



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

**“EFECTO DE UNA MEZCLA DE ÁCIDOS ORGÁNICOS ADMINISTRADA EN EL AGUA
DE BEBIDA SOBRE LAS VARIABLES PRODUCTIVAS, LA BIOQUÍMICA SANGUÍNEA
Y LA RESPUESTA INMUNE DE POLLOS DE ENGORDA ALIMENTADOS CON UNA
DIETA CONTAMINADA CON AFLATOXINAS”**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

ERNESTO MARÍN FLAMAND

TUTOR:

JESÚS ABRAHAM MÉNDEZ ALBORES (FES CUAUTITLÁN-UNAM)



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS

A mis Padres:

Que siempre han sido el aliciente a seguir esforzándome y superándome día a día, los dos son un ejemplo a seguir como personas, profesionistas y académicos, nunca podre agradecer todo lo que han hecho por mí, y todo el apoyo incondicional que me han dado, los amo en verdad, gracias por estar siempre a mi lado.

Que puedo yo dejarles comandantes si ustedes son los poetas.

A Irina mi hermana:

Mi persona favorita, que en todas ocasiones tiene demostraciones de cariño hacia mí, que aunque muchas veces no comprende las cosas que me suceden, siempre tiene un abrazo, un te quiero y un beso, te amo pequeña y siempre estaré a tu lado hasta el ultimo momento.

A mi Familia:

Mis tíos Cacho, Eugenio, Jolene, Silvia y Dina, mis primos Cynthia, Hugo, Shawna, y Leo, muchas gracias por todos esos momentos juntos los quiero mucho.

A mis Amigos:

Víctor, Omar, Israel, Roy, Yery, Leo, Calos Vidal, Aurelia, Enano, Mariel, Paulina y Elia ya son muchos años desde que la vida nos unió muchas gracias por ser parte fundamental de mi vida los quiero.

A mis Compañeros de Trabajo y Amigos:

Juan Carlos, Cynthia, Ana, Lucia, Neli, Alejandro Sánchez, Alejandro Vargas, Víctor Quintero, Blanca, Yola, Gerardo, Juan Sebastián y Dulce María muchas gracias por su amistad, por sus enseñanzas y por ser parte de la mejor sección del planeta. ¡Arriba Patología!

A mis tesisistas y alumnos:

Marcela, Alejandra, Gerardo y Yair, gracias por ser parte de este proyecto sin ustedes esto nunca se hubiera podido realizar, gracias por su apoyo y por formar un excelente equipo de trabajo y gracias por ser mis amigos, los quiero mucho.

A mi Tutor:

Abraham muchas gracias por permitirme ser tu alumno, tesisista y amigo, gracias por todo lo que me has enseñado, por tus consejos y apoyo, este trabajo es el fruto de tu esfuerzo y trabajo estaré siempre agradecido.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México:

Gracias por permitirme ser parte de esta gran institución y ser la mejor universidad de México y una de las primeras del mundo, y ser la cuna de la investigación nacional.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán:

Gracias por ser mi segundo hogar por casi 18 años, por permitirme estudiar, enseñar y aprender en ella.

A la Unidad de Investigación en Granos y Semillas (UNIGRAS):

Gracias por apoyarme siempre en esta aventura llamada investigación.

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION	3
ANTECEDENTES	5
1.1 Situación de la avicultura en México.	5
1.2 Factores que afectan la producción pecuaria.....	6
1.3 Micotoxinas y Micotoxicosis	7
1.3.1 Las aflatoxinas	8
1.3.2 Absorción y excreción de las aflatoxinas.....	10
1.3.3 Metabolismo de las aflatoxinas.....	11
1.3.4 Interacciones de las aflatoxinas con las biomoléculas	13
1.3.5 Inhibición de la síntesis del ATP	14
1.3.6 Inhibición de la síntesis del ADN y ARN.....	15
1.3.7 Inhibición de la síntesis de proteínas	16
1.3.8 Alteración del metabolismo de los lípidos.....	16
1.4 Estrategias de control para el problema de las micotoxinas.....	17
1.4.1 Métodos físicos.	17
1.4.2 Métodos biológicos	22
1.4.3 Métodos químicos	23

1.5 Ácidos orgánicos	25
1.5.1 Generalidades.....	25
1.5.2 Funciones y usos de los ácidos orgánicos	26
1.5.3 Efectos y mecanismos de acción de la actividad antimicrobiana de los ácidos orgánicos	27
1.5.4 Efectos más allá de la actividad antimicrobiana de los ácidos orgánicos..	28
1.5.5 Efectos de los ácidos orgánicos sobre las micotoxinas.....	28
JUSTIFICACIÓN.....	30
OBJETIVOS.	31
a) Objetivo general.....	31
b) Objetivos particulares.	31
HIPÓTESIS.....	32
METODOLOGIA.....	33
5.1 Fase experimental 1	33
5.1.1 Ácidos orgánicos.....	33
5.1.2 Animales	33
5.1.3 Dietas experimentales	35
5.1.4 Recolección de muestras y parámetros	36
5.1.5 Inmunización y respuesta inmune.....	39
5.1.6 Peso de órganos.....	39

5.1.7 Diseño experimental y análisis estadístico.....	39
5.2 Fase experimental 2	41
RESULTADOS	42
6.1 Fase experimental 1	42
6.2 Fase experimental 2	45
DISCUSION	48
7.1 Fase experimental 1	48
7.2.1 Parámetros productivos y tasa de supervivencia.....	48
7.1.2 Química sanguínea y respuesta inmune	50
7.1.3 Peso relativo de órganos	51
7.2 Fase experimental 2	53
7.2.1 Parámetros productivos y tasa de supervivencia.....	53
7.2.2 Química sanguínea y respuesta inmune	54
7.2.3 Peso relativo de órganos	56
CONCLUSIÓN	57
REFERENCIAS	58

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Algunos ácidos orgánicos y sus propiedades.	25
Tabla 5.1 Ingredientes y composición de las dietas experimentales	35
Tabla 6.1. Efecto de mezclas de ácidos orgánicos suministradas en el agua de bebida sobre los parámetros productivos y la tasa de supervivencia en el pollo de engorda....	43
Tabla 6.2. Efecto de mezclas de ácidos orgánicos suministradas en el agua de bebida sobre algunos parámetros sanguíneos y la respuesta inmune en el pollo de engorda ...	44
Tabla 6.3 Efecto de mezclas de ácidos orgánicos suministradas en el agua de bebida sobre el peso relativo de órganos	44
Tabla 6.4. Efecto de la mezcla de ácidos orgánicos suministrada en el agua de bebida sobre los parámetros productivos y la tasa de supervivencia de pollos de engorda alimentados con una dieta contaminada con aflatoxinas a un contenido de 100 ng/g ..	46
Tabla 6.5. Efecto de la mezcla de ácidos orgánicos suministrada en el agua de bebida sobre algunos parámetros sanguíneos y la respuesta inmune de pollos de engorda alimentados con una dieta contaminada con aflatoxinas a un contenido de 100 ng/g ..	47
Tabla 6.6. Efecto de la mezcla de AO suministrada en el agua de bebida sobre el peso relativo de órganos de pollos de engorda alimentados con una dieta contaminada con aflatoxinas a un contenido de 100 ng/g	47

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Estructura química de las aflatoxinas.....	9
---	---

RESUMEN.

La presente investigación se llevó a cabo en dos fases experimentales, en la fase experimental 1 se evaluó el efecto de 3 mezclas de ácidos orgánicos suministradas en el agua de bebida sobre los parámetros productivos, la bioquímica sanguínea y la respuesta inmune de pollos de engorda. Para esta fase experimental se utilizaron 180 pollitos de línea comercial Ross-308, por un periodo de 42 días, los cuales se dividieron aleatoriamente en 4 grupos de 3 repeticiones cada uno. Los grupos fueron tratados con las mezclas: mezcla 1 (ascórbico-cítrico-málico), mezcla 2 (ascórbico-sórbico-málico), y mezcla 3 (ascórbico-tartárico-málico). El agua acidificada se suministró a una concentración de 0.5% (p/v), y el grupo referencia (control) recibió agua sin acidificar. Los resultados mostraron que las mezclas de ácidos orgánicos no presentaron un efecto significativo sobre el peso vivo corporal; sin embargo, se encontraron mejoras en el índice de conversión alimenticia, el consumo de alimento, y la tasa de supervivencia, en comparación con el grupo control. Las aves tratadas con la mezcla 1, mostraron el mejor índice de conversión alimenticia (1.803), consumo de alimento (96.19 g/ave/día), y la mejor tasa de supervivencia (95.63%). Las variables sanguíneas como el hematocrito, las proteínas plasmáticas totales, la albumina sérica, las enzimas gamaglutamil-traspeptidasa (GGT) y aspartatoamino-trasferasa (AST), así como los títulos de anticuerpos, no fueron afectados significativamente debido a la administración de las mezclas de ácidos orgánicos. Por el contrario, se observaron reducciones en la actividad de la enzima alaninoamino-trasferasa (ALT) y un incremento en la relación AST/ALT en los grupos tratados con las mezclas 1 y 3, respectivamente. Por lo tanto la suplementación de ácidos orgánicos en el agua de bebida mejoró significativamente el desempeño productivo de las aves. En la fase experimental 2 se evaluó el efecto de las mezclas de ácidos orgánicos (ascórbico-tartárico-málico) suministrada en el agua de bebida sobre los parámetros productivos, la bioquímica sanguínea y la respuesta inmune de pollos de engorda alimentados con una dieta contaminada con aflatoxinas totales (100 ng/g). Para el experimento, se utilizaron 180 pollitos de línea comercial Ross-308, los cuales se dividieron aleatoriamente en 4 grupos de 3 repeticiones cada uno. El experimento se llevó a cabo durante un ciclo de 42 días. El grupo de referencia (control), recibió agua sin acidificar y alimento libre de aflatoxinas; el segundo grupo recibió la mezcla de ácidos orgánicos (AO) y fue tratado con agua acidificada al 0.5% (p/v), y alimento libre de aflatoxinas; el tercer

grupo recibió agua sin acidificar y alimento contaminado con aflatoxinas (AF); mientras que el cuarto grupo recibió agua acidificada y alimento contaminado con aflatoxinas (AO+AF). Los resultados mostraron que los grupos AO y AO+AF presentaron los mejores valores en el consumo de alimento (91.18 g/ave/día), índice de conversión (1.78 g consumidos/g ganados), y tasa de supervivencia (93.41 %). Las variables sanguíneas como el hematocrito, las proteínas plasmáticas totales, la albumina sérica, la enzima gamaglutamil-traspeptidasa (GGT), y los títulos de anticuerpos no fueron afectados significativamente en los cuatro tratamientos. Por el contrario, la actividad enzimática de la aspartatoamino-transferasa (AST) y de la alaninoamino-transferasa (ALT) fue modificada debido al suministro del agua acidificada en los grupos de aves que consumieron la dieta con aflatoxinas. Consecuentemente, la relación AST/ALT fue afectada; así, el grupo AF presentó una relación de 4.60, en comparación con una relación de 3.23 registrada para el grupo AO+AF. Con base en los resultados, se puede concluir que el uso de la mezcla de AO suministrada en el agua de bebida puede ser una alternativa para mejorar el consumo alimenticio, el índice de conversión y la tasa de supervivencia, así como atenuar algunos efectos adversos ocasionados por el consumo de alimento contaminado con aflatoxinas.

Palabras clave: Aflatoxinas, Pollo de engorda, Ácidos orgánicos, Parámetros productivos, Valores plasmáticos, Enzimas séricas, Título de anticuerpos.

INTRODUCCION

La avicultura se estructura como una cadena de producción, transformación y distribución de productos de origen aviar. El primer eslabón consiste en producir material genético, huevo fértil para incubar mediante granjas tanto de progenitoras como de reproductoras. En segundo plano esta la incubación, crianza y desarrollo de gallina ponedora, pollo y pavo para engorda. En tercero, la producción de pollo y pavo en canal y la de huevo de plato; en una cuarta etapa la distribución o procesamiento de sus productos finales para los consumidores. También en este complejo participan algunas industrias de apoyo como las de alimentos balanceados, productos fármaco-biológicos, servicios colaterales, que incluyen desde la fabricación de cajas, empaques, infraestructura e instalaciones, hasta la asesoría técnica y administrativa.

En la industria avícola, el alimento es el principal componente del costo de producción total en la producción de carne y huevo. El maíz, la harina de soya y el sorgo continúan siendo internacionalmente los ingredientes de elección en las dietas para aves, El alimento es probablemente el factor más importante en la industria avícola, que puede exponer a las aves a una amplia variedad de posibles patógenos y tóxicos a través del tracto gastrointestinal.

El sistema inmune del ave es de especial importancia en la avicultura debido a que las parvadas comerciales son criadas en sistemas intensivos, condiciones bajo las cuales las parvadas son vulnerables a una variedad de agentes infecciosos. Existen múltiples factores que pueden alterar de forma negativa el sistema inmune de las aves.

En este contexto, las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos que contaminan los alimentos destinados para las aves, estas micotoxinas tienen efectos nocivos para la producción por que impactan a diferentes niveles, produciendo síndromes diversos, que van desde el impacto negativo a los parámetros productivos como son la ganancia de peso, la conversión alimenticia y el índice de supervivencia , hasta las alteraciones que producen a nivel del sistema inmune, que se traducen en la susceptibilidad a diversas enfermedades que repercuten directamente a la producción avícola.

Dentro de las micotoxinas se encuentran las aflatoxinas, las aflatoxinas son producidas por los generos *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, y *A. nomius*, ellas como las demás micotoxinas producen diversos efectos nocivos para la producción avícola.

Para resolver la problemática que representan las micotoxinas, se han utilizado diversas estrategias, el presente trabajo se realizó con la finalidad de evaluar el uso de mezclas de ácidos orgánicos administradas en el agua de bebida para reducir los efectos tóxicos de las aflatoxinas, y así aportar una herramienta útil para el control de esta problemática.

ANTECEDENTES

1.1 Situación de la avicultura en México.

En los últimos años la avicultura productora de carne en México así como toda la producción pecuaria y agrícola tuvo cambios importantes en el entorno económico en el cual se desenvuelve, esto influyó en gran medida en los ritmos de crecimiento de la producción, todos estos cambios fueron afectados por el alza en los precios de los insumos alimenticios, un ejemplo de esto es el encarecimiento de los granos en el año 2008 lo que afectó a todos los sectores económicos vinculados a la alimentación tanto humana como animal (SAGARPA, 2009).

De alguna forma todas estas variaciones económicas beneficiaron a la avicultura productora de carne, ya que existió un desplazamiento de todas las demás carnes hacia la carne de pollo por ser la de menor precio al consumidor; sin embargo, se estableció una fuerte limitante a la alza de precios, lo que afectó al productor, ya que su utilidad o rentabilidad se vieron diezmadas por el alza en los precios de los insumos, un ejemplo de esto es el incremento de los precios de los granos en los últimos años, esta baja en la rentabilidad afectó en mayor medida a los productores más pequeños y medianos, lo que se tradujo en una concentración de la producción avícola a un menor número de empresas, esta concentración de la producción es una situación que ha vivido la avicultura en los últimos 13 años, a pesar de todas estas situaciones desfavorables para la avicultura, la UNA (Unión Nacional de Avicultores) reportó que en el 2010 la avicultura nacional aportó el 0.7% en el PIB total, el 19.5% en el PIB agropecuario y el 38.1% en el PIB pecuario, lo que la coloca en un lugar privilegiado en la producción pecuaria.

La UNA también reportó que la avicultura nacional participó con el 63.4% de la producción pecuaria, de este porcentaje la carne de pollo aporta el 33.7%, por otro lado el 29.1% lo aporta la producción de huevo y 0.20% la producción de pavo

Estos niveles de producción repercuten en el alto consumo de insumos agrícolas por parte de la avicultura, este consumo ha tenido un incremento del 3.9% anual, por los

últimos 10 años lo que hace a la industria avícola la mayor industria transformadora de proteína vegetal en proteína animal.

La SAGARPA reporta que la producción de carne de pollo ha mostrado un incremento del 4.9% anual en los últimos 10 años, lo que la hace el área más dinámica en el sector productor de carnes, en el 2010 se produjeron 2822 millones de toneladas de carne de pollo lo que la coloca como la líder en el sector.

En cuanto al consumo, el sector avícola productor de carne es muy importante para el mercado mexicano, la UNA menciona que 6 de cada 10 mexicanos incluyen productos avícolas en su dieta diaria, por otro lado SAGARPA menciona que en el 2008 la carne de pollo tuvo el 43.5% del consumo de carnes, muy por encima de la carne de bovino con 26.5% y la de porcino con el 25.0%, este nivel de producción por parte del sector avícola productor de carne demanda un gran cantidad de insumos alimenticios.

1.2 Factores que afectan la producción pecuaria.

La producción pecuaria puede ser afectada por muchos factores tanto intrínsecos como extrínsecos a la propia producción, todos estos factores afectan a la producción en varios niveles y repercuten en pérdidas económicas, de calidad de los productos, y tiempo.

Los factores son de diversa índole y a continuación se enlistan algunos de los más importantes:

- Situación económica del país.- La situación económica del país afecta directamente a los costos de producción y rentabilidad de la producción, ya que si los insumos para la producción son muy elevados, y los precios de venta son muy bajos consecuentemente el índice de rentabilidad disminuye y la producción no se hace costosa.
- Enfermedades presentes en el país o la región geográfica.- Las enfermedades que afectan a la producción son muy variadas, pero en general, todas se traducen en pérdidas económicas, ya que afectan directamente a los animales reduciendo su

capacidad productiva o en el gasto económico de la prevención o profilaxis del proceso patológico.

- Problemas de manejo zootécnico.- Los errores en el manejo zootécnico se traducen en pérdidas de variada índole, así como predisposición a enfermedades, disminución en el consumo alimenticio o elevados índices de conversión o eficiencia alimenticia.

- Problemas relacionados con la alimentación.- En una explotación avícola de carne y huevo, el alimento representa del 70 al 80% de los costos de producción (Etches, 1998). Los problemas relacionados con la alimentación son prioritarios en la producción pecuaria, estos problemas pueden ser desde errores en la formulación de las dietas, así como contaminaciones en el alimento, que reducen sus características organolépticas y nutritivas, la contaminación del alimento puede ser principalmente por los siguientes factores:
 - Microorganismos patógenos.
 - Sustancias químicas.
 - Insectos.
 - Hongos y sus toxinas

1.3 Micotoxinas y Micotoxicosis

A los metabolitos tóxicos producidos por los hongos se les conoce como micotoxinas, este nombre común se utiliza para designar a una gran familia de sustancias de diversa índole, tanto química como biológica. La micotoxicosis es la intoxicación por micotoxinas y sus signos y síntomas son diversos y en muchos casos específicos de la micotoxina o micotoxinas involucradas, todas las micotoxinas producen diferentes síndromes tanto en animales como en el hombre.

