



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
POSTGRADO DE BIOLOGÍA APLICADA

**EVALUACIÓN DE LA MICOFLORA Y BIOCONTROL DE
AFLATOXINAS EN ALIMENTOS CONCENTRADOS PARA POLLOS DE
ENGORDE**

LCDA. ROSSIANNY JOSÉ RODRÍGUEZ BEJARANO

TRABAJO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE MAGISTER SCIENTIARUM EN BIOLOGÍA
APLICADA MENCIÓN MICROBIOLOGÍA APLICADA

Cumaná, 2009



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
POSTGRADO DE BIOLOGÍA APLICADA

**EVALUACIÓN DE LA MICOFLORA Y BIOCONTROL DE
AFLATOXINAS EN ALIMENTOS CONCENTRADOS PARA POLLOS DE
ENGORDE**

LCDA. ROSSIANNY JOSÉ RODRÍGUEZ BEJARANO

TRABAJO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE MAGISTER SCIENTIARUM EN BIOLOGÍA
APLICADA MENCIÓN MICROBIOLOGÍA APLICADA

Cumaná, 2009

**EVALUACIÓN DE LA MICROFLORA Y BIOCONTROL DE
AFLATOXINAS EN ALIMENTOS CONCENTRADOS PARA POLLOS DE
ENGORDE**

APROBADO POR:

Dra. Sara Centeno Briceño
Asesora Académica

Dra. Luisa Rojas
Jurado

M.Sc. Mirella Pulgar
Jurado

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTOS	II
LISTA DE TABLAS.....	III
LISTA DE FIGURAS	IV
RESUMEN	V
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA.....	21
Recolección y transporte de las muestras	21
Procesamiento de las muestras.....	21
Recuento de las unidades formadoras de colonia por gramo (UFC/g)	21
Aislamiento de hongos filamentosos y levaduras	22
Identificación de los microorganismos aislados	23
Determinación de aflatoxinas.....	24
Fundamento del test	24
Preparación de la muestra y extracción.....	25
Procedimiento del Test	25
Evaluación de la capacidad de biocontrol de aflatoxinas por acción de extractos de <i>Citrus limon</i>	26
Determinación del crecimiento fúngico	27

Actividad Tóxica.....	28
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
CONCLUSIONES.....	54
RECOMENDACIONES	56
BIBLIOGRAFÍA	57
HOJA DE METADATOS.....	76

DEDICATORIA

La vida te da la oportunidad de seguir adelante, superándote y alcanzando nuevos logros, quiero dedicar la culminación de esta meta a los seres más importantes de mi vida, que me han acompañado en las buenas y las malas colmándome de amor, alegrías y consejos. Los que nunca me dejaron abandonar mis sueños, motivándome, y siendo mi ejemplo a seguir, por su entrega, constancia, valor, trabajo, fortaleza en todas las cosas que se han propuesto.

A mis padres Ana Rosa Bejarano de Rodríguez y Huber Rodríguez Guevara,

mis hermanos Hubiannys Rodríguez Bejarano y Huber Rodríguez Bejarano y a mi gran amor Robert Carvajal Valor

A todos los amo.

AGRADECIMIENTOS

A:

Mi asesora Dra. Sara Centeno Briceño por toda su ayuda, sus consejos durante el desarrollo de esta investigación y sobre todo por brindarme su amistad.

El Prof. Hernando Herrera por su colaboración y consejos en los ensayos de la actividad tóxica

La Distribuidora avícola del estado Sucre, ubicada en Cumanacoa por abrirnos las puertas y permitirnos recolectar las muestras.

La Dra. María Ángeles Calvo Torras, catedrática de la Universidad Autónoma de Barcelona- España, por su valioso asesoramiento en el desarrollo de la fase experimental de este trabajo.

La Lcda. Sara Figueroa, por compartir los esfuerzos en el laboratorio durante el desarrollo de la investigación.

GRACIAS A TODOS

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. Porcentaje de géneros de hongos aislados de las muestras de alimentos concentrados para pollos de engorde.....	31
TABLA 2. Porcentaje de especies de hongos aisladas de muestras de alimentos concentrados para pollos de engorde.....	33
Tabla 3. Concentración de Aflatoxinas Totales (AFt) en las muestras de alimentos concentrados para pollos de engorde.....	40
Tabla 4. Efecto del extracto de <i>Citrus limon</i> sobre la concentración de aflatoxinas totales en las muestras de alimentos concentrados para pollos de engorde.....	44
Tabla 5. Actividad tóxica del extracto de <i>Citrus limon</i> mezclado con diferentes concentraciones patrones de aflatoxinas frente al crustáceo <i>Artemia salina</i>	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras de las aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ , M ₁ y M ₂	6
Figura 2. Características Macroscópicas de <i>Pencillium citrinum</i> en Agar Papa	38
Figura 3. Características Microscópicas de <i>Penicillium citrinum</i> en Agar Papa	38
Figura 4. Características Macroscópicas de <i>Eurotium herbariorum</i> en Agar Czapek.	39
Figura 5. Características Microscópicas de <i>Eurotium herbariorum</i> en Agar Czapek.	39
Figura 6. Características Macroscópicas de <i>Aspergillus flavus</i> en Agar Extracto de Malta.	40
Figura 7. Características Microscópicas de <i>Aspergillus flavus</i> en Agar Extracto de Malta	40
Figura 8. Efecto de extracto de <i>Citrus limon</i> sobre el crecimiento de <i>A. flavus</i>	46
Figura 9. Efecto de extracto de <i>Citrus limon</i> sobre el crecimiento de <i>P. citrinum</i>	47
Figura 10. Efecto de extracto de <i>Citrus limon</i> sobre el crecimiento de <i>A. niger</i>	47
Figura 11. Efecto de extracto de <i>Citrus limon</i> sobre el crecimiento de <i>P. citrinum</i>	50
Figura 12. Efecto de extracto de <i>Citrus limon</i> sobre el crecimiento de <i>A. flavus</i>	50
Figura 13. Efecto de extracto de <i>Citrus limon</i> sobre el crecimiento de <i>A. niger</i>	51

RESUMEN

En el presente estudio se evaluó la micoflora y la presencia de aflatoxinas en alimentos concentrados para pollos de engorde, con el fin de controlar el desarrollo de hongos aflatoxigénicos y su toxina con la aplicación de técnicas de biocontrol utilizando un extracto de *Citrus limon*. Para ello, se recolectaron 50 muestras de un lote de alimentos concentrados para pollos de engorde. Se determinaron las unidades formadoras de colonia por gramo (ufc/g) y se identificaron las especies fúngicas aisladas. Se cuantificaron las concentraciones de aflatoxinas totales a través del método de enzaimmunoensayo competitivo (ELISA), luego se aplicó un sistema de biocontrol contra aflatoxinas utilizando el extracto de *Citrus limon*. La capacidad antifúngica del extracto se determinó sobre el crecimiento de hongos descritos como aflatoxigénicos y se aplicó un ensayo de toxicidad sobre *Artemia salina* para descartar la posible toxicidad de los compuestos formados después del biocontrol. El recuento fúngico ($3,3 \times 10^4$ UFC/g) se encontró por debajo del límite micológico establecido por normas internacionales. De las especies fúngicas aisladas, se halló mayor frecuencia de *Penicillium citrinum*, *Eurotium herbariorum* y *Aspergillus flavus*. Se detectó que el 90% de las muestras analizadas estuvo contaminado con aflatoxinas, encontrándose el mayor porcentaje entre las concentraciones de 5 a 14 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (54%). Por otra parte, el extracto de *Citrus limon* resultó ser un potente antifúngico y antiaflatoxigénico, reduciendo significativamente las concentraciones de aflatoxinas en las muestras de alimentos para pollos de engorde e inhibiendo por completo el desarrollo de hongos aflatoxigénicos. El extracto de *Citrus limon* mezclado con concentraciones por debajo de 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de aflatoxina no resultó tóxico para el crustáceo *Artemia salina*.

INTRODUCCIÓN

Los alimentos concentrados para aves, son el producto alimenticio resultante de la mezcla final de materias primas capaces de satisfacer todos los requerimientos de la especie para una determinada edad y propósito. Las materias primas para elaborar alimentos concentrados para animales son productos preparados industrialmente, cuya composición está representada por cereales (maíz, sorgo, trigo y harina de soya), subproductos de cereales, melaza de caña, grasa, calcio, fósforo, vitaminas, minerales trazas y aditivos (enzimas y hormonas). De estos componentes, los cereales, principalmente el maíz, el trigo, el sorgo y, recientemente, el arroz, son las principales fuentes energéticas que constituyen más del 50% del total de los ingredientes de las raciones para pollos de engorde (COVENIN, 1983; González, 1990; Armas y Chicco, 2000).

La mayoría de los hongos filamentosos son contaminantes habituales de las materias primas de alimentos destinados al consumo animal, ya que son capaces de crecer en hojas, tallos, cereales y semillas, entre otros. Dentro de los productos agrícolas, los más susceptibles a la contaminación por hongos son los cereales (arroz, trigo, cebada y maíz). El grado de contaminación de estos cereales depende de las condiciones climáticas a nivel de campo, de las condiciones de almacenamiento y procesamiento post-cosecha; estas condiciones están caracterizadas por temperaturas superiores a 30°C en las bodegas de almacenajes, la presencia de humedad interna del alimento por encima del 12%, la acción dañina de los insectos y otros microorganismos, que en conjunto favorecen la colonización de los

hongos (Hashem, 1990; Hayes, 1993; Petersson y Schnürer, 1995; Gqaleni *et al.*, 1997; Blanco, 1999; Colleen y David, 1999; Miller, 2001; Saunders, 2001; Scudamore, 2005; Cotty y García, 2007).

En diferentes investigaciones, se han aislado numerosas especies de hongos en muestras de alimentos concentrados destinados al consumo animal, estableciéndose que la mayoría de las especies aisladas pertenecen a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Acremorium*, *Monilia*, *Botrytis*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Thichothecium*, *Absidia*, *Candida*, *Rhodotorula* y *Geotrichum*, entre otros (Kamphuis *et al.*, 1992; Mahmoud, 1993; Dalcero *et al.*, 1997; Magnoli *et al.*, 1998; Pascual y Calderón, 2000; Dutta y Das, 2001; Amer, 2005).

Cuando las materias primas y alimentos concentrados para animales son colonizados por hongos filamentosos existe el riesgo de contaminación con micotoxinas, producidas a través del metabolismo secundario del microorganismo. Este metabolismo se define como todos aquellos procesos por medio de los cuales los microorganismos producen sustancias, que por su naturaleza química, no pueden considerarse necesarias para su ciclo vital, ni su crecimiento celular. Estas moléculas son relativamente pequeñas y suelen ser genotípicamente específicas para un grupo de especies de un mismo género (Abramson *et al.*, 1997; Scott, 1997; Placinta *et al.*, 1999; Calvo *et al.*, 2002).

La mayoría de las micotoxinas descritas son producidas por especies de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. Estos productos metabólicos se desarrollan en una variedad de sustratos y su presencia en niveles superiores a los tolerables representa una amenaza para la inocuidad

de los alimentos y un riesgo importante para la salud (Desjardins *et al.*, 2000; Thompson y Scott, 2000; Bennett y Klich, 2003 y Soriano, 2007).

Hasta el momento, se han descrito alrededor de 300 micotoxinas, de las cuales sólo unas pocas reciben atención especial por su mayor amenaza para la salud humana y animal. Las micotoxinas con un especial interés biológico y económico son las aflatoxinas, ocratoxinas, tricotecenos, zearelenona y fumonisinas. La toxicidad de estos metabolitos secundarios en los animales puede ser aguda tras una elevada ingestión de la toxina o crónica en exposiciones prolongadas a bajos niveles (D'Mello y Macdonald, 1997; Bennett y Klich, 2003; Flores *et al.*, 2006).

La producción de micotoxinas se asocia normalmente a un reducido número de especies. Así, las aflatoxinas están producidas por algunas especies de *Aspergillus* sección *Flavi*, y las ocratoxinas por especies del género *Aspergillus* sección *Circumdati* y por *Penicillium verrucosum*. Las fumonisinas, son producidas principalmente por especies de *Fusarium* sección *Liseola* (Abarca, *et al.*, 2000).

De las especies de *Aspergillus*, las más comunes clasificadas como toxigénicas son: *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. fumigatus*, *A. versicolor* y *A. ochraceus*, pertenecientes a la clase Deuteromycetes, de reproducción asexual y caracterizadas morfológicamente por presentar micelios e hifas hialinas septadas, con formación de conidióforos con vesículas que van desde rectangulares hasta globosas, algunas de ellas pueden presentar métulas y esterigmas que contienen los conidios livianos y de fácil propagación, los alimentos donde frecuentemente se han aislado estos microorganismos son: cereales, nueces, tabaco, higos, semillas

oleaginosas, entre otros (Abarca, *et al.*, 2000; Bennett y Klich, 2003 y Martins *et al.*, 2003).

El género *Penicillium* es un hongo filamentoso que contamina frecuentemente a los alimentos en almacenamiento, produce más de 10 micotoxinas diferentes (ácido ciclopiazónico, patulina, citrinina, ácido penicílico, entre otras). Este género también pertenece a la clase Deuteromycetes, es de reproducción asexual, y se caracteriza morfológicamente por presentar hifas hialinas acompañadas de conidióforos en forma de pincel. Las especies de este género descritas como micotoxigénicas son: *P. citrinum*, *P. verrucosum*, *P. viridicatum*, *P. brevicompactum*, *P. chrysogenum*, *P. expansum*, *P. aurantiogriseum*, etc; las cuales son aisladas frecuentemente de cereales, frutas tales como manzana, pera, entre otros alimentos (Abarca, *et al.*, 2000; Bennett y Klich, 2003; Martins *et al.*, 2003).

De las especies de *Fusarium* existentes en la naturaleza, sólo un pequeño número contamina los cultivos de cereales; especialmente los de maíz, éstas producen micotoxinas tales como: fumonisinas, zearalenona y tricotecenos. Las especies toxigénicas comúnmente identificadas son: *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. anthophilum* y *F. globosum*. Taxonómicamente pertenecen a la clase Deuteromycetes, se reproducen de forma asexual y morfológicamente presentan micelio septado, hialino, con conidióforos que sostienen macroconidios fusiformes, la mayoría producen esclerotes que les permiten sobrevivir en condiciones adversas (Samson, 1998; Abarca, *et al.*, 2000; Bennett y Klich, 2003; Martins *et al.*, 2003).

Las micotoxinas que comúnmente contaminan los cereales son las aflatoxinas, ocratoxina A, fumonisina, deoxynivalenol y zearalenona, las

cuales se caracterizan por su capacidad de resistir altas temperaturas; lo que trae como consecuencia que no sean completamente destruidas durante el procesamiento del alimento, estando presente en el producto finalmente procesado (Bullerman y Bianchini, 2007).

Las aflatoxinas (AF) son las de mayor importancia en la avicultura, y son producidas por las especies *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. oryzae* y *Penicillium puberulum*. En 1967 fueron reportadas las especies *A. niger*, *A. gruber*, *A. wentii*, *P. frequentans*, *P. variabile* y *P. citrinum* como productoras de aflatoxinas. Las principales aflatoxinas son conocidas como B₁, B₂, G₁ y G₂, cuyos nombres se refieren a la fluorescencia observada bajo luz ultravioleta, la cual puede ser azul (B) o verde (G) y cuyos subíndices indican la movilidad cromatográfica relativa. Así mismo, dentro del grupo de las aflatoxinas se deben mencionar las aflatoxinas M₁ y M₂, las cuales son formas hidrolizadas de las AFB₁ y AFB₂ las cuales son excretadas en la leche de los mamíferos cuando consumen alimentos contaminados con estas aflatoxinas (Jiujiang, *et al.*, 2002; Eaton y Gallagher, 1994; Soriano, 2007).

