

## EFFECTO DE UN SECUESTRANTE DE MICOTOXINAS SOBRE LA PRODUCCIÓN DE GAS Y DEGRADACIÓN RUMINAL *IN VITRO* DE HARINA DE MAÍZ CON AFLATOXINA B1

### *Effect of Mycotoxin Binder on in Vitro Gas Production and Ruminal Degradation of Maize Meal with Aflatoxin B1*

Diógenes Saavedra\*, Álvaro Ojeda\*<sup>1</sup>, Odalis Luzón\* y Claudio Mazzani\*

\*Universidad Central de Venezuela. Instituto de Producción Animal. Facultad de Agronomía. Apartado Postal 4579. Maracay, estado Aragua. Venezuela

Correo-E: [ajojeda99@yahoo.com](mailto:ajojeda99@yahoo.com)

Recibido: 13/03/14 - Aprobado: 20/11/14

#### RESUMEN

Con el propósito de evaluar el efecto de un secuestrante comercial de micotoxinas (SM) con base en glucomananos, sobre la producción de gas y degradación ruminal *in vitro*, se incubó harina de granos de maíz (*Zea mays* L.) en licor ruminal con concentraciones de aflatoxina B1 (AFB1) de 4, 8 y 12 ppb, respectivamente, y proporciones de AFB1: SM de 1:75000 (SM-75), 1:150000 (SM-150) y 1:225000 (SM-225). Adicionalmente, se consideró un tratamiento sin inclusión del secuestrante de micotoxinas (SM-0). La producción de gas se registró a las 3, 6, 9, 12, 16 y 24 h, y la actividad del SM a las 3 h de incubación. La información fue analizada utilizando un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial 3x4. La concentración de AFB1 afectó negativamente ( $P < 0,05$ ) la producción de gas, con el mayor impacto a las 9 h, cuando 12 ppb [5,15 mL/g de materia seca (MS)] generaron una reducción en la producción de gas, en comparación con 4 y 8 ppb (6,57 y 6,01 mL/g MS), respectivamente. Independientemente del nivel utilizado y luego de 24 h de incubación, el uso de SM incrementó ( $P < 0,05$ ) la producción de gas respecto al SM-0 en 25,5% (68,5 vs. 56,6 mL/g MS, respectivamente). En todos los tratamientos, SM-75 mostró la mayor producción

#### ABSTRACT

To evaluate the effect of a commercial mycotoxin binder (MB) based on glucomannans, on the *in vitro* gas production and ruminal degradation, maize (*Zea mays* L.) grain meal was incubated in ruminal liquor with aflatoxin B1 (AFB1) concentrations of 4, 8 y 12, respectively, and proportions of AFB1: MB of 1:75000 (MB-75), 1:150000 (MB-150), and 1:225000 (MB-225). Additionally, a treatment without MB was considered (MB-0). Gas production was measured at 3, 6, 9, 12, 16, and 24 h, and MB activity after 3 h of incubation. Data was analyzed using a completely randomized design with a 3x4 factorial arrangement. The results show that gas production was negatively affected by AFB1 concentration ( $P < 0.05$ ), with the higher impact at 9 h, when 12 ppb [5.15 mL/g of dry matter (DM)] generated a reduction, when compared to 4 and 8 ppb (6.57 and 6.01 mL/g of DM, respectively). Regardless of the level used and after 24 h of incubation, the use of MB increased ( $P < 0.05$ ) gas production in 25.5%, compared to SM-0 (68.5 vs. 56.6 mL/g of DM, respectively). In all treatments, MB-75 showed the highest gas production without improvements, due to further increases in the ratio MB: AFB1. The AFB1 concentration negatively affected ( $P < 0.05$ ) degradation of DM of maize meal, with

<sup>1</sup> A quien debe dirigirse la correspondencia (To whom correspondence should be addressed)

de gas, sin mejoras debido a aumentos adicionales en la relación SM:AFB1. La concentración de AFB1 afectó ( $P < 0,05$ ) negativamente la degradación de la MS de la harina de maíz, con una reducción del 39,8%, luego de 12 h de incubación. La capacidad secuestrante fue del  $86,0 \pm 3,34\%$ , sin diferencias ( $P > 0,05$ ) debida al nivel de AFB1 o a la relación AFB1:SM. Estos resultados demuestran que el aditivo biotecnológico evaluado, reduce el impacto negativo de la AFB1 sobre la producción ruminal *in vitro* de gas y la degradación aparente de la MS.

