

Artículo original

Extracto de *Citrus limon* para el control de aflatoxinas y hongos aflatoxigénicos en alimentos concentrados para pollos de engorde producidos en Venezuela

Rossianny José Bejarano Rodríguez^{a,b}, Sara Josefina Centeno Briceño^{a,*}

^aPostgrado en Biología Aplicada; ^bLaboratorio de Investigaciones Microbiológicas. Escuela de Ciencias. Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Cumaná, Venezuela.

Recibido 26 de enero de 2009; aceptado 09 de junio de 2009

Resumen: Se evaluó la presencia de aflatoxinas totales en muestras de alimentos concentrados para pollos de engorde y se aplicaron técnicas de control para los hongos aflatoxigénicos y sus toxinas (aflatoxinas), utilizando un extracto comercial de *Citrus limon*. Para ello se recolectaron al azar 50 muestras de un lote de alimentos concentrados para pollos de engorde. Se cuantificaron las concentraciones de aflatoxinas a través del método de enzimoimmunoensayo competitivo (ELISA) y se aplicó un sistema de control contra aflatoxinas, utilizando un extracto de *Citrus limon*. Finalmente, se determinó la capacidad antifúngica del extracto sobre el crecimiento de los hongos aflatoxigénicos aislados de las muestras. Se detectó que el 90% de las muestras analizadas estaban contaminadas con aflatoxinas, encontrándose en el 54% de las mismas un rango de concentraciones entre 5 a 14 $\mu\text{g}/\text{kg}$. El extracto de *Citrus limon* resultó ser un potente antiaflatoxigénico y antifúngico, reduciendo las concentraciones de aflatoxinas en las muestras de alimentos para pollos de engorde hasta en un 73,6%, e inhibiendo por completo el crecimiento de los hongos descritos como aflatoxigénicos.

Palabras claves: Extracto de *Citrus limon*, hongos aflatoxigénicos, alimentos concentrados.

Citrus limon extract for aflatoxin and aflatoxigenic fungi control in concentrated chicken feed produced in Venezuela

Abstrac: The presence of total aflatoxins in samples of concentrated chicken feed was evaluated, and control techniques for aflatoxigenic fungi and their toxins (aflatoxins) using a *Citrus limon* commercial extract were applied. For this purpose, 50 samples were collected randomly from a lot of concentrated chicken feed. The aflatoxin concentrations were quantified through a competitive enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA), and an aflatoxin control system was applied using a *Citrus limon* extract. Finally, the antifungal capacity of the extract over the growth of the aflatoxigenic fungi isolated from the samples was determined. It was established that 90% of the analyzed samples were contaminated with aflatoxins, and 54% of them had a 5-14 $\mu\text{g}/\text{kg}$ concentration range. The *Citrus limon* extract was a potently antiaflatoxigenic and antifungal, reducing the aflatoxin concentrations in the chicken feed samples in up to 73.6%, and totally inhibiting the growth of fungi described as aflatoxigenic.

Keywords: *Citrus limon* extract, aflatoxigenic fungi, concentrated feed

* Correspondencia:
E-mail: sarafigue@yahoo.com

Introducción

Los alimentos concentrados para aves son los productos alimenticios resultantes de la mezcla final de materias primas capaces de satisfacer todos los requerimientos de la especie para una determinada edad y propósito. La composición de estos alimentos está representada principalmente por subproductos de cereales (maíz, sorgo, trigo, soja y arroz) y por melaza de caña, grasa, calcio, fósforo vitaminas y trazas de minerales. De estos componentes, los sub-

productos de cereales son las principales fuentes energéticas y constituyen más del 50% del total de los ingredientes de las raciones para pollos de engorde [1-3].

Cuando los alimentos concentrados para animales o las materias primas para elaborarlos son colonizados por hongos filamentosos, existe el riesgo de contaminación con micotoxinas, las cuales pueden definirse como productos naturales tóxicos, de bajo peso molecular, que son sintetizadas por algunos hongos filamentosos mediante metabolismo secundario, como un mecanismo del hongo para

aumentar su adaptación al medio o para competir con otros microorganismos por el sustrato [4-7].