La relación de las micotoxinas y el hombre se remonta a los mismos orígenes de la historia, hay referencias que sugieren enfermedades causadas por micotoxinas en los rollos del mar muerto y en el antiguo Egipto. Hace más de 500 años los alcaloides del cornezuelo de centeno fueron utilizados como preparaciones medicinales en China, en la Edad Media,

existen descripciones del “Fuego de San Antonio”, condición que se atribuye al consumo de alimentos preparados a partir de granos de centeno contaminado. Alcaloides del cornezuelo de centeno, con efectos tanto gangrenosos y convulsivos, probablemente estaban involucrados en los encantamientos que condujeron a los juicios de brujería en Salem, Massachusetts.

Durante los años 1940 y 1950, los brotes de enfermedad mortal en seres humanos en Rusia se produjeron durante los primeros años de la Segunda Guerra Mundial. Esta situación fue bien documentada y se conoce como "Aleukia Tóxica Alimentaria". Esta enfermedad con efectos necrotizantes y hemorrágicos en el sistema nervioso central, desencadenando a menudo en la muerte, este trastorno fue reconocida como una manifestación tóxica de contaminación por hongos de los granos cosechados, se cree que fue el resultado de la intoxicación con toxina T2.

La micotoxicología moderna comenzó con el descubrimiento y aislamiento de las aflatoxinas, este suceso es bien conocido por ser el resultado de las investigaciones sobre la misteriosa “Enfermedad X de los pavos” de 1960, que resultó en la pérdida de miles de pavos jóvenes en el Reino Unido. La causa de la enorme mortalidad en pavos jóvenes y de brotes similares en otros animales de granja se relacionó con el uso de harina de cacahuete enmohecida procedente de Brasil (Allcroft y Carnaghan, 1963).

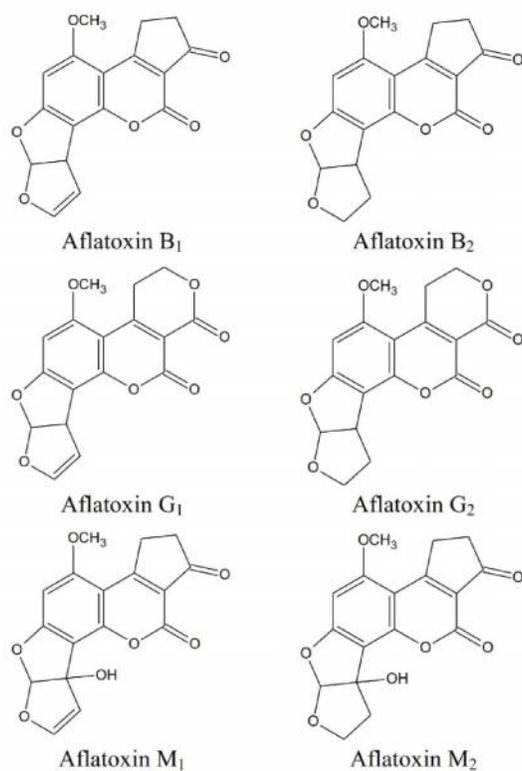
Desde el descubrimiento de las aflatoxinas y sus efectos negativos en la salud de los animales éstas se han convertido en un área activa de investigación. En este sentido, la investigación durante las últimas cinco décadas ya ha aclarado los efectos negativos de las aflatoxinas en los animales y el hombre.

1.3.1 Las aflatoxinas.

Las aflatoxinas como las otras micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos producidos principalmente por *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, y *A. nomius*. El nombre de “aflatoxina” derivó de la primera letra de *Aspegillus* y las 3 primeras letras de flavus. Químicamente las aflatoxinas son derivados de las difuranocumarinas, que tienen la característica de fluorecer bajo la luz ultravioleta, dependiendo del color de la fluorescencia

se dividen en aflatoxina B1 y B2 para la fluorescencia azul (Blue) y aflatoxina G1 y G2 para la fluorescencia verde (Green). Las aflatoxinas M1 y M2 son metabolitos hidroxilados de la aflatoxina B1 y B2 respectivamente que se pueden encontrar en la leche, el huevo y el suero. Otros metabolitos de la aflatoxina B1 son la aflatoxina Q1 y el aflatoxicol (Yunus, 2011; Richard, 2007; Sumit, 2010). En el figura 1.1 se muestra la estructura química de las aflatoxinas.

Figura 1.1 Estructura química de las aflatoxinas



Las aflatoxinas son el grupo más intensamente investigado de micotoxinas, debido a sus efectos tóxicos y cancerígenos demostrados tanto en animales de laboratorio como en el ganado, así como sus efectos tóxicos agudos y hepato-carcinógeno crónicos en el ser humano y otros animales. Se considera que la aflatoxina B1 es el carcinógeno natural más potente (Wogan *et al.*, 1974 ; Wogan, 1992).

La aflatoxina B1 es tóxica para una amplia gama de especies animales, es principalmente una hepatotóxica y es hepatocarcinógena, pero provoca una variada cantidad de otros efectos, ya sea directa o indirectamente asociados con esta toxicidad, como es la inmunosupresión, la reducción de la tasa de crecimiento, la baja en la producción de leche y huevo, la reducción de fertilidad, la baja eficiencia en la utilización del alimento y la anemia. La aflatoxina B1 se ha demostrado que induce el carcinoma hepatocelular en muchas especies de animales, incluidos los peces, aves, primates no humanos y roedores (Wogan, 1992).

Existe una amplia variación en la susceptibilidad de las especies a la hepato-carcinogénesis asociada con aflatoxina B1. Peces y aves de corral, se sabe que son extremadamente sensibles a la aflatoxina B1, responden a dosis tan bajas como 15 a 30 ng/g. Las ratas responden a niveles de 15 a 1000 ng/g, mientras que los ratones no mostraron efectos a niveles de hasta 150,000 ng/g (Wogan, 1992).

1.3.2 Absorción y excreción de las aflatoxinas.

La absorción de las aflatoxinas se ha probado en modelos muranos, los trabajos indican que la absorción es muy rápida, casi toda la aflatoxina que se consume por vía oral es absorbida (Yunus, 2011). En cuanto a la excreción, las aflatoxinas son sometidas a diversas transformaciones en metabolitos principalmente en el hígado. Sin embargo, la eliminación de las aflatoxinas del organismo es mucho más lenta. Sawhney *et al.* (1974), encontraron, que utilizando aflatoxina marcada radioactivamente, en gallinas de postura después de la administración se recuperó el 28% de la aflatoxina a las 24 horas post-administración y a los 7 días después de la administración, el 71% de la aflatoxina marcada. Por otro lado Mabee *et al.* (1973) y Chen *et al.* (1984), encontraron que al alimentar a pollos de engorda con una dieta contaminada con aflatoxinas se encontraron residuos en varios tejidos de los cuales los más importantes fueron: el ventrículo, el hígado y el riñón y después de suspender la dieta contaminada en un lapso de 4-10 días, no pudieron encontrar residuos detectables de aflatoxina en los tejidos. Estos autores concluyeron que en el pollo de engorda los residuos de aflatoxina en los tejidos aumentan con el contenido de aflatoxina en la dieta, y disminuyen con el aumento de la edad (o después de una exposición más prolongada). La

eliminación de la aflatoxina de los tejidos fue más rápida en las aves de mayor edad que en las aves más jóvenes.

1.3.3 Metabolismo de las aflatoxinas.

Después de la absorción en el intestino la mayor parte de las aflatoxinas llegan a hígado y es el lugar principal para su metabolismo y acumulación, aquí las aflatoxinas son sometidas a una extensa cantidad de cambios enzimáticos que resultan en diversos metabolitos, y también es el principal lugar de unión de estos metabolitos a las proteínas y a los ácidos nucleicos, el riñón por otra parte, también forma parte de la detoxificación de las aflatoxinas pero en menor proporción (Guengerich *et al.*, 1998).

Ya en el hepatocito las aflatoxinas son procesadas principalmente por dos complejos enzimáticos, el citocromo P450, y las glutatión-S-trasferasas, estos dos complejos son responsables de la mayoría del metabolismo y detoxificación de las aflatoxinas en el organismo (Rawal *et al.*, 2010; Rawal *et al.*, 2011).

El rol del complejo enzimático P450 en el metabolismo de las aflatoxinas en el pollo de engorda es muy importante. Las enzimas de este complejo son una superfamilia de hemoproteínas que ayudan a la oxidación de varios sustratos, que van desde esteroides, fármacos, contaminantes y varios carcinógenos. El citocromo P450 juega un papel muy importante en la formación de carcinógenos e intermediarios mutágenos electrofílicos (Rawal *et al.*, 2010; Rawal *et al.*, 2011).

La aflatoxina no es tóxica por sí misma, esta requiere la transformación al metabolito electrofílico y activo AFB1-8,9-exo-epóxido (AFBO), para ejercer su toxicidad. Este metabolito reacciona con los nucleótidos celulares y puede inducir mutaciones, uniéndose y alquilando el ADN, principalmente en la posición N7 de la guanina produciendo 8,9-dihidro-8-(N7-guanil)-9-hidroxi-AFB1. También es capaz de unirse a otras moléculas celulares tales como proteínas y otros ácidos nucleicos (Rawal *et al.*, 2010).

Esta biotransformación de la aflatoxina es de tal importancia para que se ejerza el efecto tóxico, que un buen ejemplo de esto es la especial sensibilidad a la toxicidad de las aflatoxinas en los pavos, el P450 del hígado de los pavos es muy eficiente en esta

biotransformación, 3.5 veces mas eficiente que el P450 del pollo, esto explica en parte, la susceptibilidad de esta especie a la intoxicación con aflatoxina (Klein *et al.*, 2000; Rawal *et al.*, 2011).

Después de la ingestión, el metabolismo de la aflatoxina en pavos y humanos es mediado por las enzimas CYP1A2 y CYP3A4, en pollos esto se lleva a cabo por sus homólogos CYP1A5 y CYP3A37, por otro lado homólogos de la enzima CYP1A producen el metabolito destoxificado llamado aflatoxina M1 (AFM1), mientras tanto la CYP3A también produce otro metabolito destoxificado la aflatoxina Q1 (AFQ1), otros homólogos tanto de CYP1A Y CYP3A producen un tercer metabolito destoxificado llamado aflatoxicol, éste es de suma importancia por que se considera un metabolito de almacenaje en su forma no toxica con la posibilidad de revertir después a su forma toxica AFB1-8,9-exo-epoxido (AFBO) (Guengerich *et al.*, 1998; Rawal *et al.*, 2011). Mientras que en su forma activa AFB1-8,9-exo-epoxido (AFBO) se une a diversas biomoleculas, la vía principal de destoxificación de las aflatoxinas es por la conjunción al glutatión formando el aducto aflatoxin-glutation (AFB-GSH) que se excreta principalmente por la vía biliar, esta reacción es catalizada por una serie de enzimas llamadas Glutation-S-Tranferasas (GST) que son una familia de proteínas diméricas con múltiples funciones de destoxificación (Rawal *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2013).

Por otro lado existe evidencia suficiente que la conjugación del epóxido (AFBO) por medio de la GSH es el factor determinante para la susceptibilidad a la aflatoxina en las diferentes especies, mas importante aun que la activación por parte del P450, por ejemplo: Los ratones son muy resistentes a la intoxicación con AFB, sin embargo el P450 es muy eficiente en la activación de la misma; sin embargo, su GSH también es muy eficiente en la destoxificación a diferencia del pavo que tiene deficiencias en GSH, esto hecho explica en parte la susceptibilidad especial de los pavos a la intoxicación por AFB. En general las aves tienen deficiencias en la destoxificación por GSH y son muy eficientes en la transformación o activación de la AFB por parte del complejo citocromo P450 (Hayes *et al.*, 1991; Guengerich *et al.*, 1998; Klein *et al.*, 2000).

1.3.4 Interacciones de las aflatoxinas con las biomoléculas.

-Ácidos Nucleicos.

Los heteroátomos nucleofílicos como el nitrógeno y el oxígeno de las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos son susceptibles a los ataques electrofílicos por parte de metabolitos de las aflatoxinas formando aductos covalentes. Posteriormente a la transformación de la aflatoxina al AFB1-8,9-exo-epoxido (AFBO), este metabolito realiza un ataque electrofílico a la posición N7 de la guanina del ADN y ARN, formando 8,9-dihidro-8-(N7-guanil)-9-hidroxi-AFB1 (AFB1-N7-Gua), que se considera el principal aducto formado a partir de la AFB1; sin embargo, existen otros metabolitos de la AFB1 que producen aductos con los ácidos nucleicos como es el formado por la AFM1 (AFM1-N7-Gua). Cualquier alteración en la estructura de los ácidos nucleicos (ADN y ARN) provocada por estos aductos, dan como resultado principalmente: la interrupción de la transcripción de ADN y ARN, errores en la transcripción y traducción de los ácidos nucleicos que se traducen en mutagénesis y disminución de la síntesis proteica, entre otros (Bedard *et al.*, 2006).

-Proteínas.

Las proteínas son importantes componentes celulares estructurales y funcionales, estas pueden actuar como receptores celulares, por poseer átomos de nitrógeno, oxígeno y azufre nucleofílicos, en sus grupos funcionales (Hsieh, 1987). La estructura y actividad de las proteínas puede ser alterada por las aflatoxinas, tanto por uniones no específicas irreversibles (covalentes) que resultan en cambios conformacionales y en el bloqueo de sitios de acción y en uniones no específicas reversibles (no covalentes) que actúan como reservorio de la toxina, prolongando su tiempo de exposición, o como transportadores de metabolitos activos en la célula (Ch'ih y Devlin, 1984; Hsieh, 1987).

Ch'ih y Devlin en el año 1984 proponen la existencia de proteínas citoplasmáticas que se unen a las aflatoxinas, que en la entrada a la célula éstas mismas traslocan a la aflatoxina a los microsomas para su activación, ya activada la aflatoxina es también traslocada a varios sitios celulares, entre estos el núcleo y la mitocondria. En estudios recientes se han encontrado unión de la aflatoxina a proteínas de diversa índole como ejemplo (piruvato

cinasa, albúmina, anhidrasa carbónica, RNAsa pancreática y a histonas) (McLean y Dutton, 1995).

La unión de las aflatoxinas a diversas proteínas funcionales puede inhibir su actividad, particularmente en el caso de enzimas, si la síntesis de la proteína no está afectada las proteínas no funcionales serán remplazadas por nuevas proteínas sintetizadas, esto conlleva un gasto de nutrientes para la célula. Por otro lado, si las proteínas involucradas en vías biosintéticas, en neurotransmisión, funciones hormonales, transporte de membrana e inmunidad, son afectadas por la unión con las aflatoxinas, estos son factores críticos para entender algunos de los efectos bioquímicos y fisiológicos de las aflatoxinas (McLean y Dutton, 1995).

1.3.5 Inhibición de la síntesis del ATP.

La inhibición de la producción de energía a nivel celular es uno de los efectos más importantes en la aflatoxicosis, y este efecto se produce por múltiples vías, la primera es la interferencia con el metabolismo de la glucosa en la célula, tanto en la disminución de la actividad de la glucógeno-sintetasa encargada de la formación del glucógeno, como en la actividad de la fosfoglucomutasa que cataliza la transferencia del grupo fosfato desde el carbono 1 de la glucosa-1-fosfato al carbono 6 de la glucosa-6-fosfato para posteriormente transformarse en piruvato e ingresar al ciclo de los ácidos tricarbóxicos (Bbosa *et al.*, 2013). Por otro lado, las aflatoxinas actúan en el sistema de transporte de electrones en la fosforilación oxidativa, inhibiendo el transporte de electrones entre los citocromos b y c o c1 y también inhibiendo la actividad de la citocromo oxidasa (Doherty y Campbell, 1972). Adicionalmente las aflatoxinas interactúan con el DNA mitocondrial modificándolo así como con las proteínas mitocondriales (Ch'ih y Devlin, 1984; Hsieh, 1987).

La inhibición de la fosforilación oxidativa tiene como resultado la depleción del ATP celular y como consecuencia los gradientes de sodio y potasio son afectados traduciéndose en la hinchazón celular y mitocondrial (Hsieh, 1987, Bbosa *et al.*, 2013).

1.3.6 Inhibición de la síntesis del ADN y ARN.

La inhibición o alteración de los ácidos nucleicos es el principal efecto de las aflatoxinas, muchos de los demás efectos son consecuencia directa o indirecta de este. La inhibición de la síntesis de ADN en el hígado ocurre a concentraciones de toxina que aparentemente no inhiben la síntesis de ARN o proteínas, esto sugiere que la interferencia en la síntesis de ADN es el principal efecto bioquímico (Hsieh, 1987). Al parecer, la aflatoxina bloquea la iniciación de la replicación del ADN más que al proceso de elongación, esto puede ser resultado de la unión covalente de las aflatoxinas al ADN y a ciertas proteínas involucradas en este proceso, principalmente a las enzimas involucradas en la síntesis de ADN. Por otro lado, la unión de las aflatoxinas a las proteínas de membrana, puede reducir la entrada de timidina y otros precursores de nucleótidos necesarios para la síntesis del ADN (McLean y Dutton, 1995).

La síntesis de ARN también es afectada por las aflatoxinas, y esto sucede en diversos niveles, la aflatoxina inhibe la síntesis del ARN ribosomal (rARN), así como del ARN mensajero (mARN), esta inhibición es principalmente por dos vías, la primera es la reducción de la traducción del ADN y la segunda por la inhibición de la actividad enzimática de la ARN polimerasa II que es la responsable de la síntesis del mARN (Clifford *et al.*, 1967; Yu, 1977). Por otro lado Yu (1981) sugiere que la aflatoxina interfiere con la elongación de la cadena del ARN, adicional a esto la unión de la aflatoxina a las proteínas cromosomales como son las histonas, puede jugar un papel importante en la inhibición de la producción de los ácidos nucleicos.

Las alteraciones en los ácidos nucleicos por parte de las aflatoxinas son de una vital importancia para entender muchos de los efectos sistémicos de las mismas. Por otro lado estas alteraciones son de tal importancia, que los efectos se observan morfológicamente como cambios en la ultraestructura de los componentes del núcleo y nucléolo, generando una redistribución gradual de estos mismos, que se traduce en la segregación granular y fibrilar, y la fragmentación de los mismos que dan como resultado manifestaciones nucleares observables al microscopio (Yu , 1977).

1.3.7 Inhibición de la síntesis de proteínas.

La inhibición de la síntesis proteica mediada por las aflatoxinas es el resultado de varios mecanismos de acción, directamente por la alteración o inactivación de enzimas biosintéticas o indirectamente por la alteración del ADN, tanto en su estructura, como en la inhibición de la transcripción y aunado a esto, la inhibición de la síntesis de ARN ribosomal y mensajero, y por último y no menos importante la interferencia en el transporte de nutrientes como son los aminoácidos (Hsieh , 1987).