**(Palabras clave:** Aflatoxinas; gases; *in vitro*; *Aspergillus flavus*; harina de maíz; degradabilidad ruminal; detoxificación metabólica; raciones)

## INTRODUCCIÓN

Las micotoxinas son compuestos derivados del metabolismo secundario de hongos, las cuales cuando están presentes como contaminantes en alimentos balanceados, heno o silajes, pueden constituir residuos tóxicos en los productos de consumo humano, generados a partir de los sistemas de producción animal [1].

Las aflatoxinas son micotoxinas de amplia difusión en ambientes tropicales, y de éstas, la Aflatoxina B1 (AFB1) es una difuranocumarina que genera disfunción hepática y renal, además de daño genético de tipo carcinogénico, teratogénico y mutagénico [2]. Aunque se estima que el medio ruminal puede degradar hasta un 10% de la AFB1 ingerida, este proceso genera aflatoxicol, un compuesto de elevada toxicidad el cual es absorbido por el epitelio del tracto digestivo. Por su parte, la fracción de AFB1 que alcanza el torrente sanguíneo se convierte a nivel tisular en Aflatoxina M1, la cual se une covalentemente a macromoléculas celulares para acumularse en hígado, riñones y pulmones [2,3], generando disminución de la velocidad de crecimiento y una baja conversión de alimento [4]. Estos efectos se deben principalmente a interferencias sobre diversos sistemas enzimáticos ligados al metabolismo intermediario de nutrientes y el sistema inmunológico [5].

Una estrategia para reducir los efectos deletéreos de las micotoxinas es la incorporación a la ración de agentes secuestrantes, productos que actúan para reducir su biodisponibilidad y prevenir su absorción

a reducción de 39.8%, after 12 h of incubation. The binding capacity was  $86.0 \pm 3.34\%$ , without differences ( $P < 0.05$ ) due to AFB1 concentration or AFB1: MB relation. These results demonstrate that the assessed biotechnological additive reduces the negative impact of AFB1 on the *in vitro* ruminal gas production and apparent DM degradation.

**(Key words:** Aflatoxins; gases; *in vitro*; *Aspergillus flavus*; corn flour; metabolic detoxification; rations)

a nivel gastrointestinal, disminuyendo el impacto tóxico directo al animal e indirecto al ser humano [6]. Actualmente, se dispone de secuestrantes con base en paredes celulares de levaduras, los cuales han sido evaluados y utilizados en la elaboración de alimentos balanceados para animales no rumiantes [7, 8], con un impacto en rumiantes que aún no ha sido suficientemente caracterizado en términos de su influencia sobre parámetros de la fermentación ruminal.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de un secuestrante de micotoxinas con base en paredes celulares de levaduras sobre la producción de gas y degradación ruminal *in vitro* de harina de maíz contaminada con AFB1.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La evaluación se realizó en los Laboratorios de Micotoxicología y Nutrición Animal, adscritos a la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela, y localizados en Maracay-Edo. Aragua ( $10^{\circ} 16' 20''$  N y  $67^{\circ} 36' 35''$  O) a una altura de 455 msnm, con una temperatura media anual de  $25,4^{\circ}\text{C}$  y humedad relativa de 72,3% [9].

Como sustrato se emplearon granos de maíz amarillo (*Zea mays* L.) adquiridos en el mercado local, los cuales fueron esterilizados dos veces a vapor abierto ( $121^{\circ}\text{C}$ ), para posteriormente ser inoculados con una suspensión en aislado de *Aspergillus flavus* de alta capacidad toxigénica [10], preparada a partir de colonias de 8 d de crecimiento en papa dextrosa agar, y ajustada a una concentración de  $10^6$  conidios/mL

con el empleo de una cámara de Neubauer. El maíz inoculado fue incubado durante 21 d a temperatura ambiente, para posteriormente extraer la AFB1 en solución de agua/metanol (20:80 v/v) bajo agitación moderada (150 agitaciones/min) durante 120 min. La concentración de AFB1 se determinó a través de cromatografía líquida de alta presión (HPLC), empleando un equipo marca Hewlett Packard/ modelo 1100 [11].