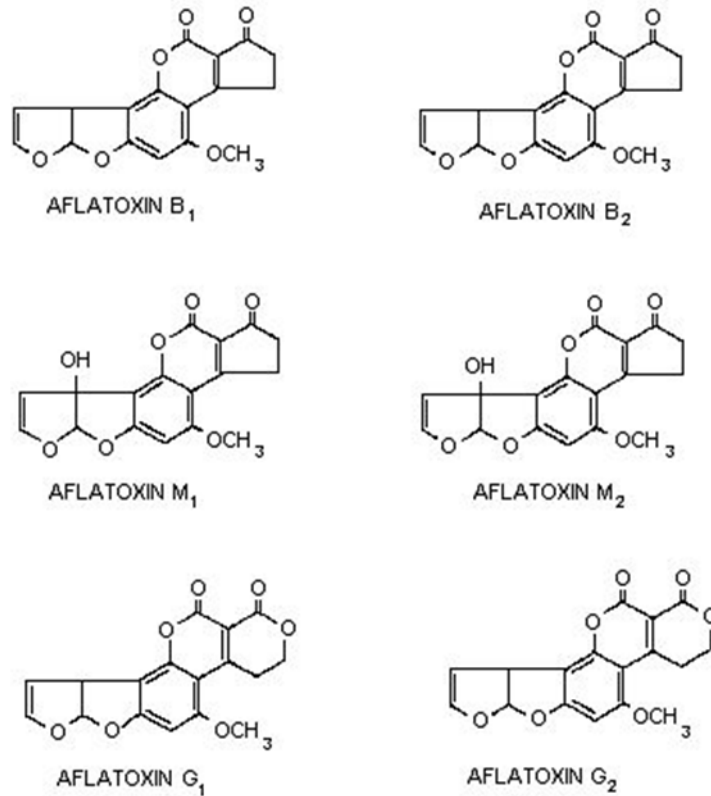


Figura 1. Estructuras de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ y M₂ (Urrego y Díaz, 2006).

Las aflatoxinas son inodoras, insípidas e incoloras. Químicamente, son estables en los alimentos y resistentes a la degradación bajo procedimientos de cocción normales. Es difícil eliminarlas una vez que se producen. La exposición humana a aflatoxinas se origina principalmente por ingestión de comidas contaminadas. La inhalación de estas toxinas también puede suceder ocasionalmente debido a exposición de tipo laboral o profesional (Urrego y Díaz, 2006).

Este tipo de toxina actúa inhibiendo la incorporación de precursores para la síntesis de ADN, ARN y proteínas, además bloquea la acción de ciertas enzimas que ayudan a la síntesis de ácidos nucleicos, causando en el hígado, necrosis centrolobulillar, infiltración de polimorfonucleares. La toxicidad va a depender de la dosis, del grado de exposición, la edad y el estado nutricional del animal, y los posibles efectos sinérgicos de otros agentes químicos a los que esté expuesto (Peraica *et al.*, 1999; Villalobos *et al.*, 2001; Bennett y Klich, 2003; Astoviza y Socarrás, 2005).

La aflatoxicosis ha sido reportada y descrita en pollos de engorde, así como sus consecuencias en la salud y capacidad productiva del ave como una alteración generalizada que conlleva a la pérdida de peso, alteración de la conversión alimenticia e inmunosupresión, esta última aumenta la susceptibilidad del ave a sufrir enfermedades virales y bacterianas (D'Mello y Macdonald, 1997; Perozo *et al.*, 2003).

El maíz y otros cereales durante la pre- y post cosecha pueden ser contaminados con *A. flavus*, principalmente cuando existen fallas, por malas prácticas de manufacturación, así como, durante la recolección y almacenamiento de estos alimentos; aunado a esto, el aumento de la temperatura alrededor de 28°C en las bodegas de almacenamiento y porcentajes de humedad correspondida entre 8-12% y 17-19%, respectivamente, favorecen la mayor producción y acumulación de aflatoxinas en el alimento (Giorni, *et al.*, 2006).

La contaminación por aflatoxinas durante las cosechas de algunos cereales puede ocurrir en dos etapas: la primera sucede cuando se produce

la contaminación fúngica en los cultivos, y la segunda durante la recolección y almacenamiento de los granos; sin embargo, la contaminación puede suceder de forma combinada en las dos fases, por ejemplo; debido a daños causados por insectos en el campo o a la mala manipulación post-cosecha (Cotty y García, 2007).

Se han establecido reglamentos que limitan la concentración de micotoxinas en diversos países para proteger al consumidor de los efectos nocivos de estos compuestos. Estas regulaciones se establecen dependiendo de la disponibilidad de datos toxicológicos y de la aparición de nuevos datos, así como también, de un conocimiento detallado sobre las posibilidades de muestreo, análisis de las muestras y problemas socioeconómicos. A finales del año 2003, aproximadamente 100 países (que cubren el 85% de los habitantes del mundo) establecieron regulaciones específicas para las micotoxinas en los alimentos. Las normas se referían a las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂, la aflatoxina M₁, los tricotecenos (deoxinivalenol, diacetoxyscirpenol, T-2 y la toxina HT-2), Fumonisin (B₁, B₂ y B₃), ácido agárico, ocratoxina A, patulina, esterigmatocistina y zearalenona (Van Egmond *et al.*, 2007).

Debido a la comprobada naturaleza tóxica de las aflatoxinas, los organismos gubernamentales han establecido concentraciones límites de estos metabolitos tóxicos en los alimentos. Países como Estados Unidos, México y Venezuela reglamentan que el alimento destinado al consumo animal no debe sobrepasar de 20,0 µg/kg, mientras que la Comunidad Europea establece que los límites para aflatoxinas deben ser menores de 5 µg/kg (FAO, 2003; Perozo *et al.*, 2003; Requena *et al.*, 2005; Krishnamurthy y Shashikala, 2006; Zinedine *et al.*, 2007).

Las industrias procesadoras de alimentos concentrados para animales, deben garantizar que sus productos estén por debajo de los límites toxicológicos establecidos para micotoxinas. La mejor manera de evitar problemas de contaminación por micotoxinas, es a través de la prevención; sin embargo, muchas veces las medidas de prevención son insuficientes, y se estima que gran parte de los granos del mundo se encuentren contaminados con micotoxinas. Por consiguiente, se han buscado diversas formas para tratar el grano contaminado (NOM, 2000).

La mejor herramienta para evitar la presencia de micotoxinas en los alimentos es inspeccionar las condiciones de almacenamiento (temperatura, humedad, actividad de agua); sin embargo, cuando la contaminación es inevitable, se deben utilizar estrategias de destoxificación teniendo en cuenta que el procedimiento ideal de descontaminación debe ser fácil de usar, de bajo costo y no debe producir compuestos que también sean tóxicos. Además, el proceso debe ser irreversible y no debe alterar el valor nutricional del grano o del alimento tratado (Martín *et al.*, 2002).

Los métodos de descontaminación se pueden dividir básicamente en métodos físicos, químicos, fisicoquímicos y biológicos. Esta división es de manera convencional, pues algunos métodos utilizan combinaciones de los diferentes principios de acción. Entre los métodos físicos se incluyen, la separación mecánica, la flotación, separación por color o remoción de los granos quebrados y lavado con soluciones después de la recolección de los granos. Probablemente, el método físico más empleado en una industria pecuaria sea la separación de granos quebrados, esto permite reducir de una manera importante la contaminación por micotoxinas, sin embargo con

frecuencia no se hace, debido a un concepto equivocado de utilizar al máximo los granos, sin pensar en los riesgos productivos (Pitt y Hocking, 2006).

Entre los métodos químicos utilizados para la eliminación de algunas micotoxinas, se encuentran el uso de sustancias amoniacales, formol, hidróxido de calcio, bisulfito de sodio, ozono, cloro, monometilamina y las irradiaciones; no obstante, estos tratamientos están siendo prohibidos por las nuevas legislaciones europeas, debido al grado de efectos secundarios que pueden producir en los consumidores (Lingk, 1991; Sanchis *et al.*, 2000; Unnikrishnan y Nath, 2002; García y Heredia, 2006; Magan, 2006).

Los métodos biológicos operan a través de procesos bioquímicos, tales como: el uso de microorganismos competitivos, enzimas microbianas capaces de inactivar algún punto en la biosíntesis de micotoxinas, modificación genética de los granos y modificación genética de los hongos, este último es usado para la inoculación de cepas no toxigénicas en plantas o granos susceptibles. Así mismo, en la actualidad se está ampliando el uso de microorganismos para desintoxicar a un organismo después de haber ingerido la aflatoxina, como lo demuestran estudios realizados por Tejada *et al.* (2008) quienes señalan que alimentos inoculados con *Nocardia corynebacteroides* y suministrados a pollos, previamente contaminados con aflatoxina, puede reducir significativamente daños histológicos en órganos diana, tales como hígado, riñón e intestino delgado (Widstrom *et al.*, 1995; Sanchis *et al.*, 2000; Kabak *et al.*, 2006 y Krishnamurthy y Shashikala, 2006).

En Europa disminuyen las pérdidas en la producción enfocándose en minimizar la contaminación de aflatoxinas, una de las técnicas utilizadas es

mezclar los alimentos con extractos naturales, ya que un gran número de hierbas y plantas han sido reportadas como inhibidores de la producción de aflatoxinas; así mismo, en las cosechas de algunas materias primas se han creado ambientes competitivos con otros microorganismos como *Mucor*, *Rhizopus* y cepas no aflatoxigenicas de *A. flavus* y *A. parasiticus* que impiden la producción de esta micotoxina, con esto se ha conseguido disminuir el efecto tóxico de estos hongos ya que estas estrategias son de simple aplicación, poseen muy baja toxicidad para los animales y no presentan efectos fitotóxicos (Sanchis *et al.*, 2000; Kabak *et al.*, 2006 y Krishnamurthy y Shashikala, 2006).

Pitt y Hocking (2006) emplearon técnicas que permiten disminuir la producción de aflatoxinas en alimentos, usando la exclusión competitiva o inhibición competitiva, esta técnica consiste en contaminar el suelo o los granos con hongos como *Aspergillus flavus* o *Aspergillus parasiticus* no toxigénicos. El proceso de inhibición se logra porque los microorganismos no toxigénicos inoculados se desarrollan mejor sobre el sustrato, reduciendo el desarrollo los hongos micotoxigénicos.

Otra técnica ampliamente extendida son las modificaciones genéticas realizadas a las plantas (transgénesis) las cuales logran la sobre-expresión de proteínas y metabolitos antifúngicos, que realzan el sistema de defensa de la planta. Así mismo, se han usado bacterias endofíticas, como *Bacillus subtilis*; cuyo sistema enzimático reduce la acumulación de micotoxinas, ya que esta bacteria ocupa un lugar ecológico dentro de la planta de maíz y compite con hongos como *Fusarium moniliforme*, cuya estrategia funciona como un principio competitivo de exclusión (Bacon *et al.*, 2001; Duvick, 2001).

En busca de nuevas alternativas de control, con sustancias que sean inofensivas tanto para el hombre como para el ambiente, se están empleando compuestos de origen natural que tengan propiedades antifúngicas, como son los aceites esenciales. Los aceites esenciales son productos obtenidos del reino vegetal, en los que se hallan concentrados sabores y aromas característicos. Están constituidos por mezclas complejas de hidrocarburos, compuestos oxigenados y residuos no volátiles, contenidos en glándulas o vesículas secretoras inmersas en los tejidos de las hojas, flores, corteza (pericarpio) y semillas de los frutos de muchas especies. Las plantas pueden producir aceites esenciales para diversos fines; por un lado protegen a la planta de plagas, enfermedades e inclusive de la invasión de otras plantas y por otro lado para atraer insectos y aves (polinizantes). Estas cualidades de protección y atracción, se ven reflejadas en propiedades antisépticas, antiinflamatorias, antidepresivas, afrodisíacas y otras, presentes en mayor o menor grado en la totalidad de los aceites (Soliman y Badaea, 2002; Martínez, *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004 García y Heredia, 2006; Magan, 2006; Magro *et al.*, 2006).

Los aceites esenciales pueden ser utilizados como antioxidantes naturales en sustitución de componentes químicos añadidos como preservantes en alimentos. Adicionalmente, las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales derivan de numerosas plantas orgánicas que han sido empíricamente organizadas en centenares, pero sólo han tenido importancia científica recientemente. Son muchos los géneros que han sido utilizados como aceites esenciales, entre los que se destaca: *Thymus*, *Origanum*, *Syzygium*, *Mentha* y *Eucalyptus*, los cuales han exhibido propiedades antioxidantes por la presencia de carvacrol, eugenol, mentol y

eucaliptol; respectivamente, que ejercen efectos antifúngicos y antibacteriales (Serrano, *et al.*, 2008).

La composición química de las esencias naturales está constituida por una mezcla que puede contener alrededor de 20 a 60 componentes en diferentes concentraciones, con un predominio de 2 ó 3 compuestos en altas concentraciones comparados con otros componentes que pueden estar presentes en cantidades trazas. Por ejemplo, en el aceite esencial de *Origanum compactum* los mayores componentes presentes son carvacrol (30%) y timol (27%), en el de *Coriandrum sativum* es el linalol (68%). Así mismo, *Artemisia herba-alba* contiene un 57% de α y β -tuyona y un 24% de canfor, *Cinnamomum camphora* posee un 50% de 1,8 cineol, en la *Menta piperita* existe un 59% de mentol y 19% de mentona, entre otros. Generalmente estos compuestos determinan las propiedades biológicas de los aceites esenciales (Bakkali *et al.*, 2008).

Estas sustancias incluyen dos grupos de origen biológico sintetizados de manera diferente. El principal grupo está constituido por terpenos y terpenoides y el otro por componentes aromáticos y alifáticos, todos caracterizados por su baja masa molecular. Los principales terpenos son los monoterpenos que constituyen el 90% de la mayoría de los aceites esenciales y sesquiterpenos pero también pueden existir diterpenos, triterpenos y tetraterpenos. Las estructuras funcionales son conocidas como: Carbures (azulenos, bisaboleno, cadinenes, farnesol, logifolono, entre otros), alcoholes (bisabol, cedrol, farnesol, carotol, etc), cetonas (germacrona, turmenonas, vetinona, entre otras) y epóxidos (óxido cariofileno, epóxidos humuleno, etc.) los ejemplos más comunes de plantas que contienen estos compuestos son: angélica, bergamota, caraway, citronella, eucaliptus,

lavandina, limón, mandarina, menta, naranja, tomillo, entre otras (Grassmann y Elstner, 2003; Burt, 2004; Bakkali *et al.*, 2008).

Los componentes aromáticos derivados del fenilpropano, son menos frecuentes que los terpenos, entre los más conocidos se tiene a los aldehídos (cinnamaldehído), alcoholes (alcohol cinnámico), fenoles (cavicol, eugenol), derivados metoxi (anetola, elemicina, estragola, metileugenoles), componentes dioximetilenos (apiola, miristicina, safrola); las principales plantas que poseen estos componentes son: anís, canela, clavo, y algunas familias botánicas como: Apiaceae, Lamiaceae, Myrtaceae y Rutaceae) (Burt, 2004; Bozin, *et al.*, 2006; Bakkali *et al.*, 2008).

Los aceites esenciales pueden sufrir degradación química, siendo un proceso mediante el cual la calidad de las sustancias químicas es reducida en el tiempo. Existen tres factores responsables de la degradación de los aceites esenciales, éstos son: presencia de oxígeno, calor y luz. El oxígeno puede cambiar la composición química por combinación con algunos de sus componentes, este proceso es llamado oxidación y tiende a ocurrir en aceites esenciales ricos en terpenos, tales como el limón y el pino; la oxidación tiende a ocurrir más rápido que la degradación por el calor y la luz. Sin embargo, es igual de importante almacenarlos fuera del alcance del calor y en frascos de color ámbar, cualquier tipo de degradación de las esencias naturales reducirá sus efectos antimicrobianos (Tisserand, 1996).