1.3.8 Alteración del metabolismo de los lípidos.

Es bien conocido que las aflatoxinas producen acumulación de lípidos en el hígado, esta condición se le conoce como cambio grasoso o lipidosis hepática y es una lesión que comúnmente se asocia a la aflatoxicosis, en general esta acumulación es el resultado de dos efectos principalmente, la disminución del transporte de lípidos y la alteración en la biosíntesis de los mismos, estos dos efectos ocurren en contenidos de aflatoxinas en la dieta que no tienen efecto en el crecimiento ni en la síntesis de ARN (Hsieh, 1987). En los pollos la disminución en el transporte de los lípidos por las aflatoxinas, se relaciona principalmente a la disminución en la cantidad de los transportadores (proteínas) y a la disminución del metabolismo de los ácidos nucleicos lo que afecta tanto a ácidos grasos como a triglicéridos. Por otra parte, la alteración de la función mitocondrial como la que se observa comúnmente en presencia de las aflatoxinas y sus metabolitos, resulta en el decremento de la oxidación de los ácidos grasos lo que lleva a una acumulación de lípidos en los hepatocitos, aunado a esto también la alteración de las enzimas involucradas en la biosíntesis de los lípidos se ve afectada por la presencia de las aflatoxinas (Tung *et al.*, 1972; Donaldson *et al.*, 1972).

1.4 Estrategias de control para el problema de las micotoxinas.

A lo largo de los años se han utilizado diversos métodos de control para el problema de las micotoxinas, estos métodos de control son de diversa índole y se pueden clasificar en las siguientes categorías:

- Métodos físicos.
- Métodos biológicos.
- Métodos químicos.

1.4.1 Métodos físicos.

Los métodos físicos para la descontaminación de las aflatoxinas se dividen en dos rubros principalmente:

Radiación.

La radiación se clasifica en radiación ionizante y radiación no-ionizante. La radiación ionizante como son los rayos gamma, X y ultravioleta, producen cambios moleculares con un aumento en la temperatura mínimo o virtualmente nulo; sin embargo, estos cambios moleculares pueden ser dañinos para los organismos vivos. Por el contrario, la radiación no-ionizante como son: las ondas de radio, microondas, radiación infrarroja y la luz visible, en cantidad suficiente provocan una elevación de la temperatura usualmente acompañada con cambios moleculares que no son riesgosos para el hombre y los animales (Rustom, 1997). El uso de la radiación ionizante es un tema controversial para la salud del hombre y de los animales; sin embargo, su uso en la eliminación de microorganismos patógenos se ha estado utilizado en los últimos años (Kyzlink, 1990).

La radiación ultravioleta se ha utilizado como medio de descontaminación, ya que las aflatoxinas son sensibles a ellas, la AFB1 absorbe la radiación ultravioleta a los 362 nm, produciendo cerca de 12 productos foto-degradados (Samarajeewa *et al.*, 1990), al parecer estos productos foto-degradados no son tóxicos como lo demostró Gamage *et al.* (1990) quienes utilizaron aceite de coco contaminado con aflatoxina B1 y expuesto a la radiación solar, en patos de un día de edad, por un periodo de 7 días y no encontraron alteraciones en

peso, mortalidad y cambios histológicos. Por otro lado se reportan disminuciones de entre 60-75% en el contenido de aflatoxinas totales y entre el 61 y 76% de aflatoxina B1 en alimento para pollos contaminado y expuesto a la radiación solar por cerca de 30 horas (Herzallah *et al.*, 2008).

Otro tipo de radiación que se ha utilizado para la descontaminación de alimentos con aflatoxinas son los rayos gamma. Ghanem, *et al.* (1997) encontraron que al utilizar radiación gamma sobre diferentes alimentos contaminados con aflatoxina B1 a dosis de 4, 6 y 10 kiloGrays, la degradación de la aflatoxina llegó a ser de 87.8% para cacahuete y 84.0% en maíz, encontrando una correlación negativa entre contenido de aceite y la degradación. La presencia de agua también tiene un papel importante en la destrucción de la aflatoxina por la radiación gamma, ya que la radiólisis del agua conduce a la formación de radicales libres altamente reactivos. Estos radicales pueden atacar fácilmente AFB1, en el anillo furano terminal, produciendo productos de menor actividad biológica (Van Dyck *et al.*, 1982), asociado a esto Patel *et al.* (1989) utilizaron una combinación sinérgica de rayos gamma y peróxido de hidrogeno logrando reducir la dosis de radiación gamma hasta en un 25%, solamente con la incorporación de peróxido de hidrogeno.

El uso de radiación no-ionizante también se ha investigado, pero aunque son mucho menos riesgosas para la salud humana y animal, no presentan los mismos resultados que la ionizante. Herzallah *et al.* (2008), utilizaron microondas para descontaminar alimento de pollo, y realizaron la comparación con otras radiaciones y las microondas mostraron los menores niveles de descontaminación, ya que obtuvieron solo niveles de entre 21 y el 33% de inactivación de la aflatoxina B1 en concordancia con los estudios de Samarajeewa *et al.*, (1990).

Compuestos adsorbentes o secuestrantes.

Estos métodos se centran en la eliminación de micotoxinas por diferentes adsorbentes añadidos a las dietas contaminados por micotoxinas con la finalidad de que sean eficaces en el tracto gastro-intestinal, estos tratamientos son más de carácter profiláctico que terapéutico. En la actualidad la utilización de adsorbentes de micotoxinas es la forma más

aplicada y extendida de proteger a los animales contra los efectos nocivos las mismas (Rustom, 1997).

La discusión general para los diferentes adsorbentes se ha enfocado principalmente en sus propiedades de eficiencia, especificidad y el proceso o método de adsorción, el rasgo más importante de un adsorbente es su estructura molecular o física, por ejemplo, la carga eléctrica, la distribución de esa carga, el tamaño del poro y el área activa. Por consiguiente otras propiedades como la polaridad, la solubilidad, la forma de la partícula y la constante de disociación, son también características de suma importancia. Por lo tanto la investigación de cada una de estas características en los diversos adsorbentes y su eficacia en la absorción se han llevado a cabo en los últimos años (Huwig *et al.*, 2001). A continuación se listan algunos de los adsorbentes más comúnmente usados y algunas de sus propiedades.

-Carbón activado.

El carbón activado que se forma por pirólisis de la materia orgánica, es un polvo no soluble muy poroso con elevada superficie con respecto a la masa (500-3500 m²/g). Desde el siglo XIX se ha utilizado como un antídoto contra el envenenamiento. Por esta razón, también podría inactivar a las micotoxinas. En solución acuosa, puede adsorber la mayor parte de las micotoxinas eficientemente, sin embargo el carbón activado posee poco o incluso ningún efecto contra la micotoxicosis. Edrington *et al.* (1997) utilizaron carbón súper activado para reducir los efectos tóxicos de aflatoxina en pollo de engorda y no encontraron efectos positivos en su uso. Esto puede ser debido al hecho de que el carbón activado es un adsorbente no específico y en consecuencia, los nutrientes esenciales también son adsorbidos en particular si sus concentraciones en el alimento son mucho más altas en comparación con los de la micotoxina. En ensayos con cabras, se ha demostrado que altas dosis de carbón activado son benéficas en una situación de envenenamiento agudo en relación con la ingesta de altas cantidades de aflatoxinas (Hatch *et al.*, 1982).

-Silicatos.

Los silicatos se dividen en subclases según su estructura, zeolitas, HSCAS (aluminosilicatos de sodio y calcio hidratados) y arcillas todos estos consisten en aluminatos, silicatos y algunos iones intercambiables de metales, principalmente alcalinos e iones de metales alcalinotérreos (Huwig *et al.*, 2001).

Las zeolitas están compuestas de tetraedros de SiO_4 y AlO_4 como dos bloques fundamentales de construcción con el átomo del metal en el centro de cada tetraedro. Las zeolitas son similares a tamices moleculares, así como las resinas de intercambio iónico y son adecuadas para la distinción de diferentes moléculas por tamaño, forma y carga (Huwig *et al.*, 2001).

Los aluminosilicatos de sodio y calcio hidratados (HSCAS) a diferencia de los aluminosilicatos naturales poseen una mayor capacidad de adsorción al tratarse de productos más refinados. En su estructura además de iones aluminio se intercalan otros iones como el calcio o el sodio aumentando la distancia entre los iones silicio y mejorando la capacidad de adsorción (Ramos *et al.*, 1997; Miazzi *et al.*, 2000).

Los HSCAS pueden adsorber selectivamente a la aflatoxina durante el proceso digestivo, lo que hace que gran parte de la aflatoxina no sea disponible para la absorción en el tracto gastrointestinal (Kubena *et al.*, 1990). La quimoadsorción de la aflatoxina por parte de los HSCAS implica la formación de un complejo entre el sistema α -ceto-lactona o bilactona de la aflatoxina y los iones metálicos no coordinados en los HSCAS (Sarr *et al.*, 1990). Phillips *et al.* (1988) añadieron HSCAS en un contenido de 0.5% a las dietas de pollo que contenían 7.5 mg/kg de aflatoxina B1, los efectos inhibitorios de la aflatoxina sobre el crecimiento de las aves fueron significativamente disminuidos. En otro estudio se alimentaron pollos de engorda por 21 días a un contenido de 5 mg/kg de aflatoxinas totales y se utilizaron HSCAS comerciales, al final de experimento se observó una mejora en el consumo, la conversión alimenticia y la mortalidad (Kubena *et al.*, 1998).

-Otros adsorbentes.

Debido a las limitaciones de adsorción mineral, muchos estudios se han llevado a cabo durante la última década en adsorbentes biológicos, tratando de obtener una mayor eficacia y especificidad y al mismo tiempo reducir el impacto en la calidad nutricional en comparación con adsorbentes minerales.

-Levaduras o extractos de levadura.

Por varios años se han utilizado diversas levaduras y productos derivados de ellas, un ejemplo de esto es *Saccharomyces cerevisiae* que ha demostrado tener la capacidad de unirse a la AFB1 (Shetty y Jespersen, 2006) y reducir los efectos nocivos de AFB1 en las dietas de pollos de engorda (Stanley *et al.*, 1993). Por otro lado se han usado también las levaduras termo-lisadas y estas también han demostrado efectividad contra la aflatoxicosis. Sin embargo, los estudios se han enfocado en la utilización de las paredes celulares de *Saccharomyces cerevisiae* que son la porción de la levadura que une más aflatoxina (Santin *et al.*, 2003; Stanley *et al.*, 1993; Shetty y Jespersen, 2006), así como subproductos derivados de la levadura, por ejemplo, el polímero de glucomanano esterificado extraído de la pared celular de la levadura mostró unión con AFB1. Las adiciones de glucomanano esterificado en 0.2 g/kg a dietas que contenían 1000 ng/g de aflatoxinas totales, resultaron en mejoras en los parámetros productivos y en la inmunidad en pollos de engorda en comparación a los grupos que no recibieron la adición del glucomanano (Santin *et al.*, 2003). Karaman *et al.* (2003) utilizaron glucomananos obtenidos de levaduras a contenidos de 0.5 g/kg y 1.0 g/kg en un alimento que contenía 2.0 mg/kg de aflatoxinas totales en pollos de engorda por un lapso de 21 días y los pollos que recibieron la dosis de 1.0 g de glucomananos presentaron lesiones macroscópicas y microscópicas menos severas que el grupo tratado solo con aflatoxina.

1.4.2 Métodos biológicos.

El uso de procesos químicos y físicos para descontaminar los alimentos está limitado por altos costos, pérdida de calidad nutricional, poca eficiencia, baja especificidad y la resistencia de los consumidores a utilizar sustancias químicas, por todas estas razones los científicos se han puesto a favor de la destoxificación de micotoxinas por transformación biológica, que puede ser definida como degradación o transformación enzimática de las micotoxinas (tanto por los microorganismos completos o por enzimas) en compuestos menos tóxicos (Wu *et al.*, 2009).

Una amplia gama de microorganismos tales como bacterias, hongos y levaduras han demostrado su capacidad para biotransformar micotoxinas. Entre estos microorganismos encontramos *Trichosporon mycotoxinivorans*, *Rhizopus sp*, *Sporotrichum sp* y *Alternaria sp* (Hwang *et al.*, 1994; Varga *et al.*, 2000; Halasz *et al.*, 2009)

La eliminación y la desintoxicación de AFB1 por transformación se han investigado durante muchos años. Desafortunadamente, pocos estudios se han llevado a la identificación del producto transformado. Una de las primeras bacterias estudiadas por su capacidad para eliminar AFB1 fue *Flavobacterium aurantiacum* (también conocido como *Nocardia corynebacterioides*). Una muestra contaminada con aflatoxinas y *F. aurantiacum* NRRL B-184 se mezclaron entre sí y se incubaron a 28°C durante 12 horas, toda la aflatoxina G se retiró, así como una parte de la aflatoxina B (Ciegler *et al.*, 1966). La misma bacteria se utilizó para descontaminar alimento de pollo y se encontraron diferencias significativas en peso y aflatoxina residual en hígado, así como cambios histopatológicos en los grupos que recibieron el alimento tratado con la bacteria y la aflatoxina (Tejada-Castaneda *et al.*, 2008), *Rhodococcus sp* es también una bacteria que ha demostrado degradar con bastante eficiencia a varias micotoxinas entre ellas incluida la aflatoxina B1 (Cserhádi *et al.*, 2013). Por otro lado, el uso de *Bacillus subtilis* para descontaminar dietas con aflatoxina en pollos de engorda también resultó en buenos resultados (Fan *et al.*, 2013).

Recientemente se han utilizado estrategias que combinan varios microorganismos y enzimas de los mismos para destoxificar alimentos contaminados con aflatoxina. Zuo *et al.* (2013), utilizaron *Lactobacillus casei*, *Bacillus subtilis* y *Pichia anomala* en combinación de una

enzima que degrada aflatoxina proveniente de *Aspergillus oryzae*, todo esto en una combinación para crear un aditivo para el alimento de pollos de engorda, los resultados mostraron que con la suplementación del aditivo al 0.15% en las dietas de los pollos, se observaron mejoras en los parámetros productivos y residuos de aflatoxina en tejidos.

1.4.3 Métodos químicos.

-Oxidación.

Algunos agentes oxidantes como el ozono y el peróxido de hidrógeno se han utilizado para hacer alimentos contaminados con micotoxinas inofensivos. Agentes oxidantes químicos pueden reaccionar con numerosos grupos funcionales. McKenzie *et al.* (1998) demostraron que un tratamiento de maíz contaminado con O₃ producido electroquímicamente, brindó protección contra la aflatoxina B1 en pavos jóvenes.

-Reducción.

Agentes reductores como el ácido ascórbico, bisulfito sódico (NaHSO₃), tiosulfato de sodio (Na₂S₂O), se han utilizado para la reducción de aflatoxinas y deoxynivalenol (DON) (Kabak *et al.*, 2006). El bisulfito de sodio transforma a DON en DON-sulfonato, que es menos tóxico y se reportó como una herramienta eficaz para disminuir los efectos nocivos de DON en lechones (Dänicke *et al.*, 2005).

- Amoniación (Amoniolisis).

La amoniación del maíz, se ha utilizado principalmente para disminuir el nivel de aflatoxinas en los alimentos, es un método eficaz para la desintoxicación de alimentos, este método ha estado en uso desde hace varios años (Park *et al.*, 1988). Este proceso es particularmente efectivo contra AFB1 cuando se lleva a cabo a alta temperatura y presión. Uno de los productos de degradación es AFD1, menos tóxica que la aflatoxina B1. Sin embargo, este método costoso no es eficaz contra otras micotoxinas y puede dañar la calidad de los alimentos debido a un excesivo nivel de amoníaco en el alimento en cuestión (Park *et al.*, 1988).

-Alcalinización.

Bajo condiciones alcalinas, la estructura de algunas de las micotoxinas puede cambiar, algunos autores han puesto a prueba la eficacia de la nixtamalización, un tratamiento térmico alcalino tradicional del maíz ampliamente utilizado para la fabricación de tortillas que consiste en la cocción del maíz en agua hirviendo agregando hidróxido de calcio, este tratamiento ha demostrado reducir los niveles de aflatoxina hasta en un 92% en el producto terminado. (Elias-Orozco *et al.*, 2002; Méndez-Albores *et al.*, 2004a). Sin embargo, se ha descubierto que este tratamiento puede ser revertido cuando el producto es acidificado, la acidificación de los subproductos de la aflatoxina, pueden revertir la toxicidad de los mismos (Méndez-Albores *et al.*, 2004b).

-Acidificación.

El tratamiento de las aflatoxinas con ácidos fuertes destruye la actividad biológica de AFB1 y AFG1 mediante la conversión a la forma hemiacetal AFB2a y AFG2a respectivamente, debido a la adición de agua, catalizada por el ácido a través del doble enlace en el anillo de furano, lo que se traduce en pérdida de la fluorescencia y la toxicidad. Por otro lado varios autores han utilizado ácidos orgánicos para catalizar esta reacción y han obtenido resultados importantes (Méndez-Albores *et al.*, 2007; Salgado-Tránsito *et al.*, 2011.).

-Otros productos químicos.

Otros productos químicos, incluyendo formaldehído, etanol acuoso, cloruro de sodio y diversos compuestos que contienen azufre tales como dióxido de azufre, han reportado ser eficaces en la destrucción de varias micotoxinas. Por otro lado, no hay investigación adecuada que se haya llevado a cabo para examinar la eficacia y la aplicabilidad de estos tratamientos.

A pesar de que estos productos químicos demostrado ser eficaces en la destrucción de diversas micotoxinas, no cumplen plenamente con los lineamientos impuestos por la FAO, en especial las relativos a la seguridad de los productos de reacción y la conservación de las propiedades nutricionales y organolépticas de los alimentos tratados, por lo que su uso está restringido (Galvano *et al.*, 2001).

1.5 Ácidos orgánicos.

1.5.1 Generalidades.

Como un grupo de sustancias químicas, se consideran como ácidos orgánicos todos los ácidos carboxílicos, en estos también se incluyen los ácidos grasos y los aminoácidos, y todos los ácidos con la estructura general R-COOH. Todos estos compuestos tienen una gran diversidad de usos y aplicaciones, por ejemplo los ácidos orgánicos que tienen una actividad antimicrobiana son principalmente los de cadena corta (C1-C7), como el fórmico, acético, propiónico, butírico y también los que tienen un grupo hidroxilo (usualmente en el carbono alfa) como el láctico, el málico, el tartárico y el cítrico, algunos de estos ácidos han demostrado beneficios en el crecimiento de los animales, Los ácidos orgánicos son ácidos débiles y se disocian sólo parcialmente. Muchos de los ácidos orgánicos con efectos benéficos sobre el rendimiento de los animales también son conocidos por ser eficaces conservadores de alimentos. La magnitud de sus efectos antimicrobianos varía de un ácido a otro y depende de la concentración y el pH (Dibner, 2002). Así como su pKa que es la fuerza que tienen las moléculas de disociarse (es el logaritmo negativo de la constante de disociación ácida de un ácido débil, $pK_a = -\log K_a$) Una forma conveniente de expresar la relativa fortaleza de un ácido es mediante el valor de su pKa, que permite ver de una manera sencilla en cambios pequeños de pKa los cambios asociados a variaciones grandes de Ka. Valores pequeños de pKa equivalen a valores grandes de Ka (constante de disociación) y, a medida que el pKa decrece, la fortaleza del ácido aumenta. Un ácido será más fuerte cuanto menor es su pKa. En la Tabla 1.1 se enlistan algunos de los ácidos orgánicos y sus propiedades.