### **Producción In vitro de Gas**

La producción *in vitro* de gas se estimó de acuerdo a Theodorou *et al.* [12], incubando 0,78 g de granos de maíz molidos (1 mm Ø) en envases de vidrio color ámbar de 130 cm<sup>3</sup>, donde una vez colocado el sustrato se adicionaron 8 mL de inóculo ruminal, 80 mL de solución nutritiva (macro y microminerales), y solución de AFB1 para garantizar concentraciones de 4, 8 y 12 ppb AFB1 en el medio de cultivo. Estas concentraciones se localizaron en el rango esperado en el rumen de una vaca seca entre 1 y 6 h luego de la ingesta de 200 a 250 µg AFB1/animal/d, y una fase líquida ruminal de 50 a 60 l [13].

Considerando un ayuno previo de 10 h, el inóculo ruminal se obtuvo de tres vacas (*Bos taurus* x *Bos indicus*) adultas con cánula ruminal y peso vivo de 450 ± 4,2 kg, manejadas a pastoreo en potreros de gramíneas cultivadas de los géneros *Brachiaria*, *Cynodon*, *Digitaria* y *Panicum*, a las que se les suministró al momento del ordeño un suplemento a razón de 2 kg/animal/d (90,4% materia seca, 16,9% proteína cruda, 37,2% fibra neutro detergente y 7,6% cenizas). El secuestrante de micotoxinas (SM) estuvo constituido por glucomanos esterificados derivados de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* (Mycosorb®, Alltech Inc. Nicholasville, KY), y fue incorporado al medio de cultivo hasta alcanzar relaciones AFB1:SM de 1:75000 (SM-75), 1:150000 (SM-150) y 1:225000 (SM-225). Estos valores se establecieron considerando como referencia la dosis recomendada por el fabricante (20 g SM/animal/d). Adicionalmente, se consideró un tratamiento donde no se incluyó el producto secuestrante (SM-0).

Los envases de vidrio se mantuvieron en incubadora a 39°C, realizando lecturas de la producción de gas (3, 6, 9, 12, 16 y 24 h) con el empleo un transductor de presión (Red Lion®, modelo DP5-1/8 DIN). Considerando cuatro repeticiones por tratamiento, los

ajustes en las medidas experimentales se efectuaron a partir de blanco negativo (inóculo y solución nutritiva), blanco positivo (inóculo, solución nutritiva y AFB1) y réplicas estándar de heno de *Cynodon dactylon*, con patrón de producción de gas conocido. La cantidad de gas generado se determinó por la transformación de las lecturas de presión (p, psi) a volumen (V, mL), ajustando los registros a la siguiente fórmula [14]:

$$V = 0,172 + 5,121p + 0,011p^2$$

### **Degradación Aparente**

La degradación aparente de la materia seca se evaluó luego de 12 y 24 h de incubación *in vitro*, empleando cuatro envases adicionales en cada tiempo. A tal fin, los envases de vidrio se colocaron en baño de maría inverso (- 4°C), y se filtró su contenido empleando crisoles de vidrio con placa de porcelana porosa (poro # 1) previamente pesados, los cuales fueron luego deshidratados hasta alcanzar un peso constante en estufa a 105°C, estimando por diferencia de peso la degradación aparente *in vitro* de la materia seca.

### **Capacidad Secuestrante**

Para determinar la capacidad secuestrante (CS) se colectaron 15 mL de muestras del licor ruminal empleado en la evaluación, así como del sobrenadante de cada tratamiento una vez transcurridas las primeras 3 h de incubación. A estas muestras se les adicionaron 70 mL metanol y 5 g de cloruro de sodio para luego agitar durante 2 min. En el caso de los granos de maíz, este mismo procedimiento se aplicó a 15 g de muestra previamente fracturada en una licuadora. Las lecturas se efectuaron por HPLC, evaluando la CS en términos relativos a partir de la diferencia entre la cantidad de AFB1 presente inicialmente en el medio de cultivo y la recuperada luego de centrifugar el contenido de las botellas a 3500 g durante 15 min [11, 13].