Las propiedades antimicrobianas de diferentes extractos de plantas están relacionados con su habilidad de sintetizar, por metabolismo secundario, varios componentes químicos de estructura relativamente compleja, entre las cuales se incluyen compuestos alcaloides, flavonoides,

isoflavonoides, taninos, cumarinas, glicósidos, terpenos, fenilpropanos y ácidos orgánicos (Souza, *et al.*, 2005).

La actividad biológica de los extractos naturales puede deberse al sinergismo entre sus diversos componentes ya que por separado poseen menos actividad que cuando se encuentran juntos, su mecanismo de acción no se conoce en profundidad, pero se puede señalar que su actividad microbiostática o microbicida está asociada a compuestos lipofílicos que pasan a través de la pared celular y la membrana citoplasmática desordenando las diferentes capas de polisacáridos, ácidos grasos y fosfolípidos. En bacterias la permeabilización de la membrana está asociada con pérdida de iones y reducción del potencial de membrana, colapsando la bomba de protones y reduciendo el pool de ATP, también pueden coagular el citoplasma. En células eucarióticas, como los hongos, los aceites esenciales pueden provocar despolarización de las membranas mitocondriales por disminución del potencial de membrana afectando el ciclo iónico del calcio y otros canales iónicos y reduce el gradiente de pH afectando (como en las bacterias) la bomba de protones y el pool de ATP. El cambio de la fluidez de la membrana produce la permeabilidad anormal de radicales, citocromo C, iones de calcio y proteínas como resultado de estrés oxidativo y fallas bioenergéticas. La permeabilización fuera y dentro de la membrana de la mitocondria puede causar la muerte por apoptosis y necrosis (Souza, *et al.*, 2005; Krishnamythy y Shashikala, 2006; Bakkali *et al.*, 2008).

Actualmente, se han especificado mecanismos y espectros de acción de algunos aceites esenciales, por ejemplo el carvacrol y timol (componentes de aceites esenciales de orégano) son capaces de desintegrar la membrana externa de las bacterias Gram negativas, liberando los lipopolisacáridos e

incrementando la permeabilidad de la membrana, con pérdida paulatina de ATP, magnesio, iones de cloro entre otros, se ha encontrado que el eugenol (mayor componente de aceite de clavo) inhibe la producción de amilasa y proteasa de *B. cereus*, posteriormente deteriora la pared celular y aumenta el lisis de la bacteria, así mismo, el p-cimeno, un precursor biológico del carvacrol, es hidrofóbico y causa plasmólisis del citoplasma, pero no es efectivo por sí sólo, ya que cuando es combinado con carvacrol, se ejerce de manera efectiva su acción, el p-cimeno se inserta en la bicapa lipídica y permite el transporte del carvacrol, entre otros (Burt, 2004; Bozin, 2006).

Las observaciones por microscopia electrónica revelan alteraciones ultraestructurales de varios compartimientos de la membrana plasmática, citoplasma y núcleo. El análisis de perfiles lipídicos por cromatografía de gas y de la envoltura celular por microscopia electrónica de varias bacterias tratadas con aceites esenciales muestra un fuerte descenso de ácidos grasos insaturados y un incremento de ácidos grasos saturados. Las propiedades citotóxicas son de gran importancia en las aplicaciones de los aceites esenciales no sólo para ciertos patógenos para animales y humanos, sino también para la preservación de productos de origen agrícola o marino. Los aceites esenciales o algunos de sus componentes son efectivos para una gran variedad de organismos incluyendo virus, bacterias, hongos, protozoarios y parásitos (Bakkali *et al.*, 2008).

Algunos aceites esenciales contienen moléculas fotoactivas tales como la furocumarina, la cual se une al ADN de la célula en combinación con la luz ultravioleta produciendo aductos que son citotóxicos y altamente mutagénicos. Sin embargo, algunos aceites esenciales, en la oscuridad, no son citotóxicos o mutagénicos por sí sólo. La citotoxicidad o fototoxicidad

depende del tipo de moléculas presentes en los aceites esenciales, que pueden producir diferentes tipos de radicales con o sin exposición a la luz. Así mismo, se muestra que algunos aceites esenciales como *Citrus aurantium dulcis* y *Cymbopogon citratus* pueden ser citotóxicos y fototóxicos al mismo tiempo (Burt, 2004; Bakkali *et al.*, 2008).

Sánchez *et al.* (2005) han investigado los efectos antifúngicos de algunos aceites esenciales, específicamente de extractos de plantas de Agave, que dependiendo de su concentración, pueden reducir hasta un 75% el crecimiento de hongos aflatoxigénicos y hasta un 99% la producción de sus micotoxinas. Así mismo, Martín *et al.* (2002) evaluaron el efecto de extractos alcohólicos de plantas silvestres sobre la inhibición del crecimiento de hongos micotoxigénicos, destacando que los extractos de plantas *Larrea tridentata*, *Baccharis glutinosa*, *Datura discolor* y *Proboscidea parviflora*, controlaron al menos el crecimiento de dos especies de hongos, *A. flavus* y *Fusarium poae*. Los datos obtenidos por Mishra y Dubey (1994) permitieron destacar la capacidad antifúngica de los extractos de *Cymbopogon citratus*, a una concentración mínima inhibitoria de 1000 µg/kg.

El empleo de aceites esenciales ha resultado útil en el control de pudriciones postcosecha. Por ejemplo, los extractos de hinokitiol redujeron hasta 41% la pudrición del café causada por *Monilinia fruticola*. También se observó una marcada reducción en el desarrollo de la pudrición en berenjena y pimientos rojos, cuando los frutos fueron sumergidos en una solución de hinokitiol de 750 µl/l. Así mismo, la aplicación de aceites esenciales provenientes de orégano, cilantro y tomillo, entre otros, se han estudiado para controlar en tomates a *Rhizopus stolonifer*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria arborescens* y *Geotricum candidum*, hongos incidentes en postcosechas. Los

resultados han sido variables, en función del hongo y del tipo de extracto evaluado (Hernández *et al.*, 2007).

Diferentes aceites esenciales han sido utilizados como una alternativa de sustitución a fungicidas sintéticos en el control de *Phytophthora infestans*, microorganismo que ataca las cosechas de tomate, como lo demuestran estudios realizados por Soylu *et al.* (2006) quienes emplearon aceites esenciales obtenidos de la parte aérea y aromática de plantas de orégano, tomillo, lavanda, romero y laurel, encontrando que todos los aceites inhiben el desarrollo de *P. infestans* en una manera dosis dependiente.

Estudios realizados por Burt (2004), señalan que algunos aceites esenciales se están utilizando como conservantes en alimentos, por ejemplo, en pescado al añadirle una concentración de 0,5 µl/ml de aceite de orégano se reduce efectivamente el desarrollo bacteriano; en vegetales se han combinado con aceites de Cinnamaldehído y timol siendo efectivos para controlar la colonización de *Salmonella*, sobre todo en alfalfa; en arroz se han empleado aceites de carvacrol (0,15-0,75 µl/ml) que han resultado eficientes para controlar la esporulación de *Bacillus cereus*. En frutas se han usado aceites de Cinnamaldehído y carvacrol siendo efectivos al reducir la cantidad de microorganismos viables, sobre todo en kiwi utilizando concentraciones de 0,15µl/ml

En países tropicales, existe un predominio de árboles y arbustos, y en ocasiones, plantas herbáceas, de la familia *Rutaceae* que han tenido importancia, debido a los frutos (cítricos) de muchas de sus especies, así como a la producción de aceites esenciales y medicinales (Mishra y Dubey, 1994; Garnier *et al.*, 2000; Anaya *et al.*, 2005; Souza *et al.*, 2005; Yoshida *et*

al., 2005; Yoshida *et al.*, 2006). La mayoría de los aceites esenciales extraídos de frutas cítricas tienen propiedades antifúngicas, ya que producen fitoalexinas que son sustancias segregadas por las plantas bajo condiciones de estrés, las cuales poseen un amplio espectro contra hongos, algunos virus y bacterias (Mohanlall y Bharti, 2006).

En estudio realizado por Tzortzakis y Economakis (2007) se señala que el aceite esencial de *Cymbopogon citratus* es caracterizado por su alto contenido de citral (69%), el cual es utilizado como materia prima para la elaboración de vitamina A y betacaroteno, además de poseer una amplia actividad antimicrobiana (para bacterias y hongos patógenos en humanos), exhibiendo un amplio espectro fungicida que inhibe completamente el desarrollo de 35, 45 y 47 especies fúngicas a 500, 1000 y 1500 µg/kg, respectivamente y esta actividad puede permanecer inalterada por 210 días de almacenamiento de este aceite.

La aplicación de aceites esenciales como método de biocontrol de aflatoxinas puede transformar la molécula tóxica en otro metabolito, lo que se conoce como biotransformación. Sin embargo, al desconocer la naturaleza de estas sustancias formadas, éstas siguen representando una amenaza, es por esta razón, entre otras aplicaciones, que se emplean pruebas de citotoxicidad, a través de *Artemia salina*, un crustáceo sensible a un amplio rango de compuestos con actividad biológica y de muy diversas estructuras químicas. Esta prueba fue empleada por Logrieco *et al.* (1996) para la selección y caracterización de cepas de *Fusarium* productoras de fusaproliferina y ha sido aplicada al estudio de extractos de *Aspergillus* y *Penicillium*, y en la valoración de la toxicidad de hongos entomopatógenos. Así como también, se ha propuesto para la búsqueda de nuevos metabolitos

tóxicos y para la determinación de la concentración letal 50 (CL₅₀) o del porcentaje de mortalidad que produce una sustancia, habiéndose determinado una correlación con las pruebas específicas de citotoxicidad (González *et al.*, 2007).

La presencia de aflatoxinas en alimentos para consumo humano y animal representa un grave problema de salud pública, además de afectar sensiblemente la producción agropecuaria. Esta complicación requiere de soluciones integrales que permitan disminuir a corto plazo los efectos nocivos en la población expuesta. La principal arma para combatir a las micotoxinas la constituye la difusión objetiva de la información a todos los integrantes de la cadena productiva de alimentos, las consecuentes medidas de prevención y las medidas de control que se pueda aplicar a lo largo de la misma. Por esta razón, esta investigación se enfocará en evaluar la micoflora presente en los alimentos concentrados utilizados en granjas avícolas del estado Sucre para la alimentación de pollos de engorde, a fin de determinar la presencia de hongos micotoxigénicos y la concentración de aflatoxinas presentes en ellos. Así como, aplicar técnicas de biocontrol utilizando un extracto de *Citrus limonun* en los alimentos concentrados para pollos de engorde con la finalidad de determinar la eficacia de éstos para eliminar las aflatoxinas presentes en estos alimentos.

METODOLOGÍA

Recolección y transporte de las muestras

Se recolectaron 50 muestras que representó el 10% del lote de alimentos concentrados para pollos de engorde, almacenados en una distribuidora avícola del estado Sucre, aplicándose el método de muestreo aleatorio simple, especificado por la International Commission of Microbiological Specifications for Food (ICMSF, 1999).

Las muestras se trasladaron al laboratorio de Investigaciones microbiológicas del Departamento de Bioanálisis de la Universidad de Oriente, en bolsas plásticas estériles dentro de una cava con hielo donde se preservó las condiciones originales de las mismas y se procesaron de manera inmediata.

Procesamiento de las muestras

Recuento de las unidades formadoras de colonia por gramo (UFC/g)

Se pesaron 10 gramos de cada muestra y se colocaron por separado en erlenmeyer estériles de 250 ml de capacidad, de forma aséptica; con 90 ml de solución salina fisiológica (SSF) estéril. Los matraces se mantuvieron en agitación mecánica constante durante 15 a 30 minutos con el propósito de

desprender el mayor número de microorganismos. Esta preparación representó la dilución 10^{-1} .

A partir de esta solución se realizaron diluciones decimales seriadas; para ello se añadió 1 ml de la preparación anterior en un tubo con 9 ml de SSF estéril, se siguió este procedimiento hasta alcanzar una dilución de 10^{-5} .

Posteriormente, se tomaron de cada una de las diluciones preparadas, 0,1 ml y se sembraron por duplicado, en placas con Agar Extracto de Malta al 2% (AEM) (Himedia Laboratories Limited, India), adicionado de 30 $\mu\text{g/ml}$ de antibiótico (cloranfenicol) para evitar el crecimiento bacteriano. La siembra se realizó por agotamiento en superficie con espátula de Digralski. Cada una de las placas se identificó con la dilución a la cual corresponde cada tubo, y se incubaron durante 5 a 10 días a temperatura ambiente ($28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) (Pascual y Calderón, 2000).

Las UFC/g se calcularon multiplicando el número de colonias en las placas por el factor de dilución correspondiente y el número resultante se multiplicó por 10 para obtener finalmente el número de UFC/g (García, 1987).

Aislamiento de hongos filamentosos y levaduras

Se escogieron todas las colonias con características macroscópicas diferentes, las cuales se inocularon por separado, en tubos de ensayo, con AEM dispuesto en bisel, y se incubó a temperatura ambiente por 5 días.

Identificación de los microorganismos aislados

La identificación de los hongos filamentosos se realizó mediante el estudio macroscópico de las colonias, el cual incluyó el grado de crecimiento, aspecto superficial, borde, textura, presencia de pigmento. Seguidamente, se estudiaron las características microscópicas colocando una porción de la colonia con una aguja de inoculación sobre una gota de azul de lactofenol, y se cubrió con una laminilla observándolo luego al microscopio e identificándose las estructuras fúngicas. La identificación de las especies se realizó a través de la técnica de microcultivo según la metodología descrita por Ridell (1950) y siguiendo las claves establecidas por Samson *et al.* (1998).

Las colonias con características levaduriformes, se estudiaron detallando sus características macroscópicas y microscópicas. Se identificaron mediante una prueba que permitió demostrar la capacidad que tienen las levaduras de utilizar o asimilar diferentes carbohidratos en aerobiosis, conocida como auxonograma y se llevó a cabo a través del sistema API 20 C AUX[®] (BIOMÉRIEUX, Francia), el cual está compuesto por una galería de 20 pocillos conteniendo substratos de diferentes azúcares que permiten realizar 19 pruebas de asimilación (el pocillo N° 1 representa el control negativo). Se procedió a inocular cada pocillo con un medio semisólido que contiene 100 µl de suspensión de levaduras, con densidad óptica idéntica al patrón 2 de la escala de Mc Farland cuya concentración es igual a 2×10^7 levaduras/ml. Las galerías se incubaron a 28-30°C durante 24-72 horas. Las lecturas se realizaron por observación directa de la turbidez presentada en cada microtubo, representado por el crecimiento de las levaduras.

Los sustratos ensayados con el API 20 C AUX[®] fueron: glucosa, glicerol, 2-ceto-D-glucorato, L-arabinosa, D-xilosa, adonitol, xilitol, galactosa, inositol, sorbitol, alfa metil-D-glucosido, N-acetil-D-glucosamida, celobiosa, lactosa, maltosa, sacarosa, trehalosa, melezitosa y rafinosa.

Determinación de aflatoxinas

La determinación de las aflatoxinas se realizó por el método de enzaimunoensayo competitivo (ELISA) siguiendo las instrucciones de los kits respectivos suministrados por BIOPHARM (Alemania).

Fundamento del test

El test se basa en la reacción antígeno-anticuerpo. Los micropozos están recubiertos con anticuerpos de captura contra anticuerpos anti-aflatoxina. Se agregan estándares de aflatoxina o las soluciones de las muestras, conjugado aflatoxina-enzima y anticuerpo anti-aflatoxina a los micropozos. La aflatoxina libre y el conjugado aflatoxina-enzima compiten para unirse a sitios del anticuerpo anti-aflatoxina. Al mismo tiempo, los anticuerpos anti-aflatoxinas se unen a los anticuerpos de captura inmovilizados sobre la placa. El conjugado aflatoxina-enzima que no se unió es removido posteriormente en un proceso de lavado. El sustrato cromógeno es agregado a los micropozos e incubado. El conjugado aflatoxina-enzima unido a los micropozos a través de los anticuerpos, convierte al cromógeno en una sustancia azul. La adición de la solución de parada provoca un cambio de color de azul a amarillo. La medición se realiza fotométricamente a 450 nm y la absorción es inversamente proporcional a la concentración de

aflatoxina en la muestra.