Tabla 1.1. Algunos ácidos orgánicos y sus propiedades

Acido	Nombre químico	Formula	pKa
Fórmico	Ácido Fórmico	HCOOH	3.75
Acético	Ácido Acético	CH ₃ COOH	4.76
Propiónico	Ácido 2-Propanoico	CH ₃ CH ₂ COOH	4.88
Butírico	Ácido Butanoico	CH ₃ CH ₂ CH ₂ COOH	4.82
Láctico	Ácido 2-Hidroxipropanoico	CH ₃ CH(OH)COOH	3.83
Sórbico	Ácido 2,4-Hexadienoico	CH ₃ CH:CHCH:CHCOOH	4.76
Fumárico	Ácido 2-Butenodioico	COOHCH:CHCOOH	3.02
Málico	Ácido Hidroxibutenodioico	COOHCH ₂ CH(OH)COOH	3.40
Tartárico	Ácido 2,3-Dihidroxi- Butenodioico	COOHCH(OH)CH(OH)COOH	2.93
Cítrico	Ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico	COOHCH ₂ C(OH)(COOH)CH ₂ COOH	3.13

1.5.2 Funciones y usos de los ácidos orgánicos.

Los ácidos orgánicos se han utilizado durante décadas en la conservación de los alimentos, la protección de los alimentos de la destrucción microbiana y fúngica o para aumentar el efecto de conservación de alimentos fermentados, por ejemplo, ensilajes. En particular, el ácido fórmico y el ácido propiónico se han utilizado ampliamente para este propósito (Kyzlink, 1990).

Experimentos con cerdos han mostrado que diversos ácidos orgánicos, incluyendo el ácido cítrico, el ácido fumárico, el ácido fórmico y el ácido propiónico tienen una influencia positiva en el crecimiento (Partanen y Mroz, 1999). Se ha informado de que el efecto nutritivo de los ácidos orgánicos es más pronunciado en los cerdos recién destetados (Gabert y Sauer, 1994; Roth y Kirchgessner, 1998), que a menudo sufren de trastornos digestivos resultantes en diarrea relacionada con infecciones por *E. coli*. La acidificación de la dieta aumenta la proteólisis gástrica y la digestibilidad de los aminoácidos. Se ha demostrado que el anión ácido forma complejos con Ca, P, Mg y Zn, que se traducen en una mejor digestibilidad de estos minerales. Además, los ácidos orgánicos sirven como sustratos en el metabolismo intermediario (Kirchgessner y Roth, 1988).

En la producción avícola, los ácidos orgánicos no han ganado tanta atención como en la producción porcina. Una razón para esto puede ser que los resultados en cuanto al aumento de peso y la conversión alimenticia después de la adición en la dieta de ácidos orgánicos no son tan convincentes como los resultados de la producción porcina (Langhout, 2000). Sin embargo, una influencia positiva ya sea en el índice de conversión o del crecimiento ha sido reportado para el ácido fumárico, el ácido propiónico, el ácido sórbico y el ácido tartárico (Samanta *et al.*, 2010; Ao *et al.*, 2010).

Un objetivo muy importante de la acidificación de la dieta es la inhibición de las bacterias intestinales que compiten con el huésped por los nutrientes disponibles, y una reducción de los metabolitos bacterianos posiblemente tóxicos, por ejemplo el amoniaco y aminos, lo que se traduce en una mejora de la ganancia de peso del animal huésped. La inhibición del crecimiento de bacterias potencialmente patógenas, *E. coli* y *Salmonella*, en la alimentación y en el tracto gastrointestinal tienen un beneficio con respecto a la salud animal. En la

producción avícola los ácidos orgánicos, principalmente se han utilizado con el fin de disminuir o erradicar los problemas con las infecciones de *Salmonella*, *Campylobacter* y *Clostridium* (Chaveerach *et al.*, 2004; Biggs y Parsons, 2008; Dahiya, 2006).

1.5.3 Efectos y mecanismos de acción de la actividad antimicrobiana de los ácidos orgánicos

En general, los sitios de acción de los ácidos orgánicos sobre las bacterias son: la membrana citoplasmática, el citoplasma y funciones metabólicas específicas asociadas con la replicación, la síntesis de proteínas, los procesos enzimáticos y el ADN (Cherrington, 1991).

Aunque han sido ampliamente estudiados, los mecanismos antibacterianos para los ácidos orgánicos no están completamente elucidados, ya que los mismos son capaces de exhibir propiedades bacteriostáticas y bactericidas dependiendo de diversos factores (Ricke, 2003).

Dada la naturaleza de ácido débil de la mayoría de estos compuestos, el pH se considera como un factor determinante en la eficacia, ya que afecta a la concentración de ácido no disociado, por lo que la importancia de un pH bajo sobre la actividad antimicrobiana de ácidos orgánicos puede explicarse por su efecto sobre la disociación del ácido. A pH bajo, la mayor parte del ácido orgánico estará en la forma no disociada. Los ácidos orgánicos no disociados son lipofílicos y pueden difundir a través de las membranas celulares. Una vez dentro de la célula bacteriana, el pH más alto del citoplasma provoca la disociación del ácido en aniones y protones, y la resultante reducción en el pH del citoplasma y los contenidos celulares lo que se traduce en la interrupción de las reacciones enzimáticas, el metabolismo de macromoléculas y los sistemas de transporte de nutrientes. El transporte del exceso de protones consume adenosin-trifosfato (ATP) lo que se traduce en el agotamiento de la energía celular (Ricke, 2003; Cherrington, 1991).

En general, la actividad enzimática se reduce en pH bajos y este es un efecto secundario de la acidificación del citoplasma, autores reportan que en presencia de ácidos orgánicos se inhiben enzimas como la glucosa-fosfato deshidrogenasa, la piruvato cinasa, la lactato deshidrogenasa, entre otras, esto refleja la sensibilidad específica de las enzimas a los cambios en el pH (Cherrington, 1991). Por otro lado la síntesis de macromoléculas se ve

afectada por la acidificación, autores reportan que en presencia de ácidos orgánicos la síntesis proteica, la síntesis de ADN y ARN se ve disminuida, esto refleja la sensibilidad de las enzimas biosintéticas a los cambios del pH. En cuanto al ADN, Cherrington (1990) sugirió que el anión del ácido puede interferir con la conformación de la molécula de ADN mediante la interacción con las cargas de iones alrededor de ella. Las diferencias en la estructura de estos aniones, podrían explicar las diferencias en la actividad de los ácidos orgánicos con un mismo o similar pK.

1.5.4 Efectos más allá de la actividad antimicrobiana de los ácidos orgánicos.

¿Los ácidos orgánicos actúan sólo a través de la actividad antimicrobiana o hay otros aspectos beneficiosos? Ciertamente, muchos de los efectos de los ácidos orgánicos se encuentran bien reportados anteriormente, como son la mejora de la digestibilidad de la proteína y los aminoácidos, la reducción del amoníaco y la producción de aminas biogénas, estos efectos también se observan con antibióticos promotores del crecimiento. Sin embargo, otros efectos se han reportado con ácidos orgánicos que sugieren beneficios más allá de la modificación de la microbiota intestinal. Estos efectos incluyen otros beneficios asociados a la acidificación, incluyendo mejoras en la actividad de las enzimas digestivas como el aumento en la conversión del pepsinógeno a pepsina, la actividad de la fitasa microbiana, y el aumento de la secreción pancreática. Finalmente, existe evidencia de aumento en el crecimiento de la mucosa gastrointestinal en presencia de ácidos orgánicos tal como el ácido butírico entre otros (Ricke, 2003).

1.5.5 Efectos de los ácidos orgánicos sobre las micotoxinas.

Los usos y efectos que tienen los ácidos orgánicos sobre las aflatoxinas son variados, se han utilizado a varios niveles, desde su uso como inhibidores del crecimiento microbiano en los granos y alimentos almacenados, para prevenir la producción de toxinas producidas por estos microorganismos, Singh (1987) utilizó ácidos orgánicos solos y en mezclas, para inhibir el crecimiento de especies toxigénas de hongos y encontró que utilizando los ácidos orgánicos a una concentración de 5% a los 6 meses de almacenaje se inhibió al 100% la colonización de los granos por hongos y a los 8 meses se redujo al 80%.

Los ácidos orgánicos también se han utilizado para descontaminar los granos y alimentos ya contaminados, Méndez-Albores *et al.* (2007) reportaron niveles de 87% de descontaminación de aflatoxinas utilizando ácido cítrico en alimento para patos. Por otro lado también se reporta que los ácidos orgánicos tienen propiedades antimutágenas, Lankaputhra (1998) utilizó bacterias productoras de ácidos orgánicos para disminuir la mutagenicidad de varios mutágenos, entre ellos la aflatoxina, y obtuvo niveles de hasta 50% de disminución en la mutagenicidad para la misma.

Como se puede observar el problema de la contaminación de granos y alimentos por las aflatoxinas, es de suma importancia en la industria avícola, como anteriormente se mencionó, se han utilizado diversos métodos para el control de este problema, sin embargo el uso de mezclas de ácidos orgánicos administrados en el agua de bebida para el control de la aflatoxicosis aviar ha sido poco estudiado, y hace falta investigar el uso correcto de este método de control, con el fin de encontrar mejoras en los parámetros productivos, como son el índice de conversión alimenticia, el consumo de alimento y la tasa de supervivencia.

JUSTIFICACIÓN

Debido al problema que representa la contaminación de los alimentos con aflatoxinas en la industria avícola, es de suma importancia generar estrategias que ayuden a mantener las variables productivas dentro de los estándares de la estirpe; por tal motivo, la presente investigación se llevó a cabo con el objetivo de evaluar el comportamiento de algunas mezclas de ácidos orgánicos suministradas en el agua de bebida sobre las variables productivas, la bioquímica sanguínea y la respuesta inmune de pollos de engorda alimentados con una dieta contaminada con aflatoxinas a un contenido de 100 ng/g.

OBJETIVOS

a) Objetivo general

- Evaluar el efecto de tres mezclas de ácidos orgánicos suministradas en el agua de bebida sobre los parámetros productivos, la bioquímica sanguínea, y la respuesta inmune de pollos de engorda alimentados con una dieta contaminada con aflatoxinas totales tipo B (AFB1 y AFB2) a un contenido de 100 ng/g.

b) Objetivos particulares

- Determinar el efecto de tres mezclas de ácidos orgánicos suministradas en el agua de bebida sobre los parámetros productivos de pollos de engorda alimentados con una dieta comercial.
- Valorar el impacto sobre la bioquímica sanguínea de pollos de engorda adicionados con las mezclas de ácidos orgánicos en el agua de bebida y alimentados con la dieta comercial.
- Evaluar el efecto de las mezclas de ácidos orgánicos en el agua de bebida sobre la respuesta inmune medida por el títulos de anticuerpos de pollos de engorda alimentados con la dieta comercial.
- Estimar el impacto de una mezcla de ácidos orgánicos sobre los parámetros productivos de pollos de engorda alimentados con una dieta comercial contaminada con aflatoxinas totales a un contenido de 100 ng/g.
- Determinar el efecto en la bioquímica sanguínea de pollos de engorda suplementados con una mezcla de ácidos orgánicos en el agua de bebida y alimentados con una dieta comercial contaminada con aflatoxinas totales a un contenido de 100 ng/g.
- Valorar el efecto de una mezcla de ácidos orgánicos en el agua de bebida sobre la respuesta inmune medida por el títulos de anticuerpos de pollos de engorda alimentados con una dieta comercial contaminada con aflatoxinas totales a un contenido de 100 ng/g.

HIPÓTESIS

H0 -La adición de una mezcla de ácidos orgánicos en el agua de bebida mejorará los parámetros productivos, la bioquímica sanguínea y la respuesta inmune del pollo de engorda alimentado con una dieta comercial contaminada con aflatoxinas totales a un contenido de 100 ng/g.

METODOLOGÍA

El presente trabajo de investigación se realizó en 2 fases experimentales.

5.1 Fase experimental 1

Este experimento se realizó con la finalidad de determinar cuál es la mezcla de ácidos orgánicos con mejor comportamiento en las variables evaluadas.

5.1.1 Ácidos orgánicos.

Se prepararon 3 diferentes mezclas de ácidos orgánicos (AO) a una proporción 35:60:5, respectivamente. Mezcla 1 (ascórbico-cítrico-málico), mezcla 2 (ascórbico-sórbico-málico), y mezcla 3 (ascórbico-tartárico-málico), cada una de ellas se prepararon usando ácidos orgánicos en polvo, ascórbico [5-((s)-1,2-dihidroxi-3,4-dihidroxi-2(5H)-ona], cítrico [ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico], DL-málico [ácido L-hidroxi-2,3-butanodioico], sórbico [ácido 2,4-hexadienoico] y tartárico (ácido 2,3-hidroxi-2,3-butanodioico). Todos los ácidos orgánicos fueron adquiridos a Mallinckrodt Baker (JT Baker, Xalostoc, México).

Las mezclas de ácidos orgánicos se proporcionaron a los animales en el agua de bebida a una concentración de 0.05% (p/v), el pH de agua de bebida fue de 7.79 y después de la adición de los ácidos el pH obtenido fue para la mezcla 1 (2.68), mezcla 2 (2.58) y para la mezcla 3 (2.73). Los valores de pH se determinaron con un potenciómetro modelo PC45, Conductronic S.A., Puebla, México.

5.1.2 Animales.

Se utilizaron 180 pollos de un día de edad sin sexar de la estirpe Ross 308, se mantuvieron por un periodo de 42 días (ciclo completo), con alimento y agua *ad libitum*, se dividieron en 4 grupos con 3 repeticiones por grupo quedando 15 pollos por repetición y 45 pollos por grupo, cada repetición se mantuvo en una corraleta plástica de 120 cm (largo) × 120 cm (ancho) × 40 cm (alto) (Modelo Chick-Fence, Sephnos S.A. de C.V. Celaya Gto.), en piso con una capa de 5 cm de viruta de madera limpia. Al inicio del experimento se utilizaron bebederos de iniciación tipo vitrolero (Modelo BVXX0204003 Sistemas Agropecuarios JAT

S.A. de C.V, Zapopan Jalisco), al día 14 se intercambiaron por bebederos tipo campana (Modelo AAAX0104001 Sistemas Agropecuarios JAT S.A. de C.V, Zapopan Jalisco) y se mantuvieron hasta el final del experimento. Al inicio del experimento y hasta el día 10 se utilizaron comederos de iniciación (Modelo Turbogrow-S, Sephnos S.A. de C.V., Celaya Gto.) posteriormente se intercambiaron a comederos de tolva de 11 kg (Modelo CTXX0104001 Sistemas Agropecuarios JAT S.A. de C.V., Zapopan Jalisco) hasta el final del experimento. Se utilizaron criadoras infrarrojas de gas butano para mantener a los animales en un rango de temperatura óptimo.

5.1.3 Dietas experimentales

Se utilizaron 2 dietas, inicio (1-21 d) y crecimiento (22-42d) las cuales fueron preparadas en base sorgo y se formularon de acuerdo a las recomendaciones del National Research Council (NRC, 1994). En la tabla 5.1 se muestra la composición y el análisis químico de cada una de ellas. No se utilizaron ni antibióticos, ni promotores del crecimiento, ni coocidiostatos en ninguna de las dietas.

Tabla 5.1 Ingredientes y composición de las dietas experimentales

Ingrediente (%)	Inicio (1- 21d)	Crecimiento (21-42d)
Sorgo	50.33	56.28
Pasta de soya	41.52	35.59
Aceite de girasol	3.46	3.11
Ortofosfato	1.86	1.9
Carbonato de Calcio	1.56	1.92
Sal (NaCl)	0.41	0.41
L-Lisina HCl	0.19	0.11
Clorhidrato de colina	0.1	0.1
Pre-Mezcla Vitaminica ¹	0.1	0.1
Pre-Mezcla Mineral ²	0.05	0.05
Azúcar + zinc	0.05	0.05
L-Treonina	0.03	0.03
<i>Calculado</i> ³		
EM (Kcal/Kg) ⁴	3010	3111
Proteína Cruda	24	22.5
Calcio	1	1
Fosforo total	0.5	0.5
Metionina + Cistina	1.6	1.4
Lisina	1.5	1.3
Treonina	0.97	0.85
Zinc (mg./kg.)	45	45
<i>Analizado</i>		
Proteína cruda	23.75	22.39
Calcio	1.1	1.1
Fosforo total	0.57	0.53

1 Pre-Mezcla Vitaminica aporta por kg a la dieta: Vitamina A, 12 000 IU; Vitamina D3, 2 500 IU; Vitamina E, 15 mg; Vitamina K3, 2mg; Vitamina B1, 2.25mg; Vitamina B2, 7.5 mg; Vitamina B6, 3.5mg; Vitamina B12, 0.020mg; Acido folico, 1.5mg; ácido pantoteico, 12.5mg.

2 Pre-Mezcla Mineral aporta por kg a la dieta: Cu, 8mg como CuSO₄.5 H₂O; Mn, 100mg como MnO; Fe, 80 mg como FeSO₄.H₂O; I, 1mg como dihidroyoduro etilendiamina; Se, 0.15mg como Na₂SeO₃.

3 En materia seca

4 EM: Energía metabolizable

5.1.4 Recolección de muestras y parámetros

A las aves se le proporcionó agua y alimento *ad libitum*, semanalmente se registró la cantidad de alimento ofrecido, así como al inicio del experimento y semanalmente las aves se pesaron individualmente y se registraron y calcularon los siguientes parámetros: peso vivo corporal (PV), consumo de alimento (CA), índice de conversión alimenticia (IC) y tasa de supervivencia (TS). Al final de experimento se obtuvo: suero, plasma y sangre completa para la determinación de los siguientes análisis:

Hematocrito.- Para la determinación del porcentaje de hematocrito se utilizó sangre completa con anticoagulante y tubos capilares no heparinizados de 80 microlitros los cuales se centrifugaron a 1500 g x 10 minutos y posteriormente se determinó el porcentaje de hematocrito utilizando un lector de micro-hematocrito (Modelo L-10, Solbat S.A. de C.V Puebla, Puebla).

Proteínas plasmáticas y albumina.- Para determinar la concentración de las proteínas se utilizaron kits comerciales (Proteína Total Biuret, BioSystems S.A. Barcelona España) y (Albumina, BioSystems S.A. Barcelona España) utilizando el siguiente protocolo:

Proteínas plasmáticas.