### **Análisis Estadístico**

La información se evaluó de acuerdo a un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial 3x4, considerando como factores AFB1 (4, 8 y 12 ppb) y SM (1:0, 1:75.000, 1:150.000 y 1:225.000). Toda la información fue analizada empleando el software Statistix [15], y en caso de diferencias estadísticas (P<0,05), éstas fueron evaluadas a través de la prueba de comparación de medias de Tukey.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**Producción *In vitro* de Gas**

Durante las primeras 9 h de incubación *in vitro* hubo una interacción (P<0,01) entre los efectos en evaluación (Cuadro 1). En este sentido, finalizadas las primeras 3 h esta interacción se observó (P<0,01) sólo en SM-225 (Figura 1a), donde el nivel de 8 ppb AFB1 presentó una producción acumulada de gas de 2,0 mL/g MS, valor que supera la media de los otros niveles en 2,3 veces. A las 6 h de evaluación (Figura 1b), se evidenciaron diferencias en la tendencia de la producción de gas entre SM-0 y SM-225 (P<0,01), donde en el primer caso un nivel de contaminación con AFB1 de 4 ppb mostró un comportamiento superior al resto (3,0 vs 1,6 mL/g MS), lo que varió para el tratamiento SM-225, donde 8 ppb superó a los restantes tratamientos (5,25 vs 2,45 mL/g MS). Finalmente, la Figura 1c muestra que a las 9 h de incubación se presentó un comportamiento similar a las 6 h, con registros de 6,07 vs 4,07 y 7,98 vs 5,47 mL/g MS, respectivamente.

Luego de 24 h de incubación hubo una reducción (P<0,05) en la producción acumulada *in vitro* de gas a medida que se incrementó la concentración de AFB1 en el medio de cultivo, con una disminución en 12 ppb respecto a 4 y 8 ppb de 8,4 y 2,2%,

respectivamente (Cuadro 1). Es de resaltar que a las 9 h de incubación, si bien la producción acumulada de gas presentó un comportamiento similar al descrito anteriormente, este efecto depresivo (P<0,01) de la AFB1 alcanzó 27,6 y 16,7%, respectivamente.

En cuanto al empleo del secuestrante, en los tratamientos donde se incorporó éste al medio de cultivo se observaron incrementos (P<0,05) a las 12 y 24 h en la producción de gas respecto a SM-0 de 2,81 y 13,91 mL/g MS, equivalentes a 26,8 y 25,5%, respectivamente. En todos los tratamientos, SM-75 evidenció la mayor producción de gas, sin mejoras debido a aumentos adicionales en la relación SM:AFB1. En este sentido, se ha señalado que la afinidad de los SM a base de glucomanos tiende a disminuir en la medida que la cantidad de secuestrante en el medio se incrementa [16].

La producción de gas en el ambiente ruminal es controlada por la actividad fermentativa de microorganismos (bacterias, protozoarios y hongos), y comprende la generación de ácidos grasos volátiles, dióxido de carbono y metano, entre otros. Los protozoarios son el grupo más activo en el proceso de destoxificación ruminal de micotoxinas, lo que pudiera estar comprometido en animales con alto contenido de cereales en su ración, en virtud que un pH ácido afecta negativamente a los

