



Archivos de Medicina Veterinaria
ISSN: 0301-732X
archmv@uach.cl
Universidad Austral de Chile
Chile

Reyna-Santamaría, L; Basilio-Navarrete, A; Martínez-Rojero, RD; Casaubon-Huguenin, MT
Comportamiento productivo y toxicosis en pollos de engorde alimentados con aflatoxinas B1, B2 y tres adsorbentes de micotoxinas
Archivos de Medicina Veterinaria, vol. 48, núm. 2, 2016, pp. 215-222
Universidad Austral de Chile
Valdivia, Chile

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=173047611011>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

Comportamiento productivo y toxicosis en pollos de engorde alimentados con aflatoxinas B₁, B₂ y tres adsorbentes de micotoxinas

Productive performance and poisonous in broilers fed with aflatoxin B₁, B₂ and three adsorbents of mycotoxins

L Reyna-Santamaría^a, A Basilio-Navarrete^a, RD Martínez-Rojero^a, MT Casaubon-Huguenin^b

ABSTRACT. The aim of this study was to evaluate the effect of 1,200 µg/kg of Aflatoxin B₁ (AF_{B1}), Aflatoxin B₂ (AF_{B2}) and three mycotoxins adsorbents on growth performance, antibody titers to Newcastle, blood chemistry and histopathological lesions in broilers. One hundred ninety two one-day old chickens were randomly divided into 4 treatments and 3 replicates of 16 chickens, in a 42-day experiment. Treatments evaluated: T1 = basal diet; T2 = basal diet with 1,200 µg/kg of AF_{B1} and AF_{B2}; T3 = basal diet with 1,200 µg/kg of AF_{B1} and AF_{B2} plus adsorbent (A); T4 = basal diet with 1200 µg/kg of AF_{B1} and AF_{B2} plus adsorbent (B). The results indicate that the chickens eating the adsorbent (A) and 1200 µg/kg of AF_{B1} and AF_{B2} improved their feed conversion (FC), increased its antibody titers to Newcastle (ATN) at 21 and 42 days, decreased the aspartate transaminase (AST) at 21 days and it increased its albumin (A) and total protein (TP) at 21 and 42 days. Uric acid (UA) decreased within 42 days. The histopathological lesions were similar in the chickens, independently of treatment. In conclusion, the aflatoxins B₁ and B₂ at a concentration of 1,200 µg/kg and the adsorbent (A) for 42 days can reduce FC, increase ATN, reduce AST, reduce the UA and raise the A and TP, however this was not the case for adsorbent (B) when is combined with the aflatoxins in the level previously mentioned.

Key words: aflatoxin, mycotoxins adsorbent, broilers, immune response.

RESUMEN. El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de 1.200 µg/kg de aflatoxina B₁ (AF_{B1}), aflatoxina B₂ (AF_{B2}) y de tres adsorbentes de micotoxinas, sobre el comportamiento productivo, títulos de anticuerpos para Newcastle, química sanguínea y lesiones histopatológicas en pollos de engorde. 192 pollos de un día de edad fueron aleatoriamente distribuidos en cuatro tratamientos y tres repeticiones por tratamiento de 16 pollos cada una, en un experimento de 42 días. Tratamientos evaluados: T1 = dieta basal; T2 = dieta basal con 1200 µg/kg de AF_{B1} y AF_{B2}; T3 = dieta basal con 1.200 µg/kg de AF_{B1} y AF_{B2} y adsorbente (A); T4 = dieta basal con 1.200 µg/kg de AF_{B1} y AF_{B2} y adsorbente (B). Los resultados indican que los pollos al consumir el adsorbente A y 1.200 µg/kg de AF_{B1} y AF_{B2}, mejoraron su conversión alimenticia (CV), incrementaron sus títulos de anticuerpos para Newcastle (TAN) a los 21 y 42 días, se disminuyó la aspartato transaminasa (AST) a los 21 días y aumentó su albúmina (A) y proteínas totales (PT) a los 21 y 42 días. El ácido úrico (AU) disminuyó a los 42 días. Pero las lesiones histopatológicas fueron similares en los pollos, independientemente del tratamiento. Las aflatoxinas B₁ y B₂ en la concentración descrita y el adsorbente (A) durante 42 días pueden reducir la CV, aumentar el TAN, reducir la AST, reducir el AU, elevar la A y las PT, no así el adsorbente (B), al combinarse con aflatoxinas en la dosis mencionada.

Palabras clave: aflatoxinas, adsorbente de micotoxinas, pollos de engorde, respuesta inmune.

INTRODUCCIÓN

Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos para los animales y el hombre, producidos por hongos del género *Aspergillus* sp., siendo las especies más importantes *A. flavus* y *A. parasiticus*. Existen muchas micotoxinas, pero son las aflatoxinas B₁ (AF_{B1}) y B₂ (AF_{B2}) las de mayor importancia por su efecto tóxico en los pollos de engorde (Leeson y col 1995, Zhang y Caupert 2012).

Las micotoxinas son capaces de producir efectos tóxicos, teratogénicos, mutagénicos, carcinogénicos o de depresión del sistema inmune; esta última aumenta la susceptibilidad del ave al ataque de agentes infecciosos

como bacterias y virus (Corrier 1991, Sklan y col 2001, Ellakany y col 2011).

La presencia de aflatoxicosis ha sido determinada en pollos de engorde, así como también sus efectos en la salud y capacidad productiva del animal; las aflatoxinas llegan al ave por el alimento, afectando negativamente tanto su estado de salud como su estado productivo (Pier 1992).

Las principales micotoxinas que podemos encontrar en ingredientes para pollos de engorde son las aflatoxinas, las que se han clasificado en cuatro formas principales: aflatoxina B₁ (AF_{B1}), aflatoxina B₂ (AF_{B2}), aflatoxina G₁ (AF_{G1}) y aflatoxina G₂ (AF_{G2}; Monbaliu y col 2010). Por su toxicidad son en orden descendente la AF_{B1} > AF_{G1} > AF_{B2} > AF_{G2} dentro de ellas la AF_{B1} es la que más comúnmente se encuentra en los alimentos (Fandohan y col 2005, Mary y col 2012).