Preparación de la muestra y extracción

Se pesaron 5 g de cada muestra, previamente molida y se mezcló con 25 ml de metanol al 70% por tres minutos, aplicando movimientos constantes; posteriormente se filtró a través de un papel de filtro Whatman #1. 1 ml del filtrado se diluyó con 1 ml de agua destilada. Finalmente, se utilizaron 50 μ l del filtrado diluido por micropozo en el test.

Procedimiento del Test

El kit posee una galería de 48 pocillos (6 tiras, cada una de 8 micropozos separables) recubiertos con anticuerpos de captura. En los primeros pocillos se colocaron los estándares.

Se transfirieron 50 μ l de los estándares y muestras a analizar a los micropozos por duplicado. Posteriormente, se agregaron 50 μ l del conjugado aflatoxina-enzima en los micropozos correspondientes y se mezclaron con 50 μ l de anticuerpo anti-aflatoxina, se dejó incubar por 10 minutos, a temperatura ambiente. Se vaciaron los micropozos golpeando (tres veces consecutivas) el marco porta micropozos sobre un papel absorbente limpio para asegurar la eliminación completa de restos de líquido. Se lavaron los micropozos con 250 μ l de agua destilada utilizando una micropipeta, se vaciaron nuevamente los micropozos de la forma indicada. Este procedimiento se repitió dos veces más. A continuación, se agregaron 100 μ l de sustrato/cromógeno a cada micropozo, se mezcló el contenido de la

microplaca suavemente y se incubó 5 minutos ($\pm 0,5$) en la oscuridad a temperatura ambiente. Seguidamente, se agregaron 100 μl de la solución de parada a cada micropozo, se mezcló el contenido de la microplaca suavemente y se midió la absorción a 450 nm en el transcurso de los siguientes 10 minutos con un lector de ELISA marca BIOTEK MODELO ELX800. La obtención de los resultados se realizó usando el software comercial KC-Junior™

Evaluación de la capacidad de biocontrol de aflatoxinas por acción de extractos de *Citrus limon*.

Para realizar el biocontrol de las aflatoxinas en las muestras de alimentos concentrados para pollo de engorde fue utilizado un extracto de *Citrus limonum* comestible marca DISQUIFAR, C.A., Distribuido en Valencia, estado Carabobo, Venezuela y se siguió la metodología descrita por García *et al.* (2005) con ligeras modificaciones.

Se seleccionó el 10% de las muestras de alimentos concentrados para pollo contaminadas con aflatoxina, se pesaron 5 g de cada una de ellas y se colocaron en tubos de ensayo estériles. Posteriormente, se agregaron 100 μl del extracto de *Citrus limon* y se dejó actuar por 1 h. A continuación se procedió a realizar la determinación de aflatoxina por la técnica de ELISA, manteniendo un ensayo control, al cual no se le añadió el extracto de limón. Se determinó el porcentaje de reducción en la concentración de aflatoxina.

Adicionalmente, Se seleccionó al azar el 10% de las muestras a las que no se le detectaron concentraciones de aflatoxina por encima de 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y se contaminaron con una concentración conocida de la micotoxina.

Para ello se pesaron 5 g de cada muestra, y se colocaron en tubos de ensayo estériles, se añadieron 100 µl de aflatoxina de 45 µg/kg de concentración. Posteriormente, se agregaron 100 µl del extracto de *Citrus limon* y se dejó actuar por 1 h. Seguidamente, se determinó la concentración de aflatoxina mediante la técnica de ELISA, manteniendo un ensayo control el cual no poseía el extracto. Finalmente, se determinó el porcentaje de reducción de la aflatoxina en las muestras. El tratamiento de los resultados se realizó calculando el porcentaje de reducción de la micotoxina.

Determinación del crecimiento fúngico

La capacidad antifúngica del extracto de limón se determinó sobre el crecimiento de *Aspergillus flavus* y otros hongos descritos como aflatoxigénicos que hayan sido aislados o en su defecto proporcionados por el laboratorio de Investigaciones Microbiológicas del Departamento de Bioanálisis de la Universidad de Oriente (codificados como: *A. flavus* HF-121, *A. niger* HF-101 y *P. citrinum* PC-023), para lo cual se preparó una mezcla del extracto de limón con el del medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA), en una relación 1:10. La mezcla se vertió sobre una placa de Petri y una vez solidificado el agar se inoculó *A. flavus*, *A. niger* y *P. citrinum* en el centro de cada placa, incubándose posteriormente a temperatura ambiente (28°C ±2°C). Las placas se examinaron cada 48 horas, observándose el crecimiento de los hongos inoculados y midiendo el diámetro de las colonias del hongo desarrollado en cada observación, se realizó este procedimiento por triplicado. Este ensayo fue acompañado por una placa control que contenía los cultivos respectivos (Martín *et al.*, 2002; Magro *et al.*, 2006).

Actividad Tóxica

Con la finalidad de determinar si los compuestos formados después del tratamiento de las muestras con extracto de *Citrus limonum* eran tóxicos o no, se adicionó en un tubo de ensayo 100 µl de aflatoxina de concentraciones conocida (1,7 µg/kg; 5,0 µg/kg; 15 µg/kg 45 µg/kg) y 100 µl del extracto de *Citrus limon*, dejando actuar por 1 hora.

Para determinar el grado de toxicidad, se utilizó el crustáceo *Artemia salina*. Los quistes de éste se colocaron en agua de mar bifiltrada, con iluminación continua, en un envase con una bomba que facilitó la aireación y eclosión de los nauplios durante 24 horas.

Se aplicó el ensayo de toxicidad sobre *Artemia salina* por triplicado en cada uno de los extractos. Para ello, se disolvieron 50 µl de las mezclas de aflatoxinas con el extracto en 0,5 ml de solvente (metanol) completando con 4,5 ml de agua de mar bifiltrada. A cada solución se le agregaron 10 nauplios de *Artemia salina*. Los bioensayos se acompañaron con un control (0,5 ml del solvente y 4,5 ml de agua de mar bifiltrada) y a las 24 horas se contó el número de organismos muertos. Se determinó para cada solución el porcentaje de mortalidad, calculándose los valores promedios de las muestras y el blanco, clasificándose posteriormente de acuerdo al porcentaje de mortalidad de: 0-9% no tóxico (NT), 10-49% levemente tóxico (LT), 50-89% tóxico (T) y 90-100% muy tóxico (MT) (Sanabria *et al.*, 1997 y González y Aportela, 2001).

Análisis Estadístico

Los resultados de las especies fúngicas identificadas y los niveles concentraciones de aflatoxinas detectadas en las muestras de alimentos concentrados para pollo de engorde fueron estudiadas por el método de análisis porcentual (%) y se mostraron en tablas. Fueron comparados los niveles concentraciones de aflatoxinas antes y después del tratamiento con el extracto de limón, por el método estadístico *T-student* con un nivel de significancia de $p < 0,05$ (Wayne, 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El recuento fúngico promedio encontrado en las muestras de alimentos concentrados para pollos de engorde, recolectadas de una distribuidora avícola del estado Sucre, fue de $3,3 \times 10^4$ UFC/g. Estos resultados se compararon con los encontrados por Dalcero *et al* (1997) quienes reportaron recuentos que oscilan entre 10^4 a 10^6 UFC/g. Así mismo, Labuda y Tancinová (2006) en su investigación con diferentes tipos de alimentos para aves de corral encontraron recuentos promedios entre 1×10^2 a $8,2 \times 10^4$ UFC/g (Hayes, 1993; Petersson y Schnürer, 1995; Gqaleni *et al.*, 1997; Blanco, 1999; Colleen y David, 1999; Miller, 2001; Martins *et al.*, 2003).

La norma Venezolana de alimentos completos para aves (COVENIN: N°1881, 1983) sólo establece límites para contaminantes biológicos, tales como insectos vivos, huevos y/o larvas de insectos; inertes, color, olor, granulometría, productos tóxicos específicamente aflatoxinas y como microbiológicos sólo para *Salmonella*, no estableciendo límites micológicos.

Sin embargo; el Instituto Colombiano Pecuario establece dentro de su norma un límite micológico de 1×10^5 UFC/g (Norma Técnica Colombiana (NTC): N°2107, 1999). El recuento encontrado en esta investigación está por debajo de ese límite establecido. Sin embargo, es necesario conocer qué especies fúngicas se encuentran para determinar si están presentes hongos micotoxigénicos que puedan alterar la salud de los animales que lo consumen ya que estos hongos pueden producir y acumular micotoxinas en el alimento que al ser ingerido por el ave pueden afectar su capacidad productiva conllevando a la pérdida de peso, alteración de la conversión alimenticia e inmunosupresión, esta última aumenta la susceptibilidad del ave a sufrir enfermedades virales y bacterianas (D'Mello y Macdonald, 1997; Perozo *et al.*, 2003).

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación se puede deducir que existe una asociación estrecha entre este tipo de alimentos con la colonización de hongos ya que es un alimento con bajas a_w , entre 0,7 a 0,8, rico en cereales, subproductos de cereales y vitaminas, de igual manera; se debe tener en cuenta que la variación de crecimiento fúngico, dependerá de una serie de factores, principalmente de aquellos relacionados con la humedad, presencia de ambientes aireados, cambios climáticos, integridad de las materias primas y/o daño mecánico antes y después de las cosechas; parámetros que determinan el posible grado de contaminación fúngica en los alimentos concentrados para pollos (Gqaleni *et al.*, 1997; Blanco, 1999; Colleen y David, 1999; Miller, 2001; Martins *et al.*, 2003).

La contaminación fúngica puede ocurrir en cualquier punto de la cadena alimentaria desde el cultivo hasta la recolección de la cosecha, el transporte, el almacenamiento y procesado de los diferentes productos

agrícolas. Los factores que favorecen la proliferación de los hongos aflatoxigénicos son principalmente las altas temperaturas y una elevada humedad relativa, así como la humedad del suelo, las sequias extremas y los daños producidos en la semillas por golpes mecánicos y el ataque de insectos, roedores, pájaros entre otros, los cuales constituyen excelentes vía de entrada para el desarrollo de hongos y la eventual formación de aflatoxinas. El almacenamiento y transporte en condiciones inapropiadas se han identificado como puntos críticos para evitar la contaminación por aflatoxinas, recomendándose siempre la limpieza y ventilación de los recintos de almacenamiento y, sobre todo, el secado de los productos agrícolas hasta un nivel de humedad que impida el crecimiento de hongos (Cotty y García, 2007; Soriano, 2007 y Giorni *et al.*, 2008).

La tabla 1 muestra la frecuencia de los géneros fúngicos aislados en muestras de alimentos concentrados para pollos de engorde encontrándose en mayor proporción *Aspergillus* (46%), *Penicillium* (26%) y *Eurotium* (20%).

TABLA 1. Porcentaje de géneros de hongos aislados de las muestras de alimentos concentrados para pollos de engorde. **Error! Marcador no definido.**

Géneros	Porcentaje (%)
HONGOS FILAMENTOSOS	
<i>Aspergillus</i>	46,00
23	
<i>Penicillium</i>	26,00
3	
<i>Eurotium</i>	20,00

0

<i>Syncephalastrum</i>	10,00
<i>Mucor</i>	6,00
<i>Acremonium</i>	6,00
<i>Curvularia</i>	4,00
<i>Cladosporium</i>	4,00
<i>Phoma</i>	2,00
<i>Aerobasidium</i>	2,00
LEVADURAS:	
<i>Exophiala</i>	4,00
<i>Rhodotorula</i>	2,00

Los géneros fúngicos aislados con mayor frecuencia en la presente investigación coinciden con diferentes investigaciones que han reportado mayor prevalencia de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Eurotium* en los alimentos concentrados para pollo, así como también en las materias primas (maíz, ñame, yuca, arroz, trigo, cebada, entre otras) utilizadas para su fabricación, considerando que estos géneros se han clasificado como hongos de almacenamiento, se puede deducir, que durante esta etapa hubo una multiplicación y propagación de sus esporas, asociado a las elevadas temperaturas y los cambios climáticos que acompañan la zona de recolección de las muestras. (Dalcero *et al.*, 1997; Martins *et al.*, 2003; Labuda y Tancinova 2006; Ribeiro, *et al.*, 2006; Iamanaka *et al.*, 2007; Gnonlonfin *et al.*, 2008).

El 20% de frecuencia encontrada del género *Eurotium* en las muestras de alimentos concentrados para pollos de engorde analizadas, posiblemente se debió a la naturaleza físico-química y nutritiva que presenta el alimento, ya que

las bajas a_w del producto lo hacen un sustrato de fácil colonización para este microorganismo, caracterizado principalmente por ser un microorganismo xerófilo. Así como lo demuestran investigaciones realizadas por Fraga *et al* (2007) que al analizar diferentes etapas del procesamiento de alimentos para aves de corral evidenciaron en mayor frecuencia especies del género *Aspergillus* y *Eurotium* (*A. flavus* y *E. chevalieri*) en el producto final, observando posteriormente que son capaces de producir altas cantidades de aflatoxinas y ocratoxina A, respectivamente.

Los porcentajes de las especies fúngicas frecuentemente aisladas en las muestras de alimentos concentrados para pollo de engorde, expresados en la tabla 2, corresponden a las especies *Penicillium citrinum* (26%), *Eurotium herbariorum* (20%) y *Aspergillus flavus* (16%).

Penicillium citrinum se caracterizó macroscópicamente por presentar aspecto aterciopelado de color azul verdoso, el reverso es amarillo cambiando a naranja con los días de incubación, con formación de exopigmento de color amarillo. Al microscopio se observó micelio hialino septado, conidióforos de paredes lisas con mótulas divergentes en una sola rama, presentando entre 6 a 10 fiálides, los conidios mostraron paredes lisas, hialoconidios, globosos y subglobosos (figuras 2y 3).

¡Error! Marcador no definido.

TABLA 2. Porcentaje de especies de hongos aisladas de muestras de alimentos concentrados para pollos de engorde.

Especie	n	Porcent aje (%)
---------	---	--------------------

HONGOS FILAMENTOSOS:

<i>Penicillium citrinum</i>	13	26,00
<i>Eurotium herbariorum</i>	1	20,00
	0	
<i>Aspergillus flavus</i>	8	16,00
<i>Syncephalastrum racemosus</i>	5	10,00
<i>Aspergillus terreus</i>	4	8,00
<i>Mucor racemosus</i>	3	6,00
<i>Acremonium charticola</i>	3	6,00
<i>Aspergillus niger</i>	2	4,00
<i>Aspergillus tamaris</i>	2	4,00
<i>Aspergillus ochraceus</i>	2	4,00
<i>Curvularia lunata</i>	2	4,00
<i>Aspergillus penicillioides</i>	2	4,00
<i>Aspergillus versicolor</i>	2	4,00
<i>Micelia sterilia</i>	2	4,00
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1	2,00
<i>Cladosporium phaeospermum</i>	1	2,00
<i>Phoma glomerata</i>	1	2,00
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1	2,00
<i>Aerobasidium pullulans</i>	1	2,00

LEVADURAS:

<i>Exophiala</i> sp.	2	4,00
<i>Rhodotorula glutinis</i>	1	2,00

La elevada frecuencia de *P. citrinum* hallada en esta investigación coincide con el estudio realizado por Ribeiro *et al* (2006) que al evaluar la micoflora de alimentos concentrados para aves, hallaron en mayor frecuencia *Aspergillus flavus* y *Penicillium citrinum*. Así mismo, en Argentina Bressler *et al* (1995), aislaron *Penicillium citrinum* y su toxina (citrinina) en alimentos de consumo humano y animal. Diferentes autores han demostrado que la citrinina produce alteración de la función renal, siendo responsable de nefropatías y necrosis tubular del riñón en diferentes animales. También se ha descrito su capacidad para producir mutaciones, adenomas renales, alteraciones en las mitocondrias de riñón e hígado, en el sistema cardiovascular y en la inmunidad, reduciendo así el desarrollo y la fertilidad en los animales que la consumen (Dalcero *et al.*, 1997; Lurá *et al.*, 2001; Martins *et a.l.*, 2003; Labuda y Tancinova 2006).