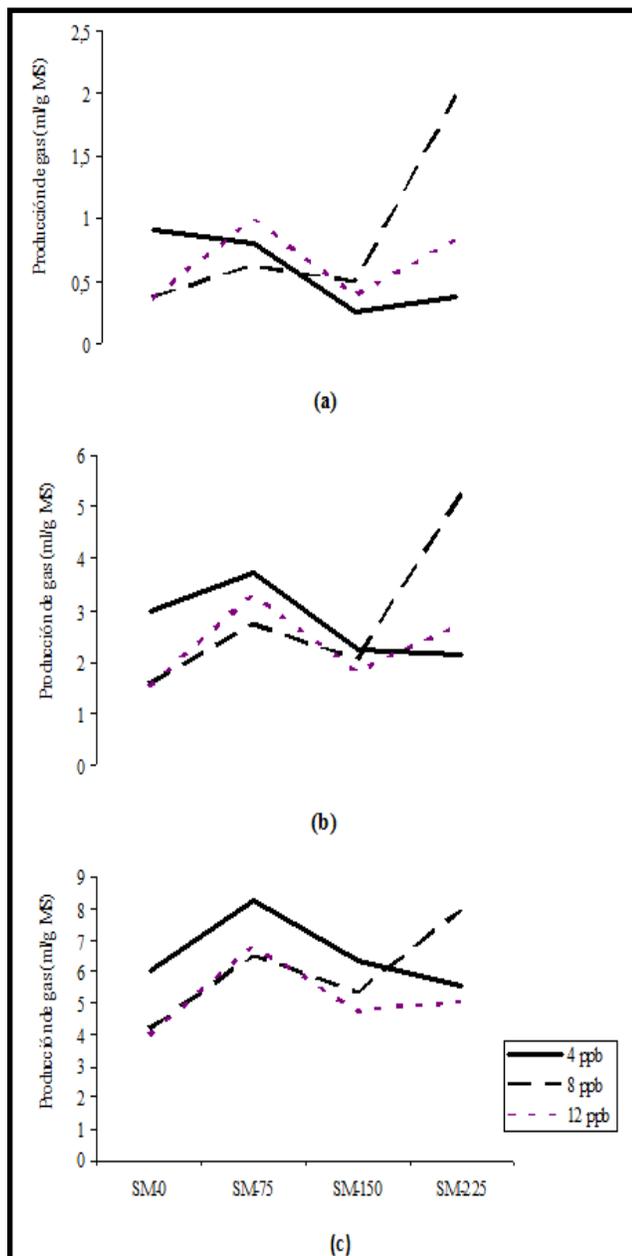
**Cuadro 1.** Producción (mL/g MS) acumulada *in vitro* de gas en harina de maíz contaminada con Aflatoxina B1 (AFB1) y tratada con un secuestrante de micotoxinas (SM)

Efecto	Nivel	Tiempos (h)				
		3	6	9	12	24
AFB1 (ppb)	4	0,58 <sup>b</sup>	2,79 <sup>ab</sup>	6,57 <sup>a</sup>	13,58 <sup>a</sup>	68,09 <sup>a</sup>
	8	0,87 <sup>a</sup>	2,91 <sup>a</sup>	6,01 <sup>a</sup>	12,63 <sup>ab</sup>	64,18 <sup>ab</sup>
	12	0,66 <sup>ab</sup>	2,35 <sup>b</sup>	5,15 <sup>b</sup>	11,58 <sup>b</sup>	62,82 <sup>b</sup>
SM	SM-0	0,55 <sup>bc</sup>	2,03 <sup>b</sup>	4,74 <sup>c</sup>	10,49 <sup>c</sup>	54,60 <sup>b</sup>
	SM-75	0,82 <sup>ab</sup>	3,27 <sup>a</sup>	7,21 <sup>a</sup>	14,92 <sup>a</sup>	70,24 <sup>a</sup>
	SM-150	0,38 <sup>c</sup>	2,05 <sup>b</sup>	5,49 <sup>bc</sup>	12,36 <sup>b</sup>	68,17 <sup>a</sup>
	SM-225	1,07 <sup>a</sup>	3,38 <sup>a</sup>	6,20 <sup>b</sup>	12,61 <sup>b</sup>	67,11 <sup>a</sup>
EEM		0,09	0,21	0,29	0,58	2,03
Efectos						
	AFB1	0,02	0,02	<0,01	<0,01	0,04
	SM	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
	AFB1*SM	<0,01	<0,01	<0,01	0,08	0,72

Relaciones AFB1:SM de 1:0 (SM-0), 1:75000 (SM-75), 1:150000 (SM-150) y 1:225000 (SM-225)

EEM: error estándar de la media

<sup>a,b,c</sup>Medias con letras distintas en una misma columna indican diferencias estadísticas significativas



**Figura 1.** Producción (mL/g MS) acumulada de gas luego de 3 (a), 6 (b) y 9 (c) horas de incubación *in vitro*

protozoarios del rumen [17]. Se señala que el 42% de las micotoxinas que ingresan al rumen pueden ser inactivadas; sin embargo, en el caso de AFB1, los procesos de detoxificación enzimática mediados por microorganismos ruminales sólo alcanzan el 10% del tóxico ingerido [3, 6, 17].