Las aflatoxinas (AF) son las micotoxinas de mayor importancia en la avicultura, porque son contaminantes frecuentes de cereales y porque están asociadas a enfermedades y muerte de aves de granja [8-10]. Estas toxinas son producidas por *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. oryzae* y *A. niger*, principalmente. Las principales aflatoxinas identificadas son B₁, B₂, G₁ y G₂, de las cuales, la más tóxica es la aflatoxina B₁ [11,12]. 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 las síntesis de ácidos nucleicos, causando en el hígado necrosis centrolobulillar, infiltración de polimorfocitos y degeneración grasa. La toxicidad va a depender de la dosis, del grado de exposición, la edad, el estado nutricional del animal y los posibles efectos sinérgicos de otros agentes químicos a los que esté expuesto [8,13-15].

Actualmente, se están buscando nuevas alternativas para controlar la presencia de hongos contaminantes de alimentos así como de las toxinas que ellos puedan producir, empleando compuestos de orígenes naturales que sean inofensivos tanto para el hombre como para el ambiente y que posean propiedades antifúngicas. Los aceites esenciales son productos vegetales constituidos generalmente por alcaloides, flavonoides, isoflavonoides, taninos, cumarinas, glicósidos, terpenos, fenilpropanos y ácidos orgánicos, que se caracterizan por poseer propiedades antisépticas, antimicrobianas, antiinflamatorias, antidepressivas y afrodisíacas, entre otras [16-21].

Debido a que 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, se requiere aportar soluciones que permitan disminuir los efectos nocivos en la población expuesta. Por estas razones, el objetivo de esta investigación fue determinar la actividad antifúngica y antiaflatoxigénica de extractos de *Citrus limon* en muestras de alimentos concentrados para pollos de engorde producidos en Venezuela.

Materiales y Métodos

Recolección y transporte de las muestras

Se recolectaron 50 muestras, que representaron el 10% de un lote de alimentos concentrados para pollos de engorde, almacenado en una distribuidora avícola del estado Sucre, aplicándose el método de muestreo aleatorio simple, especificado por la International Commission of Microbiological Specifications for Food [22].

Procesamiento de las muestras

- Determinación de aflatoxinas en muestras de alimentos concentrados para pollos de engorde:

La determinación de las aflatoxinas en muestras de alimentos concentrados para pollos de engorde se realizó por

el método de ensayo inmunoenzimático competitivo (ELISA), siguiendo las instrucciones de los kits respectivos suministrados por Biopharm (Alemania).

La prueba 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 "stop" 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.

La lectura se realizó utilizando un lector de ELISA marca Biotek modelo ELX800. La obtención de los resultados se ejecutó usando el software comercial KC-Junior™.

- Evaluación del efecto antiaflatoxigénico del extracto de *Citrus limon*:

Para realizar el control de las aflatoxinas en las muestras de alimentos concentrados para pollos de engorde fue utilizado un extracto de *Citrus limon* (pH:4,5) comestible marca Disquifar, C.A., distribuido en Valencia, estado Carabobo, Venezuela y producido por Laboratorio Frutalia, Caracas, Venezuela.

Se seleccionó el 10% de las muestras de alimentos concentrados para pollos de engorde 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 dos ensayos controles: al primero no se le añadió el extracto de limón y al segundo se le adicionó el extracto de limón a una muestra sin aflatoxina. 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 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 (marca r-Biopharm lote: 03496, Alemania). 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 dos ensayos controles: el primero no poseía el extracto y para el segundo se tomó una muestra a la que no se le halló ninguna concentración de aflatoxina y

se le agregó sólo el extracto. Finalmente, se determinó el porcentaje de reducción de la aflatoxina en las muestras.