La AF_{B1} representa un papel muy importante, ya que las temperaturas elevadas y la humedad relativa presente en el medio ambiente favorecen su producción, provocando así pérdida de peso en los pollos, altas conversiones alimenticias, además de que causan inmunosupresión

Aceptado: 15.10.2015.

^aColegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero, Iguala, México.

^bFacultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

*Corresponding author: L Reyna-Santamaría; Avenida Vicente Guerrero No. 81, Primer piso, Colonia Centro, CP 40000, Iguala de la Independencia, Guerrero, México; santamaría53@yahoo.com.mx

(Perozo y col 2003^a, Ghahri y col 2010, Khan y col 2010, Rawal y col 2010).

Uno de los órganos diana por excelencia de las aflatoxinas es el hígado, en donde se presentan lesiones muy serias, caracterizadas por infiltración de grasa, degeneración vacuolar y proliferación de los canalículos biliares (Sathish y Raod 2001). Lo anterior provoca cambios en el metabolismo hepático, disminución de la síntesis de proteínas debido a la afinidad de la toxina a regiones específicas del ADN del núcleo del hepatocito, bloqueando así el proceso de transcripción requerido para la síntesis proteica (Leeson y col 1995).

Una alternativa para prevenir la ocurrencia de aflatoxicosis y mejorar la producción de carne en pollos de engorde es el uso de aditivos, específicamente como los secuestrantes o adsorbentes de micotoxinas. Estos son usados en el organismo del animal para localizar y adsorber de manera eficiente las micotoxinas; formando complejos irreversibles, no digeribles con las micotoxinas a nivel gastrointestinal, disminuyendo su absorción, para luego ser excretados en las heces. La selección del adsorbente adicionado a alimentos contaminados con aflatoxinas puede ser capaz de secuestrar aflatoxinas durante el proceso digestivo, evitando pasar a las micotoxinas hacia el interior del animal (Phillips y col 1990).

El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de la inoculación de 1.200 µg/kg de AF_{B1}, AF_{B2} y tres adsorbentes de micotoxinas en el alimento, sobre el comportamiento productivo, título de anticuerpos contra la enfermedad de Newcastle, química sanguínea y daño histopatológico en pollos de engorde en las etapas de iniciación y finalización.

MATERIAL Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en la Unidad Avícola del Centro de Estudios Profesionales del Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero. Se utilizaron 192 pollos de engorde, sexados (machos) de la línea comercial Ross 308 de un día de edad y con un peso inicial promedio de 40 g. El experimento tuvo una duración de seis semanas (42 días), en el que se evaluó la respuesta de las aves durante las tres semanas de la etapa de iniciación y las siguientes tres semanas correspondientes a la etapa de finalización. Estas fueron distribuidas aleatoriamente a base de un diseño completamente al azar (Steel y Torrie 1980) en cuatro tratamientos, con tres repeticiones de 16 pollos cada una.

Se utilizó una sola dieta experimental (para facilitar su manejo y por la disponibilidad de ingredientes) con 21% de proteína cruda y 3,100 Kcal de EM/kg de materia seca. Fue elaborada de acuerdo con los requerimientos nutricionales para pollos de engorde (NRC, 1994) y contenía granos de maíz contaminado con AF_{B1} y AF_{B2} (1.200 µg/kg) y tres secuestrantes de micotoxinas comerciales. Los tratamientos evaluados se describen a continuación: T1 = dieta basal sin

AF_{B1} y AF_{B2}; T2 = dieta basal con 1.200 µg/kg de AF_{B1} y AF_{B2}; T3 = dieta basal con 1.200 µg/kg de AF_{B1} y AF_{B2} y adicionada con el adsorbente (A) de micotoxinas (T5X Premium, dosis 1 kg/t); T4 = dieta basal con 1.200 µg/kg de AF_{B1} y AF_{B2} y adicionada con una mezcla de dos adsorbentes (B) de micotoxinas (Zeolex Extra y Zeotek, 3 y 1 kg/t, respectivamente, dosis de la mezcla final 4 kg/t). Estos dos últimos adsorbentes (B) se mezclaron para probar si existe sinergismo entre ambos y así comparar si ambos mejoran su efecto sobre el adsorbente (A), en la producción de pollos de engorde. El adsorbente (A) T5X Premium es una marca registrada producida por la compañía Neovia y está adicionado con proteína, grasa cruda, minerales, vitamina E y selenio, con propiedades antioxidantes. Los adsorbentes (B) son marcas registradas producidos por los laboratorios Nutek S.A. De C.V. El Zeolex Extra es un aluminosilicato de calcio y sodio hidratado y el Zeotek es un organoaluminosilicato (desarrollado a partir de un aluminosilicato y un compuesto orgánico (C-18) unidos químicamente).

La dieta experimental se analizó previamente para determinar su contenido de aflatoxinas, utilizando el método de columna de inmunoafinidad (aflatest[®]) sobre la base del procedimiento descrito por la Asociación Oficial de Análisis Químicos AOAC (2012), sin que se encontraran niveles detectables de aflatoxinas. La inoculación de AF_{B1} y AF_{B2} purificada con la dieta experimental se realizó de manera uniforme, para lograr la concentración deseada de 1.200 µg/kg antes y después de la adición de los secuestrantes de micotoxinas; así como se determinaron las aflatoxinas en la dieta final para asegurar dicha concentración.

El programa de manejo y sanitario fue similar para todos los tratamientos tal y como se realiza rutinariamente en una granja de tipo comercial; el consumo de agua y alimento se ofreció a las aves a libre acceso. Las aves se vacunaron vía ocular contra la enfermedad de Newcastle (Cepa La Sota) a los 8 y 28 días de edad.

Las variables de respuesta para medir el comportamiento productivo en las etapas de iniciación y finalización fueron: consumo de alimento (CA), ganancia de peso (GP) y conversión alimenticia (CV). En química sanguínea se registró: concentración de aspartato transaminasa (AST), albúmina (A), proteínas totales (PT), glucosa (G) y ácido úrico (AU). Para el grado de lesión histopatológica en órganos en una escala de 0 a 3 por su grado de severidad se evaluó: glándula timo (GT), bolsa de Fabricio (BF), médula ósea (MO), duodeno (D), intestino medio (Yeyuno-Meckel) (IM), hígado (H) y riñón (R), y título de anticuerpos de la enfermedad de Newcastle (TAN). Para esta última se empleó la técnica de la inhibición de la hemoaglutinación (HI) previo desafío en campo, con 10 unidades de hemoaglutinante; se utilizaron estas unidades por la alta concentración de anticuerpos en las aves, apegado a la Norma Oficial Mexicana (NOM-013-Z00-1994) y a la técnica descrita por (Sever 1962).

