformatics and Biomedical Engineering, 2008. ICBBE 2008. The 2nd International Conference on* (pp. 74-80). IEEE.

Yamamoto I, Maruyama H. 1985. Effect of dietary seaweed preparations on 1,2-dimethylhydrazine-induced intestinal carcinogenesis in rats. *Cancer Letters* 26(3): 241-251.

Yangthong M, Hutadilok-Towatana N, Phromkunthong W 2009. Antioxidant Activities of Four Edible Seaweeds from the Southern Coast of Thailand. *Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum)* 64(3): 218-223.

- Yarru LP, Settivari RS, Antoniou E, Ledoux DR, Rottinghaus GE. 2009. Toxicological and gene expression analysis of the impact of aflatoxin B-1 on hepatic function of male broiler chicks. *Poultry Science*, 88, 360-371.
- Yarru LP, Settivari RS, Gowda NKS, Antoniou E, Ledoux DR, Rottinghaus GE. 2009. Effects of turmeric (*Curcuma longa*) on the expression of hepatic genes associated with biotransformation, antioxidant, and immune systems in broiler chicks fed aflatoxin. *Poultry Science*, 88(12), 2620-2627.
- Yasuhara-Bell J, Lu Y. 2010. Marine compounds and their antiviral activities. *Antiviral Research* 86(3): 231-240.
- Ye H, Wang K, Zhou C, Liu J, Zeng X. 2008. Purification, antitumor and antioxidant activities in vitro of polysaccharides from the brown seaweed *Sargassum pallidum*. *Food Chemistry* 111(2): 428-432
- Yiannikouris A, André G, Buléon A, Jeminet G, Canet I, François J, Jouany J-P. 2004. Comprehensive Conformational Study of Key Interactions Involved in Zearalenone Complexation with β -d-Glucans. *Biomacromolecules*, 5(6), 2176-2185. doi: 10.1021/bm049775g
- Yiannikouris A, Andre G, Poughon L, Francois J, Dussap C G, Jeminet G, Bertin G, Jouany JP. 2006. Chemical and conformational study of the interactions involved in mycotoxin complexation with β -D-Glucans. *Biomacromolecules* 7, 1147–1155.
- Ying Hua S, Zi Rong X, Cheng Zhang W, Yu S. 2007. Efficacy of two different types of montmorillonite to reduce the toxicity of aflatoxin in pigs. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 50, 473-478.
- Yinghua S, Zirong X, Yu S, Chengzhang W, Jianlei F. 2009. Effects of Two Different Types of Montmorillonite on Growth Performance and Serum Profiles of Broiler Chicks during Aflatoxicosis. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 33(1), 15-20.
- Zechner-Krpan V, Petravić-Tominac V, Panjkota-Krbavčić I, Grba S, Berković K. 2009. Potential Application of Yeast β -Glucans in Food Industry. *Agriculturae Conspectus Scientificus*. Vol. 74 (2009) No. 4 (277-282)

RESUMEN BIBLIOGRÁFICO

Oscar Daniel García Pérez

Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con especialidad en Nutrición y Tecnología de Alimentos Para Organismos Acuáticos.

Tesis: **EFFECTO TOXICOLÓGICO DE LA PRESENCIA DE AFLATOXINAS Y UTILIZACIÓN DE PRODUCTOS REMEDIADORES EN JUVENILES DE CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei*.**

Campo de Estudio: Nutrición Acuícola

Datos personales: Nacido en Ciudad Victoria Tamaulipas, el 19 de agosto de 1983

Educación: Egresado de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Tamaulipas, Obteniendo el grado de: Médico Veterinario Zootecnista 2002-2007 (cédula 5625534)

Experiencia profesional:

- Responsable de la granja de engorda de bagre (*Ictalurus punctatus*) “El Tirón Parejo” ubicada en la presa Emilio Portes Gil, Xicoténcatl Tamps. (2006-2007)
- Responsable de la granja de cría de bagre (*Ictalurus punctatus*) “El Tirón Parejo” ubicado ubicada en Gómez Farías Tamps. (2007-2008)
- Realización de tesis Doctoral: Efecto toxicológico de la presencia de aflatoxinas y utilización de productos remediadores en juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. (Agosto 2008 – Agosto 2013)

Presentaciones en congresos:

- **Oscar Daniel García Pérez**, Martha Nieto López Mireya Tapia Salazar. Evaluación de algunos agentes secuestrantes de aflatoxinas como posibles remediadores en alimentos contaminados para juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* 13a Feria Nacional de Postgrados, México.
- Alfredo Bustamante, **Oscar Daniel García Pérez**, Mireya Tapia-Salazar, Martha Nieto López, David Villarreal Cavazos, Lucia Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie. Evaluación de diferentes aluminosilicatos como posibles remediadores de aflatoxinas en alimentos para camarón. XI Simposio Internacional De Nutrición Acuícola.
- **Oscar Daniel García Pérez**, Mireya Tapia Salazar Rut Velázquez Soto Martha Nieto López David Villarreal Cavazos Lucia Elizabeth Cruz Suárez Denis Ricque Marie. Evaluación de la presencia de aflatoxinas sobre el rendimiento de juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. XI Simposio Internacional de Nutrición Acuícola.
- **Oscar Daniel García Pérez**, Mireya Tapia Salazar, Martha Nieto López, David Villarreal Cavazos, Lucia Elizabeth Cruz Suárez, Juan Carlos Medina Antonio Fierro, Denis Ricque Marie. Efecto toxicológico de la presencia de aflatoxinas

sobre el rendimiento de juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. X Simposio Internacional De Nutrición Acuícola.

- Marta Nieto López, Mireya Tapia Salazar, **Oscar Daniel García Pérez**, Denis Ricque Marie, David Villarreal Cavazos, Julián Gamboa Delgado, Lucia Elizabeth Cruz Suárez. Uso de agentes detoxificantes para disminuir los efectos de las micotoxinas en alimentos para camarón. 1er seminario Centroamericano Producción de camarón DISAGRO. Guatemala.

Artículos Publicados en revistas Arbitradas:

- **García-Pérez OD**, M Tapia-Salazar, Martha Guadalupe Nieto-López, David Villarreal-Cavazos, Lucía Elizabeth Cruz-Suárez, Denis Ricque-Marie. Effectiveness of aluminosilicate-based products for detoxification of aflatoxin-contaminated diets for juvenile pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Ciencias Marinas, Vol.39, Pag.1-13.
- M Tapia-Salazar, **García-Pérez OD**, Velásquez-Soto RA, Nieto-López MG, Villarreal-Cavazos D, Rique-Marie D, Cruz-Suárez LE. Growth, feed intake, survival, and histological response of white shrimp *litopenaeus vannamei* fed diets containing grains naturally contaminated with aflatoxin. Ciencias Marinas, Vol.38, Pag.491-504.

Artículos publicados en revistas de difusión:

- **Oscar Daniel Pérez García**, Mireya Tapia Salazar, Martha Nieto López, David Villareal Cavazos, Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque-Marie. Efecto de la presencia de aflatoxinas en alimentos para camarón blanco *L. vannamei*. Revista CIENCIAUANL

Capítulos de libros.

- Mireya Tapia-Salazar, **Oscar Daniel García Pérez**, Martha Nieto-López, Denis Ricque-Marie, David Villarreal-Cavazos, Lucia Elizabeth Cruz-Suarez. Uso de secuestrantes para disminuir la toxicidad de micotoxinas en alimentos para acuicultura. Avances en Nutrición Acuícola X. Memorias del Décimo Simposio Internacional de Nutrición Acuícola. Vol. 10 Pagina 514-547.