Por otra parte, una de las especies aisladas con un porcentaje de frecuencia de 20% fue *Eurotium herbariorum*, el cual está caracterizado por presentar colonias de color verdes a verdes grisáceos con algunas zonas amarillas, con producción de pigmento de color amarillo que al transcurrir los días de incubación éste se oscurece (vino tinto), el reverso se observó de color marrón oscuro. Microscópicamente se evidenció micelio septado, conidióforos hialinos ligeramente rugosos, vesículas globosos, esterigmas y conidios subglobosos, hialoconidios y rugosos, además se observaron cleistotecios marrones oscuros con ascos y ascosporas dentro de ellos (Figuras 4 y 5).

Eurotium herbariorum está clasificado taxonómicamente en la clase Ascomycetes, representa el teleomorfo de *Aspergillus glaucus*. Frecuentemente, estas especies fúngicas contaminan las materias primas

utilizadas para la preparación de alimentos destinados para el consumo animal, como lo señala Vásquez (2002) al basar su estudio en el ecosistema de granos almacenados, indicó que la presencia de estos microorganismos está regulada por la combinación de tensión de oxígeno, el contenido de humedad del grano en equilibrio con la humedad relativa del ambiente y el tipo de producto agrícola.

Aspergillus flavus fue la tercera especie aislada con mayor frecuencia en esta investigación, es un microorganismo caracterizado macroscópicamente por presentar micelio de color verde amarillento, granuloso, reverso de color crema en Agar Extracto de Malta. Al microscopio se observó micelio septado, hialino, con cabezas conidiales ligeramente rugosas, vesículas globosas, algunas de ellas con esterigmas unidas directamente a las vesículas o a las mótulas, los conidios se diferenciaron por ser equinulados y hialoconidios (Figuras 6 y 7).

Los resultados obtenidos en este estudio para la especie *A. flavus* en las muestras de alimentos para pollos se asemejan a los encontrados por Dalcero *et al* (1997) al hallar una prevalencia de esta especie de 8% en alimentos para aves de corral. Así mismo, Labuda y Tancinová (2006) en su investigación sobre la caracterización de la micoflora en alimentos destinados para el consumo animal, hallaron con mayor frecuencia en su estudio a *A. flavus*, una especie de hongo potencialmente productora de aflatoxinas. Se ha demostrado que durante las cosechas los conidios de *A. flavus* son inoculados en el maíz y otros cereales gracias a la acción dañina de los insectos, éstos permiten que el hongo sea capaz de formar esclerotes (estructuras de resistencias ante condiciones adversas) que luego son dispersadas en el suelo durante las cosechas, gracias a esto el hongo

sobrevive y produce nuevamente conidióforos y conidios (Wagacha y Muthomi, 2008).

Cabe señalar que la presencia de un hongo descrito como toxigénico no es indicativa de producción de micotoxina, porque ésta es una propiedad que puede existir sólo en cepas de una especie micotoxigénica, lo que significa que no todas las cepas, por ejemplo de *Aspergillus flavus* sean aflatoxigénicas. Así mismo, la ausencia de especies descritas como micotoxigénicas en muestras de alimentos, no significa que no se encuentren micotoxinas en las mismas, debido a que las toxinas fúngicas pueden persistir después de la muerte de la forma vegetativa del hongo por procesos industriales en la producción del alimento (Martins *et al.*, 2003; Ribeiro *et al.*, 2006; Fraga *et al.*, 2007; Naicker, *et al.*, 2007).



Figura 2. Características Macroscópicas de *Penicillium citrinum* en Agar Papa Dextrosa

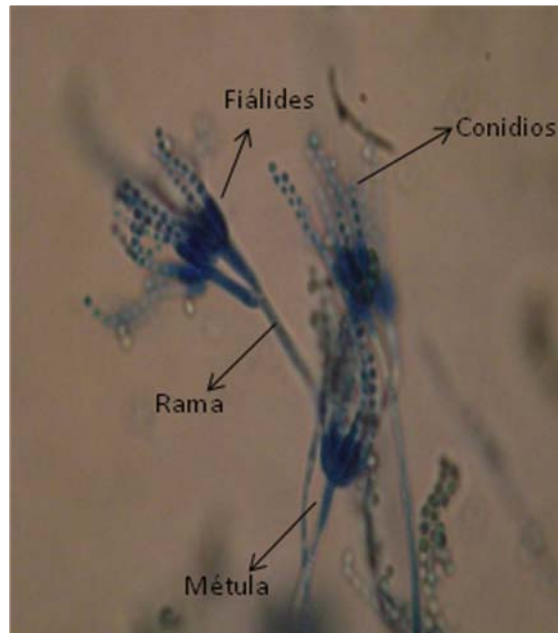


Figura 3. Características Microscópicas de *Penicillium citrinum* en Agar Papa Dextrosa



Figura 4. Características Macroscópicas de *Eurotium herbariorum* en Agar Czapek.

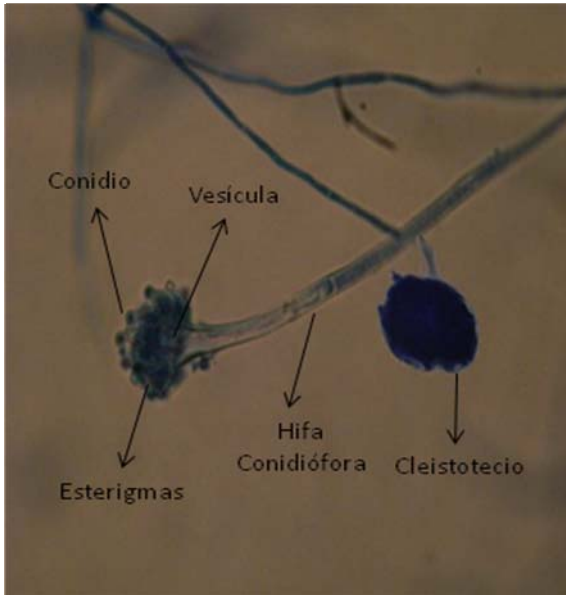


Figura 5. Características Microscópicas de *Eurotium herbariorum* en Agar Czapek.



Figura 6. Características Macroscópicas de *Aspergillus flavus* en Agar Extracto de Malta.

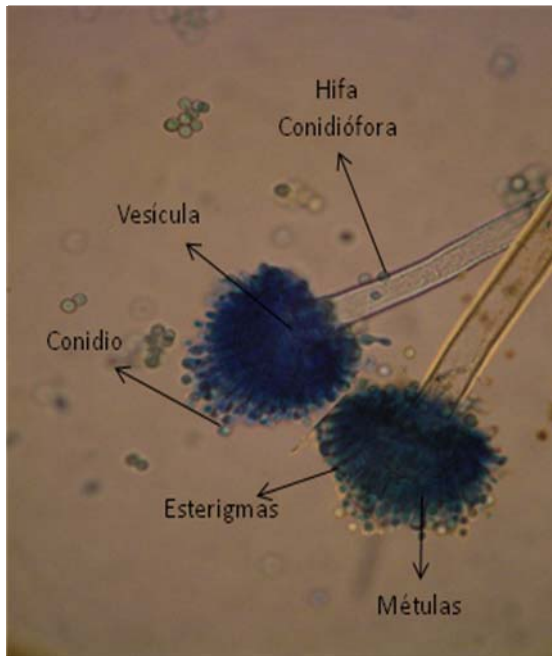


Figura 7. Características Microscópicas de *Aspergillus flavus* en Agar Extracto de Malta

En la tabla 3 se muestran las concentraciones de Aflatoxinas Totales (AFt) halladas en las muestras de alimentos para pollos de engorde, detectándose que el 54% de las muestras se encontraron en una rango de concentración de 5-14 $\mu\text{g}/\text{kg}$, seguida del 28% menores de 1,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 12% entre 1,7-5,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Tabla 3. Concentración de Aflatoxinas Totales (AFt) en las muestras de alimentos concentrados para pollos de engorde

Rango de concentración ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Nº de Muestras	Porcentaje (%)
--	----------------	----------------

0,0	05	10
< 1,7	09	18
1,7-5,0	06	12
5,0-14	27	54
15-19	3	6
20-45	0	0
>45	0	0
Total	50	100

El 90 % de las muestras de alimentos concentrados para pollos analizadas en esta investigación estuvieron contaminadas con AFt con concentraciones por debajo de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, es decir, por debajo del límite que establece la norma venezolana COVENIN 1881-83; sin embargo, si se toma en cuenta que la mayoría de los países industrializados establecen límites inferiores a esta cantidad; por ejemplo, la Unión Europea a través de Commission Regulation (EC) N°1881/2006 regula la AFt en 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Se puede considerar que el 60% (n=30) de las muestras analizadas se encuentran por encima de este límite toxicológico (Maia y Pereira, 2002; Thirumala-Devi *et al.*, 2002; FAO, 2003; Méndez *et al.*, 2006; Krishnamurthy y Shashikala, 2006; Martins, *et al.*, 2007; Offiah y Adesiyun, 2007).

La contaminación y variación de la concentración de las aflatoxinas en este tipo de alimentos puede estar influenciada por diversos factores, entre los que se cuentan condiciones medio ambientales durante el procesamiento, tales como una a_w entre 0,8-0,9 y humedad por encima de 12% que favorecen el desarrollo de los hongos aflatoxigénicos, los cuales pueden colonizar la superficie o el interior de los canales de los silos, produciendo

posteriormente la micotoxina que en su mayoría se acumula en las capas superficiales del alimento y al granularlo se distribuye en el producto procesado; así mismo, debe tenerse en cuenta que las materias primas utilizadas para la elaboración del alimento (sobre todo el maíz) son susceptibles a sufrir contaminación por los hongos potencialmente aflatoxigénicos (Salay y Mercadante, 2002; Castells *et al.* 2008).

Es de considerar que la presencia de AF en los alimentos concentrados para pollos de engorde representa una amenaza para los animales que los consumen, porque estas toxinas fúngicas tienen efectos acumulativos, que pueden desarrollar aflatoxicosis crónica. Como lo afirman Perozo *et al.*, (2003) al señalar que los efectos tóxicos de la exposición a AF dependen de un conjunto de factores tales como el tiempo de exposición y concentración de la toxina, interacción con otras micotoxinas, la composición y valor nutricional del alimento, además del estado sanitario y nutricional del ave.

Es de considerar que la presencia de AF en los alimentos concentrados para pollos de engorde representa una amenaza para los animales que los consumen, porque estas toxinas fúngicas tienen efectos acumulativos, que pueden desarrollar aflatoxicosis crónica. Como lo afirman Perozo *et al.*, (2003) al señalar que los efectos tóxicos de la exposición a AF dependen de un conjunto de factores tales como el tiempo de exposición y concentración de la toxina, interacción con otras micotoxinas, la composición y valor nutricional del alimento, además del estado sanitario y nutricional del ave.

En humanos esta toxina puede ser absorbida por el tracto

gastrointestinal debido a su alta liposolubilidad, siendo biotransformada en el hígado por enzimas microsomales de la superfamilia del citocromo P₄₅₀ entre las que se encuentran CYP1A2, 3A4, 3A5 y 3A7. Las dos enzimas más importantes son representadas por la CYP3A4 que interviene en la formación de la forma exo-epóxido y el metabolito AFQ. El tiempo de vida media plasmática para la AFB₁ es de 36,5 minutos, su volumen de distribución 14% del peso corporal y el aclaramiento renal 1,25 l/kg/h. Aproximadamente el 80% de la dosis total de AFB₁ se excreta en una semana. La AFM₁ se excreta en las 48 horas siguientes a la ingestión y representa entre el 1 al 4% de la AFB₁ ingerida (Villalobos *et al.*, 2001; Jiujiang *et al.*, 2002; Bennett y Klich, 2003; Urrego y Díaz, 2006).

La AFB₁-epóxido presenta dos conformaciones: una endo y una exo. La forma endo posee aproximadamente 500 veces más poder mutagénico que la forma exo. El fenómeno de mutagenicidad puede explicarse mediante la formación de un compuesto estable por la unión covalente con el nitrógeno N-7 de los residuos guanil del DNA (o RNA) mediante la inducción de depurinación y escisión de la hebra lo que puede inducir mutación en células somáticas. Esta formación de ligandos o aductos persistentes se lleva a cabo en regiones del DNA ricas en guanina. En el proceso de replicación del DNA, el complejo formado se intercala causando mutación: la guanina sufre transversión a timina; esto ocurre en el codón 249 del gen p53, este gen está implicado como punto de chequeo durante la síntesis y reparación del DNA. Si el daño no se repara, esta misma proteína induce apoptosis, la consecuencia de este tipo de alteración está determinada como carcinoma hepatocelular (Richard, 2007).

Estudios recientes realizados por Giacomini (2006) y Binder *et al*

(2007) demostraron que existen grados de susceptibilidad individual entre animales de la misma especie y del mismo sexo frente a la intoxicación por AFt. Así mismo, Newberne (1973) comprobó la diferencia de susceptibilidad de pollos de engorde a las aflatoxinas según la edad de estas aves, indicando que aves más jóvenes presentan mayores daños en su desarrollo en comparación con las aves de más edad. El alimento concentrado analizado en la presente investigación es destinado a pollos de 22 a 35 días de nacidos por lo que se trata de individuos susceptibles a los efectos nocivos de las aflatoxinas.

En los resultados obtenidos de la técnica de biocontrol con extracto de *Citrus limon* utilizada en esta investigación como método de destoxificación en alimentos concentrados para pollos de engorde, se encontró mayores porcentajes de reducción de aflatoxinas en las muestras que fueron contaminadas experimentalmente con 45 µg/kg de AFt con un porcentaje promedio de reducción de 73,6 % (Tabla 4). En todos los casos de evidenció diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Tabla 4. Efecto del extracto de *Citrus limon* sobre la concentración de aflatoxinas totales en las muestras de alimentos concentrados para pollos de engorde

Rango de concentración AFt (µg/kg)	Promedio Concentración final AFt (µg/kg)	Promedio del % de reducción	p valor
------------------------------------	--	-----------------------------	---------

1,7-5,0	0,50	67,5	0,0007*
5,0-15,0	1,84	69,3	0,0275*
15,0-20,0	5,01	56,3	0,0065*
45 ⁺⁺	11,10	73,6	0,0002*

Las muestras fueron analizadas a través del método estadístico *T-student* a un nivel de confiabilidad de 95% ($p < 0,05$). Estableciéndose diferencias estadísticamente significativas (*) y no significativas (ns). (++) : Muestras contaminadas experimentalmente

El mayor porcentaje de reducción encontrado puede deberse al modo de contaminación y distribución de la micotoxina, lo que demuestra que mientras más homogénea sea la mezcla mejor será el efecto antiaflatoxigénico del extracto. Estos resultados se asemejan con las investigaciones realizadas por Krishnamurthy y Shashikala (2006) quienes encontraron un porcentaje de reducción de 72,72% y 68,18% a concentraciones de 5 y 10%, respectivamente de aceite esencial de *Citrus sinensis* evaluada de manera directa sobre 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de aflatoxina en alimentos de aves de corral, demostrando que su efecto inhibitorio está relacionado con ciertos compuestos tales como limoneno (55,4% a 91,7%), myrceno (2,1% a 32,1%), alfa-pineno (0,6% a 1,6%) y linalool (0,4% a 6,9%), componentes presentes en la mayoría de los cítricos los cuales exhiben de una u otra forma, actividades antiaflatoxigénicas. Sin embargo, el grado de destoxifocación va a depender de la concentración del extracto (Baik *et al.*, 2008).

