








# Bentonita como adsorbente de arsénico y plomo en el tracto digestivo de bovinos: estudio *in vitro*

Marco Fuentes de María Torres<sup>1</sup> ; Jacinto E Ramírez Bribiesca<sup>1</sup> ; Numa P Castro González<sup>2</sup> ; María M Crosby Galván<sup>1</sup> ; René Pinto Ruiz<sup>3</sup> ; David Hernández Sánchez<sup>1\*</sup> .

<sup>1</sup>Colegio de Postgraduados, Posgrado de Ganadería, Texcoco, México.

<sup>2</sup>Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Ingeniería Agrohidráulica, Tlatlauquitepec, México.

<sup>3</sup>Universidad Autónoma de Chiapas, Facultad de Ciencias Agrícolas, Villaflores, México.

\*Correspondencia: [sanchezd@colpos.mx](mailto:sanchezd@colpos.mx)

Recibido: Octubre 2023; Aceptado: Diciembre 2023; Publicado: Enero 2024.

## RESUMEN

**Objetivo.** Determinar la dosis recomendable de bentonita como quelante de arsénico (As) y plomo (Pb) en el medio ruminal, abomasal y duodenal mediante un sistema *in vitro*, considerando las variables de fermentación ruminal y el efecto adsorbente de As y Pb. **Materiales y métodos.** Se prepararon viales con 50 mL de medio anaerobio y 0.5 g de alfalfa como sustrato. Los medios se adicionaron con 1.01 y 1.95 ppm de As y Pb, respectivamente. Los tratamientos consistieron en el nivel de bentonita (B) adicionada al medio, B-0%, B-1.5%, B-3.0% y B-4.5%. Los medios se incubaron durante 24 h y se midió el pH, producción de AGV, N-NH<sub>3</sub>, degradabilidad *in vitro* de MS (DIVMS) y efecto quelante de la bentonita, simulando las condiciones del rumen, abomaso y duodeno. Se usó un diseño completamente al azar y contrastes ortogonales. **Resultados.** La bentonita no modificó el pH ni la proporción molar de AGV ( $p > 0.05$ ), pero la producción total de AGV presentó un efecto lineal negativo al aumentar el nivel del mineral. Asimismo, el N-NH<sub>3</sub> disminuyó ( $p < 0.05$ ) al adicionar bentonita. La DIVMS fue menor con B-3.0% y B-4.5% (52.36<sup>b</sup> y 49.74<sup>b</sup>%) en comparación con B-0% y B-1.5% (62.30<sup>a</sup>, 61.98<sup>a</sup>). La inclusión de B-1.5% y B-4.5% mejoró ( $p < 0.05$ ) la adsorción de As y Pb en el medio ruminal, abomasal y duodenal. **Conclusiones.** La proporción de bentonita recomendable como quelante de As y Pb es de 1.5%, ya que la dosis de 4.5% afectan la DIVMS y por consiguiente, la productividad animal.

**Palabras clave:** Quelante; arsénico; plomo; ganado lechero; arcillas (*Fuente: DeCS*).

## ABSTRACT

**Objective.** To determine the recommended dose of bentonite as a chelator of arsenic (As) and lead (Pb) in the rumen, abomasal and duodenal environment by means of an *in vitro* system, considering the variables of ruminal fermentation and the adsorbent effect of As and Pb. **Materials and methods.** Vials were prepared with 50 mL of anaerobic medium and 0.5 g of alfalfa as substrate. The culture media were added with 1.01 and 1.95 ppm of As and Pb, respectively. The treatments consisted of

### Como citar (Vancouver).

Fuentes de MTMT, Ramírez BJE, Castro GNP, Crosby GMM, Pinto RR, Hernández SD. Bentonita como adsorbente de arsénico y plomo en el tracto digestivo de bovinos: estudio *in vitro*. Rev MVZ Córdoba. 2024; 29(1):e3365. <https://doi.org/10.21897/rmvz.3365>



©El (los) autor (es) 2024. Este artículo se distribuye bajo los términos de la licencia internacional Creative Commons Attribution 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>), que permite a otros distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de su obra de modo no comercial, siempre y cuando den crédito y licencien sus nuevas creaciones bajo las mismas condiciones.

different levels of bentonite (B) added to the medium, B-0%, B-1.5%, B-3.0% and B-4.5%. The media were incubated for 24 h, and pH, volatile fatty acid (VFA) and N-NH<sub>3</sub> production, *in vitro* DM digestibility (IVDMD) and chelating effect of bentonite were measured, simulating rumen, abomasum and duodenum conditions. A completely randomised design and orthogonal contrasts were used. **Results.** Bentonite did not modify the pH ( $p>0.05$ ) and the molar proportion of VFAs, but the total VFA concentration presented a negative linear effect with increasing bentonite levels. Likewise, the N-NH<sub>3</sub> level decreased ( $p<0.05$ ) with increasing inclusion levels of bentonite. The IVDMD was reduced with B-3% and B-4.5% (52.36<sup>b</sup> and 49.74<sup>b</sup>%) in comparison to B-0% and B-1.5% (62.30<sup>a</sup> and 61.98<sup>a</sup>%). Treatments B-1.5% and B-4.5% improved ( $p<0.05$ ) As and Pb adsorption in the rumen, abomasal and duodenal environments. **Conclusions.** The recommended level of bentonite as chelator of As and Pb is 1.5%; doses of 4.5% affect IVDMD and, consequently, animal productivity.

**Keywords:** Chelating; arsenic; lead; dairy cattle; clays (*Source: DeCS*).

## INTRODUCCIÓN

Los metales pesados (MP) como el arsénico, cadmio, cromo y plomo representan un problema serio de contaminación en México, y no se trata con responsabilidad, a pesar de comprometer el medio ambiente, la salud y la seguridad alimentaria; sin embargo, su impacto y los sitios de riesgo aumentan de acuerdo con los reportes científicos (1,2) donde se resalta la urgencia de aplicar tecnologías para biorremediación (3).

Una causa recurrente de contaminación la propicia la industria cuando descargan sustancias con MP en ríos y arroyos. De modo que, cuando los suelos aledaños son irrigados con aguas contaminadas, afectan cultivos y forrajes usados en la alimentación animal (4,5). A causa de esto, se han determinado niveles de arsénico y plomo (0.06 y 0.073 mg/kg de As y Pb, respectivamente) por arriba de los niveles permisibles en leche, basándose en estándares internacionales (2).

Con este antecedente, se buscan tratamientos para remover los MP presentes en aguas residuales, suelo y forrajes (6). Una alternativa de bajo costo y disponible en México son las arcillas naturales, como la bentonita y clinoptilolita. Estas contienen minerales como aluminosilicatos capaces de adsorber MP, por lo que se usan para el tratamiento de aguas contaminadas (7). Además, son quelantes orales, efectivos para la desintoxicación de MP en humanos y animales sin efectos secundarios. Los resultados son efectos positivos en el tracto digestivo del ser humano y en el sistema inmunológico del hombre y animales (8).

Sin embargo, en la literatura revisada no se encontró información relacionada con la capacidad quelante de la bentonita en el tracto digestivo de ganado bovino. Conocer la capacidad de adsorción de MP de la bentonita en el tracto digestivo de bovinos permitirá brindar estrategias de alimentación con este mineral para disminuir la aparición de MP en leche o carne. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue establecer la dosis recomendable de bentonita en la dieta de ganado lechero considerando las variables de fermentación ruminal y su efecto quelante sobre arsénico y plomo en el medio ruminal, abomasal y duodenal en un sistema *in vitro*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Localización.** La prueba *in vitro* se realizó en el Laboratorio de Nutrición Animal, perteneciente al Programa de Ganadería, Colegio de Postgraduados, situado en Montecillo, Estado de México, México.

**Tratamientos.** Estos se describen en la tabla 1 y contienen bentonita (Bentonita cálcica con 80% de pureza; Nutre y Fortalece MX, México) en niveles crecientes y alícuotas de arsénico (As) y plomo (Pb). Las cantidades de As y Pb adicionadas al sustrato del medio fueron derivadas de estándares de 1000 ppm (Merck, Alemania) de cada metal pesado evaluado.

**Tabla 1.** Tratamientos experimentales.

Tratamiento/ bentonita (B), %	Evaluación <i>in vitro</i> en Rumen, abomaso y duodeno		
	Bentonita adicionada <sup>‡</sup> , mg	Arsénico <sup>§</sup> ppm	Plomo <sup>§</sup> ppm
		1.01	1.95
B-0	0	R1-R8	
B-1.5	7.5	R1-R8	
B-3	15.0	R1-R8	
B-4.5	22.5	R1-R8	

<sup>‡</sup> La bentonita adicionada (mg) fue con base al contenido de materia seca del medio de cultivo. <sup>§</sup> Concentración de arsénico (1.01 ppm) y plomo (1.95 ppm) adicionada al sustrato del medio con base a los niveles determinados en alfalfa en estudios previos (1,2). R1-R8 indica las repeticiones en cada tratamiento.

**Elaboración de los medios de cultivo.** Se utilizó un medio anaerobio elaborado con solución mineral I [ $K_2HPO_4$  (J.T. Baker<sup>®</sup>), 6 g en 1000 mL de agua destilada], 5 mL; solución de  $Na_2CO_3$  al 8% (J.T. Baker<sup>®</sup>), 5 mL; solución mineral II [6 g  $(NH_2)_2SO_4$  (J.T. Baker<sup>®</sup>) + 6 g  $KH_2PO_4$  (J.T. Baker<sup>®</sup>) + 2.45 g de  $MgSO_4$  (Meyer<sup>®</sup>) + 12 g  $NaCl$  (Meyer<sup>®</sup>) + 1.6 g  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  (Meyer<sup>®</sup>) en 1000 mL de agua destilada], 5 mL; líquido ruminal clarificado [líquido ruminal, filtrado a través de cuatro capas de gasa, centrifugado (Hettich<sup>®</sup>, EBA 21, Alemania) a 12,857 x g por 10 min, y esterilizado en autoclave (Lab-Med<sup>®</sup>, LMV40, México) a 15 psi, 121 °C y durante 15 min], 30 mL; resazurina al 0.1% (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>), 0.1 mL; solución cisteína-sulfido [15 mL  $NaOH$  (Meyer<sup>®</sup>) 2N + 2.5 g L-cisteína (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) + 2.5 g  $Na_2S \cdot 9H_2O$  (Meyer<sup>®</sup>) en 100 mL de agua destilada], 2 mL; agua destilada, 52.6 mL. El pH del medio se ajustó a  $7 \pm 0.02$  y se esterilizó (GeoLab, Chile) a 121°C, 15 psi durante 15 min (9).

En viales de cultivo (120 mL) estériles que contenían 0.5 g de heno alfalfa procesada en un molino (Thomas Scientific<sup>®</sup>, Thomas-Wiley, USA) con tamiz de 1 mm, se agregaron 50 mL del medio bajo flujo de  $CO_2$ . Posteriormente, se colocaron tapones de goma (20 mm Ø) y casquillos de aluminio, sellando con una engargoladora (Wheaton<sup>®</sup>, USA). Los medios se incubaron durante 24 h a 38 °C para comprobar esterilidad. Adicionalmente se elaboraron tres blancos por tratamiento a los cuales no se les adicionó arsénico y plomo.

**Inoculación e incubación de medios.** El inóculo fue líquido ruminal fresco, el cual se extrajo de un toro Holstein de 560 kg PV, fistulado en rumen. La alimentación del bovino se basó en heno de alfalfa (45%) y avena (55%) con un aporte total de 17 kg/d. El protocolo de manejo del bovino se realizó en apego al Reglamento de uso y cuidado de los animales destinados a la investigación del Colegio de Postgraduados 02.11.16. El líquido ruminal se filtró a través de tela manta de cielo, para separar la materia sólida y se trasladó al laboratorio en un termo. Previamente, 24 viales por tratamiento se colocaron en baño María a 39 °C para evitar un choque térmico del inóculo. La inoculación fue con 5 mL de líquido ruminal en cada vial, la aplicación fue con jeringas de 10 mL estériles desechables y agujas calibre 20G x 1¼" hipodérmicas (Terumo<sup>®</sup>).

Los medios inoculados se incubaron durante 24 h y este proceso sirvió para evaluar la adsorción de arsénico y plomo a nivel ruminal. Para esto, se utilizaron ocho viales por tratamiento para medir las variables de fermentación ruminal y el efecto quelante de arsénico y plomo con las proporciones de bentonita evaluadas. La adsorción de metales pesados en la porción de abomaso y duodeno se realizó con los viales remanentes que fueron incubados simulando el medio ruminal. Se utilizaron ocho repeticiones por tratamiento para simular las condiciones de pH del abomaso y un número de repeticiones similar por tratamiento para crear las condiciones de pH del duodeno, con las especificaciones que se describen más adelante.

### VARIABLES EVALUADAS

**pH.** Se midió con un potenciómetro (HANNA<sup>®</sup>, HI2211, Italia) en cada uno de los medios a 0 y 24 h de incubación.

**Ácidos grasos volátiles (AGV) y nitrógeno amoniacal (N-NH<sub>3</sub>).** Al concluir la incubación se recolectaron 4 mL de cultivo y se adicionó 1 mL de ácido metafosfórico (25%). De esta mezcla se tomaron 2 mL del sobrenadante y se procesó en una centrifuga (Hettich<sup>®</sup>, EBA 21, Alemania) a 20 000 x g durante 10 min. Del sobrenadante se extrajeron 1.5 mL y se depositaron en viales para medición de AGV y N-NH<sub>3</sub>. La determinación de AGV se realizó en un cromatógrafo de gases (Perkin Elmer<sup>®</sup>, Clarus 500, USA)(10). La

medición de  $N-NH_3$  se realizó de acuerdo al método descrito por McCullough (11) a 630 nm con el uso de un espectrofotómetro UV-visible (Varian®, Cary 1-E, USA).

**Degradación *in vitro* de la materia seca (DIVMS).** Se recuperó el residual con la bentonita de cada vial usando papel filtro Whatman® N° 541 a peso constante. Cada filtro con la muestra residual se llevó a peso constante secando a 70 °C durante 24 h. Posteriormente se pesó el papel filtro con la muestra en una balanza analítica (OHAUS®, Adventurer, USA). La DIVMS se calculó con la fórmula (12):

$$DIVMS(\%) = \frac{[\text{peso inicial} - (\text{peso final} - \text{peso de la bentonita})]}{\text{peso inicial}} \times 100$$

### Adsorción de metales pesados

**Efecto quelante de la bentonita en medio ruminal.** Al concluir la incubación, los medios de cultivo se transfirieron a tubos de polietileno de 50 mL, se centrifugaron a 452 x g por 5 min y se transfirió el sobrenadante a frascos de polietileno de 50 mL. Se agregó una alícuota de 0.5 mL de  $HNO_3$  al 65%, grado analítico (J.T. Baker®, USA) y las muestras se conservaron a 4°C para analizar el contenido de metales pesados.

**Efecto quelante de la bentonita en medio ácido.** Al término de la incubación, el contenido de cada vial se sometió a condiciones de acidez con HCl 1 N (J.T. Baker®, USA) a un pH de 4 (simulando las condiciones del abomaso); después, las muestras se incubaron a 22°C por 1 h. Las muestras se transfirieron a tubos de polietileno de 45 mL y se centrifugaron a 452 x g durante 5 min. Se recuperó el sobrante y se depositó en frascos de polietileno de 50 mL, se acidificó con 0.4 mL de  $HNO_3$  al 65%, grado analítico y se preservaron las muestras a 4°C hasta su análisis.

**Efecto quelante de la bentonita en medio alcalino.** Al finalizar la incubación se agregó 0.135 g de sales biliares (Oxgall Difco®, USA) a cada medio y se incubó por 3 h, para simular las condiciones del duodeno. Después se centrifugó durante 15 min a 452 x g. Finalmente las muestras se acidificaron con 0.4 mL de  $HNO_3$  al 65%, grado analítico y se guardaron a 4 °C hasta el análisis.

**Digestión de muestras.** El sobrenadante y el precipitado de las muestras preservadas fueron digeridos para analizar el contenido de metales arsénico y plomo posteriormente. Muestras de 45 mL del sobrenadante se depositaron en tubos de teflón de 55 mL y se agregaron 5 mL de  $HNO_3$  (69-70%). Asimismo, se pesaron muestras de 0.5 g del precipitado, se colocaron en tubos de teflón de 55 mL y se adicionaron 4 mL de  $H_2O_2$  al 30% p/v más 10 mL de  $HNO_3$ . Posteriormente, las muestras fueron procesadas en un sistema de digestión por microondas (CEM corporation Mathews®, CEM-MARS 5, USA). Este proceso se realizó con las siguientes condiciones en muestras del sobrenadante: 900-1050 W de potencia, con una rampa de 10 min, presión de 800 psi, temperatura de 170 °C y tiempo de espera de 10 min. La digestión de las muestras del precipitado se realizó con las mismas condiciones, solamente cambió el tiempo de rampa a 15 min, temperatura de 200 °C y 15:00 min de tiempo de espera.

**Análisis de arsénico (As) y plomo (Pb).** El contenido de estos elementos fue determinado por espectroscopia de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES, por sus siglas en inglés; Varian®, 725-ES, USA). Los reactivos empleados fueron grado analítico y se utilizó agua desionizada  $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$  para la elaboración de las soluciones. El estándar de calibración para arsénico y plomo se elaboró con una solución patrón ICP multielemento estándar XVI, compuesta de 21 elementos en  $HNO_3$  Suprapura 65%, con densidad de  $1.032 \text{ g/cm}^3$  y 20°C (Merck KGaA®, Alemania). Las longitudes de onda utilizadas fueron 189.042 y 220.353 nm para As y Pb, respectivamente (2).

**Diseño experimental.** Se valoraron cuatro tratamientos con ocho repeticiones por cada sección del tracto digestivo evaluada (rumen, abomaso y duodeno). Los datos se analizaron con un diseño completamente al azar. Se utilizó un Modelo Lineal General (GLM) en el análisis de datos. Para comprobar la normalidad de los datos se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk y cuando no existió una distribución normal, se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis. Además, se evaluaron contrastes de polinomios ortogonales para probar el efecto lineal y cuadrático de los niveles de bentonita, mediante el paquete estadístico SAS® Versión 9.4 (13).

## RESULTADOS

El pH de los cultivos donde se simularon las condiciones del rumen, abomaso y duodeno no presentó cambios ( $p > 0.05$ ) con los porcentajes de bentonita adicionados (Tabla 2).

**Tabla 2.** Efecto de la proporción de bentonita en el pH del medio de cultivo simulando tres porciones del tracto digestivo.

Tratamiento <sup>*/</sup> bentonita (B), %	Rumen	Abomaso	Duodeno
B-0	6.46	4.30	6.63
B-1.5	6.43	4.30	6.50
B-3	6.40	4.36	6.50
B-4.5	6.43	4.40	6.56
P-valor	0.48	0.34	0.09
DE	0.04	0.07	0.07
PS-W	0.27	0.15	0.93
L	0.81	0.62	0.36
Q	0.69	0.60	0.54

\*Todos los tratamientos incluyeron la contaminación intencional del sustrato con 1.01 y 1.95 ppm de As y Pb, respectivamente. DE: Desviación estándar, PS-W: Prueba de Shapiro-Wilk; L: Efecto lineal. Q: Efecto cuadrático.

La adición de niveles crecientes de bentonita no afectó ( $p > 0.05$ ) la proporción molar de AGV (Tabla 3). Sin embargo, la concentración total de AGV disminuyó de forma lineal ( $p < 0.05$ ) al aumentar el porcentaje del mineral. Asimismo,

el N-NH<sub>3</sub> disminuyó ( $p < 0.05$ ) con la adición de bentonita, independientemente del nivel adicionado, aunque hubo efecto cuadrático (Tabla 3). El aporte de B-3 y B-4.5% redujo ( $p < 0.05$ ) la DIVMS, pero con 1.5% de la arcilla, la DIVMS fue similar ( $p > 0.05$ ) al grupo testigo (Tabla 3).

La adición de B-1.5 y B-3% propició el mejor ( $p < 0.05$ ) efecto quelante sobre arsénico en el medio ruminal, pero con B-4.5% resultó similar al tratamiento testigo (B-0%), presentándose efecto cuadrático (Tabla 4). En el medio abomasal, el aporte de 1.5 a 4.5% de bentonita redujo ( $p < 0.05$ ) casi en su totalidad el arsénico presente, sin diferencia entre los medios suplementados. En el medio duodenal, la adición de B-1.5 y B-4.5% mostraron el mayor ( $p < 0.05$ ) efecto quelante al registrarse la concentración más baja de As en el sobrenadante, aunque estos tratamientos fueron diferentes ( $p < 0.05$ ). Congruente con lo anterior, los niveles de B-1.5 y B-4.5% mostraron el mejor efecto adsorbente de arsénico en el precipitado del medio duodenal.

Los niveles de bentonita evaluados redujeron ( $p < 0.05$ ) la concentración de plomo en el sobrenadante del medio ruminal, abomasal y duodenal, pero B-1.5% tuvo el mejor efecto quelante en el medio ruminal y B-4.5% en el medio abomasal y duodenal (Tabla 4). Los valores de Pb determinados en el precipitado constataron mayor ( $p < 0.05$ ) efecto quelante con B-4.5% en duodeno.

**Tabla 3.** Concentración de metabolitos y digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIMS) en el medio ruminal con diferentes proporciones de bentonita.

Tratamiento <sup>*/</sup> bentonita (B), %	AGV, % molar			AGV total, mmol/L	N-NH <sub>3</sub> , mg/dL	DIVMS, %
	A	P	B			
B-0	68.26 <sup>a</sup>	19.53 <sup>a</sup>	9.27 <sup>a</sup>	54.43 <sup>a</sup>	48.33 <sup>a</sup>	62.30 <sup>a</sup>
B-1.5	67.79 <sup>a</sup>	19.72 <sup>a</sup>	9.46 <sup>a</sup>	46.09 <sup>b</sup>	18.14 <sup>b</sup>	61.98 <sup>a</sup>
B-3	66.24 <sup>a</sup>	20.22 <sup>a</sup>	10.0 <sup>a</sup>	39.76 <sup>c</sup>	27.43 <sup>b</sup>	52.36 <sup>b</sup>
B-4.5	67.38 <sup>a</sup>	19.51 <sup>a</sup>	9.55 <sup>a</sup>	35.71 <sup>d</sup>	26.60 <sup>b</sup>	49.74 <sup>b</sup>
P-valor	0.4	0.59	0.49	2.2 <sup>e-6</sup>	0.003	4.5 <sup>e-7</sup>
DE	1.44	0.66	0.62	7.55	0.006	6.02
PS-W	0.83	0.31	0.46	0.50	0.02	0.95
L	0.46	0.57	0.49	2 <sup>e-6</sup>	0.006	4.8 <sup>e-4</sup>
Q	0.38	0.48	0.40	2 <sup>e-6</sup>	0.01	2.5 <sup>e-4</sup>

\*Todos los tratamientos incluyeron la contaminación intencional del sustrato con 1.01 y 1.95 ppm de As y Pb, respectivamente. A: acético, P: propiónico y B: butírico. AGV: ácidos grasos volátiles. N-NH<sub>3</sub>: nitrógeno amoniacal. DE: Desviación estándar, PS-W: Prueba de Shapiro-Wilk; <sup>a,b,c,d</sup> Letras distintas indican diferencias. L: Efecto lineal. Q: Efecto cuadrático.

**Tabla 4.** Proporciones crecientes de bentonita y su efecto quelante determinado en el sobrenadante y precipitado de medios de cultivo adicionados con arsénico y plomo.

Tratamiento <sup>Y</sup> / Nivel de bentonita (B), %	Sobrenadante Medio				Precipitado Medio			
	Ruminal		Abomasal		Duodenal		Duodenal	
	As	Pb	As	Pb	As	Pb	As	Pb
	----- mg/L -----				--- mg/kg ---			
B-0	0.018 <sup>a</sup>	0.034 <sup>a</sup>	0.016 <sup>a</sup>	0.033 <sup>a</sup>	0.017 <sup>a</sup>	0.032 <sup>a</sup>	0.005 <sup>c</sup>	0.0 <sup>c</sup>
B-1.5	0.0 <sup>b</sup>	0.005 <sup>d</sup>	0.0 <sup>b</sup>	0.021 <sup>b</sup>	0.005 <sup>c</sup>	0.011 <sup>c</sup>	0.013 <sup>a</sup>	0.031 <sup>b</sup>
B-3	0.0 <sup>b</sup>	0.025 <sup>b</sup>	0.0 <sup>b</sup>	0.014 <sup>c</sup>	0.011 <sup>b</sup>	0.027 <sup>b</sup>	0.010 <sup>b</sup>	0.030 <sup>b</sup>
B-4.5	0.017 <sup>a</sup>	0.015 <sup>c</sup>	0.0 <sup>b</sup>	0.009 <sup>d</sup>	0.0 <sup>d</sup>	0.005 <sup>d</sup>	0.013 <sup>a</sup>	0.034 <sup>a</sup>
P-valor	1.0 <sup>e-7</sup>	0.006	1.2 <sup>e-7</sup>	3.8 <sup>e-4</sup>	1.0 <sup>e-5</sup>	1.0 <sup>e-5</sup>	2.9 <sup>e-6</sup>	4.5 <sup>e-5</sup>
DE	0.02	0.02	0.04	0.04	0.03	0.04	0.003	0.02
PS-W	2.5 <sup>e-7</sup>	0.01	1.02 <sup>e-4</sup>	0.25	0.37	0.18	2.5 <sup>e-03</sup>	0.22
PK-W	0.02	0.02	0.01	0.02	0.01	0.01	0.02	0.02
L	3.1 <sup>e-8</sup>	0.03	4.4 <sup>e-8</sup>	0.03	4.3 <sup>e-5</sup>	1.5 <sup>e-5</sup>	8.7 <sup>e-5</sup>	1.8 <sup>e-5</sup>
Q	3.2 <sup>e-8</sup>	0.04	6.4 <sup>e-8</sup>	0.02	5.7 <sup>e-5</sup>	1.6 <sup>e-5</sup>	1.9 <sup>e-4</sup>	1.1 <sup>e-5</sup>

<sup>Y</sup>Todos los tratamientos incluyeron la contaminación intencional del sustrato con 1.01 y 1.95 ppm de As y Pb, respectivamente. DE: Desviación estándar, PS-W: Prueba de Shapiro-Wilk; <sup>a,b,c,d</sup>, Letras distintas indican diferencias. PK-W: Prueba de Kruskal-Wallis. L: Efecto lineal. Q: Efecto cuadrático.

## DISCUSIÓN

El presente estudio demostró que niveles de 1.5 a 4.5% de bentonita no afecta el pH ruminal en condiciones *in vitro*. El resultado es congruente con otros estudios *in vivo* donde se suplementó 1% de bentonita (pH de 6.23) en cabras en crecimiento (14) o 2% (pH de 6.43) en toros de engorda (15), sin reportar cambios de pH ruminal respecto al testigo. En contraste, el pH ruminal aumentó cuando se adicionó 0.4% (nanopartículas, pH de 6.8) o 2% (forma natural, pH de 6.7) de bentonita en la dieta de cabras lactantes (16), o con 2 (pH de 6.36) y 6% (pH de 7.1) de zeolita en la dieta de ovinos en crecimiento (17,18). Los autores atribuyeron en parte, la mejor respuesta de estos minerales sobre el pH cuando las dietas incluyeron más de 40% de forraje.

La presencia de aluminosilicatos en la estructura de las zeolitas o bentonitas confiere capacidad de intercambio catiónico y actúa como alcalinizante en el medio, presentándose cambios del pH ruminal, aun con dietas altas en grano (19). No obstante, el nivel de estos minerales en la dieta de rumiantes puede incrementar la degradación del almidón, generar mayor producción de lactato y dejar sin efecto la actividad búfer (20). En cambio, la fermentación ruminal de la alfalfa se pudo relacionar con AGV de menor impacto sobre el pH (21) y podría explicar en parte la ausencia de cambios en el pH del presente estudio. Además, el medio de cultivo empleado

incluyó soluciones búfer las cuales normalmente mantienen el pH sin cambios significativos, en un intervalo de 6.2 a 7.0 (9), dentro del cual se encuentran los valores obtenidos.

El pH del medio abomasal y duodenal fue manipulado, simulando las condiciones prevalecientes en esas porciones del tubo digestivo, por ello tampoco se registraron cambios en el pH con los tratamientos evaluados. La proporción individual de AGV se reportó sin cambios cuando se suplementó zeolita o bentonita al 1% en la dieta de ganado lechero (22), como ocurrió en el presente estudio. Asimismo, el aporte de 2, 4 y 6% de zeolita en la dieta de corderos indicó valores individuales de AGV sin diferencia entre tratamientos (17). Los valores de AGV obtenidos en esta investigación son congruentes con los observados en el medio ruminal, aun cuando no se suplementa zeolita, con proporciones de acético, propiónico y butírico de 67, 18.9, y 12.4% (9).

La reducción en la concentración total de AGV del presente estudio fue similar a cuando se suplementó 1% de bentonita en la dieta de bovinos lecheros (23). Además, otros estudios reportan concentraciones de AGV de 70 a 130 mmol (24), superiores a las observadas en este estudio, lo que indica una disminución en la producción total de AGV a medida que aumentó el nivel de bentonita. Está documentado que niveles superiores a 2% de bentonita en la dieta pueden disminuir la actividad de las bacterias

ruminales y con ello, la tasa de fermentación (25). Esto puede explicar la reducción en la digestibilidad de MS y menor producción total de AGV observada con el aporte de B-3% y B-4.5%.

Los niveles de bentonita evaluados redujeron la concentración de amonio de manera similar. Otros estudios confirman la misma tendencia al ofrecer 2 y 4% de clinoptilolita (20) o 2% de bentonita (26) en la dieta de ovinos o novillos. La bentonita tiene la capacidad de modular la concentración de amonio en el medio (23,20), al secuestrar este metabolito y liberarlo gradualmente, favoreciendo su estabilidad y mejor aprovechamiento por las bacterias ruminales (27). La capacidad de la bentonita para retener amonio se asocia con su carga negativa en la superficie, su porosidad, estructura y la capacidad de adsorción (28,29). Además, estas arcillas son adsorbentes selectivos y tienen alta afinidad por el ion amonio (30).

De esta manera, la suplementación con clinoptilolita (1 a 2%) o bentonita (2%) permite mantener valores entre 5 a 25 mg de N-NH<sub>3</sub>/dL, considerados normales en el medio ruminal (15,18). Congruente con lo anterior, los niveles de N-NH<sub>3</sub> registrados al suplementar bentonita estuvieron dentro de este intervalo.

La alfalfa es un forraje de excelente calidad, pero la adición de B-3% y B-4.5% afectó la degradabilidad de la MS, indicando el efecto negativo de esta arcilla. Una respuesta similar se observó al adicionar 2 a 6% de zeolita (77.94, 66.36, 73.50, 73.83% de DIVMS, testigo vs 2, 4 y 6% de zeolita) en un sistema *in vitro* (17) o cuando se suplementó 3% de bentonita en la dieta de bovinos (47.90 vs 31.29% de digestibilidad, testigo vs 3% de bentonita, respectivamente) (28). La bentonita es una arcilla indigestible y su uso en la dieta por arriba de 3% puede afectar la digestibilidad (31,32), como ocurrió con B-3% y B-4.5% en este estudio. Este resultado se explica por una mayor tasa de pasaje de la digesta propiciada por la bentonita al atraer y unirse a partículas de fibra e incluso con los microorganismos del rumen, creando una asociación física entre estos componentes, alterando la velocidad de paso y la digestibilidad. Además, la alta afinidad de la zeolita por el agua y cationes osmóticamente activos facilita la interacción entre la fibra y los microorganismos, debido a esto también se podría alterar la tasa de flujo del líquido a través del rumen al incluir más de 2% de zeolita en la dieta, causando una reducción en la digestibilidad (33), como ocurrió

en el presente estudio. Adicionalmente, el aporte de estas arcillas se relaciona con la formación de polímeros muy estables entre el aluminio y sílice, incrementando la presencia de Al en el medio ruminal, con un posible efecto negativo en la actividad y supervivencia microbiana (34), lo cual puede explicar también la disminución de la DIVMS.

Las proporciones de bentonita evaluadas *in vitro* en la porción del rumen, abomaso y duodeno redujeron la concentración de arsénico y plomo en diferente magnitud, sin observarse efecto quelante sobre arsénico en rumen con B-4.5%. En este sentido, B-1.5% y B-3% propiciaron el mejor efecto quelante de arsénico y B-1.5% el de plomo en el medio ruminal, sugiriendo que un nivel de 1.5% de bentonita es recomendable para secuestrar estos metales pesados en el rumen, sin afectar la DIVMS como ocurrió con B-3%. Congruente con lo anterior, Dzagurov et al (34) observaron mejor efecto quelante al incorporar 1% de bentonita en la dieta de ganado lechero.

Mejía-Zamudio et al (35) señalaron que la capacidad de adsorción de la bentonita sobre As depende de su naturaleza y su mayor efectividad ocurre cuando está enriquecida con iones de magnesio o cloruro de sodio. Este enriquecimiento permite adsorber más del 90% de As del medio, donde la concentración inicial del metal y la presencia de un medio acuoso son las variables más significativas. La bentonita utilizada en este estudio no fue enriquecida, pero el aporte de B-1.5% y B-3% en el medio ruminal y abomasal mostraron alta eficiencia de adsorción. A pesar de no observarse cambios de pH entre los tratamientos, en las porciones del tracto digestivo estudiadas, el medio abomasal propició las condiciones óptimas de pH para adsorber As, explicando la alta capacidad de adsorción con los tres niveles de bentonita.

Carbonel-Ramos (36) menciona que la mejor adsorción de Pb ocurre a pH de 2 y 4 con la bentonita y zeolitas naturales. Congruente con lo anterior, los niveles suplementados de bentonita mostraron un comportamiento lineal positivo de adsorción en el medio abomasal, indicando mayor quelación a medida que se incrementó la proporción de la arcilla, favorecida por un medio ácido. En contraste, Hussain y Ali (37) determinaron la mayor capacidad de adsorción de la bentonita sobre el plomo a pH 5, en un medio acuoso, indicando que el potencial quelante está en función la dosis del quelante y la temperatura. En este sentido, la capacidad

quelante de la bentonita pudo ocurrir en otros ambientes no tan ácidos, pero con condiciones propicias para secuestrar metales pesados como ocurrió en la porción del rumen y duodeno.

En la literatura no se reporta absorción ruminal de As y Pb (38,39), pero si ocurre a nivel intestinal, ya que se observan lesiones graves en esta porción del tubo digestivo cuando el animal consume alimentos contaminados con metales pesados (40). Lo anterior sugiere dar mayor importancia al efecto quelante de la bentonita a nivel intestinal y con ello sugerir el nivel de inclusión en la dieta, pues es aquí donde se busca reducir la absorción de metales pesados para evitar que aparezcan posteriormente en carne o leche.

El mejor efecto quelante recomendable sobre arsénico y plomo se logra con 1.5% de bentonita en las tres secciones de tracto digestivo evaluadas, ya que dosis de 3 y 4.5% no son viables por tener efecto negativo en la DIVMS y por consiguiente en la productividad animal. Es importante considerar que por tratarse de

un estudio *in vitro*, pueden existir factores que reduzcan la efectividad de adsorción de la bentonita en estudios *in vivo* como los componentes de la dieta y la presencia de iones metálicos en el medio ruminal. Por ello, más investigación es necesaria para elucidar el efecto de la bentonita sobre la microbiota y cinética ruminal.

### Conflictos de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de interés.

### Agradecimientos

A la LGAC: Ganadería eficiente, bienestar sustentable y cambio climático, del Colegio de Postgraduados.

### Financiación

El financiamiento de este proyecto fue con recursos Institucionales del Colegio de Postgraduados dirigidos a fortalecer la investigación.

## REFERENCIAS

1. Castro-González NP, Calderón-Sánchez F, Moreno-Rojas R, Moreno-Ortega A, Tamaríz-Flores JV. Health risks in rural populations due to heavy metals found in agricultural soils irrigated with wastewater in the Alto Balsas sub-basin in Tlaxcala and Puebla, Mexico. *Int J Environ Health Res.* 2017; 12:476-486. <http://dx.doi.org/10.1080/09603123.2017.1386767>
2. Castro-González NP, Calderón-Sánchez F, Castro-de Jesús J, Moreno-Rojas R, Tamaríz-Flores JV, Pérez-Sato M, Soní-Guillermo E. Heavy metals in cow's milk and cheese produced in areas irrigated with waste water in Puebla, Mexico. *Food Addit Contam: Part B.* 2018; 11:33-36. <https://doi.org/10.1080/19393210.2017.1397060>
3. Covarrubias SA, Peña-Cabriales JJ. Environmental contamination by heavy metals in Mexico: problems and phytoremediation strategies. *Rev Int Contambien.* 2017; 33:7-21. <https://doi.org/10.20937/RICA.2017.33.esp01.01>
4. Rodríguez Fuentes H, Sánchez-Alejo E, Rodríguez-Sánchez M, Vidales-Contreras JA, Acuña-Askar K, Martínez-Turanzas G, Rodríguez-Ortiz JC. Heavy metals in raw bovine milk. *Rev de la Fac Sal Púb Nutri.* 2005; 6(4):1-12. <https://respyn.uanl.mx/index.php/respyn/article/view/155>
5. Eróstegui RCP. Contaminación por metales pesados. *Rev Cient Cienc Méd.* 2009; 12:45-46.
6. Tejeda-Tovar C, Villabona-Ortiz Á, Garcés-Jaraba L. Adsorción de metales pesados en aguas residuales usando materiales de origen biológico. *Tecno Lógic.* 2015; 18(34):109-123. <https://doi.org/10.22430/22565337.209>
7. Zanin E, Scapinello J, De Olivera M, Lazarotto-Rambo C, Franscescon F, Freitas L, et al. Adsorption of heavy metals from wastewater graphic industry using clinoptilolite zeolite as adsorbent. *Process Saf Environ Prot.* 2017; 105:194-200. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2016.11.008>



8. Kraljevic-Pavelic S, Simovic-Medica J, Gumbarevic D, Filosevic A, Przulj N, Pavelic K. Critical review on zeolite clinoptilolite safety and medical applications *in vivo*. *Front Pharmacol*. 2018; 9:1-16. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01350>
9. Sánchez-Santillán P, Herrera-Pérez J, Torres-Salado N, Almaraz-Buendía I, Reyes-Vázquez I, Rojas AR, Gómez-Trinidad M, Contreras-Ramírez EO, Maldonado-Peralta MA, Magadán-Olmedo F. Chemical composition, and *in vitro* fermentation of ripe mango silage with molasses. *Agroforest Syst*. 2020; 94:1511-1519. <https://doi.org/10.1007/s10457-019-00442-z>
10. Cobos-Peralta MA, Curzaynz-Leyva K, Rivas-Martínez R, Santillán-Gómez MI, Bárcena-Gama JR. *In vitro* effect of diets for growing lambs supplemented with dried distillers grains on rumen fermentation and gas emissions. *Agrociencia*. 2018.52(2): 203–215. <https://agrociencia-colpos.org/index.php/agrociencia/article/view/1663>
11. McCullough H. The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. *Clin Chim Acta*. 1967; 17(2):297–304. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(67\)90133-7](https://doi.org/10.1016/0009-8981(67)90133-7)
12. Rojas-García AR, Hernández-Ayona A, Sánchez-Santillán P, Alaniz-Gutierrez L, Torres-Salado N, Herrera-Pérez J, Escobar-España JC. Cinética de fermentación y degradación *in vitro* de tres leguminosas rastreras nativas del municipio de Cuajinicuilapa, Guerrero. *Rev Investig Vet Perú*. 2018; 29(4):1229-1236. <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v29i4.14340>
13. SAS Institute, SAS User's Guide: Statistics Version 9.2. Statistical Analysis System Institute Cary, North Carolina, 2010; USA.
14. Kordi M, Naserian AA, Samadia, F. The influence of adding polyethylene glycol and activated sodium bentonite on the performance, blood parameters, and muscle mineral content of saanen goats fed pistachio byproducts. *Ir J Apl Anim Sci*. 2022; 12(2):303-313. [https://ijas.rasht.iau.ir/article\\_691846\\_938568bb67fa9267278e780e3a010be8.pdf](https://ijas.rasht.iau.ir/article_691846_938568bb67fa9267278e780e3a010be8.pdf)
15. Mohsen K, Sirjani MK, Tahmasbi AM, Khoram Abadi EI, Torbaghan AE. Effects of sodium and calcium bentonite on growth performance and rumen ammonia in Holstein bulls. *Lives Res Rural Develop* 2017; 29(8):1-10. <https://lrrd.cipav.org.co/lrrd29/8/phd29144.html>
16. El-Nile EA, Elazab AM, Soltan AY, Elkomy EA, El-Zaiat MH, Sallam MAS, El-Azrak EK. Nano and natural zeolite feed supplements for dairy goats: Feed intake, ruminal fermentation, blood metabolites, and milk yield and fatty acids profile. *Anim Feed Sci Technol*. 2023; 295:115522. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2022.115522>
17. Roque-Jiménez JA, Pinos-Rodríguez JM, Rojo-Rubio R, Mendoza GD, Vázquez A, Cayetano de Jesús JA, Lee-Ranel HA. Effect of natural zeolite on live weight changes, urinal fermentation and nitrogen metabolism of ewe lambs. *S Afr J Anim*. 2018; 48(6):1148-1155. <http://dx.doi.org/10.4314/sajas.v48i6.19>
18. Ghoneem WM, El-Tanany RR, Mahmoud AE. Effect of natural zeolite as a rumen buffer on growth performance and nitrogen utilization of barki lambs. *Pakistan J. Zool* 2022; 54(3):1199-1207. <https://dx.doi.org/10.17582/journal.pjz/20191207121206>
19. Sulzberger SA, Kalebich CC, Melnichenco S, Cardoso FC. Effects of clay after a grain challenge on milk composition and on ruminal, blood and fecal pH in Holstein cows. *J Dairy Sci*. 2016; 99(10): 8028-8040. <https://dx.doi.org/10.3168/jds.2016-11030>
20. Urías-Estrada JD, López-Soto MA, Barreras A, Aguilar-Hernández JA, González-Vizcarra VM, Estrada-Angulo A, Zinn RA, Mendoza GD, Plascencia A. Influence of zeolite (clinoptilolite) supplementation on characteristics of digestion and ruminal fermentation of steers fed a steam-flaked corn-based finishing diet. *Anim Prod Sci*. 2018; 58(7):1239-1245. <http://dx.doi.org/10.1071/AN16128>
21. Sutton JD, Dhanoa MS, Morant SV, France J, Napper DJ, Schuller E. Rates of production of acetate, propionate, and butyrate in the rumen of lactating dairy cows given normal and low-roughage diets. *J Dairy Sci*. 2003; 86(11):3620-3633. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73968-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73968-X)
22. Goodarzi M, Nanekarani S. The effect of calcic and potassic clinoptilolite on ruminal parameters in Lori breed sheep. *ICAAA* 2012; 23(4):140-145. <https://dx.doi.org/10.1016/j.apcbee.2012.11.024>