- Evaluación del efecto antifúngico del extracto de *Citrus limon*:

La capacidad antifúngica del extracto de *Citrus limon* se determinó sobre el crecimiento de *Aspergillus flavus* y otros hongos descritos como aflatoxigénicos, que fueron aislados de las muestras de alimentos concentrados para pollos de engorde (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 inocularon los hongos *A. flavus*, *A. niger* y *P. citrinum* en el centro de cada placa, incubándose posteriormente a temperatura ambiente ($28^{\circ}\text{C}\pm 0,2^{\circ}\text{C}$) en una incubadora marca Felisa®. 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 [20,23].

Análisis estadístico

Los resultados de los niveles de concentraciones de aflatoxinas detectadas en las muestras de alimentos concentrados para pollos de engorde fueron estudiados por análisis porcentual (%) y se mostraron en tablas. Se compararon los niveles de 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 $p < 0,05$ [24].

Resultados

En la tabla 1 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 de 18% menores de 1,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 12% entre 1,7-5,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Tabla 1: 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 |

Los resultados de la evaluación del efecto antiaflatoxigénico del extracto de *Citrus limon* indican mayores porcentajes de reducción de la concentración de aflatoxinas en las muestras que fueron contaminadas experimentalmente con 45 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AFt con un porcentaje promedio de reducción de 73,6%, seguido de 69,3% y 67,5% en las muestras a las que se le detectaron rangos de concentración entre 5-15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 1,7-5,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de Aft, respectivamente (Tabla 2). En todos los casos se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Tabla 2: Efecto antiaflatoxigénico del extracto de *Citrus limón* en las muestras de alimentos concentrados para pollos de engorde.

| Rango de concentración inicial de Aft ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | Rangos de concentración reducida de Aft ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | Promedio Concentración final Aft ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | Promedio del % de reducción | valor <i>p</i> |
|---|---|--|-----------------------------|----------------|
| Control 0 | 0 | 0 | 0 | ---- |
| 1,7-5,0 | 0-0,83 | 0,5 | 67,5 | 0,0007* |
| 5,0-15 | 0-3,34 | 1,84 | 69,3 | 0,0275* |
| 15-20 | 4,3-5,9 | 5,01 | 56,3 | 0,0065* |
| 45 ⁺⁺ | 8,6-12,3 | 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.

En las figuras 1, 2 y 3 se muestran los efectos inhibitorios de los extractos de *Citrus limon* sobre el crecimiento

de los hongos *A. flavus*, *P. citrinum* y *A. niger*, respectivamente, observándose en todos los casos que el extracto

actuó inhibiendo totalmente el crecimiento de los hongos ensayados durante los 7 días de incubación.

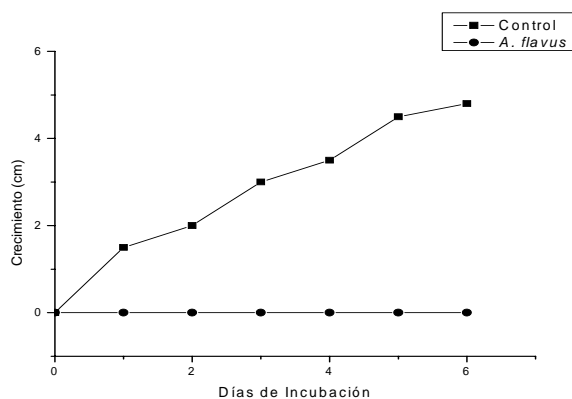


Figura 1: Efecto del extracto de *Citrus limon* sobre el crecimiento de *Aspergillus flavus*.

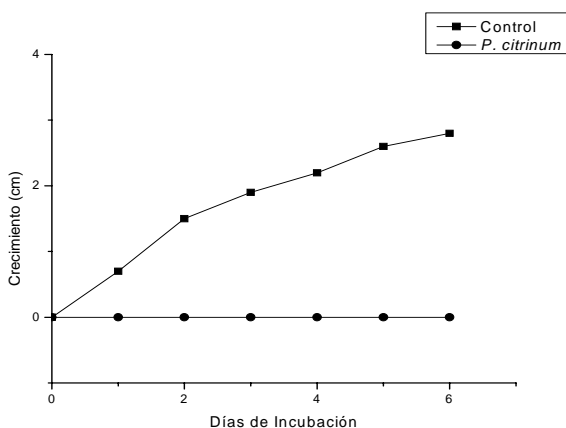


Figura 2: Efecto del extracto de *Citrus limon* sobre el crecimiento de *Penicillium citrinum*.