En las figuras 8, 9 y 10 se muestra el efecto del extracto de *Citrus limon* sobre el crecimiento de las especies fúngicas *A. flavus*, *P. citrinum* y *A. niger*, respectivamente, observándose en todos los casos que el extracto actuó como un agente fungicida sobre el crecimiento de las especies

ensayadas durante 7 días de incubación. Esto representó una inhibición del 100% en comparación con las especies testigos. Así mismo, en las figuras 11, 12 y 13 se muestran imágenes fotográficas del efecto de *Citrus limon* sobre las cepas estudiadas.

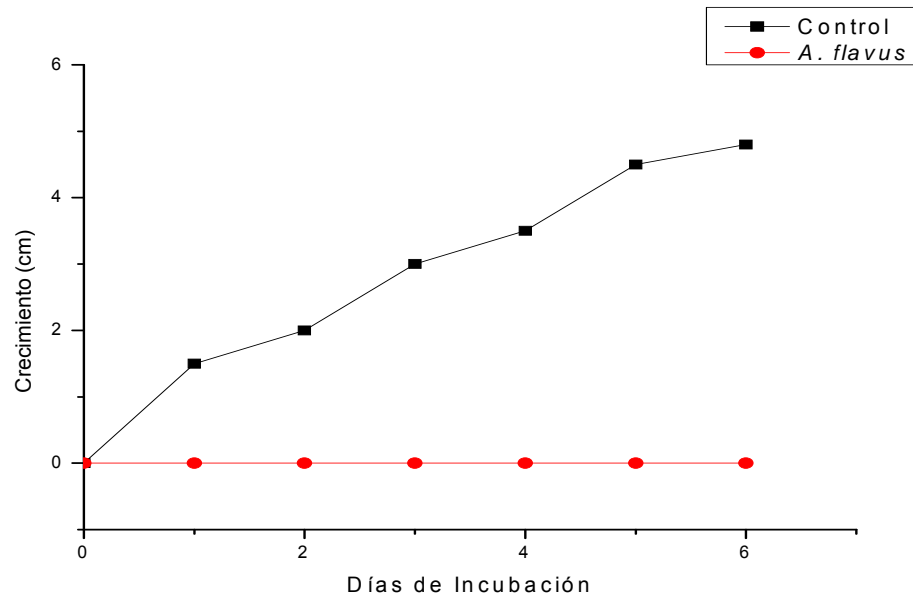


Figura 8. Efecto de extracto de *Citrus limon* sobre el crecimiento de *A. flavus*

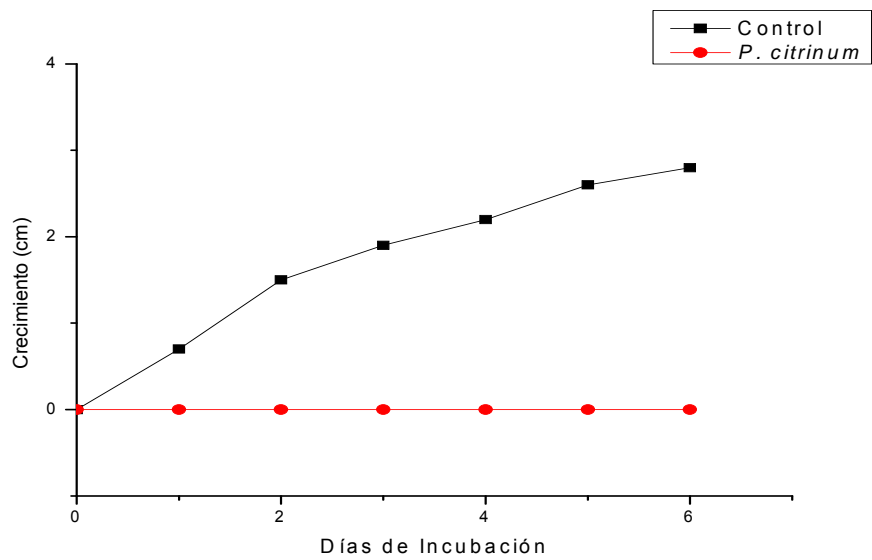


Figura 9. Efecto de extracto de *Citrus limon* sobre el crecimiento de *P. citrinum*

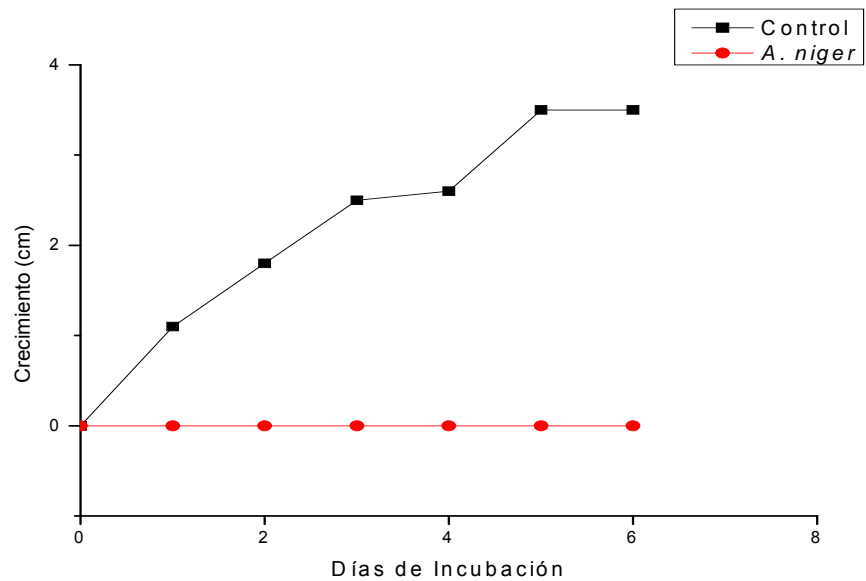


Figura 10. Efecto de extracto de *Citrus limon* sobre el crecimiento de *A.*

niger

El efecto fungicida del extracto de *Citrus limon*, así como la de otros extractos de frutas cítricas, principalmente se debe a la presencia de compuestos fitoquímicos, los cuales son biomoléculas orgánicas, responsables de la actividad antifúngica. Hasta la fecha no se conoce con exactitud el mecanismo de acción de estos compuestos, pero puede estar relacionado con la ruptura de las membranas plasmáticas de los microorganismos a través de compuestos lipofílicos (Hernández *et al.*, 2007). Investigaciones realizadas por Souza *et al* (2005) demuestran que el aceite esencial de *Citrus sinensis* muestra actividad inhibitoria sobre *A. flavus*, *Fusarium* spp. y *A. niger*, atribuyendo su efecto a una gran variedad de sustancias fitoquímicas tales como el E-citral, Z-citral, α -pineno, genariola, mirceno y 1- β pineno, que en general pueden ocasionar granulación citoplasmática, ruptura de la membrana citoplasmática e inactivación y/o inhibición de la síntesis de enzimas intra y extracelular impidiendo la germinación del micelio.

Por otra parte, los estudios realizados por Helal *et al* (2007) y Sharma y Tripathi (2008), demostraron que los aceites esenciales de *Citrus sinensis* y *Cymbopogon citratus* poseen efectos similares sobre el crecimiento del micelio de *Aspergillus flavus* y *A. niger* quienes inhibieron alrededor del 65% desarrollo de estos hongos después de cinco días de incubación y retrasando el proceso de esporulación en comparación con el control. En observaciones, utilizando microscopio de luz (LM), microscopio electrónico de barrido (SEM) y Microscopía electrónica de transmisión (TEM) para determinar la ultramodificaciones estructurales de las hifas de estos hongos

después del tratamiento con los aceites esenciales, observaron una disminución del diámetro de las hifas, precipitación de biomoléculas en la pared celular, desorganización de la membrana plasmática mitocondrial, pérdidas de $\text{Ca}^{(2)}$, $\text{K}^{(+)}$ y $\text{Mg}^{(2)}$ por parte del micelio y disminución del contenido de lípidos. Así mismo; demostraron que estos aceites esenciales en dosis subletal pueden inhibir completamente la producción de aflatoxina B_1 .

Viuda *et al* (2008) demuestran que existen otros mecanismos, que permiten que los aceites esenciales de cítricos ejerzan actividad antifúngica, tal como es la presencia de compuestos fenólicos, que por su naturaleza anfipática son capaces de interaccionar con las biomoléculas presentes en las membranas de estos microorganismos. En primer lugar la parte hidrofílica se combina con la parte polar mientras que el anillo de benceno y una cadena lateral hidrofóbica se inserta en la parte interior de la membrana, la participación de los grupos hidróxilo en la formación de enlaces de hidrógeno disminuyen el pH del medio produciéndole cambios en la estructura celular, en el cual puede inhibir la respiración y alterar la permeabilidad de sus membranas, causándole la muerte.

Los resultados obtenidos en esta investigación demuestran que el extracto de *Citrus limon* impide el crecimiento de estas especies fúngicas y puede ser adicionado, tanto a las materias primas como al producto procesado, para impedir el crecimiento de hongos aflatoxigénicos y, de esta manera, impedir la contaminación y por ende la producción de esta micotoxina.

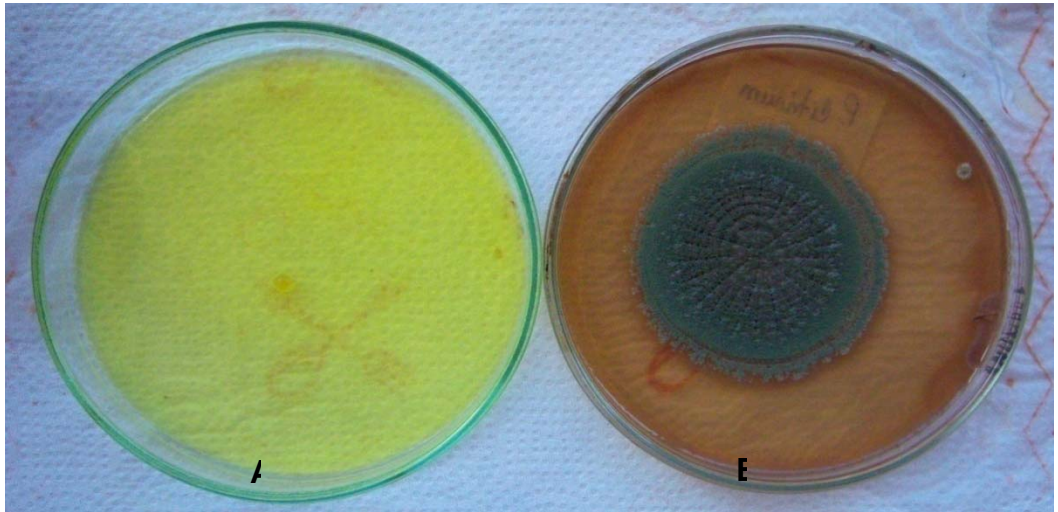


Figura 11. Efecto de extracto de *Citrus limon* sobre el crecimiento de *P. citrinum* **A**: PDA+ extracto de *Citrus limon* (1:10), inoculación central de *P. citrinum*, **B**:Control

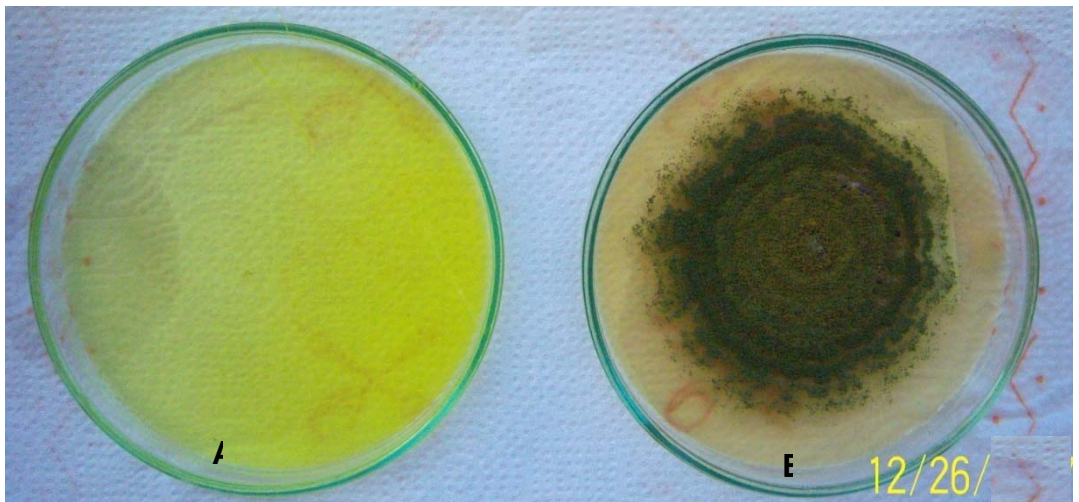


Figura 12. Efecto de extracto de *Citrus limon* sobre el crecimiento de *A. flavus*. **A**: PDA+extracto de *Citrus limon* (1:10), inoculación central de *A. flavus*, **B**:Control

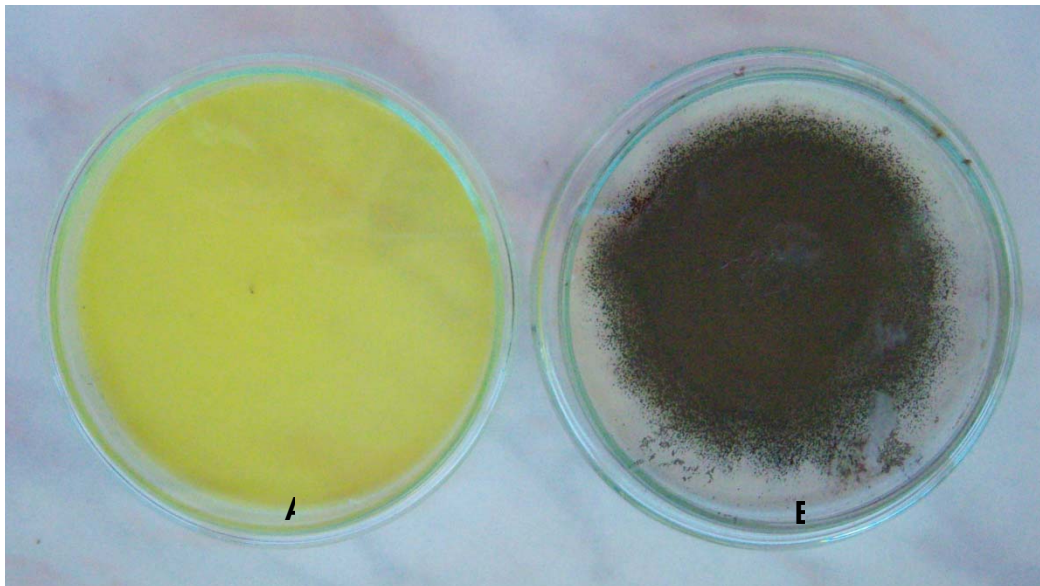


Figura 13. Efecto de extracto de *Citrus limon* sobre el crecimiento de *A. niger*. **A:** PDA+ extracto de *Citrus limon* (1:10), inoculación central de *A. niger*, **B:**Control

Los bioensayos se realizaron mezclándose una porción del extracto de *Citrus limon* con concentraciones conocidas de aflatoxinas. Se evaluó la actividad tóxica frente al crustáceo *Artemia salina*, encontrándose, que no hubo grado de toxicidad en donde se prepararon soluciones con concentraciones de aflatoxina de 1,7; 5 y 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$, mientras que la mezcla del extracto con una concentración de 45 $\mu\text{g}/\text{kg}$ resultó ser levemente tóxica para los crustáceos (tabla 5).

Tabla 5. Actividad tóxica del extracto de *Citrus limon* mezclado con diferentes concentraciones patrones de aflatoxinas frente al crustáceo

Artemia salina.

Concentración de aflatoxina (µg/kg) con extracto de <i>Citrus limon</i>	Número <i>Artemias salinas</i> muertas	Mortalidad (%)	Grado de Toxicidad
45	4	40	LT
15	0	0	NT
5	0	0	NT
1,7	0	0	NT

Porcentaje de mortalidad de: 0-9% no tóxico (NT), 10-49% levemente tóxico (LT), 50-89% tóxico (T) y 90-100% muy tóxico (MT).