En un baño de agua a 37°C se colocaron viales de vidrio conteniendo 1 ml de una solución de R- Tartrato de sodio y potasio 15 mmol/L, yoduro de sodio 100 mmol/L, yoduro de potasio 5 mmol/L, sulfato de cobre 5 mmol/L., se prepararon 3 muestras:

Blanco: 1 ml de una solución de R- Tartrato de sodio y potasio 15 mmol/L, yoduro de sodio 100 mmol/L, yoduro de potasio 5 mmol/L, sulfato de cobre 5 mmol/L.

Patrón: 1 ml de una solución de R- Tartrato de sodio y potasio 15 mmol/L, yoduro de sodio 100 mmol/L, yoduro de potasio 5 mmol/L, sulfato de cobre 5 mmol/L y 25 µl de T - PROTEIN CAL: Albúmina bovina primaria estándar 7 g/L.

Muestra problema: 1 ml de una solución de R- Tartrato de sodio y potasio 15 mmol/L, yoduro de sodio 100 mmol/L, yoduro de potasio 5 mmol/L, sulfato de cobre 5 mmol/L y 25 µl del plasma a determinar (plasma problema).

Las tres muestras se mezclaron por agitación, posteriormente se incubaron en baño de agua a 37°C por 10 minutos, a continuación se colocaron en cubetas espectrofotométricas de caras paralelas y se registró la absorbancia el patrón y de la muestra, frente al blanco en un espectrofotómetro (Modelo DU-530, Beckman Coulter, Brea, California) a una longitud de onda de 540 nm., El contenido de proteína en la muestra se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{absorbancia de la muestra}}{\text{absorbancia del patron}} \times \text{contenido del patron 7 g/L} = \text{contenido de la muestra}$$

El valor resultante se expresó en g/L.

Albúmina

En un baño de agua a 37°C se colocaron viales de vidrio conteniendo 1 ml de una solución de R-Verde bromocresol pH 4.2 0.12 mmol/L, se prepararon 3 muestras:

Blanco: 1 ml de una solución de R-Verde bromocresol pH 4.2 0.12 mmol/L

Patrón: 1 ml de una solución de R-Verde bromocresol pH 4.2 0.12 mmol/L y 5 µl ALBUMIN CAL- Patrón primario acuoso de albúmina 5 g/L

Muestra problema 1 ml de una solución de R-Verde bromocresol pH 4.2 0.12 mmol/L y 5 µl del suero a determinar (suero problema)

Las tres muestras se mezclaron por agitación, posteriormente se incubaron en baño de agua a 37°C por 5 minutos, a continuación se colocaron en cubetas espectrofotométricas de caras paralelas y se registró la absorbancia del patrón y de la muestra, frente al blanco en un espectrofotómetro (Modelo DU-530, Beckman Coulter, Brea, California) a una longitud de onda de 630 nm., La concentración de albúmina en la muestra se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{absorbancia de la muestra}}{\text{absorbancia del patron}} \times \text{contenido del patron 5 g/L} = \text{contenido de la muestra}$$

El valor resultante se expresó en g/L.

Enzimas séricas.- Para determinar la actividad de Gama glutamil-traspeptidasa (GGT), Aspartato aminotrasferasa (AST) y Alanino aminotrasferasa (ALT) se utilizaron kits comerciales (Wiener-Lab, Rosario, Argentina) utilizando el siguiente protocolo:

Gama glutamil-traspeptidasa (GGT)

En un baño de agua a 37°C se colocaron viales de vidrio conteniendo 1 ml de una solución de buffer Tris, glicilglicina y L- -glutamyl-3-carboxi-4-nitroanilida, a esta solución se le agregaron 100 µl del suero a determinar (suero problema) y se mezclaron por agitación, posteriormente se incubó en baño de agua a 37°C por 1 minuto. A continuación se colocaron en una cubeta espectrofotométrica de caras paralelas y se registró la absorbancia en un espectrofotómetro (Modelo DU-530, Beckman Coulter, Brea, California) a una longitud de onda de 405 nm cada 1, 2 y 3 minutos, después se determinó la diferencia promedio de absorbancia (A/min) restando cada lectura de la anterior y promediando los valores, el valor resultante se expresó en U/L.

Aspartato aminotrasferasa (AST)

En un baño de agua a 37°C se colocaron viales de vidrio conteniendo 1 ml de una solución de buffer tris pH 7.8 conteniendo L-aspartato, 2-oxoglutarato, nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH), malato deshidrogenasa (MDH) y lactato deshidrogenasa (LDH), a esta solución se le agregaron 100 µl del suero a determinar (suero problema) y se mezclaron por agitación, posteriormente se incubó en baño de agua a 37°C por 90 segundos, a continuación se colocaron en una cubeta espectrofotométrica de caras paralelas y se registró la absorbancia en un espectrofotómetro (Modelo DU-530, Beckman Coulter, Brea, California) a una longitud de onda de 340 nm cada 1, 2 y 3 minutos, después se determinó la diferencia promedio de absorbancia (A/min) restando cada lectura de la anterior y promediando los valores, el valor resultante se expresó en U/L.

Alanino aminotrasferasa (ALT)

En un baño de agua a 37°C se colocaron viales de vidrio conteniendo 1 ml de una solución de buffer tris pH 7.5 conteniendo L-alanina, 2-oxoglutarato, nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH) y lactato deshidrogenasa (LDH), a esta solución se le agregaron 100 µl del suero a determinar (suero problema) y se mezclaron por agitación,

posteriormente se incubo en baño de agua a 37°C por 90 segundos, a continuación se colocaron en una cubeta espectrofotométrica de caras paralelas y se registró la absorbancia en un espectrofotómetro (Modelo DU-530, Beckman Coulter, Brea, California) a una longitud de onda de 340 nm cada 1, 2 y 3 minutos, después se determinó la diferencia promedio de absorbancia ($\Delta A/\text{min}$) restando cada lectura de la anterior y promediando los valores, el valor resultante se expresó en U/L.

5.1.5 Inmunización y respuesta inmune.

Las aves se inmunizaron contra el Virus de la Enfermedad de Newcastle (ENC) utilizando una vacuna de virus vivo sepa Hitchner B1 (Laboratorios MAVER Coyoacan, Mexico, DF), esta misma se administró por vía ocular según las recomendaciones del fabricante, a los días 7 y 21 del experimento.

Al día 14 y 35 se seleccionaron aleatoriamente 24 aves (6 por tratamiento) para obtener suero y determinar el título de anticuerpos contra ENC, las muestras de sangre se mantuvieron a temperatura ambiente por 2 horas en tubos de recolección, posteriormente se centrifugaron a 1500 g x 15 min para obtener el suero, a continuación se almacenaron a -20°C para su posterior análisis. Para determinar el título de anticuerpos contra virus de ENC se utilizó la prueba de Inhibición de la hemoaglutinación descrita por Hu y Liu (1997).

5.1.6 Peso de órganos

Al final de experimento se aplicó la eutanasia y se realizó la necropsia correspondiente a 6 aves por tratamiento, se obtuvieron por disección y posteriormente se lavaron usando solución salina fisiológica: hígado, bazo, bolsa cloacal, proventrículo, ventrículo, intestino y riñones, lo cuales se pesaron individualmente para obtener el porcentaje de peso relativo.

5.1.7 Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento se condujo como un diseño completamente al azar. Los datos fueron examinados mediante un análisis de varianza (ANDEVA), y las medias fueron separadas empleando el procedimiento de Dunnett, utilizando el paquete de sistema de análisis

estadístico GraphPad Prism v6.01. Un valor de significancia de ≤ 0.5 fue usado para distinguir diferencias significativas entre los tratamientos.

Los animales se dividieron completamente al azar en 4 tratamientos con 3 repeticiones por tratamiento.

Los tratamientos se condujeron de la siguiente forma:

Tratamiento	Agua
Mezcla 1	Acidificada con Mezcla 1 (ascórbico-cítrico-málico),
Mezcla 2	Acidificada con Mezcla 2 (ascórbico-sórbico-málico),
Mezcla 3	Acidificada con Mezcla 3 (ascórbico-tartárico-málico)
Control	Agua sin acidificar

Los parámetros a evaluar o variables de respuesta fueron las siguientes:

- Peso vivo corporal (PV).
- Consumo de alimento (CA).
- Índice de conversión alimenticia (IC).
- Tasa de supervivencia (TS).
- Proteínas plasmáticas y albumina.
- Enzimas séricas (ALT, AST y GGT).
- Porcentaje de hematocrito.
- Inhibición de la hemoaglutinación para titular la concentración de anticuerpos de respuesta a la vacunación contra ENC.
- Porcentaje del peso relativo de órganos.

5.2 Fase experimental 2

Este experimento se realizó con la finalidad de determinar el comportamiento de una mezcla de ácidos orgánicos (AO) y una dieta contaminada con aflatoxinas a un contenido de 100 ng/g con el fin de evaluar la capacidad de reducir los efectos tóxicos de la aflatoxina.

El experimento se condujo con condiciones similares a la fase experimental 1 con la diferencia de las dietas contaminadas con aflatoxinas totales (AF) a un contenido de 100 ng/g y utilizando la mezcla de ácidos orgánicos (ascórbico-tartárico-málico).

Los animales se dividieron completamente al azar en 4 tratamientos con 3 repeticiones por tratamiento.

Los tratamientos se condujeron de la siguiente forma:

Tratamiento	Agua	Alimento
AO	Acidificada mezcla de AO (A:T:M)	Libre de aflatoxinas
AF	Sin acidificar	Contaminado 100 ng/g aflatoxinas totales
AF+AO	Acidificada mezcla de AO (A:T:M)	Contaminado 100 ng/g aflatoxinas totales
Control	Sin acidificar	Libre de aflatoxinas

Los parámetros a evaluar o variables de respuesta fueron las siguientes:

- Peso vivo corporal (PV).
- Consumo de alimento (CA).
- Índice de conversión alimenticia (IC).
- Tasa de supervivencia (TS).
- Proteínas plasmáticas y albumina.
- Enzimas séricas (ALT, AST y GGT).
- Porcentaje de hematocrito.
- Inhibición de la hemoaglutinación para titular la concentración de anticuerpos de respuesta a la vacunación contra ENC.
- Porcentaje del peso relativo de órganos.

RESULTADOS.

6.1 Fase experimental 1.

Los efectos de administrar las mezclas de ácidos orgánicos en el agua de bebida sobre los parámetros productivos y la tasa de supervivencia de las aves se resumen en la Tabla 6.1. Los resultados indicaron que el peso vivo corporal no se afectó significativamente en las aves tratadas con las 3 mezclas de ácidos orgánicos. El grupo control, presentó un peso vivo corporal promedio de 2259.62 g, estadísticamente similar al peso vivo promedio de los tratamientos con ácidos orgánicos (AO) (2232.03 g). En general, el peso vivo corporal fue ligeramente mayor en las aves del grupo control; sin embargo, la diferencia no fue estadísticamente significativa. En cuanto al consumo de alimento, el grupo control presentó un valor de 107.12 g/ave/d, estadísticamente diferente del valor promedio de consumo (97.32 g) en las aves tratadas con las mezclas de ácidos orgánicos (Tabla 6.1).

Adicionalmente, el índice de conversión alimenticia se comportó de la siguiente manera: las aves del grupo control presentaron el valor más alto (1.991). Sin embargo, las aves suministradas con las mezclas de ácidos orgánicos presentaron significativamente ($p < 0.05$) los mejores valores de conversión alimenticia en comparación con el grupo control (Tabla 6.1). Las aves tratadas con la mezcla 1, fue el grupo que presentó la menor conversión alimenticia (1.803), seguido de los grupos suministrados con las mezclas 2 y 3, las cuales presentaron conversiones alimenticias de 1.860 y 1.831, respectivamente (Tabla 6.1). De manera similar, las aves tratadas con la mezcla 1, fue el grupo que presentó la mejor tasa de supervivencia (96%). En general, los grupos a los cuales se les suministró la mezcla de ácidos orgánicos, presentaron la mejor tasa de supervivencia en comparación con el grupo control (Tabla 6.1).

Tabla 6.1. Efecto de mezclas de ácidos orgánicos suministradas en el agua de bebida sobre los parámetros productivos y la tasa de supervivencia en el pollo de engorda

Parámetro	Control	Mezcla 1(A:C:M)	Mezcla 2(A:S:M)	Mezcla 3(A:T:M)
Peso vivo (g)	2259.62±29.15	2240.71±37.24	2219.04±37.00	2236.43±35.01
Consumo (g/ave/d)	107.12±3.1a	96.19±2.3b	98.27±2.2b	97.49±2.5b
Conversión	1.991±0.063a	1.803±0.037b	1.860±0.028b	1.831±0.083b
Supervivencia (%)	90.66a	96.00b	94.66b	93.33b

* Media ± error estándar

^{a-b} Medias con la misma letra en el mismo renglón, no difieren significativamente ($p > 0.05$)

Adicionalmente, las mezclas de ácidos orgánicos suministradas en el agua de bebida no afectaron significativamente a los valores de hematocrito, las proteínas plasmáticas totales, la albúmina, las concentraciones de las enzimas GGT y AST, así como a los títulos de anticuerpos determinados a los 14 y 35 d (Tabla 6.2). Sin embargo, diferencias significativas ($p < 0.05$) se encontraron para la enzima ALT y para la relación AST/ALT. En el caso de la enzima ALT, las aves del grupo control presentaron un valor promedio de 53.25 U/L. Sin embargo, las aves suministradas con las mezclas 1 y 3, presentaron una disminución de la concentración, registrando valores de 16.93 y 30.09 U/L, respectivamente. En consecuencia, el incremento máximo en la relación AST/ALT (4.7), se registró en las aves del grupo tratado con la mezcla 1, seguido por el grupo tratado con la mezcla 3 (2.6). En el resto de los tratamientos (control y mezcla 2), la relación fue estadísticamente similar (Tabla 6.2).

Tabla 6.2. Efecto de mezclas de ácidos orgánicos suministradas en el agua de bebida sobre algunos parámetros sanguíneos y la respuesta inmune en el pollo de engorda

Parámetro	Control	Mezcla 1(A:C:M)	Mezcla 2(A:S:M)	Mezcla 3(A:T:M)
Hematocrito (%)	33.83 ± 2.12	31.12 ± 3.99	32.00 ± 2.47	33.25 ± 2.50
Proteínas totales (g/L)	30.28 ± 3.03	31.18 ± 3.19	30.46 ± 3.35	28.91 ± 5.28
Albumina (g/L)	11.29 ± 3.54	13.97 ± 3.70	12.33 ± 3.22	12.69 ± 3.53
GGT (U/L)	46.50 ± 4.56	44.29 ± 3.48	43.00 ± 2.48	47.44 ± 2.56
AST (U/L)	77.24 ± 4.87	79.37 ± 7.23	74.04 ± 9.73	78.67 ± 9.83
ALT (U/L)	53.25 ± 8.10a	16.93 ± 4.58c	48.52 ± 7.11a	30.09 ± 5.62b
AST/ALT	1.5a	4.7c	1.5a	2.6b
Título de anticuerpos (14d) ⁺	4.50 ± 1.82	4.67 ± 1.75	4.50 ± 1.22	4.73 ± 1.63
Título de anticuerpos (35d) ⁺	5.00 ± 0.89	5.83 ± 1.03	5.35 ± 0.52	5.33 ± 0.98

* Media ± error estándar.

^{a-c} Medias con la misma letra en el mismo renglón, no difieren significativamente (p>0.05)

⁺ Títulos de anticuerpos expresados en log₁₀.

GGT = gammaglutamil-transferasa; AST = aspartatoamino-transferasa; ALT = alaninoamino-transferasa

En cuanto al peso relativo de los órganos, las mezclas de ácidos orgánicos no afectaron significativamente el peso relativo de ninguno de los órganos (Tabla 6.3).

Tabla 6.3 Efecto de mezclas de ácidos orgánicos suministradas en el agua de bebida sobre el peso relativo de órganos

Parámetro	Control	Mezcla 1(A:C:M)	Mezcla 2(A:S:M)	Mezcla 3(A:T:M)
Proventrículo	0.513 ± 0.109	0.486 ± 0.086a	0.513 ± 0.087a	0.491 ± 0.105a
Ventrículo	2.34 ± 0.332	2.24 ± 0.226a	2.45 ± 0.375a	2.10 ± 0.242a
Hígado	2.90 ± 0.561a	2.78 ± 0.217a	3.01 ± 0.323a	2.82 ± 0.192a
Intestino	5.77 ± 0.652a	5.41 ± 0.450a	5.36 ± 0.759a	5.55 ± 1.550a
Bazo	0.118 ± 0.037a	0.122 ± 0.040a	0.151 ± 0.060a	0.114 ± 0.038a
Bolsa Cloacal	0.185 ± 0.046a	0.184 ± 0.039a	0.198 ± 0.074a	0.217 ± 0.033a

* Media ± error estándar

^{a-b} Medias con la misma letra en el mismo renglón, no difieren significativamente (p>0.05)

Fase experimental 2.

Los efectos de administrar la mezcla de ácidos orgánicos (AO) en el agua de bebida sobre los parámetros productivos y la tasa de supervivencia de las aves alimentadas con una dieta contaminada con aflatoxinas a un contenido de 100 ng/g se resumen en la Tabla 6.4. Los resultados indicaron que el peso vivo corporal fue afectado significativamente debido a los tratamientos. El grupo control, presentó un peso promedio de 2371.36 g, estadísticamente similar al peso del grupo que recibió aflatoxinas en la dieta (AF), con un valor de 2277.06 g. En contraparte, los grupos con AO y AO+AF fueron significativamente diferentes en cuanto al peso vivo corporal, éstos grupos presentaron un peso promedio de 2147.84 g. Con respecto al consumo de alimento, las aves del grupo control presentaron un valor de 112.98 g/ave/d, significativamente similar al consumo de las aves del grupo AF; sin embargo, éstos grupos fueron significativamente diferentes a los tratamientos AO y AO+AF, los cuales presentaron consumos de 96.07 y 86.29 g/ave/d, respectivamente (Tabla 6.4). Adicionalmente, el índice de conversión alimenticia se comportó de la siguiente manera: las aves del grupo control presentaron un valor de 1.99 g consumidos/g ganados, significativamente similar al grupo AF (2.02 g consumidos/g ganados). Por el contrario, éstos grupos presentaron diferencia estadística significativa con respecto a los tratamientos AO y AO+AF, los cuales registraron valores promedios en el índice de conversión de 1.83 y 1.72 g consumidos/g ganados, respectivamente. En lo referente a la tasa de supervivencia, los grupos se comportaron de la siguiente forma: el grupo AO presentó la mejor tasa de supervivencia con un promedio de 94.66%, estadísticamente similar a los grupos AO+AF (92.16%) y control (90.66%). Por otra parte, el grupo AF fue el que presentó el valor promedio más bajo en la tasa de supervivencia, presentando un valor de 86.69% (Tabla 6.4).