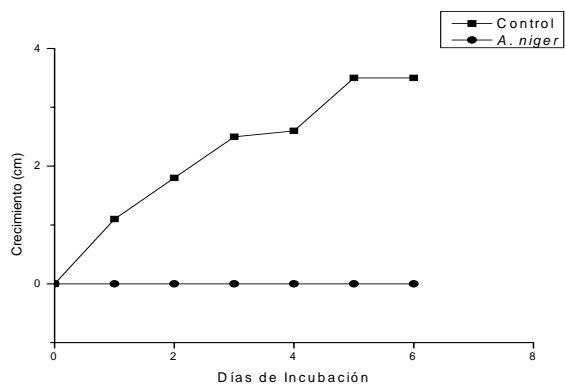


Figura 3: Efecto del extracto de *Citrus limon* sobre el crecimiento de *Aspergillus niger*.

Discusión

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 la Commission Regulation (EC) N°1881/2006 regula la AFt en 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [25]), se puede considerar que el 60% ($n=30$) de las muestras analizadas se encuentran por encima de este límite toxicológico.

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 las micotoxinas, que en su mayoría, se acumulan en las capas superficiales del alimento y al granularlo se distribuye en el producto procesado. Así mismo, debe tomarse en cuenta que las materias primas utilizadas para la elaboración del alimento (sobre todo el maíz) son susceptibles a sufrir contaminación por hongos potencialmente aflatoxigénicos [26,27]. 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 e inducen el desarrollo de aflatoxicosis crónica, tal y como lo afirman Perozo *et al.*, [28] 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, composición y valor nutricional del alimento, así como el estado sanitario y nutricional del ave.

El extracto de *Citrus limon* fue capaz de reducir de manera significativa todas las concentraciones de aflatoxinas ensayadas en las muestras de alimentos concentrados para pollos de engorde, con un mayor porcentaje de reducción en las muestras que fueron contaminadas experimentalmente con 45 $\mu\text{g}/\text{kg}$. El mecanismo de acción del extracto de *Citrus limon* sobre las aflatoxinas todavía no está definido, pero se cree que puede estar relacionado a ciertos componentes presentes en los cítricos como el limoneno, mycereno, α -pineno y linalol, los cuales han demostrado tener actividad antiaflatoxigénica [29,30].

La acción inhibitoria del extracto sobre el crecimiento fúngico puede estar influenciada principalmente por la presencia de compuestos fotoquímicos, los cuales son biomoléculas orgánicas, responsables del efecto inhibitorio del crecimiento fúngico. No se conoce con exactitud el mecanismo de acción de estos compuestos, pero puede estar relacionado con la rotura de las membranas plasmáticas de los microorganismos a través de compuestos lipofílicos [31]. Se ha demostrado que el aceite esencial de *Ci-*

trus limon 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 y mircenoy 1- β pineno, que en general pueden ocasionar granulación y ruptura de la membrana citoplasmática e inactivación y/o inhibición de la síntesis de enzimas intra y extracelulares, impidiendo la producción de micelio [21].

Por otra parte, estudios realizados por Helal *et al.*, [32] y Sharma y Tripathi [33], demostraron que los aceites esenciales de *Citrus sinensis* y *Cymbopogon citratus* poseen efectos similares sobre el crecimiento *A. flavus* y *A. niger*, inhibiendo alrededor del 65% del desarrollo de estos hongos después de cinco días de incubación y retrasando el proceso de esporulación, en comparación con el control. Se llevaron a cabo observaciones utilizando microscopio de luz, microscopio electrónico de barrido (SEM) y microscopía electrónica de transmisión (TEM) para determinar las ultra modificaciones estructurales de las hifas de estos hongos después del tratamiento con los aceites esenciales, observando 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 B₁.