Los resultados del presente estudio coinciden con lo señalado en diversas investigaciones [3, 13, 18], las cuales evidencian que durante las primeras 9 h de incubación *in vitro* se produce el mayor impacto de la AFB1 sobre la fermentación

ruminal, indicando que transcurrido ese periodo, la degradación de las aflatoxinas por la microflora ruminal aumenta lentamente hasta las 12 h. Esta cinética de la inactivación biológica de las AFB1 en el rumen, si bien reduce su impacto negativo sobre el proceso de fermentación, genera compuestos que una vez absorbidos impactan negativamente sobre el metabolismo intermediario del rumiante, lo que justifica el uso de secuestrantes como alternativa para su inactivación a nivel ruminal [2].

La eficacia del uso de agentes secuestrantes de micotoxinas medida en este estudio a través de la producción ruminal *in vitro* de gas, depende de la capacidad del secuestrante de crear uniones estables con la toxina, lo que finalmente evitaría su absorción intestinal al generar un material de elevado peso molecular [16]. La estabilidad de estas uniones está asociada principalmente a la afinidad entre la toxina y la estructura física del secuestrante, esto último muy relacionado a la carga eléctrica total y su distribución, tamaño de poros y superficie específica, entre otros. En el caso de compuestos con base en pared celular de levaduras, la organización estructural de la fracción de  $\beta$ -D-glucano modula la fuerza de unión con las micotoxinas, mayormente definidas a través de puentes de hidrógeno y fuerzas intermoleculares de Van Der Waals [6].

### Degradación Aparente de la Materia Seca

La concentración de AFB1 afectó ( $P < 0,05$ ) negativamente la degradación de la materia seca de la harina de maíz (Cuadro 2). El mayor impacto ocurrió a las 12 h de incubación, donde se observó una reducción de la degradación en 39,8%, valor que a las 24 h alcanzó el 2,5%. El tratamiento SM-75 presentó los mayores registros de degradación de la materia seca, mientras en SM-150 y SM-225 se observó una reducción de este parámetro a las 12 y 24 h de incubación de 16,5 y 3,05%, respectivamente. La incorporación del secuestrante en SM-75, cuando comparado con SM-0, generó un incremento ( $P < 0,05$ ) en la degradación de la materia seca a las 12 y 24 h de 3,3 y 7,3%, respectivamente.

La presencia de AFB1 en el medio ruminal *in vivo* se ha asociado con una reducción en la degradación de la materia seca, y particularmente sus fracciones de celulosa y proteína, así como una disminución en la producción de ácidos grasos volátiles y amoníaco, todos indicadores de su efecto deletéreo sobre la

**Cuadro 2.** Degradación ruminal aparente *in vitro* de la materia seca de harina de maíz contaminada con Aflatoxina B1 (AFB1) y capacidad de secuestro (CS) de un secuestrante de micotoxinas (SM)

Efecto	Nivel	Degradación (%)		
		12 h	24 h	CS (%)
AFB1 (ppb)	4	26,14 <sup>a</sup>	46,63 <sup>ab</sup>	82,28
	8	21,52 <sup>b</sup>	49,57 <sup>a</sup>	91,21
	12	15,74 <sup>c</sup>	45,48 <sup>b</sup>	84,38
SM	SM-0	22,50 <sup>ab</sup>	47,09 <sup>ab</sup>	
	SM-75	23,24 <sup>a</sup>	50,52 <sup>a</sup>	85,83
	SM-150	19,56 <sup>b</sup>	45,67 <sup>b</sup>	88,50
	SM-225	19,24 <sup>b</sup>	45,63 <sup>b</sup>	83,54
EEM		1,18	1,52	2,48
Efectos				
	AFB1	<0,01	0,02	0,34
	SM	<0,01	0,02	0,73
	AFB1*SM	0,06	0,08	0,46

EEM: error estándar de la media

Relaciones AFB1:SM de 1:0 (SM-0), 1:75000 (SM-75), 1:150000 (SM-150) y 1:225000 (SM-225)

<sup>a,b,c</sup>Medias con letras distintas en una misma columna indican diferencias estadísticas significativas

actividad fermentativa de la microflora ruminal [3, 19]. El mayor impacto sobre la degradación de la materia seca del sustrato durante las primeras horas de incubación es debido a que la eficacia del proceso de inactivación de la AFB1 disminuye con el tiempo en función del perfil de las poblaciones microbiales presentes en el inóculo, asociado esto al animal donante y a la ración empleada en su mantenimiento [20].