23. Amanzougarene Z, Fondevila M. Rumen Fermentation of feed mixtures supplemented with clay minerals in a semicontinuous *in vitro* system. *Animals*. 2022; 12:345-356. <https://doi.org/10.3390/ani12030345>
24. Elitok B, Guvlu S. Investigation on effects of orally given sepiolite on ruminal protozoa in cattle. *J Harmoniz Res Med and Hlth Sci*. 2017; 4(4):163-173. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73968-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73968-X)
25. Kazemi M, Eskandary T, Tahmsabi AM, Valizadeh R, Naserian AA. Effects of phosalone consumption feeding with or without sodium bentonite on performance, blood metabolites and its transition to milk of Iranian Baluchi sheep. *J Animal Sci Technol*. 2017; 59(10):1-11. <https://doi.org/10.1186/s40781-017-0135-7>
26. Tánori-Lozano A, Montalvo-Corral M, Pinelli-Saavedra A, Valenzuela-Melendres M, Zamorano-García L, Dávila-Ramírez JL, González-Ríos H. Inclusión dietaria de clinoptilolita como aditivo en la producción de rumiantes. *Revista Biotecnia*. 2022; 25(1):51-60. <http://dx.doi.org/10.18633/biotecnia.v25i1.1759>
27. Gutiérrez O, Galindo J, Oramas A, Cairo J. Effect of bentonite and zeolite supplementation on the protection of rumen protein. *In vivo studies*. *Rev Cubana Cienc Agric*. 2008; 42(3):259-261.
28. Smelcerovic M. Adsorption of ammonia by base activated bentonite clay kinetic and equilibrium studies. *Knowl Int J*. 2018; 28(4):1251-1257. <https://doi.org/10.35120/kij28041251M>
29. Sharma P, Sutara PP, Xiaob H, Zhang Q. The untapped potential of zeolites in techno-augmentation of the biomaterials and food industrial processing operations: a review. *J Future Foods*. 2023. 3-2: 127-141. <https://doi.org/10.1016/j.jfutfo.2022.12.004>
30. Días J, Huelvan C, Dinis MT, Metailler R. Influence of dietary bulk agents (silica, cellulose and natural zeolite) on protein digestibility, growth, feed intake and feed transit time in European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquat Living Resour* 1998; 11(4):219-226. [https://doi.org/10.1016/S0990-7440\(98\)89004-9](https://doi.org/10.1016/S0990-7440(98)89004-9)
31. Ghaemnia L, Bojarpour M, Mirzadeh K, Chaji M, Eslami M. Effects of different levels of zeolite on digestibility and some blood parameters in arabic lambs. *J Anim Vety Adv*. 2010; 9(4):779-781. <https://doi.org/10.3923/javaa.2010.779.781>
32. Johnson MA, Sweeny TF, Muller LD. Effects of feeding synthetic zeolite A and sodium bicarbonate on milk production nutrient digestion, and rate of digesta passage in dairy cows. *J Dairy Sci*. 1988; 71:946-953. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(88\)79640-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(88)79640-X)
33. Jugdaohsingh R, Anderson SH, Tucker KL, Elliott H, Kiel DP, Thompson RP, Powell JJ. Dietary silicon intake and absorption. *Ame J Clin Nutr*. 2002; 75(5):887-893. <https://doi.org/10.1093/ajcn/75.5.887>
34. Dzagurov B, Eremenko VI, Karlov AG, Payukhina MA, Suvorova VN. The effect of bentonite feeding for young cattle on the exchange of nitrogen, mineral elements and the digestibility of diet nutrients. *E3S Web Conf*. 2021; 254:1-6. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202125408028>
35. Mejía-Zamudio F, Valenzuela-García J, Aguayo-Salinas S, Meza-Figueroa D. Arsenic adsorption of natural zeolite pretreated with magnesium oxides. *Rev Int Contam Ambie*. 2009; 25(4):217-227.
36. Carbonel-Ramos, D. Adsorption of cadmium, copper and lead with natural and modified bentonite, kaolin and natural zeolites: a review of process parameters, isotherms and kinetics. *Ingeniería*. 2018; 23(3):252-273. <https://doi.org/10.14483/23448393.13418>
37. Hussain ST, Ali SA K. Removal of heavy metal by ion exchange using bentonite clay. *J Ecol Eng*. 2021; 22(1):104-111. <https://doi.org/10.12911/22998993/128865>
38. Lazarus M, Orct T, Blanusa M, Vickovic I, Sostanic B. Toxic and essential metal concentrations in four tissues of red deer (*Cervus elaphus*) from Baranja, Croatia. *Food Addit Contam Part A*. 2008; 25(3):270-283. <https://doi.org/10.1080/02652030701364923>
39. Mandal P. An insight of environmental contamination of arsenic on animal health. *Emerg Contam*. 2017; 3:17-22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.emcon.2017.01.004>
40. Lashkari S, Haibian M, Jensen SK. A Review on the role of chromium supplementation in ruminant nutrition—effects on productive performance, blood metabolites, antioxidant status, and immunocompetence. *Biol Trace Elem Res*. 2018; 186(2):305-321. <https://doi.org/10.1007/s12011-018-1310-5>