En los últimos años se han desarrollado un gran número de ensayos de toxicidad en el cual la respuesta ha sido medida en invertebrados. Estas pruebas tienen la virtud de ser económicas, reproducibles, fácil de llevarse a cabo y de relevancia ambiental. Invertebrados como *Artemia salina* se utilizan en la mayoría de las prueba requeridas por autoridades reguladoras para la evaluación del riesgo ambiental de los plaguicidas, productos químicos y contaminantes (Favilla *et al.*, 2003). En el presente estudio se llevó a cabo bioensayos con *Artemia salina* con la finalidad de demostrar si la combinación de la aflatoxina a diferentes concentraciones con extracto de *Citrus limon*, podía transformar la molécula de aflatoxina en otro compuesto que resultase tóxico.

Previo al bioensayo, la eclosión de los huevos comenzó a ocurrir

aproximadamente a partir de las 16 horas bajo las condiciones antes descritas para los ensayos preliminares y definitivos. En el ensayo de toxicidad la viabilidad en el grupo control fue de un 100% y no se observaron alteraciones en el comportamiento.

Se encontró que en los ensayos de biocontrol a concentraciones por debajo de 15 µg/kg de aflatoxina no hubo mortalidad del crustáceo. El 40% de mortalidad de los nauplios en los tubos que contenían 45µg/kg de aflatoxina y el extracto de *Citrus limon* se ha podido deber a que la concentración del extracto no fue suficiente para impedir su muerte; además hay que tener en cuenta que a las 24 horas estos organismos presentan una cutícula muy fina lo que los hace especialmente sensibles al tóxico, el cual penetra a través de la barrera fisiológicas absorbiéndose rápidamente y provocando diferentes alteraciones que van desde efectos subletales sobre la movilidad y la reproducción hasta la muerte de la larva (Sanabria *et al.*, 1997; González y Aportela, 2001; González *et al.*, 2007).

En base a lo antes expuesto, en general, se puede afirmar que el extracto de *Citrus limon* es una sustancia capaz de reducir de manera significativa la concentración de aflatoxinas. Así mismo, los ensayos de la actividad tóxica mostraron una eficacia significativa por la ausencia de mortalidad en el biocontrol con la mayoría de las concentraciones de aflatoxinas ensayadas. Sin embargo, es claro que la letalidad sobre *Artemia salina* depende de la concentración de aflatoxina y la interacción que se desencadene con el extracto, ya que puede ocurrir que la cutícula del crustáceo a las 24 horas sea igual de sensible a pesar de las bajas concentraciones de aflatoxinas, que pudieron haber quedado después del ensayo de biocontrol con la concentración tóxica de 45 µg/kg.

CONCLUSIONES

Los recuentos fúngicos obtenidos en las muestras de alimentos concentrados para pollo de engorde analizadas en este estudio, no sobrepasaron los límites micológicos establecidos por normativas internacionales.

Aspergillus fue el género aislado con mayor frecuencia en las muestras de alimentos concentrado analizadas y las especies mayormente aisladas fueron: *Penicillium citrinum*, *Eurotium herbariorum* y *Aspergillus flavus*.

Las concentraciones de aflatoxinas detectadas en las muestras de alimentos concentrados para pollo de engorde no sobrepasaron el nivel toxicológico establecido por las normas COVENIN; pero el 60% de las muestras sobrepasó el límite toxicológico establecido por la Norma Europea establecida para aflatoxinas.

El extracto de *Citrus limon* redujo las concentraciones de aflatoxinas presentes en las muestras de alimentos concentrados para pollos de engorde, encontrándose diferencias estadísticamente significativas.

El mayor porcentaje de reducción se encontró en las muestras de alimentos concentrados para pollo que fueron contaminadas experimentalmente con 45 µg/kg de aflatoxina.

El extracto de *Citrus limon* tiene un efecto fungicida sobre las especies *A. flavus*, *P. citrinum* y *A. niger*.

El extracto de *Citrus limon* mezclado con concentraciones por debajo de 15 µg/kg de aflatoxina no resultó tóxico para el crustáceo *Artemia salina*.

RECOMENDACIONES

Utilizar un sistema integrado de prevención y control de la contaminación fúngica y micotoxinas, como el sistema de Análisis de Peligros y Puntos críticos de Control (APPCC) para identificar, evaluar y controlar los peligros en la inocuidad de estos alimentos, estableciendo sistemas de gestión de la calidad sólidamente implantados, como las buenas prácticas de fabricación (BPF), las buenas prácticas de higiene (BPH), las buenas Prácticas agrícolas (BPA) y las buenas prácticas de almacenamiento (BPAL).

Emplear el extracto de *Citrus limon* como un agente antifúngico mezclado con las materias primas y/o productos procesados para prevenir el desarrollo fúngico y con ello la producción de micotoxinas.

Continuar el presente estudio para determinar la concentración del extracto, ya que el porcentaje de reducción de la micotoxina puede depender de la concentración del mismo. Así como también; sí se usa en suficientes cantidades puede ser un inhibidor efectivo de la producción de aflatoxina.

Desarrollar la técnicas de destoxificación y control fúngico de este extracto, con otras micotoxinas y especies fúngicas consideradas en la bibliografía como micotoxigénicas.

BIBLIOGRAFÍA

Abarca, L.; Bragulat, R.; Castellá, F.; y Cabañes, J. 2000. Hongos productores de micotoxinas emergentes. *Rev Iberoam Micol.* 17: 63-68.

Abramson, J.; Mills, R.; Marquardt, R. y Frohlich, A. 1997. Mycotoxins in fungal contaminated samples of animal feed from western Canada, 1982-1994. *Can J Vet Res.* 61(1): 49-52.

Amer, A. C. 2005. Aflatoxin contamination of developing corn kernels. *Commun Agric Appl Biol Sci.* 70(3):281-93.

Anaya, A.; Macias, R.; Cruz-Ortega, R.; García, C.; Sánchez, P.; Hernández, B. y Mata, R. 2005. Allelochemicals from *Stauranthus perforatus*, a *Rutaceous* tree of the Yucatan Peninsula, Mexico. *Phytochemica.* 66(4):487-494.

Armas, A. y Chicco, Y. 2000. Comparación del maíz, trigo, arroz y Sorgo en raciones para pollos de engorde. *Agron Trop.* 20(6):457-462.

Astoviza, M. y Socarrás M. 2005. Micotoxinas y Cáncer. *Rev Cubana Invest Bioméd.* 1(24):54-59.

Bacon, C.; Yates, I.; Hinton, D. y Meredith, I. 2001. Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. *Environ Health Perspect.* 109(2):325-332.

Baik, J.; Kim, S.; Lee, J.; Oh, T.; Kim, J.; Lee, N. y Hyun, C. 2008. Chemical composition and biological activities of essential oils extracted from Korean endemic citrus species. *J Microbiol Biotechnol.* 18(1):74-9.

Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D. y Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils-A review. *Food Chem Toxicol.* 46:446-475.

Blanco, M. 1999. *Aspergillus*. *Rev Salud.* 328:1-4.

Bennett, W. y Klich, M. 2003. Micotoxins. *Clin Microbiol Rev.* 16(3):497-516.

Binder, E., Tan, L.; Chin, L.; Handl, J. y Richard J. 2007. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. *Anim Feed Scien Techn.* 137:265–282.

Bozin, B.; Mimica, N.; Simin, N. y Anackov, G. 2006. Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *J Agricul food chem.* 54:1822-1828.

Bressler, G.; Brizzio S. y Vaamonde, G. 1995. Mycotoxin-producing potential of fungi isolated from amaranth seeds in Argentina. *Int J Food Microbiol.* 25: 101-108.

Bullerman, L. y Bianchini, A. 2007. Stability of mycotoxins during food processing. *Int J Food Microbiol.* 119:140-146.

Burt, S. 2004, Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in food a review. *Int J Food Microbiol.* 94:223-253.

Cabañes, F. 2000. Micotoxinas Emergentes. *Rev Iberoam Micol.* 17: 61-62.

Calvo, A.; Wilson, Bok, R. y Keller, N. 2002. Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development. *Microbiol Mol Biol Rev.* 66(3): 447–459.

Castells, M.; Marin, S.; Sanchis, V. y Ramos, A. 2008. Distributions of fumonisins and aflatoxins in corn fractions during industrial cornflake processing. *Int. J. Food Microbiol.* 133:81-87.

Colleen, Y., y David G. 1999. Influence of Kernel Age on Fumonisin B₁ Production in Maize by *Fusarium moniliforme*. *Appl Environ Microbiol.* 65(7): 2853–2856.

Commission Regulation (European Communities). 2006. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Norma N°1181. Official Journal of the European Union.

Cotty, P. y García, R. 2007. Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination. *Int J Food Microbiol.* 119:109-115.

COVENIN (Comisión Venezolana de Normas Industriales). 1983. Alimentos completos para aves. Norma N°1881. FONDONORMA. Caracas.

Dalcerro, A.; Magnoli, C.; Chiacchiera, S.; Palacios, G. y Reinos, M. 1997. Mycoflora and incidente of aflatoxin B-1, zearalenone and deozynivalenol in poultry feeds in Argentina. *Mycopathol.* 141(1): 37-43.

Desjardins, A.; Manandhar, H.; DPlattner, R.; Manandhar, G.; Poling, S. y Maragos C. 2000. *Fusarium* species from nepalese rice and production of mycotoxins and gibberellic acid by selected species. *Appl Environ Microbiol.* 66(3): 1020–1025.

D'Mello, J., Macdonald, A. 1997. Mycotoxins. *Anim Feed Scien Techn.* 69:155-166.

Dutta, T. y Dass, P. 2001. Isolation of aflatoxigenic strain of *Aspergillus* and detection of aflatoxin B-1 from feed in India. *Mycopathol.* 151(1):29-33.

Duvick, J. 2001. Prospects for reducing Fumonisin contamination of maize through genetic modification. *Environ Health perspect.* 109(2):337-342.

Eaton, D. y Gallagher, E. 1994. Mechanism of aflatoxin carcinogenesis. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 34:135-172.

Favilla, M.; Macchia, L.; Gallo, C. y Altomare, C. 2006. Toxicity assessment of metabolites of fungal biocontrol agents using two different (*Artemia salina* and *Daphnia magna*) invertebrate bioassays. *Food Chem Toxicol.* 44:1922-1931.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 1991. *Alimentación y nutrición. Manual para el control de calidad de los alimentos*. 10: Capacitación en análisis de micotoxinas. Roma Italia.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2003. *Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones en el año 2003*. En estudio FAO: Alimentación y nutrición. Roma Italia.

Flores, C.; Hernández, L. y Vásquez, J. 2006. Contaminación con micotoxinas en alimentos balanceados y granos de uso pecuario en México en el año 2003. *Tec Pec Mex*. 44(2):247-256.

Fraga, M.; Curvello, F.; Gatti, M.; Cavaglieri, L.; Dalcerro, A. y Da Rocha Rosa C. 2007. Potential aflatoxin and ochratoxin a production by *Aspergillus* species in poultry feed processing. *Vet Res Commun*. 31(3):343-53.

García, C. 1987. Análisis microbiológico de los alimentos. Segunda edición. Editorial Acribia. Zaragoza. España.

García, S. y Heredia, N. 2006. Mycotoxins in México: Epidemiology, management and control strategies. *Mycopathol*. 162:255-264.

García, S.; Heredia, N. y García, S. 2005. Inhibition of growth and mycotoxin production of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* by extracts of Agave species. *Int. J. Food Microbiol*. 98:271-279.

Garnier, M.; Jagoueix, E.; Cronje, P.; Le Roux, H. y Bove, J. 2000. Genomic characterization of a liberibacter present in an ornamental rutaceous tree, *Calodendrum capense*, in the Western Cape Province of South Africa. Proposal of '*Candidatus liberibacter africanus subsp. capensis*. *Int Syst Evol Microbiol.* 50(6):2119-2125.

Giacomini, L. 2006. Desempenho e plumagem de frangos de corte intoxicados por aflatoxinas. *Rev cient rural.* 36(1): 234-239.

Giorni, P.; Battilani, P.; Pietri, A. y Magan, N. 2008. Effect of A_w and CO_2 level on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production in high moisture maize post-harvest. *Inter J Food Microbiol.* 122:109-113.

González, N. 1990. *Alimentación animal*. Editorial América, C.A. Venezuela.

González, A.; Presa, M.; Latorre, M. y Lurá, M. 2007. Detección de metabolitos fúngicos con actividad tóxica mediante bioensayo sobre *Artemia salina*. *Rev Iberoam Micol.* 24: 59-6.

González, Y y Aportela, P. 2001. Determinación de la toxicidad aguda del dicromato de potasio en larvas de *Artemia salina*. *Anu Toxochol.* 1(1):104-108.

Gnonlonfin, G.; Hell, K.; Fandohan, P. y Siame, A. 2008. Mycoflora and natural occurrence of aflatoxins and fumonisin B₁ in cassava and yam chips from Benin, West Africa. *Inter J Food Microbiol.* 122:140-147

Gqaleni, N.; Smith, E.; Lacey, L. y Gettinby, G. 1997. Effects of temperature, water activity, and incubation time on production of aflatoxins and cyclopiazonic acid by an isolate of *Aspergillus flavus* in surface agar culture. *Appl Environ Microbiol.* 63(3): 1048-1053.

Grassmann, J. y Elstner, E. 2003. Essential oils. *Elsevier Sci.* 14:2177-2184.

Hashem, A. 1990. Fungal flora of barley seed in Saudi Arabia and its control. *J Food Prot.*53: 786-789.

Hayes, P. 1993. *Microbiología e higiene de los alimentos*. Editorial Acribia, España.

Helal, G.; Sarhan, M.; Abu Shahla, A. y Abou El-Khair, E. 2007. Effects of *Cymbopogon citratus* L. essential oil on the growth, morphogenesis and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* ML2-strain. *J Basic Microbiol.*47(1):5-15.

Hernández, A.; Baños, S. y Velásquez, M. 2007. Prospectivas de extractos vegetales para controlar enfermedades postcosechas hortofrutícolas. *Rev Fito Mex.* 30(2):119-123.

Hof, H. 2001. Critical annotations to the use of azoles antifungals for plant protection. *Antimicrob Agents Chemother.* 45(11): 2987-2990.

Iamanaka, B.; Castle, H.; Vicente, E.; Leite, R. y Taniwaki, M. 2007. Aflatoxigenic fungi and aflatoxins occurrence in sultanas and dried figs

commercialized in Brazil. *Food Control*. 18:454-457

International Commission of Microbiological Specifications for Food (I C M S F). 1999. *Microorganismos de los alimentos. Métodos de muestreo para análisis microbiológico: Principios y aplicaciones específicas*. Editorial Acribia. S.A. España

Jiujiang, Y.; Deepak, B. y Kenneth, E. 2002. Aflatoxin biosynthesis. *Rev Iberoam Micol*. 19:191-200.

Kabak, B.; Dobson, A. y Var, I. 2006. Strategies to Prevent Mycotoxin Contamination of Food and Animal Feed: A Review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 46:593-619.

Kamphuis, H.; Van der Horst, M.; Samson, R.; Rombouts, F. y Notermans, S. 1992. Mycological condition of maize products. *Inter J food Microbiol*. 16: 237-240.

Krishnamurthy, Y. y Shashikala, J. 2006. Inhibicion of aflatoxin B1 production of *A. flavus* Isolate from Soybean seeds by certain natural products. *Lett Appl. Microbiol*.43:469-474.

Labuda, R.; Tancinová, D. 2006. Fungi recovered from Slovakian poultry feed mixture and their toxinogenety. *Ann Agric. Eviron Med*. 13(2):193-200.

Lee, K.; Everts, H. y Beynen. 2004. Essential oils in broiler nutrition. *Inter J Poul Sci*. 3(12):738-752.