El comportamiento en la degradación aparente *in vitro* de la materia seca se ajustó a los resultados de la producción de gas, lo que evidencia la utilidad de este indicador indirecto de la actividad fermentativa de los microorganismos ruminales.

### Capacidad Secuestrante

La capacidad secuestrante se ubicó en  $86,0 \pm 3,3\%$ , sin diferencias ( $P > 0,05$ ) debidas a al nivel de AFB1 o relación AFB1:SM (Cuadro 2). Estudios *in vitro* realizados con aves y ovejas señalan un secuestro de micotoxinas de  $90 \pm 8\%$  con el uso de glucomananos de paredes celulares a concentraciones de 50, 100 y 200 ppb de AFB1 [21, 22]. Sin embargo, en algunos estudios la capacidad secuestrante de los glucomananos ha sido menor, alcanzando registros de 58% [23].

La eficacia de los glucomananos como secuestrantes de micotoxinas se ha señalado altamente influenciada por el pH del medio y tipo de disolvente. Estos factores pueden condicionar la existencia de enlaces no covalentes (adsorción) en lugar de una verdadera unión entre micotoxina y SM [24]. En este sentido, un pH de 4,0 es óptimo para la actividad de los glucomananos en disolvente de fosfato 0,5 M, las cuales son condiciones que se pueden presentar en el tracto gastrointestinal de animales monogástricos, aunque no en el medio ruminal.

Es importante señalar que si bien se determinaron los niveles de AFB1 presentes en el medio, no se evaluó el posible impacto de algunas micotoxinas (Fumonisin, Zearalenona y Deoxinivalenol, entre otras) que pudieran estar presentes y afectar la degradación y producción de gas *in vitro* de la harina de maíz.

### CONCLUSIONES

La presencia de aflatoxina B1 redujo la producción ruminal *in vitro* de gas y la degradación aparente de la materia seca, efectos que pueden evitarse con la adición de un secuestrante de micotoxinas con base en glucomananos, demostrando que dicho aditivo

puede ser una alternativa biotecnológica para la destoxificación de alimentos empleados en la formulación de raciones para rumiantes.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su reconocimiento a Alltech Venezuela, S.C.S. por el apoyo financiero para la realización de esta investigación.