Tabla 6.4. Efecto de la mezcla de ácidos orgánicos suministrada en el agua de bebida sobre los parámetros productivos y la tasa de supervivencia de pollos de engorda alimentados con una dieta contaminada con aflatoxinas a un contenido de 100 ng/g

Parámetro	Control	AO(a:t:m)	AF(100 ng/g)	AO(a:t:m)+AF(100 ng/g)
Peso vivo (g)	2371.36 ± 46.20a	2201.82 ± 54.20b	2277.06 ± 35.60a	2093.85 ± 52.96b
Consumo (g/ave/d)	112.98 ± 6.19a	96.07 ± 1.27b	108.45 ± 2.14a	86.29 ± 3.20b
Conversión(g/g)	1.99 ± 0.09a	1.83 ± 0.05b	2.02 ± 0.07a	1.72 ± 0.11b
Supervivencia (%)	90.66a	94.66a	86.69b	92.16a

* Media ± error estándar

^{a-b} Medias con la misma letra en el mismo renglón, no difieren significativamente (p>0.05)

Los efectos de administrar la mezcla de ácidos orgánicos (AO) en el agua de bebida sobre los valores de hematocrito, proteínas plasmáticas totales, albúmina, concentraciones de las enzimas GGT, AST, ALT, relación AST/ALT, así como títulos de anticuerpos determinados a los días 14 y 35 en las aves alimentadas con la dieta contaminada con aflatoxinas a un contenido de 100 ng/g se resumen en el Tabla 6.5. En general, no se encontró diferencia estadística significativa en los valores de hematocrito, proteínas totales, albúmina, la concentración enzimática de GGT, así como en los títulos de anticuerpos determinados a los días 14 y 35. Sin embargo, diferencias significativas (p<0.05) se encontraron para las enzimas ALT, AST y para la relación AST/ALT (Tabla 6.5). En el caso de la enzima AST, las aves de los grupos control y AF presentaron un valor promedio de 89.80 U/L.

Por el contrario, los grupos AO y AO+AF fueron significativamente diferentes, éstos grupos presentaron valores enzimáticos en la AST de 80.35 y 81.85 U/L, respectivamente. Adicionalmente, la actividad de la enzima ALT también fue afectada por el tratamiento con aflatoxina (AFB); sin embargo, los grupos control, AO y AO+AF no presentaron diferencia estadística significativa. Las aves del grupo AF presentaron el valor promedio más bajo en esta enzima, registrando un valor de 21.97 U/L (Tabla 6.5). En consecuencia, el máximo incremento en la relación AST/ALT (4.60), se registró en las aves del grupo AF. Los grupos control, AO y AO+AF no presentaron diferencia estadística significativa en cuanto a esta relación (Tabla 6.5).

Tabla 6.5. Efecto de la mezcla de ácidos orgánicos suministrada en el agua de bebida sobre algunos parámetros sanguíneos y la respuesta inmune de pollos de engorda alimentados con una dieta contaminada con aflatoxinas a un contenido de 100 ng/g

Parámetro	Control	AO(a:t:m)	AF(100 ng/g)	AO(a:t:m)+AF(100 ng/g)
Hematocrito (%)	33.20 ± 0.90	26.16 ± 3.04	29.87 ± 0.88	23.00 ± 0.80
Proteínas totales (g/L)	30.28 ± 1.76	29.63 ± 1.24	27.26 ± 1.74	24.99 ± 1.57
Albumina (g/L)	25.05 ± 4.83	17.34 ± 0.66	30.43 ± 5.74	21.73 ± 5.46
GGT (U/L)	62.76 ± 8.30	30.69 ± 2.81	64.73 ± 6.99	43.54 ± 9.54
AST (U/L)	78.21 ± 9.09a	80.35 ± 3.40b	101.39 ± 21.07a	81.85 ± 7.28b
ALT (U/L)	52.16 ± 5.20a	35.13 ± 4.61a	21.97 ± 2.53b	25.32 ± 3.38a
AST/ALT	1.50a	2.29b	4.60c	3.23b
Título de anticuerpos (14d)+	6.83 ± 0.75	6.33 ± 0.67	6.17 ± 0.31	6.83 ± 0.48
Título de anticuerpos (35d)+	5.00 ± 0.37	4.83 ± 0.40	4.67 ± 0.33	4.50 ± 0.34

* Media ± error estándar.

^{a-c} Medias con la misma letra en el mismo renglón, no difieren significativamente (p>0.05)

+ Títulos de anticuerpos expresados en log₁₀.

GGT = gamma-glutamyl-transferasa; AST = aspartato-amino-transferasa; ALT = alanino-amino-transferasa

En cuanto al peso relativo de los órganos, la mezcla de ácidos orgánicos y la dieta contaminada con aflatoxinas no afectaron significativamente el peso relativo de ninguno de los órganos (Tabla 6.6).

Tabla 6.6. Efecto de la mezcla de AO suministrada en el agua de bebida sobre el peso relativo de órganos de pollos de engorda alimentados con una dieta contaminada con aflatoxinas a un contenido de 100 ng/g

Parámetro	Control	AO(a:t:m)	AF(100 ng/g)	AO(a:t:m)+AF(100 ng/g)
Proventrículo	0.513 ± 0.045a	0.491 ± 0.043a	0.532 ± 0.037a	0.501 ± 0.022a
Ventrículo	2.34 ± 0.136a	2.10 ± 0.099a	2.54 ± 0.159a	2.54 ± 0.173a
Hígado	2.90 ± 0.229a	2.82 ± 0.079a	2.68 ± 0.149a	3.07 ± 0.258a
Intestino	5.77 ± 0.266a	5.56 ± 0.633a	5.41 ± 0.374a	6.26 ± 0.554a
Bazo	0.118 ± 0.015a	0.115 ± 0.016a	0.099 ± 0.021a	0.127 ± 0.026a
Bolsa Cloacal	0.186 ± 0.011a	0.218 ± 0.013a	0.175 ± 0.017a	0.199 ± 0.013a

* Media ± error estándar

^{a-b} Medias con la misma letra en el mismo renglón, no difieren significativamente (p>0.05)

DISCUSION.

7.1 Fase experimental 1.

7.1.1 Parámetros productivos y tasa de supervivencia

Generalmente los ácidos orgánicos poseen un efecto positivo sobre el crecimiento, debido a que la acidificación de la dieta incrementa la proteólisis gástrica y la digestibilidad de las proteínas, aumentando la actividad enzimática digestiva (Langhout, 2000; Salgado-Tránsito *et al.*, 2011). La razón por la cual la proteína es mejor utilizada cuando se adicionan los ácidos orgánicos a la dieta, es debido a que el pepsinógeno es convertido en pepsina, lo cual incrementa la actividad de dicha enzima y aumenta la digestibilidad de la proteína. Por otra parte, los péptidos derivados de proteólisis gástrica, desencadenan la liberación de ciertas hormonas, incluyendo la gastrina y la colecistocinina, las cuales regulan la digestión y la absorción de las proteínas y otros nutrientes. Aunado a esto, los ácidos orgánicos estimulan la liberación de las enzimas pancreáticas así como la activación de las mismas, por otro lado la actividad antimicrobiana también se traduce en la mejora de la salud intestinal (Ricke, 2003). La mejora en el índice de conversión y en el peso vivo corporal ha sido demostrada con anterioridad en pollos de engorda, los cuales fueron alimentados con dietas suplementadas con acidificantes (Denli *et al.*, 2003; Samanta *et al.*, 2010; Ao *et al.*, 2010). Por el contrario, los resultados de la inclusión de ciertos ácidos orgánicos o mezclas de ellos en el agua de bebida de las aves, continúan siendo limitados y controversiales. Chaveerach *et al.* (2004) reportaron que no se encontraron diferencias en el peso vivo corporal entre el grupo control y las aves tratadas con una mezcla comercial de ácidos orgánicos en el agua de bebida así como, Yesilbag y Colpan (2006) suplementaron gallinas de postura con una mezcla de ácido fórmico y propiónico en el alimento y no encontraron diferencias significativas en el peso vivo, consumo y conversión alimenticia. Parker *et al.* (2006) reportaron que la acidificación del agua (0.08% mezcla de ácidos orgánicos) llevó a una mejora significativa en la conversión alimenticia pero no en el peso vivo corporal, ni en la mortalidad de las aves. En este contexto, los resultados de la fase experimental 1 concuerdan con los autores antes mencionados. Sin embargo, en este experimento, el consumo de alimento, el índice de conversión alimenticia y la tasa de supervivencia fueron mejorados significativamente en los grupos tratados con la mezcla de ácidos orgánicos suministrada el

agua de bebida (Tabla 6.1). Este fenómeno puede ser relacionado a los beneficios que tienen las mezclas de ácidos orgánicos en el agua de bebida, debido a que la acidificación reduce significativamente el número de *Enterobacteriaceae* y *Campylobacter* en el agua, y favorecen el incremento en el número de bacterias aeróbicas en el ciego, siendo esto posible debido a que las mezclas de ácidos orgánicos proveen una fuente de energía extra para el crecimiento bacteriano. Es bien conocido que los ácidos orgánicos tienen una baja tendencia a liberar sus iones H^+ , y un fuerte sabor es comúnmente asociado a ellos. En consecuencia, altos niveles de ácidos orgánicos pueden reducir el consumo de agua. En este experimento, la adición de las tres diferentes mezclas de ácidos orgánicos fueron bien toleradas por las aves. Es importante señalar que el consumo de agua fue monitoreado en los cuatro tratamientos; sin embargo, no se encontró diferencia en este parámetro (datos no mostrados).

La tasa de supervivencia fue estadísticamente diferente entre los 4 grupos (Tabla 6.1). La mortalidad observada durante los 42 días del experimento fue: 7 aves del grupo control, y 3, 4, y 5 aves de los grupos tratados con las mezclas 1, 2 y 3, respectivamente. Es importante notar que la mortalidad únicamente se presentó en las 2 primeras semanas del experimento. Majewska *et al.* (2009) reportó índices de supervivencia del 95% y 95.2%, en pollos Ross-308 suplementados dos veces por semana con ácido láctico sin diluir y con una dilución del 50% (4 cm^3/L de agua), respectivamente. Estos resultados concuerdan con los valores encontrados en este experimento. En resumen, las mejoras en el consumo, la conversión alimenticia, y la tasa de supervivencia en algunos tratamientos, puede ser el resultado del efecto de las mezclas de ácidos orgánicos sobre el control de las bacterias patógenas, o por mantener la salud del tracto gastrointestinal, teniendo en cuenta que el efecto de las mezclas de ácidos orgánicos no son solo debido a la reducción del pH, ya que el efecto benéfico de las mezclas de ácidos orgánicos en los parámetros productivos está relacionado con un uso más eficiente de los nutrientes (proteínas, calcio, fósforo, magnesio y zinc), lo que resulta en una mejora del índice de conversión alimenticia. En consecuencia, el uso de una correcta combinación de ácidos orgánicos puede ser más efectiva desde el punto de vista de la actividad sinérgica entre ellos.

7.1.2 Química sanguínea y respuesta inmune

De los diferentes parámetros sanguíneos determinados como el hematocrito, las proteínas plasmáticas, y la albumina sérica, éstos no fueron significativamente afectados al final del experimento en las aves que recibieron el agua con las diferentes mezclas de ácidos orgánicos (Tabla 6.2). Estos resultados concuerdan con lo obtenido en pollos de engorda, a los que se les suplementó con ácido acético (Abdo, 2004). Abdel-Fattah *et al.* (2008) también reportaron que las proteínas plasmáticas totales y la albumina no se afectaron debido a la inclusión de 1.5 o 3% de ácido cítrico en pollos, durante un periodo de 42 d.

Mientras que el incremento de los valores enzimáticos en las aves varía en las diferentes especies, la elevación de la actividad enzimática ha sido correlacionada con el daño hepatocelular. La causa más frecuente de la elevación de la enzima AST en las aves, es la enfermedad hepática; aves con valores mayores a 230 U/L se consideran anormales (Campbell y Coles, 1986). Un moderado incremento (2 a 4 veces) en la actividad de la enzima AST se observa cuando hay un ligero daño, mientras que en la necrosis hepática, se observa una marcada elevación. En este experimento, los resultados demostraron que la inclusión de las mezclas de ácidos orgánicos en el agua de bebida no presentó efecto en la actividad de las enzimas GGT y AST. Adil *et al.* (2010) no reportó diferencias significativas en la actividad de las enzimas ALT y AST en pollos suplementados con ácidos orgánicos (butírico, fumárico, y láctico). Para el caso de la enzima ALT, valores bajos fueron registrados en los grupos suministrados con la mezcla 1 y 3, respectivamente (Tabla 6.2). Estos resultados concuerdan con los encontrados por Brenes *et al.* (2003), quienes reportaron un decremento en los valores enzimáticos de la enzima ALT en pollos alimentados con una dieta con 20 g/kg de ácido cítrico y diferentes valores de fosforo. En este contexto, algunos efectos tóxicos de los ácidos orgánicos han sido también estudiados. Aktaş *et al.* (2003) reportaron que el ácido cítrico ($DL_{25} = 480$ mg/kg) aplicado por vía intraperitoneal en ratones, incrementó el nivel de la enzima AST (de 177.8 a 307.2 U/L), y disminuyó la actividad de la enzima ALT (de 695 a 101 U/L). Estos hallazgos son consistentes con los encontrados en este experimento.

Por otra parte, la relación AST/ALT ha sido usada en estudios con humanos y animales, específicamente en el pollo de engorda (Sorbi *et al.*, 1999; Valdivia *et al.*, 2000). La relación

AST/ALT ha sido útil para distinguir la enfermedad hepática y suele ser empleada para diagnóstico. En particular, una relación ≥ 2 es sugestiva de enfermedad hepática. En esta investigación, ésta relación fue un indicador útil para conocer el efecto tóxico que ejercieron en las aves las mezclas 1 y 3, respectivamente. Esto significa que el ácido cítrico y el ácido tartárico exhiben algunos efectos tóxicos; sin embargo, las aves no mostraron signos aparentes de daño hepático. Parece ser que la determinación de la actividad enzimática puede ser de gran ayuda en el diagnóstico de casos de hepatotoxicidad, cuando los síntomas clínicos importantes de toxicidad aun no aparecen.

Con respecto a los títulos de anticuerpos contra el virus de Newcastle, los tratamientos con AO mostraron una ligera alza en los valores a los días 14 y 35, respectivamente. No obstante, no se encontró diferencia estadística significativa entre los tratamientos (Tabla 6.2). Gabal y Azzam (1998) reportaron títulos de anticuerpos con valores de 4.82 y 6.31 (\log_{10}) para pollos vacunados contra el virus de Newcastle, a la semana 1 y 5, respectivamente. Sadeghi *et al.* (2012) reportaron valores entre 6.69 y 8.75 para títulos de anticuerpos contra el mismo virus en pollos de engorda estirpe Ross-308. Estos resultados, concuerdan con los valores encontrados en el experimento. Más aun, los efectos benéficos de los ácidos orgánicos sobre la inmunidad del pollo de engorda han sido reportados previamente. En este sentido, Abdel-Fattah *et al.* (2008) concluyeron que la adición de ácidos orgánicos en la dieta resultó en un aumento de la respuesta inmune de las aves. En su investigación, los pollos alimentados con una dieta suplementada con ácidos orgánicos presentaron los órganos linfoides más pesados (bolsa de Fabricio y timo), así como también mayor nivel sérico de inmunoglobulinas. Chowdhury *et al.* (2009) encontraron que las aves suplementadas con ácido cítrico en el alimento presentaron una mejora en el estado del sistema inmune determinado por la densidad de células en los órganos linfoides. Algunos autores también sugieren que la mejora en la inmunidad de las aves podría estar relacionada al efecto inhibitor de los ácidos orgánicos sobre los patógenos del tracto gastrointestinal (Dibner y Buttin, 2002; Chaveerach *et al.*, 2004; Biggs y Parsons, 2008; Dahiya, 2006).

7.1.3 Peso relativo de órganos.

En lo que respecta al peso relativo de los órganos éstos no fueron significativamente afectados en las aves que recibieron el agua con las diferentes mezclas de ácidos orgánicos.

Estos resultados concuerdan con lo obtenido por Adil *et al.* (2010) quienes suplementaron con ácido láctico, butírico y fumárico a diversas concentraciones a pollos de engorda, estos autores reportan no encontrar diferencia estadística significativa en el peso relativo del ventrículo, el corazón y el hígado. Sin embargo, Abdel-Fattah *et al.* (2008) encontraron diferencias significativas en el peso del intestino, el bazo y la bolsa cloacal, en pollos tratados con ácido láctico, cítrico y acético en el alimento a concentraciones 1.5% y 3.0%.

7.2 Fase experimental 2.

7.2.1 Parámetros productivos y tasa de supervivencia

Anteriormente se han mencionado los beneficios de la suplementación de los ácidos orgánicos en el agua de bebida de las aves, estos beneficios van desde la disminución de la microbiota intestinal, la proliferación de la mucosa intestinal, el aumento de la actividad enzimática digestiva y también la destoxificación de las aflatoxinas presentes en la dieta. (Denli *et al.*, 2003; Méndez-Albores *et al.*, 2007; Samanta *et al.*, 2010; Ao *et al.*, 2010; Salgado-Tránsito *et al.*, 2011). En este experimento, el consumo de alimento, el índice de conversión alimenticia y la tasa de supervivencia fueron mejorados significativamente en los grupos tratados con la mezcla de ácidos orgánicos en el agua de bebida, aun cuando las aves fueron alimentadas con la dieta con aflatoxinas, tal como sucedió con el grupo AO+AF (Tabla 6.4). Este fenómeno puede ser relacionado a los beneficios que tiene la mezcla de ácidos orgánicos en el agua de bebida, debido a que la acidificación tiene múltiples beneficios sobre la salud intestinal y la digestibilidad de los nutrientes, así como en la reducción de los patógenos intestinales, aunado a que la mezcla de ácidos orgánicos posee un efecto de inactivación para las aflatoxinas presentes en la dieta. La tasa de supervivencia fue estadísticamente similar entre los grupos control, AO y AO+AF, el porcentaje promedio fue de 92.49%. En el caso del grupo AF, este valor fue de 86.69% (Tabla 6.4). La mortalidad observada durante el experimento fue: 3 aves para los grupos control, AO y AO+AF, y 6 aves para el grupo AF, respectivamente. Es importante señalar que la mortalidad únicamente se presentó en las 2 primeras semanas del experimento para los grupos control, AO y AO+AF, mientras que para el grupo AF, la mortalidad se presentó a lo largo de todo el experimento. Timmerman *et al.* (2006) reportaron un índice de supervivencia del 92.73% en pollos Cobb suplementados con lactobacilos en el agua de bebida. Estos resultados concuerdan con los valores encontrados en este experimento para los grupos AO y AO+AF. Gabal y Azzam (1998) reportaron una tasa de supervivencia del 80% en pollos de la estirpe Hy, los cuales fueron alimentados con una dieta contaminada con 200 ng/g de aflatoxinas totales por un periodo de 28 d. Aun cuando el contenido de aflatoxinas en la dieta fue el doble de lo que en este experimento se evaluó, los resultados en

cuanto a la tasa de supervivencia fueron consistentes. En resumen, las mejoras en el consumo de alimento, la conversión alimenticia, y la tasa de supervivencia en los grupos que recibieron la mezcla de ácidos orgánicos en el agua de bebida, son resultado del efecto de la mezcla de ácidos orgánicos sobre el control de las bacterias patógenas, la inactivación de las aflatoxinas, y el mantenimiento de la salud del tracto gastrointestinal, teniendo en cuenta que el efecto de la mezcla de ácidos orgánicos no es solamente debido a la reducción del pH y como consecuencia a la inactivación de las toxinas.

7.2.2 *Química sanguínea y respuesta inmune*

De los diferentes parámetros sanguíneos determinados como el hematocrito, las proteínas plasmáticas totales, la albumina y la actividad de la enzima GGT, éstos no fueron significativamente afectados al final del experimento (Tabla 6.5). Estos resultados concuerdan con lo observado por Yesilbag y Colpan (2006) quienes reportaron que las proteínas plasmáticas totales y la albumina no se afectaron debido a la inclusión en la dieta de 0.5% de una mezcla de ácido propiónico y ácido fórmico en gallinas de postura, durante un periodo de 38 semanas. Salgado-Tránsito *et al.* (2011) reportaron que el hematocrito, las proteínas totales y la albumina no se afectaron en las aves que fueron alimentadas con una dieta contaminada con 39 ng/g de aflatoxinas totales. Campbell y Coles (1986) consideran que la actividad enzimática de AST se correlaciona con el daño hepático, en las aves, valores mayores a 230 U/L son considerados fuera de lo normal, cuando estos valores se incrementan en 2 a 4 veces se considera un daño hepatocelular de ligero a moderado y en la necrosis hepática la elevación es marcada. En este experimento, los resultados demostraron que la adición de la mezcla de ácidos orgánicos en el agua de bebida, presentó un efecto benéfico en la actividad enzimática de la AST. Las aves del tratamiento AF presentaron un valor enzimático de 101.39 U/L, en comparación con las aves del grupo AO+AF, las cuales presentaron un valor de 81.85 U/L, estadísticamente similar al valor registrado en el grupo AO (80.35 U/L). En este contexto, Valdivia *et al.* (2001) reportaron valores de 297 U/L para el caso de la enzima AST en pollos de engorda alimentados con una dieta contaminada con 300 ng/g de aflatoxinas durante un periodo de 21 d. Esta elevación en la actividad de la enzima AST, es consistente con los resultados de este experimento, aun cuando el nivel de aflatoxinas evaluado fue 3 veces menor. Por el contrario, en el caso de la enzima ALT, los

valores más bajos correspondieron al grupo AF (21.97 U/L). Este efecto en la disminución de la actividad enzimática es muy probablemente debido a la presencia de las aflatoxinas en la dieta, ya que se ha reportado que la actividad de esta enzima disminuye cuando las aves son alimentadas con una dieta contaminada con aflatoxinas (Tedesco *et al.*, 2004; Salgado-Tránsito *et al.*, 2011). Adicionalmente, se observó una disminución en la actividad de la enzima ALT en el grupo AO (35.13 U/L), en comparación con el grupo control (52.16 U/L). Esta disminución no concuerda con lo encontrado por Yesilbag y Colpan (2006) quienes encontraron por el contrario, un aumento en la actividad enzimática de ALT en gallinas de postura alimentadas con una mezcla de ácidos orgánicos al 0.5 % en la dieta; sin embargo, Brenes *et al.* (2003) reportaron un decremento en los valores enzimáticos de la enzima ALT en pollos alimentados con una dieta con 20 g/kg de ácido cítrico. Estos hallazgos son consistentes con los encontrados en este experimento.

Por otra parte, la relación AST/ALT en este experimento, fue un indicador útil para conocer el efecto toxico que ejercieron las aflatoxinas en las aves. Así, en el grupo AF se registró la relación más alta (4.60); por el contrario, el suministrar la mezcla de ácidos orgánicos en el agua de bebida en el grupo AO+AFB, disminuyó dicha relación a niveles de 3.23. Adicionalmente, se observó un incremento en esta relación enzimática para el grupo AO (2.29), en comparación con el grupo control (1.5). Se ha reportado que los ácidos orgánicos incrementan la relación AST/ALT, así como también las aflatoxinas presentes en la dieta. En este experimento, aun cuando los niveles de la relación AST/ALT fue de 2.29 para el caso del grupo AO, las aves no mostraron signos aparentes de daño hepático. En general, estos resultados concuerdan con lo reportado por Valdivia *et al.* (2001), quienes obtuvieron una relación AST/ALT de 14 para el caso de aves alimentadas con una dieta con un alto contenido de aflatoxinas (300 ng/g).

En lo que respecta a los títulos de anticuerpos contra el virus de Newcastle, no se encontró diferencia estadística significativa entre los tratamientos (Tabla 6.5). Oguz *et al.* (2003) reportaron títulos de anticuerpos con valores de 8.00 y 7.10 (\log_{10}) para aves vacunadas contra el virus de Newcastle a la semana 2 y 5 respectivamente para el grupo control y valores de 8.37 y 6.57 (\log_{10}) para las aves que recibieron una dieta contaminada con 100 ng/g de aflatoxinas; Sin embargo, estos resultados no mostraron diferencia estadística

significativa. En concordancia con lo anterior Azzam y Gabal (1998) no encontraron diferencia estadística significativa en los títulos de anticuerpos contra el virus de Newcastle en gallinas de postura alimentadas con una dieta contaminada con aflatoxinas a contenidos de 100 a 200 ng/g. Otros autores han reportado que los títulos de anticuerpos no son afectados significativamente en las aves alimentadas con dietas conteniendo aflatoxinas en niveles de hasta 200 ng/g (Giambrone *et al.*, 1985; Ibrahim *et al.*, 2000). Estos resultados, concuerdan con los valores encontrados en este experimento.

7.2.3 *Peso relativo de órganos.*

En cuanto al peso relativo de los órganos, las aves que recibieron los ácidos orgánicos y la aflatoxina no presentaron diferencia estadística significativa entre los diversos tratamientos. Estos resultados concuerdan con lo observado por Kalavathy *et al.* (2003), quienes no encontraron diferencia estadística significativa en los pesos de los órganos de aves suplementadas con cultivos de *Lactobacillus*. Adicionalmente, Yesilbag y Colpan (2006) tampoco encontraron diferencia significativa en el peso de los órganos de gallinas suplementadas con una mezcla de ácidos orgánicos en el alimento. Por otro lado, Miazzi *et al.* (2000) encontrarón que utilizando una dieta contaminada a un contenido de 250 ng/g de aflatoxinas totales el peso relativo del hígado se incrementó significativamente, estos resultados no concuerdan con lo observado en este experimento; Sin embargo, el contenido de aflatoxinas utilizado fue menor (100 ng/g).

CONCLUSIONES.

La consecuencia de adicionar los ácidos orgánicos en el agua de bebida presentó efectos benéficos en cuanto a los parámetros productivos de las aves en la fase experimental 1, ya que éstas mostraron mejores índices de conversión, consumo de alimento y tasa de supervivencia en comparación con el grupo control.

Los efectos producidos por la suplementación de los ácidos orgánicos en el agua de bebida modifican ligeramente la actividad de las enzimas séricas; Sin embargo, los resultados encontrados no indican que esto sea un efecto adverso para las aves.

Las mezclas de ácidos orgánicos suministrados en el agua de bebida no tuvieron un efecto significativo en la inmunidad de las aves medida por el título de anticuerpos.

La adición de las mezclas de ácidos orgánicos en el agua de bebida en las aves alimentadas con la dieta contaminada con aflatoxinas totales a un contenido de 100 ng/g presentó efectos benéficos en los parámetros productivos en comparación con el grupo que no recibió el agua acidificada y la dieta contaminada con aflatoxinas.

La adición de la mezcla de ácidos orgánicos en el agua de bebida en las aves alimentadas con la dieta contaminada con aflatoxinas totales a un contenido de 100 ng/g mostraron una mejora de la actividad enzimática sérica en comparación con el grupo que no recibió el agua acidificada y la dieta contaminada con aflatoxinas.

La mezcla de ácidos orgánicos adicionados en el agua de bebida no presentó diferencia significativa en la inmunidad de las aves medida por el título de anticuerpos en comparación con el grupo que no recibió la mezcla de ácidos orgánicos y la dieta contaminada con aflatoxinas un contenido de 100 ng/g en concordancia con lo encontrado por otros autores.

La adición con mezclas de ácidos orgánicos, representa una opción viable para disminuir los efectos adversos ocasionados por la presencia de aflatoxinas en las dietas de las aves, así como una medida de control importante para el problema de la aflatoxicosis aviar.

REFERENCIAS.

Abdel-Fattah, S. A., El-Sanhoury, M. H., El-Mednay, N. M., & Abdel-Azeem, F. 2008. Thyroid activity, some blood constituents, organs morphology and performance of broiler chicks fed supplemental organic acids. *International Journal of Poultry Science*, 7:3, 215-222.

Abdo, M. A. Z., & Zeinb, A. 2004. Efficacy of acetic acid in improving the utilization of low protein-low energy broiler diets. *Egypt Poultry Science*, 24, 123-141.

Adil, S., Banday, T., Bhat, G. A., Mir, M. S., & Rehman, M. 2010. Effect of dietary supplementation of organic acids on performance, intestinal histomorphology, and serum biochemistry of broiler chicken. *Veterinary Medicine International*, 2010.

Allcroft, R. y Carnaghan, R.B.A. 1963. Toxic products in groundnuts. Biological effects. *Chem. Ind.* 2:50

Aktaç, T., A. Kabolu, E. Bakar, H. Karacas. 2003. The short-term effects of single toxic dose of citric acid in mice. *J. Cell Mol. Biol.* 2:1 19-23.

Ao, T., Cantor, A. H., Pescatore, A. J., Ford, M. J., Pierce, J. L., & Dawson, K. A. 2009. Effect of enzyme supplementation and acidification of diets on nutrient digestibility and growth performance of broiler chicks. *Poultry Science*, 88:1, 111-117.

Aravind, K. L., Patil, V. S., Devegowda, G., Umakantha, B., & Ganpule, S. P. 2003. Efficacy of esterified glucomannan to counteract mycotoxicosis in naturally contaminated feed on performance and serum biochemical and hematological parameters in broilers. *Poultry Science*, 82:4, 571-576.

Azzam, A. H., & Gabal, M. A. 1998. Aflatoxin and immunity in layer hens. *Avian Pathology*, 27:6, 570-577.

Bailey, R. H., Kubena, L. F., Harvey, R. B., Buckley, S. A., & Rottinghaus, G. E. 1998. Efficacy of various inorganic sorbents to reduce the toxicity of aflatoxin and T-2 toxin in broiler chickens. *Poultry Science*, 77:11, 1623-1630.

Bbosa G.S., Kitya D., Odda J. & Ogwal-Okeng J. 2013. Aflatoxins metabolism, effects on epigenetic mechanisms and their role in carcinogenesis. *Health*, 5:10A, 14-34.

Bedard L.L., Massey, T.E., 2006. Aflatoxin B1-induced DNA damage and its repair. *Cancer Letters*. 241:1, 174-183.

Biggs, P., & Parsons, C. M. 2008. The effects of several organic acids on growth performance, nutrient digestibilities, and cecal microbial populations in young chicks. *Poultry Science*, 87:12, 2581-2589.

Boling, S. D., Webel, D. M., Mavromichalis, I., Parsons, C. M., & Baker, D. H. 2000. The effects of citric acid on phytate-phosphorus utilization in young chicks and pigs. *Journal of Animal Science*, 78:3, 682-689.

Brenes, A., Viveros, A., Arija, I., Centeno, C., Pizarro, M., & Bravo, C. 2003. The effect of citric acid and microbial phytase on mineral utilization in broiler chicks. *Animal Feed Science and Technology*, 110:1, 201-219.

- Byrd, J. A., Hargis, B. M., Caldwell, D. J., Bailey, R. H., Herron, K. L., McReynolds, J. L., Kubena, L. F. 2001. Effect of lactic acid administration in the drinking water during preslaughter feed withdrawal on Salmonella and Campylobacter contamination of broilers. *Poultry Science*, 80:3, 278-283.
- Campbell, T. W. y Coles E. H. 1986. Avian clinical pathology. Pages 279-291 in *Veterinary Clinical Pathology*. E. H. Coles, ed. WB Saunders Company, Philadelphia, USA.
- Canibe, N., Engberg, R. M. & Jensen, B. B. 2001. An overview of the effect of organic acids on gut flora and gut health Proceedings of the Workshop: Alternatives to feed antibiotics and coccidiostats in pigs and poultry (AFAC), Norfa network, 13.-16. October, Oslo, Norway
- Chaveerach, P., Keuzenkamp, D. A., Urlings, H. A., Lipman, L. J., & Van Knapen, F. 2002. In vitro study on the effect of organic acids on Campylobacter jejuni/coli populations in mixtures of water and feed. *Poultry Science*, 81:5, 621-628.
- Chaveerach, P., Keuzenkamp, D. A., Lipman, L. J. A., & Van Knapen, F. 2004. Effect of organic acids in drinking water for young broilers on Campylobacter infection, volatile fatty acid production, gut microflora and histological cell changes. *Poultry Science*, 83:3, 330-334.
- Chen, C., Pearson, A. M., Coleman, T. H., Gray, J. I., Pestka, J. J., & Aust, S. D. 1984. Tissue deposition and clearance of aflatoxins from broiler chickens fed a contaminated diet. *Food and chemical toxicology*, 22:6, 447-451.
- Cherrington, C. A., Hinton, M., & Chopra, I. 1990. Effect of short-chain organic acids on macromolecular synthesis in Escherichia coli. *Journal of Applied Bacteriology*, 68:1, 69-74.
- Cherrington, C. A., Hinton, M., Mead, G. C. and Chopra, I. 1991. Organic acids: chemistry, antibacterial activity and practical applications. *Advances in Microbial. Physiology*. 32:1, 87-108.
- Ch'ih J.J., & Devlin, T. M. 1984. The distribution and intracellular translocation of aflatoxin B1 in isolated hepatocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 122:1, 1-8.
- Chowdhury, R., Islam, K. M. S., Khan, M. J., Karim, M. R., Haque, M. N., Khatun, M., & Pesti, G. M. 2009. Effect of citric acid, avilamycin, and their combination on the performance, tibia ash, and immune status of broilers. *Poultry Science*, 88:8, 1616-1622.
- Ciegler, A., Lillehoj, E. B., Peterson, R. E., & Hall, H. H. 1966. Microbial detoxification of aflatoxin. *Applied Microbiology*, 14:6, 934-939.
- Clifford, J. I., Rees, K. R., & Stevens, M. E. M. 1967. The effect of the aflatoxins B1, G1 and G2 on protein and nucleic acid synthesis in rat liver. *Biochemical Journal*, 103, 258-261.
- Cranwell, P. D., & Titchen, D. A. 1974. Gastric acid secretion in newly born piglets. *Research in Veterinary Science*.16:1, 105-107.
- Cserhádi, M., Kriszt, B., Krifaton, C., Szoboszlay, S., Háhn, J., Tóth, S., & Kukolya, J. 2013. Mycotoxin-degradation profile of Rhodococcus strains. *International Journal of Food Microbiology*, 166:1, 176-185.

Dahiya, J. P., Wilkie, D. C., Van Kessel, A. G., & Drew, M. D. 2006. Potential strategies for controlling necrotic enteritis in broiler chickens in post-antibiotic era. *Animal Feed Science and Technology*, 129:1, 60-88.

Dänicke, S., Valenta, H., Gareis, M., Lucht, H. W., & Reichenbach, H. V. 2005. On the effects of a hydrothermal treatment of deoxynivalenol (DON)-contaminated wheat in the presence of sodium metabisulphite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) on DON reduction and on piglet performance. *Animal Feed Science and Technology*, 118:1, 93-108.

Denli, M., Okan, F., & Celik, K. 2003. Effect of dietary probiotic, organic acid and antibiotic supplementation to diets on broiler performance and carcass yield. *Pakistan Journal of Nutrition*, 2:2, 89-91.

Dibner, J. J. & Buttin, P. 2002. Use of organic acids as a model to study the impact of gut microflora on nutrition and metabolism. *The Journal of Applied Poultry Research* 11:4, 453-463.

Doherty W.P. & Campbell T.C. 1973. Aflatoxin inhibition of rat liver mitochondria. *Chemico-biological interactions*, 7:2, 63-77.

Donaldson, W. E., Tung, H. T., & Hamilton, P. B. 1972. Depression of fatty acid synthesis in chick liver (*Gallus domesticus*) by aflatoxin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 41:4, 843-847.

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

Elias-Orozco, R., Castellanos-Nava, A., Gaytan-Martinez, M., Figueroa-Cárdenas, J. D., & Loarca-Piña, G. 2002. Comparison of nixtamalization and extrusion processes for a reduction in aflatoxin content. *Food Additives & Contaminants*, 19:9, 878-885.

El-Nezami, H., Kankaanpaa, P., Salminen, S., & Ahokas, J. 1998. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B1. *Food and Chemical Toxicology*, 36:4, 321-326.

Etches, R. J. 1998. *Reproduction in poultry*. Acribia, S.A.

Fan, Y., Zhao, L., Ma, Q., Li, X., Shi, H., Zhou, T., & Ji, C. 2013. Effects of *Bacillus subtilis* ANSB060 on growth performance, meat quality and aflatoxin residues in broilers fed moldy peanut meal naturally contaminated with aflatoxins. *Food and Chemical Toxicology*, 59, 748-753.

Gabal, M. A. & Azzam A. H.. 1998. Interaction of aflatoxin in the feed and immunization against selected infectious diseases in poultry. II. Effect on one-day old layer chicks simultaneously vaccinated against Newcastle disease, infectious bronchitis and infectious bursal disease. *Avian Pathology*. 27:3, 290-295

Gabert, V.M. & Sauer, W. C. 1994. The effects of supplementing diets for weanling pigs with organic acids. A review. *Journal of Animal and Feed Sciences*. 3:73-87.

Galvano, F., Pietri, A., Beruzzi, T., Piva, A., & Galvano, M. 1998. Activated carbons: in vitro affinity for ochratoxin-A and deoxynivalenol and relation of adsorption ability to physicochemical parameters *Journal of Food Protection*. 61:4, 469-475.

- Galvano, F., Piva, A., Ritieni, A., & Galvano, G. 2001. Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins: a review. *Journal of Food Protection*, 64:1, 120-131.
- Ghanem, I, Orfi, M, & Shamma, M. 2008. Effect of gamma radiation on the inactivation of aflatoxin B1 in food and feed crops. *Brazilian Journal of Microbiology* 39:4, 787-791.
- Gamage, T. V., Samarajeewa, U., Wettimuny, S. D. S., & Arseculeratne, S. N. 1985. Non-toxicity to ducklings of solar-irradiated coconut oil contaminated with aflatoxin. *MIRCEN Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 1:3, 239-245.
- Guengerich, F. P., Johnson, W. W., Shimada, T., Ueng, Y. F., Yamazaki, H., & Langouët, S. 1998. Activation and detoxication of aflatoxin B1. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 402:1, 121-128.
- Guengerich F.P., Arneson, K.O., Williams, K.M., Deng, Z., & Harris, T.M. 2002. Reaction of aflatoxin B1 oxidation products with lysine. *Chemical Research in Toxicology*, 15:6, 780-792.
- Halász, A., Lásztity, R., Abonyi, T., & Bata, Á. 2009. Decontamination of mycotoxin-containing food and feed by biodegradation. *Food Reviews International*, 25:4, 284-298.
- Hatch, R.C., Clark, J.D., Jain, A.V., Weiss, R., 1982. Induced acute aflatoxicosis in goats. Treatment with activated charcoal or dual combinations of oxytetracycline, stanozolol and activated charcoal. *American Journal of Veterinary Research*. 43, 644–648.
- Heathcote, J. G., & Hibbert, J. R. 1978. *Aflatoxins: chemical and biological aspects*. Elsevier Scientific Publishing Co.
- Herzallah, S., Alshawabkeh, K., & Fataftah, A. A. 2008. Aflatoxin Decontamination of Artificially Contaminated Feeds by Sunlight, γ -Radiation, and Microwave Heating. *The Journal of Applied Poultry Research*, 17:4, 515-521.
- Hsieh D. P. H., 1987. Mode of action of mycotoxins. In :*Mycotoxins in Food*, pp. 149-176, Krogh, P. (ed.) Academic Press, Cambridge.
- Hu, X. Q., and Liu Z. J. 1997. *Manual for detection of poultry disease*. China Agri. Uni. Pre, Beijing.
- Huwig, A., Freimund, S., Käppeli, O., & Dutler, H. 2001. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicology Letters*, 122:2, 179-188.
- Hwanga, C. A., & Draughon, F. A. 1994. Degradation of ochratoxin A by *Acinetobacter calcoaceticus*. *Journal of Food Protection*, 57:5, 410-414.
- Ibrahim, I. K., Shareef, A. M., & Al-Joubory, K. M. T. 2000. Ameliorative effects of sodium bentonite on phagocytosis and Newcastle disease antibody formation in broiler chickens during aflatoxicosis. *Research in Veterinary Science*, 69:2, 119-122.
- Jacob, J. P., Blair, R., & Gardiner, E. E. 1990. Effect of dietary lactate and glucose on the incidence of sudden death syndrome in male broiler chickens. *Poultry Science*, 69:9, 1529-1532.

- Jard, G., Liboz, T., Mathieu, F., Guyonvarc'h, A., & Lebrihi, A. 2011. Review of mycotoxin reduction in food and feed: from prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 28:11, 1590-1609.
- Kalavathy, R., Abdullah, N., Jalaludin, S., & Ho, Y. W. 2003. Effects of *Lactobacillus* cultures on growth performance, abdominal fat deposition, serum lipids and weight of organs of broiler chickens. *British Poultry Science*, 44:1, 139-144.
- Karaman, M., Basmacioglu, H., Ortatagli, M., & Oguz, H. 2005. Evaluation of the detoxifying effect of yeast glucomannan on aflatoxicosis in broilers as assessed by gross examination and histopathology. *British Poultry Science*, 46:3, 394-400.
- Kabak, B., Dobson, A. D., & Var, I. I. L. 2006. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46:8, 593-619.
- Kim, J. E., Bunderson, B. R., Croasdell, A., & Coulombe Jr, R. A. 2011. Functional characterization of alpha-class glutathione s-transferases from the Turkey (meleagris gallopavo). *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 124:1, 45.
- Klein P.J., Buckner R., Kelly J., & Coulombe R.A. 2000. Biochemical basis for the extreme sensitivity of turkeys to aflatoxin B1. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 165:1, 45-52.
- Kirchgessner, M. & Roth F.X. 1988. Energy value of organic acids in the rearing of piglets and the fattening of pigs. *Übersichten zur Tierernährung*. 16:1, 93-108.
- Kubena, L. F., Harvey, R. B., Huff, W. E., Corrier, D. E., Phillips, T. D., & Rottinghaus, G. E. 1990. Efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the toxicity of aflatoxin and T-2 toxin. *Poultry Science*, 69:7, 1078-1086.
- Kubena, L. F., Harvey, R. B., Bailey, R. H., Buckley, S. A., & Rottinghaus, G. E. 1998. Effects of a hydrated sodium calcium aluminosilicate (T-Bind) on mycotoxicosis in young broiler chickens. *Poultry Science*, 77:10, 1502-1509.
- Kyzlink, V. 1990. Principles of food preservation. *Developments in Food Science.*, 22, 337-355.
- Langhout, P. 2000. New additives for broiler chickens. *World Poultry*. Elsevier 16:3, 22-27.
- Lankaputhra, W. E. V., & Shah, N. P. 1998. Antimutagenic properties of probiotic bacteria and of organic acids. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 397:2, 169-182.
- Lemke, S. L., Ottinger, S. E., Mayura, K., Ake, C. L., Pimpukdee, K., Wang, N., & Phillips, T. D. 2001. Development of a multi-tiered approach to the in vitro prescreening of clay-based enterosorbents. *Animal Feed Science and Technology*, 93:1, 17-29.
- Li, Y., Liu, Y. H., Yang, Z. B., Wan, X. L., & Chi, F. 2012. The efficacy of clay enterosorbent to ameliorate the toxicity of aflatoxin B1 from contaminated corn (*Zea mays*) on hematology, serum biochemistry, and oxidative stress in ducklings. *The Journal of Applied Poultry Research*, 21:4, 806-815.

- Liem, A., Pesti, G. M., & Edwards, H. M. 2008. The effect of several organic acids on phytate phosphorus hydrolysis in broiler chicks. *Poultry Science*, 87:4, 689-693.
- Mabee, M. S., & Chipley, J. R. 1973. Tissue distribution and metabolism of aflatoxin B1-14C in broiler chickens. *Applied Microbiology*, 25:5, 763-769.
- Majewska, T., K. Pudyszac, K. Kozłowski, K. Bohdziewicz & P. Matusevičius. 2009. Whey and lactic acid in broiler chickens nutrition. *Veterinarija ir Zootechnika* 47:69, 56-59.
- McCormick, S. P. 2013. Microbial detoxification of mycotoxins. *Journal of Chemical Ecology*, 39:7, 907-918.
- McKenzie, K. S., Sarr, A. B., Mayura, K., Bailey, R. H., Miller, D. R., Rogers, T. D., & Phillips, T. D. 1997. Oxidative degradation and detoxification of mycotoxins using a novel source of ozone. *Food and Chemical Toxicology*, 35:8, 807-820.
- McLean, M., & Dutton, M. F. 1995. Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: an update. *Pharmacology & Therapeutics*, 65:2, 163-192.
- Méndez-Albores, J. A., Arámbula-Villa, G., Loarca-Piña, M. G., González-Hernandez, J., Castaño-Tostado, E., & Moreno-Martinez, E. 2004a. Aflatoxins fate during the nixtamalization of contaminated maize by two tortilla-making processes. *Journal of Stored Products Research*, 40:1, 87-94.
- Méndez-Albores, J. A., Villa, G. A., Rio-García, D., & Martínez, E. M. 2004b. Aflatoxin-detoxification achieved with Mexican traditional nixtamalization process (MTNP) is reversible. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84:12, 1611-1614.
- Méndez-Albores, A., Del Rio-Garcia, J. C., & Moreno-Martinez, E. 2007. Decontamination of aflatoxin duckling feed with aqueous citric acid treatment. *Animal Feed Science and Technology*, 135:3, 249-262.
- Miazzo, R., Rosa, C. A. R., Carvalho, E. D. Q., Magnoli, C., Chiacchiera, S. M., Palacio, G. & Dalcero, A. 2000. Efficacy of synthetic zeolite to reduce the toxicity of aflatoxin in broiler chicks. *Poultry Science*, 79:1, 1-6.
- National Research Council (NRC), 1994. *Nutrient Requirements of Poultry*. National 449 Academic Press, Washington, DC.
- Oguz, H., Hadimli, H. H., Kurtoglu, V., & Erganis, O. 2003. Evaluation of humoral immunity of broilers during chronic aflatoxin (50 and 100 ppb) and clinoptilolite exposure. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 154:7, 483-486.
- Park, D. L., Lee, L. S., Price, R. L., & Pohland, A. E. 1987. Review of the decontamination of aflatoxins by ammoniation: current status and regulation. *Journal-Association of Official Analytical Chemists*, 71:4, 685-703.
- Parker, D., C. Hofacre, G.F. Mathis, M.A. Quiroz, J. Dibner and C. Knight. 2006. Organic acid water treatment reduced Salmonella horizontal transmission in broiler chickens. *Proceedings of the 12th European Poultry Conference*. Verona, Italy, September 12-14. World's Poultry Science Association.

- Partanen, K. H., & Mroz, Z. 1999. Organic acids for performance enhancement in pig diets. *Nutrition Research Reviews*, 12:1, 117-145.
- Patel, U. D., Govindarajan, P. R. I. Y. A., & Dave, P. J. 1989. Inactivation of aflatoxin B1 by using the synergistic effect of hydrogen peroxide and gamma radiation. *Applied and Environmental Microbiology*, 55:2, 465-467.
- Phillips, T. D., Kubena, L. F., Harvey, R. B., Taylor, D. R., & Heidelbaugh, N. D. 1988. Hydrated sodium calcium aluminosilicate: a high affinity sorbent for aflatoxin. *Poultry Science*, 67:2, 243.
- Ramos, A. J., & Hernandez, E. 1997. Prevention of aflatoxicosis in farm animals by means of hydrated sodium calcium aluminosilicate addition to feedstuffs: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 65:1, 197-206.
- Rawal, S., Kim, J. E., & Coulombe Jr, R. 2010. Aflatoxin B1 in poultry: Toxicology, metabolism and prevention. *Research in Veterinary Science*, 89:3, 325-331.
- Rawal S. & Coulombe R.A. 2011. Metabolism of aflatoxin B1 in Turkey liver microsomes: the relative roles of cytochromes P450 1A5 and 3A37. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 254:3,349-354.
- Richard, J. L. 2007. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses—an overview. *International Journal of Food Microbiology*, 119:1, 3-10.
- Ricke, S. C. 2003. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. *Poultry Science*, 82:4, 632-639.
- Rustom, I. 1997. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chemistry*, 59:1, 57-67.
- Sacakli, P., Sehu, A., Ergun, A., Genc, B., & Selcuk, Z. 2006. The effect of phytase and organic acid on growth performance, carcass yield and tibia ash in quails fed diets with low levels of non-phytate phosphorus. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 19:2, 198.
- Sadeghi, A. A., Ahmadi-Mazhin, H., Shawrang, P., & Mohammadi-Sangcheshmeh, A. 2012. Effects of MOS and heat activated sodium bentonite as aflatoxin absorbents on antibody titers against Newcastle disease and infectious bursal disease viruses in broiler chickens. *World Applied Sciences Journal*, 18:1, 127-129.
- Salgado-Tránsito, L., Del Río-García, J. C., Arjona-Román, J. L., Moreno-Martínez, E., & Méndez-Albores, A. 2011. Effect of citric acid supplemented diets on aflatoxin degradation, growth performance and serum parameters in broiler chickens. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 43:3, 215-22.
- Samanta, S., Haldar, S., & Ghosh, T. K. 2009. Comparative efficacy of an organic acid blend and bacitracin methylene disalicylate as growth promoters in broiler chickens: Effects on performance, gut histology, and small intestinal milieu. *Veterinary Medicine International*, 2010.
- Samarajeewa, U., & Gamage, T. V. 1988. Combination of solvent and radiation effects on degradation of aflatoxin B1. *MIRCEN Journal of Applied microbiology and Biotechnology*, 4:2, 203-208.
- Samarajeewa, U., Sen, A. C., Cohen, M. D., & Wei, C. I. 1990. Detoxification of aflatoxins in foods and feeds by physical and chemical methods. *Journal of Food Protection*, 53:6, 489-501.

Sarr, A. B., Clement, B. A., & Phillips, T. D. 1990. Effects of molecular structure on the chemisorption of aflatoxin B1 and related compounds by hydrated sodium calcium aluminosilicate. *Toxicologist*, 10:1, 163.

SAS Institute Inc., 1998. SAS STAT User's Guide Release. 6.12. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

Sawhney, D. S., Vadehra, D. V., & Baker, R. C. 1973. The metabolism of 14C aflatoxins in laying hens. *Poultry Science*, 52:4, 1302-1309.

Santin, E., Paulillo, A. C., Maiorka, A., Nakaghi, L. S. O., Macari, M., da Silva, A. F., & Alessi, A. C. 2003. Evaluation of the efficacy of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broilers. *International Journal of Poultry Science*, 2:5, 341-344.

Scott, P.M. 1998. Industrial and farm detoxification processes for mycotoxins. In: Le Bars, J., and Galtier, P. Eds., *Mycotox'98 International symposium*. 2-4 July, Toulouse, France, 543-548.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), 2009, Situación Actual y perspectiva de la producción de carne de pollo en México. <http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Publicaciones/Lists/Estudios%20de%20situacin%20actual%20y%20perspectiva/Attachments/15/sitpollo99.pdf> Fecha de consulta Abril 2013.

Shetty, P. H., & Jespersen, L. 2006. *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. *Trends in Food Science & Technology*, 17:2, 48-55.

Shetty, P. H., Hald, B., & Jespersen, L. 2007. Surface binding of aflatoxin B *Saccharomyces cerevisiae* strains with potential decontaminating abilities in indigenous fermented foods. *International Journal of Food Microbiology*, 113:1, 41-46.

Shlig A.A. 2009. Effect of vitamin E and selenium supplement in reducing aflatoxicosis on performance and blood parameters in broiler chicks. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences* 23:1, 97-103.

Singh, P. P., Bedi, P. S., & Singh, D. 1987. Use of organic acids for protecting moist wheat grains from microbial colonization during storage. *Journal of Stored Products Research*, 23:3, 169-171.

Sorbi, D., J. Boynton, and K. D. Lindor. 1999. The ratio of aspartate aminotransferase to alanine aminotransferase: potential value in differentiating non-alcoholic steatohepatitis from alcoholic liver disease. *American Journal of Gastroenterology*. 94:1, 1018-1022.

Stanley, V. G., Ojo, R., Woldesenbet, S., Hutchinson, D. H., & Kubena, L. F. 1993. The use of *Saccharomyces cerevisiae* to suppress the effects of aflatoxicosis in broiler chicks. *Poultry Science*, 72:10, 1867-1872.

Tedesco, D., Steidler, S., Galletti, S., Tameni, M., Sonzogni, O., & Ravarotto, L. 2004. Efficacy of silymarin-phospholipid complex in reducing the toxicity of aflatoxin B1 in broiler chicks. *Poultry Science*, 83:11, 1839-1843.

Tejada-Castaneda, Z. I., Avila-Gonzalez, E., Casaubon-Huguenin, M. T., Cervantes-Olivares, R. A., Vasquez-Pelaez, C., Hernandez-Baumgarten, E. M., & Moreno-Martinez, E. 2008. Biodetoxification of aflatoxin-contaminated chick feed. *Poultry Science*, 87:8, 1569-1576.

- Timmerman, H. M., Veldman, A., Van den Elsen, E., Rombouts, F. M., & Beynen, A. C. 2006. Mortality and growth performance of broilers given drinking water supplemented with chicken-specific probiotics. *Poultry Science*, 85:8, 1383-1388.
- Tomas'evic'-C' anovic', M., Dakovic', A., Rottinghaus, G., Matijas'evic', S. & Duri'ci'c, M. 2003. Surfactant modified zeolites-new efficient adsorbents for mycotoxins. *Microporous and Mesoporous Materials.*, 61:1, 173-180.
- Tung, H. T., Donaldson, W. E., & Hamilton, P. B. 1972. Altered lipid transport during aflatoxicosis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 22:1, 97-104.
- Valdivia, A. G., Martinez, A., Damian, F. J., Quezada, T., Ortiz, R., Martinez, C. & Reyes, J. L. 2001. Efficacy of N-acetylcysteine to reduce the effects of aflatoxin B1 intoxication in broiler chickens. *Poultry Science*, 80:6, 727-734.
- Van Dyck, P. J., Tobback, P., Feyes, M., & Van De Voorde, H. 1982. Sensitivity of aflatoxin B1 to ionizing radiation. *Applied and Environmental Microbiology*, 43:6, 1317-1319.
- Varga, J., Rigó, K., & Téren, J. 2000. Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species. *International Journal of Food Microbiology*, 59:1, 1-7.
- Verma, J., Johri, T. S., Swain, B. K., & Ameena, S. 2004. Effect of graded levels of aflatoxin, ochratoxin and their combinations on the performance and immune response of broilers. *British Poultry Science*, 45:4, 512-518.
- Yesilbag, D., & Colpan, I. 2006. Effects of organic acid supplemented diets on growth performance, egg production and quality and on serum parameters in laying hens. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 157:5, 280.
- Yu, F. L. 1977. Mechanism of aflatoxin B1 inhibition of rat hepatic nuclear RNA synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 252:10, 3245-3251.
- Yu, F. L. 1981. Studies on the mechanism of aflatoxin B1 inhibition of rat liver nucleolar RNA synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 256:7, 3292-3297.
- Yunus, A. W., Razzazi-Fazeli, E., & Bohm, J. 2011. Aflatoxin B1 in affecting broiler's performance, immunity, and gastrointestinal tract: A review of history and contemporary issues. *Toxins*, 3:6, 566-590.
- Weidenbörner, M. 2011. *Mycotoxins and Their Metabolites in Humans and Animals*. Springer.
- Wogan, G.N., S. Paglialunga, P.M. Newberne. 1974. Carcinogenic effects of low dietary levels of aflatoxin B1 in rats. *Food and Cosmetics Toxicology* 12:1, 681-685.
- Wogan, G.N., 1992. Aflatoxins as risk factors for hepatocellular carcinoma in humans. *Cancer Research* 52:1, 2114-2118.
- Wu, Q., Jezkova, A., Yuan, Z., Pavlikova, L., Dohnal, V., & Kuca, K. 2009. Biological degradation of aflatoxins. *Drug Metabolism Reviews*, 41:1, 1-7.

Zhao, J., Shirley, R. B., Dibner, J. D., Uraizee, F., Officer, M., Kitchell, M. & Knight, C. D. 2010. Comparison of hydrated sodium calcium aluminosilicate and yeast cell wall on counteracting aflatoxicosis in broiler chicks. *Poultry Science*, 89:10, 2147-2156.

Zuo, R., Chang, J., Yin, Q., Wang, P., Yang, Y., Wang, X., Wang, G. & Zheng, Q. 2013. Effect of the combined probiotics with aflatoxin B1 degrading enzyme on aflatoxin detoxification broiler production performance and hepatic enzyme gene expression. *Food and Chemical Toxicology*, 59, 470-475.