En base a lo antes expuesto, se puede afirmar que el extracto de *Citrus limón* es capaz de reducir, de manera significativa, tanto la concentración de aflatoxinas como inhibir el crecimiento de hongos aflatoxigénicos, pudiendo ser utilizado como una alternativa en los procesos de control de alimentos en los que se hayan detectado concentraciones de aflatoxinas y determinado la presencia de hongos aflatoxigénicos.

Referencias

1. Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN), 1983. Alimentos completos para aves. En <http://www.sencamer.gob.ve/sencamer/normas/1881-3.pdf>. Acceso 15 de julio de 2008.
2. González NW. Alimentación Animal. Caracas: Editorial América; 1990.
3. Armas AE, Chicco CF. Comparación del maíz, trigo, arroz y sorgo en raciones para pollos de engorde. *Agron Trop*. 1970; 20: 457-62.
4. Abramson D, Mills JT, Marquardt RR, Froehlich AA. Mycotoxins in fungal contaminated samples of animal feed from western Canada, 1982-1994. *Can J Vet Res*. 1997; 61: 49-52.
5. Scott PM. Multi-year monitoring of Canadian grains and grain-based foods for trichothecene and zearalenone. *Food Addit Contam*. 1997; 14: 333-9.
6. Placinta CM, D'Mello JP, MacDonald AM. A review worldwide contamination of cereal and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Anim Feed Sci Technol*. 1999; 78: 21-37.
7. Calvo AM, Wilson BR, Keller NP. Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2002; 66: 447-59.
8. Bennett JW, Klich M. Micotoxinas. *Clin Microbiol Rev*. 2003; 16: 497-516.
9. Mossel DAA, Moreno B, Struijk CB. Microbiología de los alimentos. 2da edición. Zaragoza: Editorial Acribia; 2003.
10. Murphy PA, Hendrich S, Landgren C, Bryant CM. Food Mycotoxins: an update. *J Food Sci*. 2006; 71: R51-R65.
11. Eaton DL, Gallagher EP. Mechanism of aflatoxin carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1994; 34: 135-72.
12. Soriano CJ. Micotoxinas en alimentos. Madrid: Editorial Díaz de Santos S.A; 2007.
13. Peraica M, Radic B, Lucic A, Pavlovic M. Efectos tóxicos de las micotoxinas en el ser humano. *Bol OMS*. 1999; 77: 754-66.
14. Bucio-Villalobos CM, Guzmán de Peñas D, Peña-Cabiales JJ. Aflatoxin synthesis in corn fields in Guanajuato, México. *Rev Iberoam Micol*. 2001; 18: 83-7.
15. Astoviza MB, Socarrás MM. Micotoxinas y cáncer. *Rev Cub Invest Biomed*. 2005; 1: 54-9.
16. Soliman KM, Badeaa RI. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food Chem Toxicol*. 2002; 4: 1669-75.
17. Martínez J, Sulbarán FB, Ojeda GR, Ferrer A, Nava R. Actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina. *Rev Fac Agron*. 2003; 20: 502-12.
18. Lee KW, Everts H, Beynen AC. Essential oils in broiler nutrition. *Int J Poultry Sci*. 2004; 3: 738-52.
19. Magan N. Mycotoxin contamination of food in Europe: early detection and prevention strategies. *Mycopathol*. 2006; 162: 245-53.
20. Magro A, Carolino M, Bastos M, Mexia A. Efficacy of plant extracts against stored products fungi. *Rev Iberoam Micol*. 2006; 23: 176-8.
21. Souza E, Lima E, Freire K, Paiva C. Inhibitory action of some essential oils and phytochemicals on the growth of various moulds isolated from foods. *Braz Arch Biol Technol*. 2005; 48:245-50.