## REFERENCIAS

1. Fink-Gremmels J. Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: A review. *Food Addit Contam.* 2008; 25(2):172-80.
2. Anguiano-Ruvalcaba GL, Vargas-Cortina AV, Guzmán-De Peña D. Inactivación de aflatoxina  $\beta$ 1 y aflatoxicol por nixtamalización tradicional del maíz y su regeneración por acidificación de la masa. *Salud Públ Mex.* 2005; 47(5):369-75.
3. Abidin Z, Khatoon A. Ruminant microflora, mycotoxin inactivation by ruminal microflora and conditions favouring mycotoxicosis in ruminants: A review. *Inter J Vet Sci.* 2012; 1(1): 37-44.
4. Hussein HS, Brasel JM. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicol.* 2001; 167(2):101-34.
5. Jouany JP, Díaz DE. Effects of mycotoxins in ruminants. In: Díaz DE (ed). *Mycotoxin Blue Book*. The Nottingham University Press. UK; 2005. p. 295-321.
6. Kolossova A, Stroka J, Breidbach A, Kroeger K, Ambrosio M, Bouten K et al. Evaluation of the effect of mycotoxin binders in animal feed on the analytical performance of standardized methods for the determination of mycotoxins in feed. Institute for Reference Materials and Measurements. European Commission Joint Research Centre. Belgium; 2009. p. 48.
7. Dawson K. Los agentes secuestrantes de micotoxinas en las estrategias nutricionales para mejorar el rendimiento y la salud animal. En: Lyons P, Dawson K (eds). 9na Ronda Latinoamericana de Alltech. Kentucky, EUA; 1999. p. 33-43.
8. Manafi M, Murthy HNN, Narayana HD. Evaluation of different mycotoxin binders on broiler breeders induced with Aflatoxin B: effects on visceral organ weight and organ lesions parameters. *American-Eurasian J Agric & Environ Sci.* 2012; 12 (5): 574-78.
9. INIA. Unidad Agroclimatológica. Informe de Estación Climatológica. Instituto Nacional de Investigación Agropecuarias. Maracay. Venezuela; 2014. p. 15.
10. Mazzani C, Luzón O, Beomont P, Chavarri M. Micobiota asociada a granos de maíz en Venezuela y capacidad aflatoxigénica *in vitro* de los aislamientos de *Aspergillus flavus*. *Fitopatol Venez.* 2004; 17(1):19-23.
11. AOAC. Official Methods of Analysis. 19th Edition. Association of Official Analytical Chemists. Washington DC, EUA; 2012.
12. Theodorou M, Williams BA, Dhanoa MS, McAllan AB, France J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feed. *Anim Feed Sc Technol.* 1994; 48(3-4):185-97.
13. Moschini M, Gallo A, Piva G, Masoero F. The effects of rumen fluid on the *in vitro* aflatoxin binding capacity of different sequestering agents and *in vivo* release of the sequestered toxin. *Anim. Feed Sci Technol.* 2008; 147(4): 292-309.
14. Giraldo LA, Gutierrez LA, Sanchez J, Bolívar PA. Relación entre presión y volumen para el montaje de la técnica *in vitro* de producción de gases en Colombia. *Livest Res Rural Develop.* [Revista on-line] 2006 octubre. [acceso 23 de enero de 2014]; 18 (6). Disponible en: <http://www.lrrd.org/lrrd18/6/gira18075.htm>.
15. Statistix. Statistix for Windows. Users Manual, version 8.0. Analytical Software, Inc. Tallahassee, EUA; 2003. p. 80.
16. Dawson KA, Kudupoje M. Understanding the adsorption characteristics of yeast cell wall preparations associated with mycotoxin binding. In: Lyons TP, Jacques KA (eds.). *Science and Technology in the Feed Industry*. Nottingham University Press, Nottingham, UK; 2001. p. 169-81.
17. Díaz DE, Smith TK. Mycotoxin sequestering agents: practical tools for the neutralisation of mycotoxins. In: Díaz DE (ed). *The Mycotoxin Blue Book*, Nottingham University Press. UK; 2005. p. 323-39.
18. Upadhaya SD, Sung HG, Lee CH, Lee SY, Kim SW, Cho KJ et al. Comparative study on the aflatoxin B1 degradation ability of rumen fluid from Holstein steers and Korean native goats. *J Vet Sci.* 2009; 10(1): 29-34.
19. Mojtahedi M, Danesh M, Vakili SA, Hayati-Ashtiani M. Effect of Aflatoxin B1 on *in vitro* rumen microbial fermentation responses using batch culture. 2013; *Ann Rev Res Biol.* 3(4): 686-93.
20. Jianga YH, Yanga HJ, Lundc P. Effect of aflatoxin B1 on *in vitro* ruminal fermentation of rations high in alfalfa hay or ryegrass hay. *Anim Feed Sci Technol.* 2012; 175(1-2): 85-9.
21. Devegowda G, Raju MVLN, Swamy HVLN. Mycotoxins: Novel solutions for their counteraction.

- Feedstuffs. 1998; 70(50):12-3.
22. Westlake K, Mackie RI, Dutton M. *In vitro* metabolism of mycotoxins by bacterial, protozoal and ovine ruminal fluid preparations. Anim Feed Sci Technol. 1989; 25(1-2):169-78.
23. Díaz DE, Hagler WM, Hopkins BA, Eve JE, Whitlow LW. The potential for dietary sequestering agents to reduce the transmission of dietary aflatoxin to milk of dietary cows and to bind aflatoxin *in vitro*. J. Dairy Sci. 1999; 82(Suppl. 1): 838-52.
24. Yiannikouris G, Bertin L, Jouany JP. Reducing mycotoxin impact: the science behind Mycosorb®. In: Lyons TP, Jacques KA (eds). Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries. Proceedings of Alltech's 21st Annual Symposium. Kentucky, EUA. 2005; p. 265-76.