Los días 21 y 42 del experimento se muestraron 24 aves al azar (se seleccionaron dos pollos por unidad experimental, tal y como se ha realizado en experimentos previos), lo que permitió obtener datos de seis aves por tratamiento. Se utilizaron jeringas estériles desechables de 3 mL, y una vez obtenida la sangre radial se depositó dentro de tubos de ensayo con y sin anticoagulante, con una inclinación de 45° para permitir que se coagulara. Una vez obtenido, el suero sanguíneo fue almacenado en tubos estériles para su procesamiento. Los sueros sanguíneos se enviaron para su análisis al Laboratorio del Departamento de Producción Animal Aves, en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, para determinar los valores de: AST, A, PT, G, AU y TAN.

Los días 21 y 42 del trabajo de investigación se tomaron 24 aves al azar (dos pollos por unidad experimental), lo que permitió obtener muestras de 6 aves por tratamiento. Estos animales fueron sacrificados por dislocación cervical para hacerles la necropsia y obtener muestras a partir de: GT, BF, MO, D, IM, H y R. Se tomaron cortes de cada órgano para identificar lesiones histopatológicas, conservándose en formalina bufferada al 10%. Estas se clasificaron de acuerdo con el grado de severidad mediante la siguiente escala: 0 = normal. 1 = leve, 2 = moderada y 3 = severa.

Los datos para las variables continuas fueron sometidos a un Análisis de Varianza, para un diseño completamente al azar, utilizando el procedimiento de los Modelos Lineales Generales (GLM) del paquete estadístico SAS (1996); cuando se detectaron diferencias entre las medias se aplicó la prueba de Tukey (Steel y Torrie 1980). El análisis estadístico del grado de lesión de los diferentes órganos se realizó mediante la prueba de suma de rangos de Kruskal-Wallis (SAS 1996). Los resultados obtenidos se compararon utilizando una prueba de χ^2 para establecer

la diferencia entre los tratamientos. Todos los criterios relacionados con significancia fueron basados en una probabilidad de ($P < 0,05$).

RESULTADOS

COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO

Los resultados comparativos en las etapas de iniciación y finalización en pollos de engorde (evaluados con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$) para las variables de: CA, GP y CV se muestran en el cuadro 1.

No se observó efecto estadístico ($P > 0,05$) entre tratamientos para el CA en las etapas de iniciación y finalización, con un consumo promedio de 1,37 y 3,76 kg por pollo, respectivamente.

No existió diferencia estadística ($P > 0,05$) entre tratamientos para la GP en la etapa de iniciación con una ganancia de peso promedio de 0,92 kg por pollo. No así en la etapa de finalización donde la GP fue mayor ($P < 0,05$) en los tratamientos 1, 3 y 4; con valores de 1,78, 2,13 y 1,73 kg por pollo, respectivamente, siendo menor la GP en el tratamiento 2 (inoculado con 1.200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de $\text{AF}_{\text{B}1}$ y $\text{AF}_{\text{B}2}$ y sin secuestrante de micotoxinas) con un valor de 1,20 kg.

Se determinaron evidencias estadísticas ($P < 0,05$) entre tratamientos para la CV, siendo más baja en los pollos del tratamiento 3 (con 1.200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de $\text{AF}_{\text{B}1}$ y $\text{AF}_{\text{B}2}$ y el secuestrante A) con valores de 1,08 y 1,70 para las etapas de iniciación y finalización, respectivamente, seguidos por los pollos del tratamiento 4 adicionado con 1.200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de $\text{AF}_{\text{B}1}$ y $\text{AF}_{\text{B}2}$ y la combinación de dos secuestrantes B, siendo este último similar en su CV a la registrada en los pollos del T1 (testigo). El valor más alto en esta variable

Cuadro 1. Comportamiento productivo y título de anticuerpos para la enfermedad de Newcastle en pollos de engorde, alimentados con dietas inoculadas con $\text{AF}_{\text{B}1}$, $\text{AF}_{\text{B}2}$ y adsorbentes de aflatoxinas.

Productive performance and antibody titers to Newcastle disease in broilers fed diets spiked with $\text{AF}_{\text{B}1}$, $\text{AF}_{\text{B}2}$ and aflatoxin adsorbents.

Variable de respuesta	Tratamiento ¹			
	1	2	3	4
<i>Etapa de iniciación</i>				
Consumo de alimento por pollo (kg)	1,38 ^a	1,42 ^a	1,31 ^a	1,38 ^a
Ganancia de peso por pollo (kg)	0,92 ^a	0,64 ^a	1,17 ^a	0,97 ^a
Conversión alimenticia	1,43 ^b	2,17 ^c	1,08 ^a	1,38 ^b
<i>Etapa de finalización</i>				
Consumo de alimento por pollo (kg)	3,93 ^a	3,72 ^a	3,61 ^a	3,80 ^a
Ganancia de peso por pollo (kg)	1,78 ^a	1,20 ^b	2,13 ^a	1,73 ^a
Conversión alimenticia	2,19 ^b	3,08 ^c	1,70 ^a	2,19 ^b
<i>Títulos de anticuerpos (unidades)</i>				
Anticuerpos a los 21 días de edad	42,7 ^b	16,0 ^c	106,7 ^a	37,3 ^b
Anticuerpos a los 42 días de edad	298,7 ^b	106,7 ^c	1194,7 ^a	277,3 ^b

¹T1 = dieta experimental sin $\text{AF}_{\text{B}1}$ y $\text{AF}_{\text{B}2}$; T2 = misma dieta del T1 más la inoculación con 1200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de $\text{AF}_{\text{B}1}$ y $\text{AF}_{\text{B}2}$; T3 = misma dieta del T1 más la inoculación con 1.200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de $\text{AF}_{\text{B}1}$, $\text{AF}_{\text{B}2}$ y adicionada con el secuestrante de micotoxinas A; T4 = misma dieta del T1 más la inoculación con 1.200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de $\text{AF}_{\text{B}1}$, $\text{AF}_{\text{B}2}$ y adicionada con una mezcla de dos secuestrantes B.

^{abc}Valores que no comparten la misma literal dentro de cada variable son diferentes ($P < 0,05$).

se determinó en los pollos del T3 con una CV de 2,17 y 3,08 en las etapas de iniciación y finalización.

RESPUESTA INMUNOLÓGICA

En la respuesta inmunológica para Newcastle los resultados comparativos en los pollos de engorde realizados en dos muestreos, a los 21 y 42 días de edad, se muestran en el cuadro 1. Se encontraron diferencias estadísticas ($P < 0,05$) entre tratamientos, obteniéndose una mayor concentración del TAN en los pollos del T3 con valores de 106,7 y 1.194,7 unidades en los dos muestreos. Estos fueron seguidos por los pollos de los tratamientos 1 y 4 con valores promedios de 42,7, 298,7 y 37,3, 277,3 unidades para los dos muestreos, respectivamente. La concentración del TAN más baja se determinó en los pollos del T2 con valores de 16,0 y 106,7 unidades en los dos muestreos.

QUÍMICA SANGUÍNEA

Los resultados de las muestras que fueron sometidas a química sanguínea se presentan en el cuadro 2. Para la concentración de AST a los 21 días de edad se encontraron diferencias estadísticas ($P < 0,05$) entre tratamientos, obteniéndose el valor más alto en los pollos del T4 con 340 U/L, seguidos por los registrados en los pollos del T1 y T2 con valores de 315 y 302 U/L. La concentración más baja se obtuvo en los pollos del T3 con un valor de 233 U/L. Además, la concentración de AST a los 42 días de

edad fue similar ($P > 0,05$) entre los tratamientos evaluados con una concentración promedio de 282 U/L.

La concentración de A registrada a los 21 y 42 días de edad fue mayor ($P < 0,05$) en los pollos del T3 con valores de 28 y 23 g/L; siendo menor en los pollos de los tratamientos 1, 2 y 4, con concentraciones de 23 y 14; 22 y 11; 24 y 13 g/L, para ambos muestreos.

La concentración de PT a los 21 días de edad fue mayor ($P < 0,05$) en los pollos del T3 con una concentración de 46 g/L; siendo menor en los pollos de los tratamientos 1, 2 y 4 con un valor promedio de 35 g/L.

De manera consistente, la concentración de PT a los 42 días de muestreo fue más alta ($P < 0,05$) en los pollos del T3 con 47 g/L, seguida por la de los pollos de los tratamientos 1 y 2 con valores de 35 y 30 g/L. La concentración más baja, de 27 g/L, se determinó en los pollos del T4.

Los niveles de G registrados a los 21 y 42 días de muestreo fueron similares ($P > 0,05$) entre tratamientos con una concentración promedio de 15,5 y 0,87 mmol/L para ambos muestreos. Esta menor concentración de G observada en el muestreo a los 42 días se debe probablemente a que las muestras se contaminaron.

Los niveles observados de AU a los 21 días de muestreo fue similar ($P > 0,05$) al compararse estos valores entre tratamientos, con una concentración promedio de 520,25 μ mol/L. Sin embargo, su concentración a los 42 días de muestreo resultó ser mayor ($P < 0,05$) en los pollos del T4 con un valor de 607 μ mol/L; siendo menor a la registrada en los pollos de los tratamientos 1, 2 y 3, con valores de 200, 339 y 282 μ mol/L.

Cuadro 2. Promedios de química sanguínea en pollos de engorde alimentados con una dieta inoculada con AF_{B1}, AF_{B2} y adsorbentes de aflatoxinas a los 21 y 42 días de edad.

Average values of blood chemistry in broilers fed a diet inoculated with AF_{B1}, AF_{B2} and aflatoxin adsorbents at 21 and 42 days of age.

Variable de respuesta	Tratamiento ¹			
	1	2	3	4
<i>Concentración a los 21 días de edad</i>				
AST (U/L)	315 ^b	302 ^b	233 ^c	340 ^a
Albúmina (g/L)	23 ^b	22 ^b	28 ^a	24 ^b
Proteínas totales (g/L)	35 ^b	35 ^b	46 ^a	35 ^b
Glucosa (mmol/L)	14 ^a	15 ^a	16 ^a	17 ^a
Ácido úrico (μ mol/L)	471 ^a	531 ^a	457 ^a	622 ^a
<i>Concentración a los 42 días de edad</i>				
AST (U/L)	269 ^a	296 ^a	235 ^a	327 ^a
Albúmina (g/L)	14 ^b	11 ^b	23 ^a	13 ^b
Proteínas totales (g/L)	35 ^b	30 ^b	47 ^a	27 ^c
Glucosa (mmol/L)	1.0 ^a	0.9 ^a	0.9 ^a	0.7 ^a
Ácido úrico (μ mol/L)	200 ^b	339 ^b	282 ^b	607 ^a

¹T1 = dieta experimental sin AF_{B1} y AF_{B2}; T2 = misma dieta del T1 más la inoculación con 1.200 μ g/kg de AF_{B1} y AF_{B2}; T3 = misma dieta del T1 más la inoculación con 1.200 μ g/kg de AF_{B1}, AF_{B2} y adicionada con el sequestrante de micotoxinas A; T4 = misma dieta del T1 más la inoculación con 1.200 μ g/kg de AF_{B1}, AF_{B2} y adicionada con una mezcla de dos sequestrantes B.

^{abc} Valores que no comparten la misma literal dentro de cada variable son diferentes ($P < 0,05$).

DAÑO HISTOPATOLÓGICO

Con relación al daño histopatológico (cuadros 3 y 4), no se encontraron evidencias estadísticas ($P > 0,05$) para las variables de: GT, BF, MO, D, IM, H y R, al compararse los valores registrados en los pollos entre tratamientos en los muestreos realizados a los 21 y 42 días de edad.

DISCUSIÓN

Se han realizado muchos estudios en pollos en donde se han encontrado diferentes efectos adversos con concentraciones de aflatoxinas que van de 0 a 10,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Arce y col 1994, Fernández y col 1995, Ledoux y col 1999, Miazzo y col 2000, Rosa y col 2001, Pimpukdee y col 2004, Bintvihok y Kositcharoenkul 2006, Pasha y col 2007, Denli y col 2009, Hussain y col 2010, Magnoli y col 2011, Yang y col 2012).

COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO

Los efectos de la exposición a la $\text{AF}_{\text{B}1}$ y $\text{AF}_{\text{B}2}$ pueden ser dependientes tanto del tiempo durante el que se administran

las aflatoxinas así como de la concentración de las mismas. Bajo estas circunstancias, los valores encontrados indican que el tiempo de suministro y la concentración evaluada en el presente experimento no fueron capaces de alterar el consumo de alimento en los pollos. Este resultado es concordante con lo publicado por otros autores (Arce y col 1994, Shi y col 2006, Pasha y col 2007), estos tampoco encontraron variación en el consumo de alimento en pollos al evaluar diferentes concentraciones de aflatoxinas. En otros trabajos publicados por Daneshyar y col 2014, Sun y col 2015 encontraron un efecto negativo en el consumo de alimento en pollos a partir de la cuarta semana del ciclo de engorda al adicionar en la dieta aflatoxina B_1 . Confirmado por Sun y col 2015.

Sin embargo, otros trabajos reportan que la adición de adsorbentes en dietas contaminadas con aflatoxina B_1 mejoran el consumo de alimento en pollos de engorde (Ledoux y col 1999, Pimpukdee y col 2004, Tedesco y col 2004, Bintvihok y Kositcharoenkul 2006, Denli y col 2009). Considerando lo anterior, la concentración de aflatoxinas suministrada en el presente estudio pudiera explicar en parte la diferencia encontrada en estos ensayos. La falta de efecto del nivel de aflatoxinas utilizado sobre el consumo de alimento en

Cuadro 3. Medianas del daño histopatológico en pollos de engorde alimentados con una dieta inoculada con $\text{AF}_{\text{B}1}$, $\text{AF}_{\text{B}2}$ y adsorbentes de aflatoxinas a los 21 días de edad.

Medium of the histopathological damage in broilers fed a diet inoculated with $\text{AF}_{\text{B}1}$, $\text{AF}_{\text{B}2}$ and aflatoxin adsorbents at 21 days old.

Órganos	Tratamiento ^{1*}			
	T1	T2	T3	T4
<i>Timo</i>				
Infiltración heterófilos dispersa	0 ^a	1 ^a	0 ^a	1 ^a
<i>Bolsa de Fabricio</i>				
Apoptosis-necrosis	0 ^a	1 ^a	1 ^a	0 ^a
Infiltración linfoide subepitelial	1 ^a	2 ^a	2 ^a	1 ^a
<i>Médula ósea</i>				
Adiposis	2 ^a	3 ^a	2 ^a	2 ^a
Duodeno				
Infiltración linfoide lámina propia	1 ^a	1 ^a	1 ^a	2 ^a
Número de nódulos linfoideos	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
<i>Intestino medio (Yeyuno-Meckel)</i>				
Infiltración linfoide lámina propia	2 ^a	2 ^a	1 ^a	1 ^a
<i>Hígado</i>				
Degeneración	1 ^a	3 ^a	3 ^a	3 ^a
Infiltración linfoide alrededor de conductos biliares	0 ^a	2 ^a	0 ^a	0 ^a
Infiltración periportal linfoide	1 ^a	1 ^a	0 ^a	1 ^a
<i>Riñón</i>				
Degeneración	3 ^a	3 ^a	3 ^a	3 ^a
Necrosis del epitelio de túbulos proximales	3 ^a	2 ^a	2 ^a	0 ^a

¹T1 = dieta experimental sin $\text{AF}_{\text{B}1}$ y $\text{AF}_{\text{B}2}$; T2 = misma dieta del T₁ más la inoculación con 1.200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de $\text{AF}_{\text{B}1}$ y $\text{AF}_{\text{B}2}$; T3 = misma dieta del T₁ más la inoculación con 1.200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de $\text{AF}_{\text{B}1}$, $\text{AF}_{\text{B}2}$ y adicionada con el secuestrante de micotoxinas A; T4 = misma dieta del T₁ más la inoculación con 1.200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de $\text{AF}_{\text{B}1}$, $\text{AF}_{\text{B}2}$ y adicionada con una mezcla de dos secuestrantes B.

^aValores que no comparten la misma literal dentro de cada variable son diferentes ($P < 0,05$).

* Grado de severidad en escala original: 0 = Normal; 1 = Lesión leve; 2 = Lesión moderada y 3 = Lesión severa.

Cuadro 4. Medianas del daño histopatológico en pollos de engorde alimentados con una dieta inoculada con AF_{B1}, AF_{B2} y adsorbentes de aflatoxinas a los 42 días de edad.Medium of the histopathological damage in broilers fed a diet inoculated with AF_{B1}, AF_{B2} and aflatoxin adsorbents at 42 days old.

Órganos	Tratamiento ^{1*}			
	T1	T2	T3	T4
<i>Timo</i>				
Infiltración heterófilos dispersa	0 ^a	1 ^a	0 ^a	1 ^a
Bolsa de Fabricio				
Apoptosis-necrosis	0 ^a	1 ^a	1 ^a	1 ^a
Médula ósea				
Adiposis	3 ^a	2 ^a	3 ^a	2 ^a
<i>Duodeno</i>				
Infiltración linfoide lámina propia	1 ^a	1 ^a	1 ^a	3 ^a
Número de nódulos linfoides	1 ^a	2 ^a	1 ^a	0 ^a
<i>Intestino medio (Yeyuno-Meckel)</i>				
Número de nódulos linfoides	0 ^a	2 ^a	1 ^a	0 ^a
<i>Hígado</i>				
Degeneración	0 ^a	2 ^a	0 ^a	0 ^a
Infiltración linfoide alrededor de conductos biliares	2 ^a	1 ^a	0 ^a	0 ^a
Infiltración periportal linfoide	2 ^a	1 ^a	1 ^a	2 ^a
<i>Riñón</i>				
Degeneración	1 ^a	2 ^a	2 ^a	2 ^a
Necrosis del epitelio de túbulos proximales	2 ^a	2 ^a	2 ^a	2 ^a

¹T1 = dieta experimental sin AF_{B1} y AF_{B2}; T2 = misma dieta del T₁ más la inoculación con 1.200 µg/kg de AF_{B1} y AF_{B2}; T3 = misma dieta del T₁ más la inoculación con 1.200 µg/kg de AF_{B1}, AF_{B2} y adicionada con el secuestrante de micotoxinas A; T4 = misma dieta del T₁ más la inoculación con 1.200 µg/kg de AF_{B1}, AF_{B2} y adicionada con una mezcla de dos secuestrantes B.

^aValores que no comparten la misma literal dentro de cada variable son diferentes (P < 0,05).

* Grado de severidad en escala original: 0 = Normal; 1 = Lesión leve; 2 = Lesión moderada y 3 = Lesión severa.

los pollos puede deberse a factores medioambientales, de manejo y condiciones individuales de manejo.

En la presente investigación las AF_{B1} y AF_{B2} adicionadas en una concentración de 1.200 µg/kg y sin secuestrante de micotoxinas (T2) reducen la ganancia de peso en los pollos de engorde en la etapa de finalización, no así en la etapa de iniciación. Este resultado concuerda con lo informado en otros trabajos publicados (Arce y col 1994, Ledoux y col 1999, Miazzo y col 2000, Rosa y col 2001, Pimpukdee y col 2004, Bintvihok y Kositcharoenkul 2006, Shi y col 2006, Pasha y col 2007, Denli y col 2009, Daneshyar y col 2014), en los que se reporta que dietas contaminadas con aflatoxinas afectan negativamente la ganancia de peso de los pollos. Este resultado confirma que a mayor edad de los pollos mayor efecto de las aflatoxinas, también se observa un efecto benéfico de los adsorbentes de micotoxinas utilizados sobre la ganancia de peso.

La conversión alimenticia obtenida en el presente ensayo se vio beneficiada con la adición del adsorbente (A), y la AF_{B1} y AF_{B2}, estos resultados son consistentes con los reportados por varios autores (Rosa y col 2001, Shi y col 2006, Pasha y col 2007, Denli y col 2009), al evaluar diferentes concentraciones de aflatoxina. Sin

embargo, otros investigadores (Arce y col 1994, Ledoux y col 1999, Miazzo y col 2000, Pimpukdee y col 2004, Bintvihok y Kositcharoenkul 2006) no encontraron una mejora en esta variable al evaluar el uso de adsorbentes de aflatoxinas y diferentes concentraciones de aflatoxinas en pollos de engorde. Tedesco y col (2004) reportaron que la adición de la AF_{B1} en la dieta para pollos de engorde afecta negativamente el consumo de alimento y en menor grado la ganancia de peso, no así a la conversión alimenticia. Dichos resultados son un tanto contradictorios. Datos confirmados por otros autores (Sun y col 2015). El efecto positivo del adsorbente (A) se puede explicar por su mayor capacidad para ligar las aflatoxinas a nivel intestinal y así permitirles a los pollos una mejor conversión alimenticia.

RESPUESTA INMUNOLÓGICA

La respuesta inmune contra la enfermedad de Newcastle se vio mejorada en este ensayo en los pollos que consumieron la dieta adicionada con el adsorbente (A) y la AF_{B1} y AF_{B2}; y la peor respuesta inmune fue observada en los pollos que consumieron la dieta adicionada con la AF_{B1} y AF_{B2}, y sin adsorbente de micotoxinas. Estos resultados

son un tanto contradictorios al compararlos con otros autores (Pasha y col 2007), donde la dieta control libre de aflatoxinas favorece un mayor título de anticuerpos y la dieta adicionada con aflatoxinas y sin secuestrante el valor más bajo de anticuerpos. Por el contrario, otros autores no encontraron un efecto benéfico sobre la respuesta inmune para la enfermedad de Newcastle (Thaxton y col 1974, Perozo y col 2003^a) al evaluar diferentes concentraciones de aflatoxina en la dieta de pollos de engorde. La concentración de 1.200 µg/kg de la AF_{B1} y AF_{B2} adicionada en la dieta de este experimento fue suficiente para inducir una disminución drástica en los títulos de anticuerpos, ello confirma el efecto benéfico de los adsorbentes evaluados en esta prueba.

QUÍMICA SANGUÍNEA

Los resultados de la química sanguínea indican que con la AF_{B1} y AF_{B2} suministradas en 1.200 µg/kg y el adsorbente (A) se logró una reducción de la AST a los 21 días de edad de los pollos, pero no fue así a los 42 días, estos resultados concuerdan con los publicados en varios ensayos (Tedesco y col 2004, Bintvihok y Kositcharoenkul 2006, Shi y col 2006, Denli y col 2009, Yang y col 2012) al utilizar adsorbentes y aflatoxina en varias concentraciones en la dieta de pollos de engorde. Este resultado nos puede explicar que el adsorbente (A) tiene mayor capacidad para ligar aflatoxinas a nivel intestinal en pollos jóvenes.

Un efecto muy notorio de la exposición de las aves a la AF_{B1} y AF_{B2} y al adsorbente (A) de aflatoxinas fue el aumento en su albúmina sérica. Otros autores confirman estos resultados (Rosa y col 2001, Perozo y col 2003^b, Tedesco y col 2004, Shi y col 2006, Denli y col 2009, Cao y col 2010, Yang y col 2012), al utilizar diferentes concentraciones de aflatoxinas y adsorbentes de aflatoxinas. De manera consistente se puede observar el efecto secuestrante del adsorbente (A) sobre las aflatoxinas, al incrementar la concentración de la albúmina sérica en los pollos.

La adición a la dieta del adsorbente (A) con 1.200 µg/kg de AF_{B1} y AF_{B2}, mejoró la concentración de proteínas séricas totales en las aves. Estos resultados concuerdan con los expuestos previamente por otros investigadores (Rosa y col 2001, Perozo y col 2003^a, Perozo y col 2003^b, Tedesco y col 2004, Shi y col 2006, Denli y col 2009, Yang y col 2012) utilizando en dietas para pollos diferentes niveles de secuestrante y aflatoxinas en sus ensayos. Dichos resultados son confirmados por otros autores (Sun y col 2015). Estos resultados pueden confirmar y probablemente sean la explicación de los resultados obtenidos en el presente ensayo, permitiéndole al tejido hepático una mayor producción de proteínas totales.

De acuerdo con los valores registrados, los adsorbentes de micotoxinas y la concentración de AF_{B1} y AF_{B2} evaluadas en el experimento no fueron capaces de alterar los niveles

séricos de glucosa en los pollos. Esta menor concentración de G observada en el muestreo a los 42 días se debe probablemente a que las muestras se contaminaron. Estos resultados son similares a los publicados por otros autores (Tedesco y col 2004). Las concentraciones de aflatoxinas y los adsorbentes utilizados en este experimento no fueron capaces de mostrar su efecto sobre los niveles séricos de glucosa, esto nos indica que pueden existir diversos factores involucrados en esta respuesta.

El suministro de los dos adsorbentes de micotoxinas en la dieta y la concentración de 1.200 µg/kg de AF_{B1} y AF_{B2} no fueron capaces de alterar los niveles de AU a los 21 días de edad de los pollos, pero no fue así a los 42 días de edad donde la concentración de AU fue mayor en la dieta con el secuestrante (B); resultados similares fueron reportados en un experimento realizado por Tedesco y col 2004. Estos resultados nos indican que los adsorbentes de micotoxinas utilizados en este experimento no tuvieron un efecto muy claro en la reducción de los niveles de AU en las aves, quedando un efecto confundido por diversas causas.

DAÑO HISTOPATOLÓGICO

La concentración y el tiempo de exposición de los adsorbentes de micotoxinas y de la AF_{B1} y AF_{B2} utilizadas en el ensayo no tuvieron la capacidad de causar daños o lesiones a la: GT, BF, MO, D, IM, H y R en los pollos durante los dos períodos de muestreo. Este nulo efecto de la AF_{B1} y AF_{B2} en cada uno de los órganos analizados probablemente se debió al tiempo de exposición de los pollos a las aflatoxinas, a las condiciones ambientales, al manejo y a la genética de las aves. Estos resultados concuerdan con los encontrados por otros investigadores (Perozo y col 2003^a, Ortatatlí y col 2005, Denli y col 2009). Quedando un efecto confundido en el grado de lesión en cada uno de los órganos analizados.

Sobre la base de los resultados obtenidos y bajo las condiciones en que se realizó el presente experimento se concluye que las aflatoxinas B₁ y B₂ suministradas en una concentración de 1.200 µg/kg y adicionadas con el secuestrante de micotoxinas A durante 42 días mejoran la GP, reducen la CV, aumentan la respuesta inmune contra la enfermedad de Newcastle, reducen la concentración de AST y elevan la concentración de A y PT en pollos de engorde. Estas concentraciones de aflatoxinas no causan lesiones graves en la: GT, BF, MO, D, IM, H y R en los pollos. Por otro lado los pollos que consumieron la dieta adicionada con 1.200 µg/kg de aflatoxinas B₁ y B₂ y con el secuestrante de micotoxinas B durante 42 días mejoran su GP, aumentan su CV, reducen la respuesta inmune contra la enfermedad de Newcastle, aumentan la concentración de AST, reducen la concentración de A y PT, y elevan su concentración de AU. Similarmente estas concentraciones de aflatoxinas no causan lesiones graves en la GT, BF, MO, D, IM, H y R en pollos.

AGRADECIMIENTOS

A la compañía Neovia por los apoyos brindados. Al Colegio Superior Agropecuario del estado de Guerrero por las facilidades otorgadas en instalaciones, equipos y materiales solicitados para la realización de esta investigación.

REFERENCIAS

- AOAC, Association of Official Analytical Chemists. 2012. *Official Methods of Analysis*. 19th ed. Arlington, VA, USA.
- Arce JA, EG Ávila, CP Vásquez, CC López, FJA Tirado. 1994. Efecto de dos aluminosilicatos en dietas con 45 ppb de aflatoxinas B1 sobre los parámetros productivos en pollo de engorde. *Vet Méx* 25, 33-36.
- Bintvihok A, S Kositcharoenkul. 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. *Toxi* 47, 41-46.
- Cao H, XH Yin, SL Chen, YD Hu, R Hu, SC Li, CF Xie, Q Su, DS Yao. 2010. A study on antidotal effect of aflatoxin-detoxifizyme on aflatoxin B1 in Ling nan Yellow broilers diets. *Chinese Journal of Animal Nutrition* 22, 424-430.
- Denli M, JC Blandon, ME Guynot, S Salado, JF Perez. 2009. Effects of dietary afladetox on performance, serum biochemistry, histopathological changes and aflatoxin residues in broilers exposed to aflatoxin B1. *Poult Sci* 88, 1444-1451.
- Ellakany HF, SS Abuakkada, SS Oda, YS El-Sayed. 2011. Influence of low levels of dietary aflatoxins on *Eimeria tenella* infections in broilers. *Trop Anim Health Prod* 43, 249-257.
- Fandohan P, D Zoumenous, DJ Hounhouigan, W Marasas, MJ Wingfield, K Hell. 2005. Fate of aflatoxins and fumonisins during the processing of maize into food products in Benin. *Int J Food Microbiol* 98, 249-259.
- Fernández A, M Verde, J Gómez, M Gascon, J Ramos. 1995. Changes in the prothrombin, hematology and serum proteins during experimental aflatoxicosis in hens and broiler chickens. *Brit Poult Sci* 68, 119-122.
- Hussain Z, MK Zargham, A Khan, I Javed, MS Kashif, S Mahmood, MA Rafique. 2010. Residues of aflatoxin B1 in broiler meat: Effect of age and dietary aflatoxina B1 levels. *Food Chem Toxicol* 48, 3304-3307.
- Ledoux DR, GE Rottinghaus, AJ Bermudez, M Alonso-Debolt. 1999. Efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broiler chicks. *Poult Sci* 78, 204-210.
- Leeson S, GJ Diaz, JD Summers. 1995. *Poultry metabolic disorders and mycotoxins*. University Books, Guelph, Canada, Pp 249-280.
- Magnoli AP, MP Monge, RD Mazzzo, LR Cavagliere, CE Magnoli, CI Merkis, AL Cristofolini, AM Dalcerio, SM Chiacchiera. 2011. Effect of low levels of aflatoxina B1 on performance, biochemical parameters, and aflatoxina B1 in broiler liver tissues in the presence of monensin and sodium bentonite. *Poult Sci* 90, 48-58.
- Mary VS, MG Theumer, SL Arias, HR Rubinstein. 2012. Reactive oxygen species sources and biomolecular oxidative damage induced by aflatoxin B1 and fumonisin B1 in rat spleen mononuclear cells. *Toxicology* 302, 299-307.
- Mazzzo R, CAR Rosa, ECQ Carvalho, C Magnoli, SM Chiacchiera, G Palacio, M Saenz, A Kikot, E Basaldella, A Dalcerio. 2000. Efficacy of synthetic zeolite to reduce the toxicity of aflatoxin in broiler chicks. *Poult Sci* 79, 1-6.
- Monbalu S, C Van Poucke, C Detavernier, F Dumoulin, M Van De Velde, E Schoeters, S Van Dyck, O Averkieva, C Van Peteghem, S De Saeger. 2010. Occurrence of mycotoxins in feed as analyzed by a multi-mycotoxin LC-MS/MS method. *J Agric Food Chem* 58, 66-71.
- NRC, National Research Council. 1994. *Nutrient Requirements of Poultry*. 8th revised ed. National Research Council, Washington, D. C., USA.
- Ortatanli M, H Oguz, F Hatipoglu, M Karaman. 2005. Evaluation of pathological changes in broiler during chronic aflatoxin (50 and 100 ppb) and clinoptilolite exposure. *Res Vet Sci* 78, 61-68.
- Pasha TN, MU Farooq, FM Khattak, MA Jabbar, AD Khan. 2007. Effectiveness of sodium bentonite and two commercial products as aflatoxina absorbents in diets for broiler chickens. *Anim Feed Sci Tech* 132, 103-110.
- Perozo FM, S Rivera, G Finol, Y Mavárez. 2003^a. Aflatoxina B1, selenio y *Saccharomyces cerevisiae* en la respuesta inmune de pollos de engorde en el estado de Zulia, Nenezuela. *Rev Cient-Fac Cien V* 13, 360-370.
- Perozo F, J Ferrer, M Alvarado, H Rincón, Y Mavarez, M Gil. 2003^b. Valores hematológicos en pollos de engorde expuestos de forma continua a bajas dosis de aflatoxina B1 en el estado de Zulia, Venezuela. *Rev Cient-Fac Cien V* 13, 59-64.
- Phillips TD, BA Clement, LF Kubena, RB Harvey. 1990. Detection and detoxification of aflatoxins: Prevention of aflatoxicosis and aflatoxin residues with hydrated sodium calcium aluminosilicate. *Vet Human Toxicol* 32, 15-19.
- Pier AC. 1992. Major biological consequences of aflatoxicosis in animal production. *J Anim Sci* 70, 3964-3967.
- Pimpukdee K, LF Kubena, CA Bailey, HJ Huebner, E Afriyie-Gyawu, TD Phillips. 2004. Aflatoxin-induced toxicity and depletion of hepatic vitamin A in young broiler chicks: protection of chicks in the presence of low levels of novasil plus in the diet. *Poult Sci* 83, 737-744.
- Rawal S, JE Kim, R Coulombe, Jr. 2010. Aflatoxin B1 in poultry: Toxicology, metabolism and prevention. *Res Vet Sci* 89, 325-331.
- Rosa CAR, R Mazzzo, C Magnoli, M Salvano, SM Chiacchiera, S Ferrero, M Sáenz, ECQ Carvalho, A Dalcerio. 2001. Evaluation of the efficacy of bentonite from the south of Argentina to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broilers. *Poult Sci* 80, 139-144.
- SAS Institute. 1996. *User's Guide: Statistics*. SAS Institute Inc, Cary, NC, USA.
- Sathish M, D Raod. 2001. Histological changes in liver by aflatoxicosis and fenvalerate treated broiler birds. *Indian Vet J* 78, 1152-1153.
- Sever JL. 1962. Application of micro technique to viral serological investigations. *J Immunol*, 88, 320-329.
- Shi YH, ZR Xu, JL Feng, CZ Wang. 2006. Efficacy of modified montmorillonite nanocomposite to reduce the toxicity of aflatoxina in broiler chicks. *Anim Feed Sci Tech* 129, 138-148.
- Sklan D, E Klipper, A Friedman, M Shelly, B Makovsky. 2001. The effect of chronic feeding of diacetoxyscirpenol, T-2 toxin and aflatoxin on performance, health and antibody production in chicks. *J Appl Poultry Res* 10, 79-85.
- Steel RGD, JH Torrie. 1980. *Principles and procedures of statistics. A biometrical approach*. 2nd ed. McGraw-Hill Book Co., New York, USA.
- Sun LH, NY Zhang, RR Sun, X Gao, C Gu, CS Krumm, DS Qi. 2015. A novel strain of *Cellulosimicrobium funkei* can biologically detoxify aflatoxin B₁ in ducklings. *Micro Biotechno* 8, 490-498.
- Tedesco D, S Steidler, S Galletti, M Tameni, O Sonzogni, L Ravarotto. 2004. Efficacy of silymarin-phospholipid complex in reducing the toxicity of aflatoxin B1 in broiler chicks. *Poult Sci* 83, 1839-1843.
- Thaxton JP, HT Tung, PB Hamilton. 1974. Immunosuppression in chickens by aflatoxina. *Poult Sci* 53, 721-725.
- Yang J, F Bai, K Zhang, S Bai, X Peng, X Ding, Y Li, J Zhang, L Zhao. 2012. Effects of feeding corn naturally contaminated with aflatoxin B1 and B2 on hepatic functions of broilers. *Poult Sci* 91, 2792-2801.
- Zhang Y, J Caupert. 2012. A survey of mycotoxins in US distiller's dried grains with solubles from 2009 to 2011. *J Agric Food Chem* 60, 539-543.