Lingk, W. 1991. Health risk evaluation of pesticide contaminations in drinking water. *Gesunde Pflangen*. 43:21–25.

Logrieco A, Moretti A, Fornelli F, Fogliano V, Ritiene A, Caiaffa M, Randazzo G, Bottalico A, Macchia L. 1996. Fusaproliferin production by *Fusarium subglutinans* and its toxicity to *Artemia salina*, SF-9 insect cells, and ARC/LCL171 human B lymphocytes. *Appl Environ Microbiol*. 62:3378-3384.

Lurá, M.; Fuentes, M.; Cabagna, M.; González, A.; Nepote, A.; Giugni, M.; Rico, M. y Latorre, M. 2001. Actividad de metabolitos de *Penicillium citrinum* sobre ratones de *Mus musculus*. *Rev. Iberoam.Micol*. 18: 183-186.

Magan, N. 2006. Mycotoxin contamination of food in Europe: Early detection and prevention strategies. *Mycopathol*. 162:245-253.

Magnoli, C.; Dalcero, A.; Chiacchiera, S.; Miazzo, R. y Saenz, M. 1998. Enumeration and identification of *Aspergillus* group and *Penicillium* species in poultry feeds from Argentina. *Mycopathol*. 142: 27-32.

Magro, A.; Carolino, M.; Bastos, M. y Mexía, A. 2006. Efficacy of plant extracts against stored products fungi. *Rev Iberoam Micol*. 23:176-178.

Maia, P. y Pereira, M. 2002. Occurrence of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in some Brazilian pet foods. *Food Addit Contam*. 19(12):1180-1183.

Mahmoud, A. 1993. Toxigenic fungi and mycotoxin content in poultry feedstuff ingredients. *J Basic Microbiol*. 33: 101-104.

Martín, T.; Rocha, M.; Rosas, E.; Lopez, S. y Corrales, C. 2002. Efectos de extractos alcohólicos de plantas silvestre sobre la inhibición de crecimiento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Fusarium moniloforme*, y *Fusarium poae*. *Rev Iberoam Micol.* 19:84-88.

Martins, M.; Martins, H. y Bernardo, 2003. Fungal flora mycotoxins detection in commercial pet food. *RPCV.98(548):*179-183.

Martins, M.; Mendes Guerra, M.; d'Almeida, F. 2007. Occurrence of aflatoxin B1 in dairy cow feed over 10 years in Portugal (1995-2004). *Rev Iberoam Micol.* 24(1):69-71.

Martínez, J.; Sulbarán B.; G. Ojeda, G.; Ferrer, A. y Nava, R. 2003. Actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina. *Rev. Fac. Agron. (LUZ).* 20: 502-512.

Méndez, A.; García, J. Y Moreno, E. 2006. Decontamination of aflatoxin duckling feed with aqueous citric acid treatment. *Anim feed sci technol.* 135:249-262.

Mishra, A. y Dubey, N. 1994. Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. *Appl Environ Microbiol.* 60(4):1101-1105.

Miller, D. 2001. Factors that affect the occurrence of fumonisin. *Environ Health Perspect.* 109(2):321-324.

Mohanlall, V. y Bharti, O. 2006. Biocontrol of aflatoxins B1, B2, G1, G2 and Fumonisin B1, with 6,7 dimethoxycoumarin, a phytoalexin from *Citrus sinensis*. 69:2224-2229.

Naicker, D.; Marais, G.; van den Berg, H. y Masango, M. 2007. Some fungi, zearalenone and other mycotoxins in chicken rations, stock feedstuffs, lucerne and pasture grasses in the communal farming area of Rhenosterkop in South Africa. *J S Afr Vet Assoc.* 78(2):69-74.

Newberne, P. 1973. Cronic aflatoxicosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 163,(11):1262-1267.

Norma Técnica Colombiana (NTC). 1999. Alimento completo para Aves. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Colombia.

Norma Oficial Mexicana (NOM). 2000. Control de aflatoxinas en cereales para consume humano y animal. México.

Offiah, N. y Adesiyun, A. 2007. Occurrence of aflatoxins in peanuts, milk, and animal feed in Trinidad. *J Food Prot.* 70(3):771-775

Pascual, M. y Calderon, V. 2000. *Microbiología Alimentaria*. Segunda Edición. Madrid. España.

Peraica, M.; Radic, B. y Pavlovic, M. 1999. Efectos tóxicos de las micotoxinas en el ser humano. *Boletín de la Organización Mundial de la Salud.* 77(9):754-766.

Perozo, J. Ferrer, M.; Alvarado, H.; Rincón, H.; Mavarez, Y. y Gil, M. 2003. Valores hematológicos en pollos de engorde expuestos de forma continua a bajas dosis de Aflatoxina B₁ en el estado Zulia, Venezuela. *Rev Cient FCV-LUZ*. 1(13):59-64.

Petersson, S. y Schnürer J. 1995. Biocontrol of mold growth in high-moisture wheat stored under airtight conditions by *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii*, and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*. 61(3):1027-1032.

Pitt, J. y Hocking, D. 2006. Mycotoxins Australia: biocontrol of aflatoxins in peanuts. *Mycopathol*. 162:233-243.

Placinta, C.; D'Mello, J. y Macdonald, A. 1999. A review worldwide contamination of cereal and animal feed with *Fusarium* micotoxins. *Anim Feed Sci Technol*. 78: 21-37.

Requena, F.; Saume, E. y León, A. 2005. Micotoxinas: Riesgos y prevención. *Zoot Trop*. 23(4):393-410.

Ribeiro, J.; Fraga M.; Gatti M.; Cavaglieri L.; Magnoli C.; Dalcerro A. y Lopes C. 2006. Mycoflora of poultry feeds and ochratoxin-producing ability of isolated *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Vet Microbiol*. 113(1-2):89-96.

Richard, J. 2007. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses: an overview. *Inter J food microbiol*. 119: 3-10

Ridell, R. 1950. Permanent stained mycology preparation obtained by lied culture. *Mycoses*. 42:265-270.

Salay, E. y Mercadante, A. 2002. Mycotoxins in Brazilian corn for animal feed: occurrence and incentives for the private sector to control the level of contamination. *Food Control*. 13: 87-92

Sanabria, A.; López, S. y Gualdrón, R. 1997. Estudio fitoquímico preliminar y letalidad sobre *Artemia salina* de plantas colombianas. *Rev Col Cienc Quim Farm*. 26:15-19.

Samson, R.; Hoekstra, E. y Oorschot, C. 1998. *Introduction on the common food-borne fungi*. Central boreau voor schimmel cultures. Holanda.

Sanchis, V.; Marin, S. y Ramos, A. 2000. Control de micotoxinas emergentes. Situación lesgislativa actual. *Rev Iberoam Micol*. 17:69-75.

Sánchez, E.; Heredia, N. Y García, S. 2005. Inhibition of growth and mycotoxin production of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* by extracts of Agave species. *Inter J Food Microbiol*. 98:271-279.

Saunders, D.; Meredith, F. y Voss, A. 2001. Control of fumonisin: effects of processing. *Environ Health Perspect*. 109(2): 333–336.

Scott, P. 1997. Multi-year monitoring of Canadian grains and grain-based foods for treichothecene and zearalenone. *Food Addit Contam*. 14:333-339.

Scudamore, K. 2005. Prevention of ochratoxin A in commodities and likely effects of processing fractionation and animal feeds. *Food Addit Contam.* 22(1): 17-25.

Serrano, M.; Martínez, D.; Guillen, F.; Valverde J.; Zapata, P.; Castillo, S. y Valero, D. 2008. The addition of essential oils to MAP as a tool to maintain the overall quality of fruits. *Trends Food Sci Technol.* 19:464-471.

Sharma, N. y Tripathi, A. 2008. Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. *Microbiol Res.* 163(3):337-44.

Soliman, K. y Badeaa, R. 2002. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food Chem Toxicol.* 40(11):1669-1675.

Soriano del Castillo, J. 2007. Micotoxinas en Alimentos. Primera edición. Editorial Díaz de Santos S.A. Madrid. España.

Souza, E.; Lima E.; Freire K. y Paiva, C. 2005. Inhibitory action of some essential oils and phytochemicals on the growth of various moulds isolated from foods. *Braz Arch Biol Technol.* 48(2): 245-250.

Soylu, E.; Soyly, S. y Kurt, S. 2006. Antimicrobial activities of the essential oils plants againts tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. *Mycopathol.* 161:119-128.

Thompson, C. y Scott, H. 2000. Effect of climate and type of storage

container on Aflatoxin production in corn and its associated risk to wildlife species. *J Wildl Dis.* 36(1):172-179.

Tejada, Z.; Ávila, E.; Casaubon, T.; Cervantes, A.; Vásquez, C.; Hernández, M. y Moreno, E. 2008. Biodetoxification of aflatoxin-contaminated chick feed. *Poul Sci.*87:1569-1576.

Tisserand, R. 1996. Essential Oils safety I. *Inter J Aromatherapy.*7(3):1-5.

Thirumala-Devi, K.; Mayo M.; Reddy, G. y Reddy D. 2002. Occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in Indian poultry feeds. *J Food Prot.* 65(8):1338-1340.

Tzortzakis, N. y Economakis, C. 2007. Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus L.*) essential oil against key postharvest pathogens. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 8:253-258.

Ulrika Ä.; Volkmar P., y Schnürer, J. 2005. Nutrient Effects on Biocontrol of *Penicillium roqueforti* by *Pichia anomala* J121 during Airtight Storage of Wheat. *Appl Environ Microbiol.* 71(4): 1865-1869.

Unnikrishnan, V. y Nath, B. 2002. Hazardous chemicals in foods. *Indian Journal Dairy sci.* 11:155–158.

Urrego, J. y Díaz, G. 2006. Aflatoxinas: Mecanismos de toxicidad en la etiología de cáncer hepático. *Rev Fac Med Univ Nac Colomb.* 54(2): 108-116

Van Egmond H.; Schothorst R. y Jonker, M. 2007. Regulations relating to mycotoxins in food: perspectives in a global and European context. *Anal Bioanal Chem.* 389(1):147-57.

Vásquez, M. 2002. El ecosistema de los granos almacenados. *Avances en perspectiva.*20: 407-413.

Villalobos, B.; Guzmán, D. y Cabriales, J. 2001. Aflatoxin synthesis in corn field in Guanajuato Mexico. *Rev Iberoam Micol.* 18:83-87.

Viuda, M.; Ruiz, Y.; Fernández, J. y Pérez, J. 2008. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradise* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food Control.* 19:1130-1138.

Wayne, D. 2002. *Bioestadística*. Cuarta edición. Editorial LIMUSA S. A. México D. F.

Wagacha, J. Y Muthomi, J. 2008. Mycotoxin problema in Africa: Current status, implications to food safety and health and possible management strategies. *Inter J food Microbiol.* 74: 1-12

Widstrom, N.; Snook, M.; Wilson, D.; Cleveland, T.; McMillian, W. 1995. Silk mayzin content and resistance of commercial corn (maize) hybrids to kernel contamination by aflatoxin. *J Sci Food Agric.*67:317-321.

Yoshida, N.; Takagi, A.; Kitazawa, H.; Kawakami, J. y Adachi, I. 2005.

Inhibition of P-glycoprotein-mediated transport by extracts of *Citrus sinensis* and monoterpenoids contained in *Zanthoxyli fructus*. *Toxicol Appl Pharmacol.* 209(2):167-73.

Yoshida, N.; Takagi, A.; Kitazawa, H.; Kawakami, J. y Adachi, I. 2006. Effects of citronellal, a monoterpenoid in *zanthoxyli fructus*, on the intestinal absorption of digoxin in vitro and in vivo. *J Pharm Sci.* 95(3):552-60.

Zinedine, A.; Juan, C.; Soriano, J.; Moltó, J.; Idrissi, L. y Mañes, J. 2007. Limited survey for the occurrence of aflatoxins in cereals and poultry feeds from Rabat, Morocco. *Int J Food Microbiol.* 115(1):124-127.

HOJA DE METADATOS

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso-1/5

Título	EVALUACIÓN DE LA MICOFLOR Y BIOCONTROL DE AFLATOXINAS EN ALIMENTOS CONCENTRADOS PARA POLLOS DE ENGORDE
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Rodríguez Bejarano Rossianny José	CVLAC	14596789
	e-mail	r2cv26@yahoo.es
	e-mail	

Palabras o frases claves:

Aflatoxinas
<i>Citrus limon</i>
Alimentos para pollos

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso-2/5

Líneas y sublíneas de investigación

Área	Subárea
Postgrado de Biología Aplicada	Microbiología Aplicada

Resumen (abstract):

En el presente estudio se evaluó la micoflora y la presencia de aflatoxinas en alimentos concentrados para pollos de engorde, con el fin de controlar el desarrollo de hongos aflatoxigénicos y su toxina con la aplicación de técnicas de biocontrol utilizando un extracto de *Citrus limon*. Para ello, se recolectaron 50 muestras de un lote de alimentos concentrados para pollos de engorde. Se determinaron las unidades formadoras de colonia por gramo (ufc/g) y se identificaron las especies fúngicas aisladas. Se cuantificaron las concentraciones de aflatoxinas totales a través del método de enzima inmunoensayo competitivo (ELISA), luego se aplicó un sistema de biocontrol contra aflatoxinas utilizando el extracto de *Citrus limon*. La capacidad antifúngica del extracto se determinó sobre el crecimiento de hongos descritos como aflatoxigénicos y se aplicó un ensayo de toxicidad sobre *Artemia salina* para descartar la posible toxicidad de los compuestos formados después del biocontrol. El recuento fúngico ($3,3 \times 10^4$ UFC/g) se encontró por debajo del límite micológico establecido por normas internacionales. De las especies fúngicas aisladas, se halló mayor frecuencia de *Penicillium citrinum*, *Eurotium herbariorum* y *Aspergillus flavus*. Se detectó que el 90% de las muestras analizadas estuvo contaminado con aflatoxinas, encontrándose el mayor porcentaje entre las concentraciones de 5 a 14 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (54%). Por otra parte, el extracto de *Citrus limon* resultó ser un potente antifúngico y antiaflatoxigénico, reduciendo significativamente las concentraciones de aflatoxinas en las muestras de alimentos para pollos de engorde e inhibiendo por completo el desarrollo de hongos aflatoxigénicos. El extracto de *Citrus limon* mezclado con concentraciones por debajo de 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de aflatoxina no resultó tóxico para el crustáceo *Artemia salina*.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/5

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail							
CENTENO BRICEÑO SARA JOSEFINA	A		S		U		U	
	CVLAC							
	e-mail	Sarafigueroa@yahoo.com						
ROJAS LUISA	A		S		U		U	
	CVLAC							
	e-mail							
PULGAR MIRELLA	A		S		U		U	
	CVLAC							
	e-mail							

Fecha de discusión y aprobación:

Año Mes Día

2009	06	23
-------------	-----------	-----------

Lenguaje: SPA

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/5

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
PG.RJRB-DOC	APPLICATION/WORD

Alcance:

Espacial: Nacional (Opcional)

Temporal: Intemporal (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo:

MAGISTER SCIENTIARUM

Nivel Asociado con el Trabajo: MAGISTER SCIENTIARUM

Área de Estudio:

MICROBIOLOGÍA APLICADA

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

UNIVERSIDAD DE ORIENTE

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/5

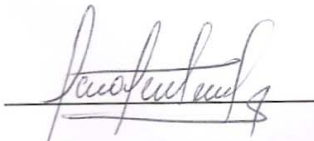
Derechos:

Yo, como autora principal de la tesis doy permiso a la difusión de la información a la Universidad de Oriente, reservándome los derechos de patente y comercio.



ROSSIANNY JOSÉ RODRÍGUEZ BEJARANO

AUTOR



SARA CENTENO

TUTOR



LUISA ROJAS

JURADO 1



MIRELLA PULGAR

JURADO 2

POR LA SUBCOMISIÓN DE TESIS:
